



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO

UF **m** G

ANA CAROLINA VALENTE SANTOS CRUZ DE ARAUJO

**OS MACRÓFAGOS TREINADOS PELO BACILO
CALMETTE-GUÉRIN (BCG) EXIBEM UMA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA PROTETORA CONTRA A BACTÉRIA
INTRACELULAR *Brucella abortus***

INCIPIT VITA NOVA

Belo Horizonte - MG

2023

ANA CAROLINA VALENTE SANTOS CRUZ DE ARAUJO

**OS MACRÓFAGOS TREINADOS PELO BACILO
CALMETTE-GUÉRIN (BCG) EXIBEM UMA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA PROTETORA CONTRA A BACTÉRIA
INTRACELULAR *Brucella abortus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Genética.

Orientador:

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

Coorientador:

Prof. Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho
(Departamento de Bioquímica e Imunologia -
ICB/UFMG).

Belo Horizonte – MG

2023

043

Araujo, Ana Carolina Valente Santos Cruz de.

Os macrófagos treinados pelo bacilo Calmette-Guérin (BCG) exibem uma resposta inflamatória protetora contra a bactéria intracelular *Brucella abortus* [manuscrito] / Ana Carolina Valente Santos Cruz de Araujo. – 2023.

137 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira. Coorientador: Prof. Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. *Mycobacterium bovis*. 3. Imunidade Inata. 4. Brucelose. 5. *Brucella abortus*. I. Oliveira, Sergio Costa. II. Marinho, Fábio Antônio Vitarelli. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Os macrófagos treinados pelo bacilo Calmette-Guérin (BCG) exibem uma resposta inflamatória protetora contra a bactéria intracelular Brucella abortus"

Ana Carolina Valente Santos Cruz de Araujo

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Sergio Costa Oliveira
Universidade Federal de Minas Gerais

Fábio Antônio Vitarelli Marinho
Universidade Federal de Minas Gerais

Luciana Cezar de Cerqueira Leite
Instituto Butantan

Andre Luiz Barbosa Bafica
Universidade Federal de Santa Catarina

Anderson Miyoshi
Universidade Federal de Minas Gerais

Fabiana Simão Machado
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 24 de novembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Antonio Vitarelli Marinho, Professor Magistério Superior-Substituto**, em 24/11/2023, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anderson Miyoshi, Membro**, em 24/11/2023, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Simão Machado, Professora do Magistério Superior**, em 24/11/2023, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Costa Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 24/11/2023, às 13:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Luiz Barbosa Bafica, Usuário Externo**, em 24/11/2023, às 14:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Cezar de Cerqueira Leite, Usuária Externa**, em 29/11/2023, às 13:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2834015** e o código CRC **EFGD5E31**.

*“Dedico este trabalho à toda minha
família, por afeto e suporte ao longo
desses anos”.*

AGRADECIMENTOS

Com certeza os desafios foram muitos ao longo deste percurso. Muitas foram as pessoas que marcaram esta longa e persistente trajetória, seja pelo envolvimento neste trabalho, seja pela parceira firmada ao longo de anos ou seja por uma palavra de conforto em um momento crucial.

Gostaria de agradecer,

Primeiramente a Deus, por me manter firme ao longo desses anos, pela conclusão desta etapa e por ter permitido o meu melhor, atuando nos mínimos detalhes. *Plantei fé e colhi gratidão!*

Ao orientador, Prof. Sergio Costa Oliveira pela oportunidade e confiança para executar este trabalho. Por ter me concedido ingressar ao seu grupo de pesquisa, o qual é de excelência em termos de recursos humanos e infraestrutura laboratorial adequada para a condução majoritária deste trabalho. Além disso, agradeço também pela oportunidade de crescimento acadêmico e conhecimentos que pude adquirir.

Ao coorientador, Dr. Fábio Vitarelli Marinho pela orientação presente desde o Mestrado, quando iniciei a rotina intensa da academia. O Dr. Fábio me introduziu aos planejamentos gigantescos e aos experimentos intensos. Só quem o conhece sabe o coração enorme que está por trás da seriedade que a ciência exige. Sou muito grata à atenção que me foi concedida e por cada “tijolo” construído para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigada pela troca ao longo desses anos e por ter aprendido tanto com você.

Ao Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) que possibilitou à condução de experimentos envolvendo irradiação de camundongos, ao ceder os equipamentos, os técnicos e toda equipe necessária para realização dos procedimentos. Em especial à Lorrane por ter tido profissionalismo e simpatia todas as vezes em que utilizamos esta unidade.

Às agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e *National Institute of Health* (NIH).

Ao biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LIDI) pela manutenção dos animais, desde a sala de criação até a de experimentação. Em especial ao

médico veterinário responsável, o Iuri, por manter o biotério, visando o bem-estar animal. Ao Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela disponibilidade em atender às demandas de animais de forma eficiente, quando o foi solicitado.

À administradora do LIDI, Sandra, que esteve sempre pronta para auxiliar no que fosse necessário, participando ativamente da interação com os fornecedores de materiais laboratoriais, sem deixar faltar os regentes e produtos para condução dos experimentos.

Aos demais colegas de laboratório que foram importantes na minha formação, pela colaboração, convivência saudável, companheirismo, aprendizados e trocas. Aos professores pelos ensinamentos, aos coordenadores e à secretária da Pós-graduação em Genética (PPGen). Aos amigos e colegas da PPGen pela troca de conhecimento em disciplinas e organizações de eventos. Ao Instituto de Ciências da Saúde (ICB) e à UFMG.

À toda minha família que está em Salvador e em Mata de São João, Bahia, que sempre me apoiou e me incentivou a buscar pelos meus sonhos. Em especial à minha mãe Nívea, tio Marcos e irmã Paloma pelos conselhos e orientações desde sempre e por todo o amor que foi a mim direcionado. Com certeza tudo isso é essencial. Amo muito vocês e sinto muita saudade. Aos amigos, principalmente aqueles que ficaram em Salvador, que me conhecem desde o ensino médio ou graduação, pelos quais mantenho um carinho especial.

Ao meu noivo, Fábio Mambelli, por ser meu companheiro de todas as horas, por sempre estar disponível e “chegar junto” nos momentos felizes e nos difíceis também. Uma pessoa extraordinária, que só quem tem a sorte de se conectar, consegue entender a grandiosidade da sua alma. Encontrei em você um companheiro para a vida toda. Te amo muito.

Obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

RESUMO

O bacilo Calmette-Guérin (BCG) é a única vacina licenciada para uso no controle da tuberculose. Além dos seus efeitos tradicionais, o BCG apresenta a capacidade de desencadear efeitos benéficos e não específicos, com destaque para o auxílio no controle de infecções heterólogas virais e bacterianas. Esses efeitos têm sido associados ao sistema imune inato, fenômeno denominado de imunidade treinada, que se apresenta de forma duradoura quando engloba a medula óssea (BM). A nossa hipótese é de que a imunidade treinada induzida pelo BCG é protetora contra a infecção pela bactéria *B. abortus*, responsável por causar a brucelose, uma zoonose sistêmica que apresenta impacto na saúde humana e animal. Neste estudo, nós demonstramos que macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 treinados pelo BCG apresentam uma resposta inflamatória aprimorada contra *B. abortus*. Os macrófagos treinados pelo BCG possuem uma expressão aumentada de MHC-II e CD40 na superfície celular e uma maior produção de IL-6, IL-12 e IL-1 β . A secreção aumentada de IL-1 β foi acompanhada pela maior ativação das plataformas canônica e não-canônica do inflamassoma. Nós observamos uma elevada expressão de caspase-11 e um maior processamento de caspase-1 em macrófagos treinados pelo BCG em resposta à *B. abortus* quando comparado com células não treinadas. Em adição, essas células treinadas pelo BCG apresentaram maior expressão de NLRP3 depois da infecção pela *B. abortus*. De um ponto de vista metabólico, a sinalização pela via Akt/mTOR/S6K foi também potencializada. Além disso, o treinamento com o BCG resultou em maior expressão de iNOS e na produção mais elevada de nitrito, culminando no maior controle da replicação intracelular de *B. abortus* pelos macrófagos. *In vivo*, nós monitoramos a redução significativa da carga bacteriana em órgãos provenientes de camundongos C57BL/6 treinados pelo BCG quando comparado ao grupo não treinado. Adicionalmente, a imunização prévia de camundongos RAG^{-/-} com o BCG protegeu parcialmente contra a infecção pela *B. abortus*, sugerindo um papel importante do compartimento imune inato neste cenário. Por fim, camundongos naive que receberam a transferência de medula óssea (BMT) de doadores treinados pelo BCG apresentaram maior resistência à *B. abortus* quando comparado com o controle não treinado. Esses resultados demonstram que a imunidade treinada induzida pelo BCG em camundongos resulta em um melhor controle intracelular da *B. abortus in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: BCG; imunidade treinada; *B. abortus*; brucelose.

ABSTRACT

The bacillus Calmette-Guérin (BCG) is the only licensed vaccine for use in tuberculosis control. It has also the ability to trigger non-specific immune protection against viral and bacterial infections. These beneficial side effects have been related to the innate immune system, a phenomenon known as trained immunity. When comprising the bone marrow (BM) compartment, this phenomenon represents a lasting immune memory. Our hypothesis is that BCG-trained immunity is protective against infection by the bacterium *B. abortus*, responsible for causing brucellosis, an infectious and systemic zoonosis that has an impact on human and animal health. In this study, we demonstrate that C57BL/6 mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) under BCG training enhance inflammatory responses against *B. abortus*. BCG-trained macrophages showed increased MHC-II and CD40 expression on cell surface and higher IL-6, IL-12 and IL-1 β production. The increase in IL-1 β secretion was accompanied by enhanced activation of canonical and non-canonical inflammasome platforms. We observed elevated caspase-11 expression and caspase-1 processing in BCG-trained macrophages in response to *B. abortus* compared to untrained cells. In addition, these BCG-trained cells showed higher NLRP3 expression after *B. abortus* infection. From a metabolic point of view, signaling through the Akt/mTOR/S6K pathway was also increased. Additionally, BCG-training resulted in higher iNOS expression and nitrite production, culminating in an improved macrophage killing capacity against intracellular *B. abortus*. *In vivo*, we monitored a significant reduction in the bacterial burden in organs from BCG-trained C57BL/6 mice when compared to the untrained group. Furthermore, previous BCG-immunization of RAG^{-/-} mice partially protects against *Brucella* infection, suggesting an important role of the innate immune compartment in this scenario. Lastly, naive recipient mice that received BM transfer (BMT) from BCG-trained donors showed greater resistance to *B. abortus* when compared to the untrained counterparts. These results demonstrate BCG-induced trained immunity in mice results in better control of intracellular *B. abortus* *in vivo* and *in vitro*.

Keywords: BCG; trained immunity; *B. abortus*; brucellosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Registros das cepas do BCG que são utilizadas nas políticas individuais de vacinação em países ao redor do mundo.....	20
Figura 2. Dados disponíveis em interface gráfica sobre a política e a prática da vacinação com o BCG no mundo	22
Figura 3. Imunidade treinada ou memória imune inata.....	27
Figura 4. A base molecular da imunidade treinada induzida pelo BCG é fundamentada na interconexão da reprogramação metabólica e epigenética.....	30
Figura 5. Modelo ilustrado de indução da imunidade treinada	31
Figura 6. A brucelose animal é uma doença amplamente distribuída no mundo, com alta incidência de infecção pela <i>B. abortus</i> no Brasil	34
Figura 7. Subversão de vias intracelulares do hospedeiro para origem do nicho replicativo da <i>Brucella abortus</i> no interior de macrófagos e posterior egresso para disseminação em células vizinhas	38
Figura 8. A ativação não-canônica mediada pela caspase-11 culmina em formação de poros na membrana, efluxo de K^+ e conseqüentemente na ativação do inflamassoma NLRP3	41
Figura 9. Estratégia de <i>gating</i> para avaliação da ativação de macrófagos e do perfil inflamatório dessas células	55
Figura 10. Modelo de indução de imunidade treinada mediada pelo BCG <i>in vivo</i>	59
Figura 11. Macrófagos treinados pelo BCG são mais responsivos à bactéria patogênica <i>B. abortus</i>	60
Figura 12. Macrófagos treinados com o BCG apresentam enriquecimento da via canônica do inflamassoma em resposta à <i>B. abortus</i>	62

Figura 13. Macrófagos treinados pelo BCG apresentaram aumento da expressão de NLRP3 antes mesmo da infecção pela <i>B. abortus</i>	63
Figura 14. O inflamassoma não canônico mediado pela caspase 11 é enriquecido em macrófagos treinados pelo BCG em resposta à infecção pela <i>B. abortus</i>	64
Figura 15. Macrófagos treinados pelo BCG apresentaram enriquecimento da via Akt/mTOR/S6K antes mesmo da infecção pela <i>B. abortus</i>	66
Figura 16. A via Akt/mTOR/S6K é mais ativa em macrófagos treinados pelo BCG após o desafio com a <i>B. abortus</i>	66
Figura 17. O treinamento com o BCG potencializa o perfil inflamatório em macrófagos em resposta à <i>B. abortus</i>	69
Figura 18. O treinamento com o BCG não influenciou a expressão da molécula ARG1 em resposta à <i>B. abortus</i>	70
Figura 19. Macrófagos treinados com o BCG apresentam maior capacidade de controle do crescimento intracelular de <i>B. abortus</i>	71
Figura 20. A imunização prévia com o BCG desencadeia uma resposta imune protetora contra <i>B. abortus</i> em camundongos	74
Figura 21. Camundongos C57BL/6 treinados pelo BCG apresentam controle potencializado da <i>B. abortus</i> em 7 d.p.i.....	75
Figura 22. Os efeitos protetores associados ao treinamento com o BCG podem ser transferidos de camundongos treinados para receptores naive via medula óssea.....	77
Figura 23. Camundongos treinados com o BCG Moreau são mais resistentes à infecção pela <i>B. abortus</i>	85
Figura 24. Os macrófagos derivados da medula óssea treinada com o BCG Moreau apresentaram enriquecimento metabólico e funcional em resposta à <i>B. abortus</i> ...	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. O gênero <i>Brucella</i> abrange doze espécies identificadas e nomeadas	33
Tabela 2. Primers usados para as análises de RT-qPCR	51
Tabela 3. Anticorpos primários utilizados para análises por western blotting	52
Tabela 4. Anticorpos conjugados utilizados para análise de citometria de fluxo.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACL	ATP citrato liase
APCs	Células apresentadoras de antígeno
ARG1	Arginase 1
ASC	<i>Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a CARD</i>
BB	<i>Brucella Broth</i>
BCA	Ácido bicinchonínico
BCVs	<i>Brucella-containing vacuoles</i>
rBCVs	<i>Replicative BCVs</i>
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BM	Medula óssea
BMDM	Macrófagos derivados de medula óssea
BMT	<i>Bone-marrow transfer</i>
BW	<i>Body weight</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CFU	Unidade formadora de colônia
ChIP	<i>Chromatin immunoprecipitation</i>
ChIP-Seq	<i>Chromatin immunoprecipitation and DNA sequencing</i>

CIC	<i>Citrate carrier</i>
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DCs	<i>Dendritic cells</i>
DMEM	Meio <i>Dulbecco's Modified Eagle's</i>
SD	Desvio padrão
d.p.i	Dias após infecção
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i>
FBS	Soro fetal bovino
GSDMD	Gasdermina D
GBPs	<i>Guanylate-binding proteins</i>
HATs	Histonas acetiltransferases
HEPES	<i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid</i>
HPV	<i>Human papillomavirus</i>
HSCs	Células tronco hematopoiéticas
H3K27me3	Trimetilação na lisina 27 da histona 3
H3K4ac	Acetilação na lisina 4 da histona 3
IL	Interleucina
IFN	Interferon

INH	Isoniazida
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p	Intraperitoneal
IRF	<i>Interferon-regulatory factor</i>
i.v	Intravenoso
KDM5	<i>Lysine demethylase 5</i>
LCCM	Meio condicionado de células L929
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
MFI	Intensidade média de fluorescência
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex II</i>
mL	Mililitro
MOI	Multiplicidade de infecção
M-PER	<i>Mammalian Protein Extraction Reagent</i>
MPPs	<i>Multipotent progenitors</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>

mTORC2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>
NFκB	Fator nuclear κB
NLRs	<i>NOD-like receptors</i>
NO	Óxido nítrico
OADC	<i>Oleic acid-albumin-dextrose-catalase</i>
OD	Densidade ótica
OIE	<i>World Animal Health Organization</i>
Omp	<i>Outer membrane protein</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RAG-1	<i>Recombination activating gene 1</i>
RIF	Rifampicina
RT-qPCR	<i>Reverse transcription qPCR</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TB	Tuberculose
TCA	Ciclo do ácido tricarbóxico
TFs	<i>Transcriptional factors</i>
TNFα	Fator de necrose tumoral α

TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
T4SS	Sistema de secreção do tipo IV
WAHIS	<i>World Animal Health Information Database Interface</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	<i>Wild-type</i> (selvagem)
µg	Microgramas
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	19
1.1 O bacilo Calmette-Guérin (BCG) e o seu uso tradicional contra a tuberculose.....	19
1.2 Os efeitos não específicos desencadeados pelo BCG e as suas aplicabilidades.....	22
1.3 O BCG como indutor de imunidade treinada e os mecanismos associados a este fenômeno.....	26
1.4 A brucelose, o gênero <i>Brucella</i> e a <i>Brucella abortus</i>	32
1.5 Interação entre a <i>Brucella abortus</i> e o sistema imunológico do hospedeiro	36
2.0 JUSTIFICATIVA	43
3.0 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo geral	45
3.2 Objetivos específicos	45
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Camundongos e ética.....	47
4.2 Cepas bacterianas e condições de crescimento.....	47
4.3 Modelo de indução de imunidade treinada.....	48
4.4 Desafio dos camundongos com a <i>B. abortus</i> , determinação de CFUs e mensuração do peso relativo de órgãos.....	48
4.5 Geração de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs).....	49
4.6 Cinética de crescimento da <i>B. abortus</i>	49
4.7 Desafio de BMDMs com a <i>B. abortus</i>	50
4.8 Análise do perfil transcricional por RT-qPCR	50

4.9	Análise de proteínas por western blotting	51
4.10	Dosagem de citocinas por ELISA	53
4.11	Mensuração de nitrito pelo ensaio de Griess	53
4.12	Experimento de transferência de medula óssea (BMT).....	53
4.13	Análise por citometria de fluxo	54
4.14	Análise estatística	56
5.0	RESULTADOS	57
5.1	O treinamento com o BCG potencializa a resposta de macrófagos contra a infecção pela <i>B. abortus</i>	57
5.2	Macrófagos treinados com o BCG apresentam enriquecimento da via canônica e não-canônica do inflamassoma durante a infecção pela <i>B. abortus</i>	61
5.3	O treinamento com o BCG desencadeia a ativação da via Akt/mTOR/S6K em macrófagos em resposta à <i>B. abortus</i>	65
5.4	O treinamento com o BCG potencializa a capacidade de controle da replicação intracelular da <i>B. abortus</i> pelos macrófagos.....	68
5.5	A imunidade treinada mediada pelo BCG confere maior resistência aos camundongos C57BL/6 contra à infecção pela <i>B. abortus</i>	72
5.6	A transferência de medula óssea (BMT) para camundongos naive pode transmitir a proteção fornecida pelo treinamento com o BCG	75
6.0	DISCUSSÃO	78
7.0	CONCLUSÃO E MODELO DO ESTUDO	85
8.0	PERSPECTIVAS PARA ESTUDOS POSTERIORES	87

REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE A – Atividades relevantes realizadas no período do Doutorado	100
APÊNDICE B – Artigo publicado em revista internacional referente aos dados desta tese.	104
APÊNDICE C – Revisão de literatura publicada em revista internacional.....	117

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 O bacilo Calmette-Guérin (BCG) e o seu uso tradicional contra a tuberculose

O bacilo Calmette-Guérin (BCG) é uma bactéria atenuada derivada do *Mycobacterium bovis* virulento, causador da tuberculose bovina. A obtenção desta cepa ocorreu no Instituto Pasteur de Lille, na França, por meio de ensaios realizados pelos pesquisadores Calmette e Guérin, razão pela qual a sua denominação foi originada. O BCG foi desenvolvido através de 230 sucessivas passagens do *M. bovis* virulento durante 13 anos (1908-1921), até que a capacidade de causar a tuberculose (TB) fosse eliminada em diferentes modelos animais. A partir de sua obtenção, a primeira administração do BCG parental como vacina ocorreu em 1921, em um menino recém-nascido que perdeu a sua mãe para a TB. Em 1924, 664 crianças foram vacinadas com o BCG, sem efeitos adversos consideráveis, além do que uma proteção de mais de 90% foi observada (CALMETTE, A., 1931; SINGH, A. K. *et al.*, 2021).

No mesmo ano (1924), a vacina contendo o BCG foi distribuída para diferentes institutos que implementaram o seu próprio modo de produção, o que resultou na emergência de diferentes cepas do BCG ao redor do mundo com vários graus de atenuação e eficácia (LUCA, S. *et al.*, 2013). Existem pelo menos quatorze cepas do BCG que apresentam considerável variabilidade a nível de diversidade genética, viabilidade e ativação de resposta de citocinas (PASCO, S. T. *et al.*, 2020). Baseado na filogenia derivada de tipagem molecular, a genealogia das cepas do BCG tem sido estabelecida e representa uma dicotomia temporal entre cepas iniciais (Japão, Rússia, Moreau e Sweden) e cepas tardias (Paster, TICE, Denmark, Glaxo). Eventos de duplicação e/ou deleção no DNA genômico de cepas tardias têm sido encontrados através de análises genômicas e transcriptômicas comparativas, com implicações para o nível de expressão de proteínas de superfície e antígenos imunodominantes (ANGELIDOU, A. *et al.*, 2020). Dentre as cepas utilizadas ao redor do mundo, o BCG Danish é o mais comum. Os países que relataram a utilização do BCG Danish na política de vacinação estão na Europa e África

Subsaariana. Além disso, em outros países como Bangladesh, Índia, Panamá e Brasil diversas cepas do BCG são utilizadas na política de vacinação (**Figura 1**) (LANCIONE, S. *et al.*, 2022). Dentre as diferentes cepas, o BCG Moreau é utilizado majoritariamente na vacinação de recém-nascidos contra a TB no Brasil (WHO, 2018).

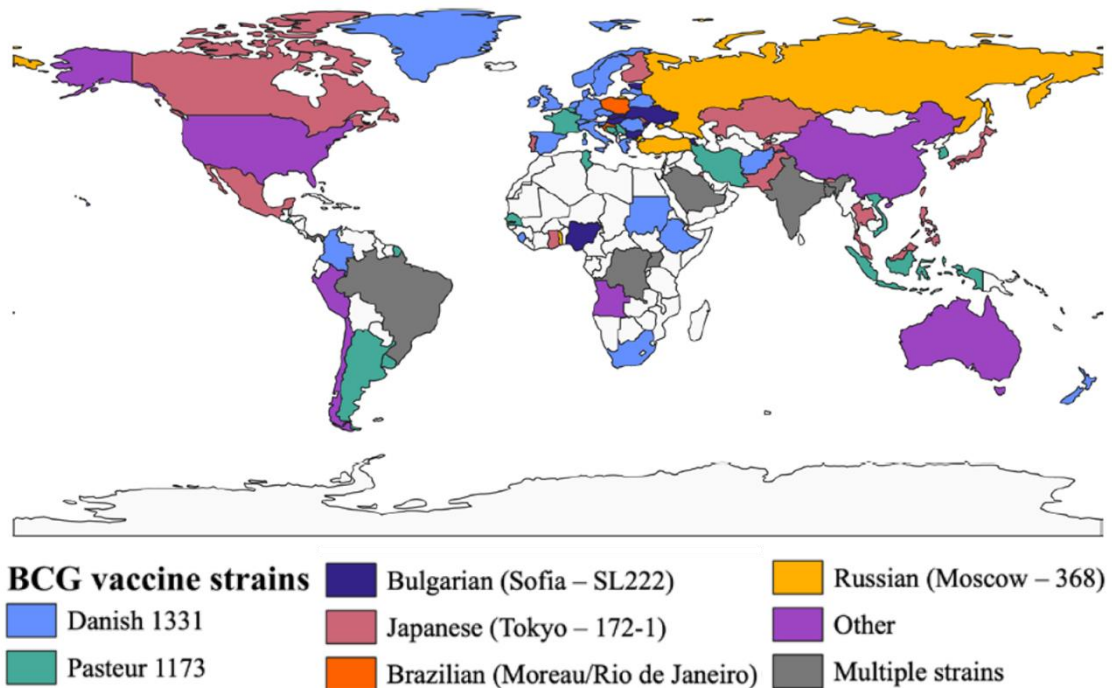


Figura 1. Registros das cepas do BCG que são utilizadas nas políticas individuais de vacinação em países ao redor do mundo. Múltiplas cepas do BCG são utilizadas no Brasil para vacinação em massa de recém-nascidos contra a TB. Além disso, a produção de vacinas contendo o BCG de forma independente pelo mundo resultou na emergência de diferentes cepas que variam genética e fenotipicamente. Fonte da imagem (LANCIONE, S. *et al.*, 2022).

O BCG é a vacina mais usada em todo o mundo, completando 100 anos de uso em 2021 (SINGH, A. K. *et al.*, 2021; WHO, 2021). Atualmente, o BCG é a única vacina licenciada para uso contra o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e é administrada em cerca de 100 milhões de recém-nascidos anualmente visando a proteção contra formas severas da TB, como a TB meníngea e a TB disseminada (KONERU, G. *et al.*, 2021; PASCO, S. T. *et al.*, 2020; WHO, 2021). Além da consistente proteção contra formas severas da doença, o BCG também protege crianças contra a TB pulmonar, o que contrasta com a variável proteção contra a TB pulmonar em adolescentes e adultos (de 0% a 80%), um dos motivos pelo qual a TB é uma das principais

causas de morte em todo o mundo (WHO, 2018). A variação da proteção em adultos pode estar associada às diferentes localizações geográficas, utilização de diferentes cepas nas políticas de vacinação e a exposição prévia às micobactérias ambientais (ADESANYA, O. A. *et al.*, 2021).

Em 2011, com o objetivo de compilar as diferentes políticas e práticas de vacinação com o BCG ao redor do mundo, houve a iniciativa para criação de um banco de dados, o *BCG World Atlas*. Esse banco de dados dispõe de uma interface gráfica interativa com informações sobre as políticas de vacinação atuais e passadas dos países ao redor do mundo (ZWERLING, A. *et al.*, 2011). O *BCG World Atlas* contém dados provenientes de 194 países, sendo que os dados foram atualizados para 188 destes em 2020. Os países estão divididos em quatro classificações segundo a prática de vacinação com o BCG: 1) vacinação nacional atual para todos os neonatos, 2) vacinação passada nacional para todos os neonatos; 3) vacinação passada nacional para todos os neonatos e atualmente administração do BCG apenas em grupos de alto risco e 4) países que recomendam a vacinação apenas para grupos de alto risco (**Figura 2**) (LANCIONE, S. *et al.*, 2022). A WHO recomenda a vacinação com o BCG de acordo com a epidemiologia individual de cada país. Países com alta incidência de TB devem vacinar recém-nascidos com uma dose, já países com baixa incidência de TB podem administrar o BCG em grupos específicos de alto risco (LANCIONE, S. *et al.*, 2022; WHO, 2021).

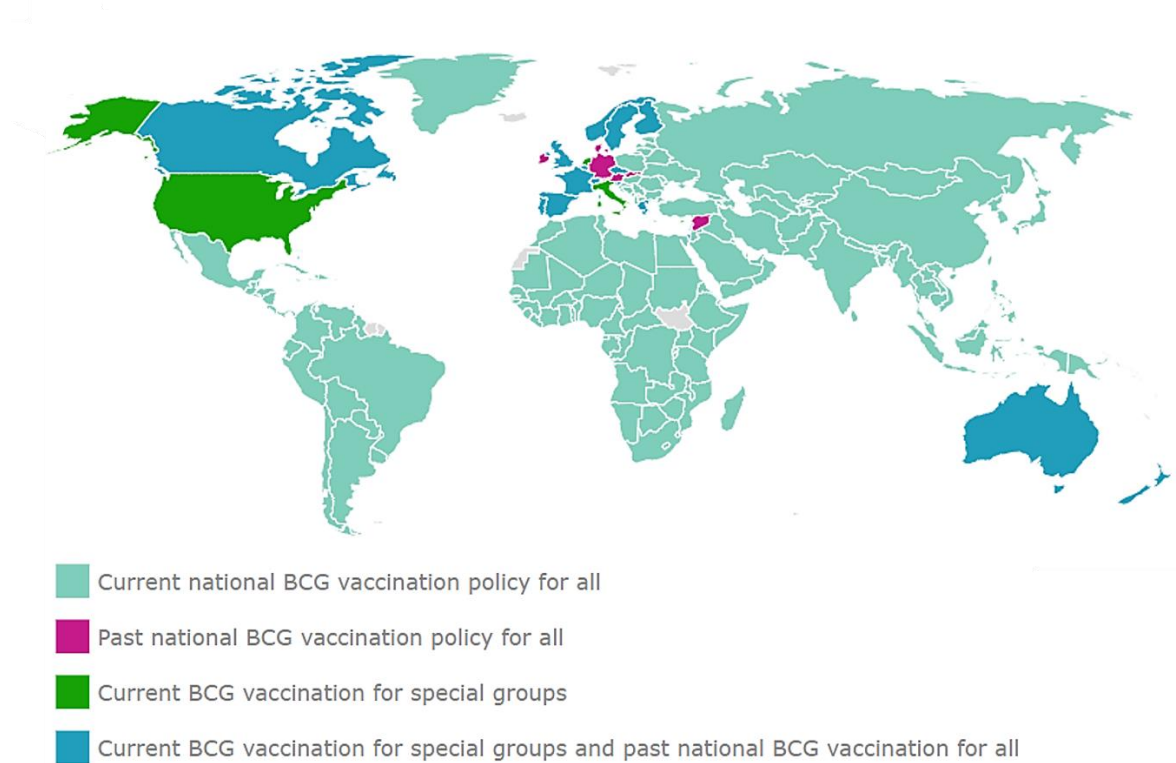


Figura 2. Dados disponíveis em interface gráfica sobre a política e a prática da vacinação com o BCG no mundo. Dentre os 194 países com dados disponíveis no BCG World Atlas, 156 países (80%) continuam a recomendar a vacinação com o BCG em massa para todos os neonatos. A maioria dos países que mudaram a política de vacinação com o BCG, da vacinação em massa para a vacinação apenas de grupos específicos, o fizeram devido à redução da incidência de TB. Esta interface gráfica corresponde a uma terceira versão mais atualizada publicada em 2020 (Adaptado de <http://www.bcgatlas.org/index.php>).

1.2 Os efeitos não específicos desencadeados pelo BCG e as suas aplicabilidades

De forma interessante, além do uso tradicional do BCG contra a TB, diversas evidências tem sugerido que essa vacina é capaz de desencadear efeitos benéficos não-específicos preventivos ou terapêuticos contra patógenos não-relacionados, câncer ou até mesmo doenças neurodegenerativas (DE QUEIROZ, N. *et al.*, 2021; SINGH, A. K. *et al.*, 2021), abrindo um leque de possibilidades para estudos envolvendo os mecanismos desencadeados pelo BCG e suas aplicações. Os efeitos não específicos mediados pelo BCG são aplicados na prática clínica há cerca de 40 anos, sendo esta bactéria utilizada como padrão ouro na terapia intravesical contra câncer de bexiga não-músculo invasivo após a ressecção transuretral. Os mecanismos exatos que ocorrem após a instilação do BCG ainda não são compreendidos (BABJUK, M. *et*

al., 2017). Em 2021, o nosso grupo demonstrou que, após o tratamento com o BCG intratumoral em modelo murino, ocorre o aumento na resposta imunológica dependente da molécula adaptadora MyD88 e parcialmente dependente da ação conjunta dos receptores do tipo Toll (TLRs) - TLR3, TLR7 e TLR9. Em conjunto, estas moléculas do sistema imune inato contribuíram para o aumento da presença de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T CD8⁺ na região intratumoral, além de gerar uma significativa polarização dos macrófagos em direção a um perfil pró-inflamatório, o que foi acompanhado pela redução significativa do volume do tumor (DE QUEIROZ, N. *et al.*, 2021).

O potencial terapêutico do BCG também tem sido observado no tratamento de verrugas oriundas da infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV). Um estudo egípcio controlado por placebo demonstrou que o tratamento tópico com o BCG resulta em uma remissão total de verrugas comuns em 65% e uma remissão total de verrugas planas em 45% das crianças acometidas. Neste estudo não houve efeitos adversos e o acompanhamento durante 6 meses não revelou nenhum evento de recorrência dentre os respondedores (SALEM, A. *et al.*, 2013). Além disso, o tratamento tópico com o BCG em 10 homens com casos de verrugas genitais (condiloma acuminado) recorrentes demonstrou uma resolução das lesões em 6 pacientes, com 5 pacientes sem recorrência do condiloma acuminado em um tempo médio de acompanhamento de 32,8 meses (BOHLE, A. *et al.*, 2001). Dessa forma, o BCG pode levar à eliminação das lesões por meio do controle do HPV e uma resposta similar a memória imunológica pode ser estabelecida, levando a ausência de recorrência.

Após uma lacuna de 70 anos das primeiras evidências dos efeitos não-específicos mediados pelo BCG, um importante estudo epidemiológico, que ocorreu na Guiné-Bissau (África Ocidental), marcou o início das investigações acerca dos mecanismos associados a esses efeitos (AABY, P. *et al.*, 2011). Este estudo foi conduzido em 2.320 crianças, sendo observado que a administração de BCG em recém-nascidos de baixo peso resultou em uma redução de

mais de 40% na taxa de mortalidade neonatal durante o primeiro mês após a vacinação, quando comparado com crianças que receberam a vacinação com atraso de 6 semanas. Essa taxa foi associada ao aumento dos mecanismos iniciais de defesa contra sepse neonatal, contra infecções/problemas respiratórios e febre. A origem das infecções, ou seja, se eram ocasionadas por vírus ou por bactérias não foi discutida nesse estudo (AABY, P. *et al.*, 2011).

Além disso, os efeitos heterólogos mediados pela revacinação com o BCG foram observados em adolescentes contra infecções do trato respiratório. Esses jovens apresentaram três vezes menos infecções respiratórias quando comparado ao controle, sendo que o BCG pode ter atuado contra infecções bacterianas e virais, já que este estudo não faz distinção (NEMES, E. *et al.*, 2018). Em um ensaio clínico randomizado, idosos hospitalizados com 65 anos ou mais, que receberam a vacinação com o BCG, cepa Bulgária, apresentaram um período significativamente maior para ocorrência de uma primeira infecção quando comparado com o placebo. O grupo de idosos vacinados também apresentou menor incidência de infecções do trato respiratório e pneumonia. A incidência de efeitos adversos não diferiu entre os grupos e não foi relacionada com o estudo (GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. *et al.*, 2020). Em 2018, a vacinação prévia com o BCG de voluntários que posteriormente receberam a vacina com o vírus da febre amarela (YFV) resultou em significativa redução da carga viral na corrente sanguínea quando comparado aos voluntários que receberam previamente o placebo (ARTS, R. J. W. *et al.*, 2018). Dessa forma, a revacinação de seres humanos com o BCG pode conferir atraso e/ou redução da ocorrência de infecções no trato respiratório em uma ampla faixa etária, efeito que pode estar associado a um maior controle da replicação de patógenos não relacionados.

Devido ao fato da vacinação com o BCG estar associada à proteção inespecífica contra infecções respiratórias virais e alguns estudos observacionais demonstrarem uma associação entre a vacinação com o BCG e a menor severidade da COVID-19, estão sendo conduzidos ao

redor do mundo cerca de 20 ensaios clínicos randomizados e controlados disponíveis no banco de dados Clinicaltrials.gov, que visam avaliar o impacto da vacinação com o BCG na incidência e severidade da COVID-19 (CESPEDES, P. F. *et al.*, 2017; GONZALEZ-PEREZ, M. *et al.*, 2021; MOORLAG, S. *et al.*, 2019). Em sua maioria, estes ensaios apresentam caráter preventivo, embora exista um ensaio clínico randomizado de caráter terapêutico sendo conduzido no Brasil, que visa avaliar o tratamento com o BCG em relação à evolução clínica da COVID-19, à eliminação do SARS-CoV-2, ao fenótipo da doença, além da avaliação da taxa de soroconversão e da titulação dos anticorpos IgM, IgA e IgG (GONZALEZ-PEREZ, M. *et al.*, 2021).

Ademais, os efeitos não específicos e preventivos do BCG foram demonstrados em modelo animal contra fungos, vírus e bactérias (ARTS, R. J. W. *et al.*, 2018; KAUFMANN, E. *et al.*, 2018). Em 2012, camundongos SCID (desprovidos de linfócitos T e B funcionais), após 14 dias de imunização com o BCG cepa SSI, foram desafiados com dose letal de *C. albicans*. Os camundongos previamente imunizados apresentaram 100% de sobrevivência, enquanto aqueles que não receberam a vacinação com o BCG apresentaram 25% de sobrevivência (KLEINNIJENHUIS, J. *et al.*, 2012). O BCG é capaz de aumentar a capacidade responsiva de células do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas, que também funcionam como células apresentadoras de antígenos (APCs), o que pode resultar no aumento da ativação de células T e subsequente aumento da resposta celular Th1 e produção de IFN- γ (MARINHO, F. V. *et al.*, 2020; MOUHOUB, E. *et al.*, 2021). Além disso, este microrganismo, por ser um forte ativador do sistema imune, estimula uma resposta Th1 robusta em recém-nascidos, com níveis da citocina IL-12 equiparáveis aos que são observados em adultos (MARCHANT, A. *et al.*, 1999). A habilidade do BCG em induzir uma resposta Th1 robusta faz do BCG um “*live-adjuvant*” (MOUHOUB, E. *et al.*, 2021).

1.3 O BCG como indutor de imunidade treinada e os mecanismos associados a este fenômeno

Os efeitos benéficos e não-específicos mediados pelo BCG contra infecções heterólogas podem ser conferidos por meio de respostas associadas à imunidade inata e/ou à imunidade adaptativa. Respostas heterólogas mediadas por linfócitos podem envolver a ativação de linfócitos T de memória CD4⁺ ou CD8⁺ que não são específicos para o antígeno (reatividade cruzada), auxiliando na polarização de uma resposta Th1 a um segundo estímulo não-micobacteriano (MOORLAG, S. *et al.*, 2019). Entretanto, diversas evidências conferem destaque à capacidade das células imunes inatas em responder de forma acentuada durante uma segunda infecção não relacionada (KAUFMANN, E. *et al.*, 2018). Nesse contexto, a proteção mediada pelo BCG contra infecções não relacionadas é observada em camundongos RAG^{-/-} e SCID (KLEINNIJENHUIS, J. *et al.*, 2012; MOORLAG, S. *et al.*, 2019), que não apresentam linfócitos T e B funcionais. Além disso, a proteção conferida pelo BCG não é transmitida por meio da transferência de células T para outros camundongos (CESPEDES, P. F. *et al.*, 2017). Essas evidências demonstram que o efeito protetor está associado, pelo menos parcialmente, ao compartimento imune inato. Este fenômeno de proteção vinculado ao sistema imune inato foi denominado de imunidade treinada e os seus mecanismos é foco de intensa pesquisa atualmente.

A introdução do conceito de imunidade treinada ocorreu em 2011 pelo pesquisador romeno e especialista em doenças infecciosas, Mihai G. Netea. Este pesquisador propôs o termo imunidade treinada para conceituar a habilidade de células do sistema imune inato em responder de forma mais acentuada e eficiente quando um contato patógeno-hospedeiro ocorrer pela segunda vez, seja ele desencadeado pelo mesmo patógeno ou por um patógeno distinto não relacionado (proteção-cruzada) (NETEA, M. G. *et al.*, 2011). É importante ressaltar que esse fenômeno não é considerado uma sobreposição de respostas imunes devido à coestimulação,

pois após o *clearance* do estímulo inicial, as células treinadas retornarão ao estado de repouso (homeostase) e serão capazes de produzir níveis mais elevados de determinadas citocinas e mediadores inflamatórios em uma segunda estimulação (**Figura 3**) (HU, Z. *et al.*, 2022).

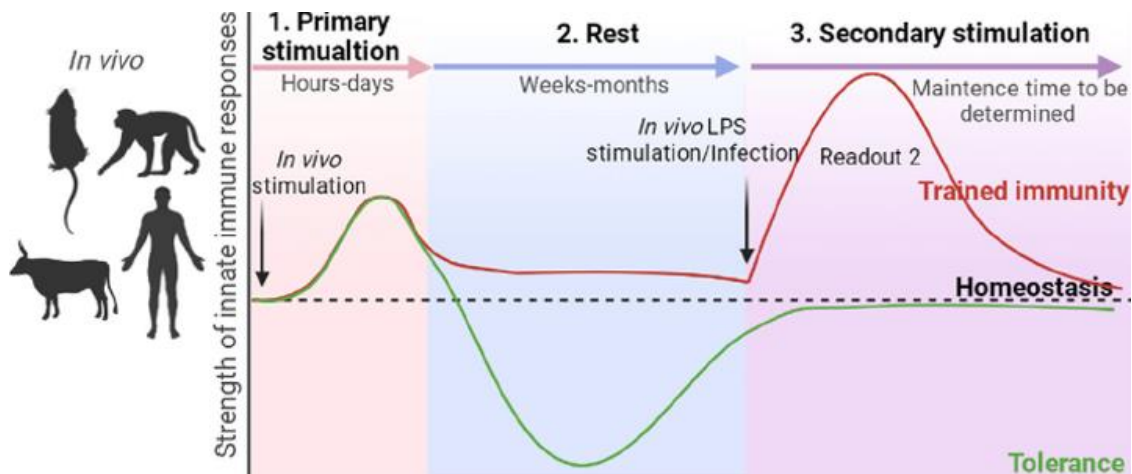


Figura 3. Imunidade treinada ou memória imune inata. A imunidade treinada é considerada a memória imunológica associada ao sistema imune inato de mamíferos. Após uma resposta inicial contra um estímulo e retorno das células ou do organismo à homeostase, um estímulo subsequente poderá induzir uma resposta aumentada no que se refere a produção de citocinas e capacidade de eliminação de agentes infecciosos. Fonte da imagem (HU, Z. *et al.*, 2022).

Apesar da imunidade treinada atuar de maneira inespecífica contra uma ampla gama de estímulos não relacionados, o termo memória inata também é utilizado devido à permanência dos mecanismos celulares que regem esse fenômeno, o que pode conferir o aumento da velocidade e robustez de uma resposta protetora contra determinado patógeno (KAUFMANN, E. *et al.*, 2018). No processo de indução da imunidade treinada, células imunes inatas passam por uma série de mudanças epigenéticas e metabólicas, que contribuem para as respostas secundárias mais eficazes (ARTS, R. J. W. *et al.*, 2016; ARTS, R. J. W. *et al.*, 2018). Em contraponto, a memória clássica representada pelos linfócitos T e B é altamente específica. Após o reconhecimento de antígenos por meio de TCRs e BCRs, originados de mudanças irreversíveis na sequência de DNA durante rearranjo gênico desses receptores, há a expansão clonal e permanência de células T e B de memória com receptores altamente específicos, que

em um segundo reconhecimento do mesmo epítopo irão montar uma resposta imune mais rápida e robusta (MOORLAG, S. *et al.*, 2018; NETEA, M. G. *et al.*, 2016).

Modelos experimentais demonstram que os efeitos benéficos e não-específicos desencadeados pelo BCG existem e a imunidade treinada tem sido demonstrada como crucial no contexto desse fenômeno (ARTS, R. J. *et al.*, 2016; KAUFMANN, E. *et al.*, 2018). De uma maneira geral, a indução da imunidade treinada por meio de indutores como BCG ou β -glucano gera o aumento da capacidade responsiva de monócitos/macrófagos na imunidade contra: *Staphylococcus aureus* (CHENG, S. C. *et al.*, 2014), *Mycobacterium tuberculosis* (KAUFMANN, E. *et al.*, 2018), *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (CIARLO, E. *et al.*, 2020), *Candida albicans* (ARTS, R. J. W. *et al.*, 2018); e até mesmo protozoários, como a *Leishmania brasilienses* (DOS SANTOS, J. C. *et al.*, 2019).

A reprogramação epigenética e metabólica estão integradas em macrófagos treinados pelo BCG. As mudanças no metabolismo incluem o enriquecimento da via da glicólise aeróbia nessas células. O aumento do consumo de glicose e da produção de lactato são mediados pela ativação da via de sinalização Akt/mTOR (CHENG, S. C. *et al.*, 2014) (**Figura 4**). O sensor metabólico mTOR (*mammalian target of rapamycin*) está presente em dois complexos multiproteicos distintos (mTORC1 e mTORC2). Sua atividade é regulada por uma variedade de sinais imunes extracelulares e metabólicos, com via de sinalização intracelular complexa. Em células imunes inatas, mTOR pode ser ativado por ligantes de TLRs e citocinas (WEICHHART, T. *et al.*, 2015). Entretanto na ausência de sinais de ativação, a via de sinalização do mTOR é inativa. Após estímulo, a quinase Akt é fosforilada e é responsável pela ativação de mTORC1 (WEICHHART, T. *et al.*, 2015). Além do enriquecimento da via do mTOR e do aumento da glicólise aeróbia, outras vias primordiais para o fenótipo estão enriquecidas em células treinadas pelo BCG, como a via da glutamina. Esta disponibiliza nutrientes para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) devido à conversão de glutamina em α -

cetogluturato. Os metabólitos do ciclo do TCA são importantes para a reprogramação epigenética, pois estes interferem na atividade das enzimas que promovem alterações pós-traducionais nas histonas. Nesse sentido, o acúmulo de fumarato (componente do ciclo do TCA) inibe a atividade da enzima KDM5 histona demetilase, ocorrendo o enriquecimento da marca de histona H3K4me3, o que resulta no aumento da acessibilidade da cromatina. Esta relação também se estabelece entre o citrato (componente do ciclo do TCA) e as enzimas histonas acetiltransferases (HATs). Após ser exportado da matriz mitocondrial para o citosol por meio da enzima transportadora de citrato (CIC), este componente é convertido em acetil-CoA e oxalacetato pela enzima ATP citrato liase (ACL) (LIU, Y. *et al.*, 2020). O acetil-CoA proveniente do citrato é utilizado pelas HATs, funcionando, portanto, como doador de acetil para a acetilação de histonas (BEKKERING, S. *et al.*, 2018; WELLEN, K. E. *et al.*, 2009). Além disso, já foi demonstrado que a inibição do metabolismo da glutamina e/ou da glicólise aeróbia resulta no decréscimo da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) na imunidade treinada induzida pelo BCG. Apesar da fosforilação oxidativa também se encontrar potencializada nessas células, o bloqueio desta parece não influenciar na responsividade dos macrófagos treinados durante estímulos secundários (ARTS, R. J. *et al.*, 2016).

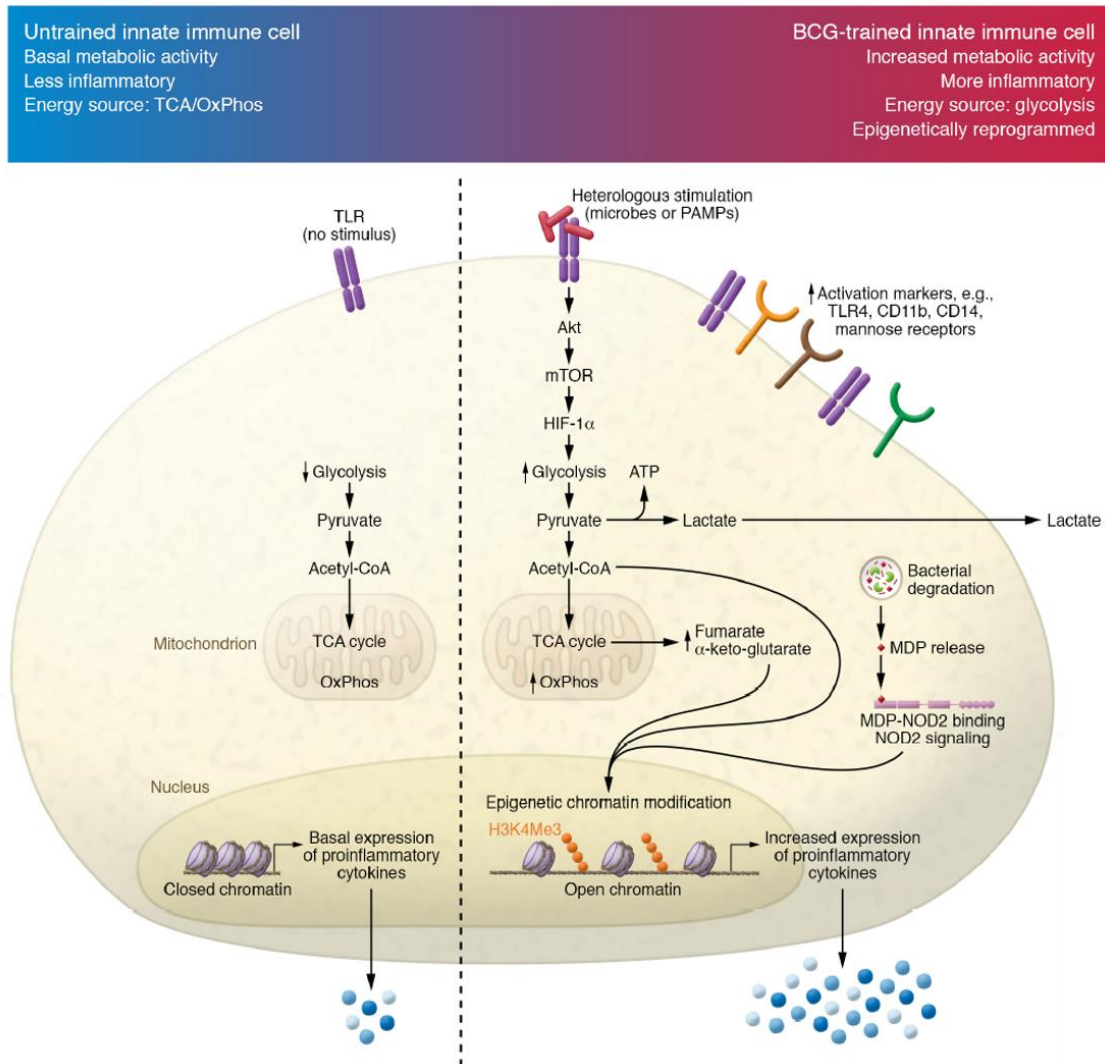


Figura 4. A base molecular da imunidade treinada induzida pelo BCG é fundamentada na interconexão da reprogramação metabólica e epigênética. Após estímulo com o BCG, a fosforilação da proteína quinase serina/treonina Akt ativa a via do mTOR. A ativação de mTORC1 resulta em aumento da glicólise aeróbia. O enriquecimento do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) pelo metabolismo da glutamina resulta em acúmulo de componentes deste ciclo. Citrato e fumarato são importantes para a reprogramação epigênética devido ao controle de enzimas que promovem alterações pós-traducionais nas histonas. A interligação entre componentes do ciclo do TCA e a reprogramação epigênética pode ser demonstrada através do fumarato e da enzima KDM5 histona demetilase. O acúmulo de fumarato inibe a ação desta enzima, favorecendo, portanto, alterações epigênicas associadas ao aumento da acessibilidade da cromatina (H3K4me3) (BEKKERING, S. *et al.*, 2018). Fonte da imagem (SINGH, A. K. *et al.*, 2021).

Uma abordagem importante no desenvolvimento de imunidade treinada é a capacidade do BCG em induzir este fenômeno em células-tronco hematopoiéticas (HSCs). Ao atingir e se estabelecer na medula óssea (BM) de camundongos C57BL/6, o BCG apresenta a capacidade de estimular extracelularmente HSCs e favorecer a expansão e o comprometimento dessas

células com a linhagem mieloide (**Figura 5**). O BCG atua em estágios iniciais da mielopoiese ao estimular HSCs e progenitores multipotentes (MPPs) na BM a se desenvolverem em macrófagos mais responsivos com programas epigenéticos específicos (KAUFMANN, E. *et al.*, 2018).

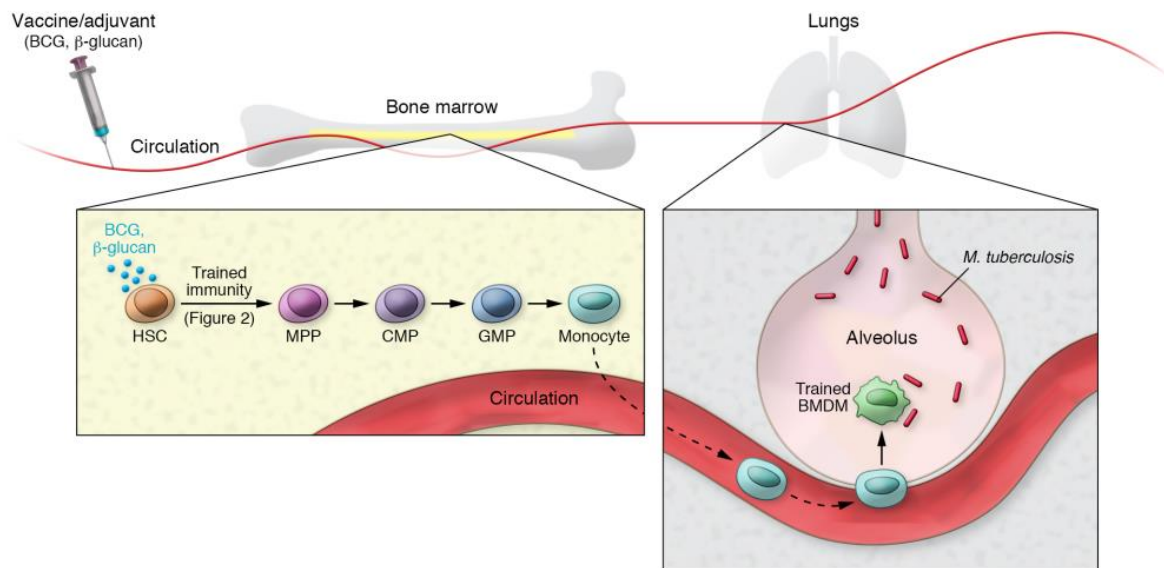


Figura 5. Modelo ilustrado de indução da imunidade treinada. O BCG é capaz de induzir proliferação e comprometimento de HSCs com a linhagem mieloide, que posteriormente originarão macrófagos mais responsivos. Após vacinação com o BCG, a BM é estimulada e as HSCs apresentam elevada taxa proliferativa. O aumento da proliferação é acompanhado do aumento do comprometimento das células com a linhagem mieloide e da diminuição do comprometimento com a linhagem linfóide. Após completa diferenciação destes precursores na linhagem monócitos/macrófagos, estas células apresentam funções efetoras potencializadas para maior combate às infecções. Utilizando a tuberculose como modelo ilustrativo, após diferenciação, há a migração de monócitos pela corrente sanguínea até o pulmão, que é o foco de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. No pulmão BMDMs treinados atuam no controle da infecção ao reduzir de forma potencializada a carga bacteriana neste órgão. Fonte da imagem (KHADER, S. A. *et al.*, 2019).

A indução da imunidade treinada pelo BCG em HSCs é de vital importância para uma proteção a longo prazo, visto que monócitos e macrófagos são células de vida útil relativamente curta e por consequência são menos propensas a transmitir memória imunológica de forma sustentada. As HSCs, por sua vez, são células de vida longa com propriedade de autorrenovação, residem na BM e sua reprogramação funcional é herdada pelos macrófagos

(KHADER, S. A. *et al.*, 2019) capazes de responder de maneira potencializada. A utilização dessa abordagem contra microrganismos que subvertam os fagócitos para a sua sobrevivência e replicação dentro do hospedeiro pode resultar em melhora do quadro patológico.

1.4 A brucelose, o gênero *Brucella* e a *Brucella abortus*

A brucelose foi identificada, pela primeira vez, pelo patologista e microbiologista David Bruce na Ilha de Malta em 1887, ao isolar um cocobacilo identificado por ele como “*Micrococcus melitensis*” (atualmente denominado como *Brucella melitensis*) do fígado de um soldado que pereceu em decorrência da Febre de Malta (BRUCE, D., 1887). Após dez anos, em 1897, o veterinário Bernard Bang isolou o “*Bang’s Bacillus*” ou “Bacilo do aborto em bovinos” (BANG, B., 1910), atualmente denominado como *Brucella abortus*.

A brucelose é a zoonose bacteriana mais difundida no mundo e uma das mais negligenciadas (WHO, 2006), causando uma perda anual de mais de 600 milhões de dólares na América Latina (HERRERA, E. *et al.*, 2008). O gênero *Brucella* é o responsável por causar esta patologia, sendo compreendido por cocobacilos Gram-negativos, imóveis, não esporogênicos e intracelulares facultativos (PERCIN, D., 2013). Atualmente, este gênero abrange doze espécies isoladas e nomeadas, que exibem características antigênicas e metabólicas distintas e que são classificadas de acordo com sua preferência pelo hospedeiro animal (**Tabela 1**) (HULL, N. C. *et al.*, 2018). Dentre essas bactérias, os principais agentes etiológicos da brucelose humana são a *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* e *Brucella suis* (DE BOLLE, X. *et al.*, 2015), sendo a *Brucella melitensis* a mais patogênica e a *Brucella abortus* a mais difundida no mundo (CORBEL, M. J., 1997).

Tabela 1. O gênero *Brucella* abrange doze espécies identificadas e nomeadas

Espécies	Hospedeiro natural preferencial	Potencial zoonótico
<i>B. melitensis</i>	Ovelhas, cabras e camelos	Sim – elevado
<i>B. abortus</i>	Bovinos, alces e búfalos	Sim – elevado
<i>B. suis</i>	Porcos, lebres e renas	Sim – elevado
<i>B. canis</i>	Cães doméstico e selvagem	Sim - moderado
<i>B. ovis</i>	Ovelhas	Nenhuma infecção reportada
<i>B. neotomae</i>	Ratos de madeira do deserto	Nenhuma infecção reportada
<i>B. ceti</i>	Cetáceos	Sim – baixo
<i>B. pinnipedialis</i>	Pinípedes	Sim – baixo
<i>B. microti</i>	Raposas vermelhas e ratazanas	Nenhuma infecção reportada
<i>B. inopinata</i>	Desconhecido	Sim - elevado
<i>B. papionis</i>	Primatas não-humanos	Nenhuma infecção reportada
<i>B. vulpis</i>	Raposa vermelha	Nenhuma infecção reportada

Observação: em destaque as espécies com potencial zoonótico mais elevado. Adaptado de (HULL, N. C. *et al.*, 2018).

O banco de dados *World Animal Health Information Database Interface* (WAHIS) dispõe de dados compilados sobre a incidência de brucelose animal originada pela *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* no mundo. Entretanto, esses dados ficam comprometidos por serem adquiridos através de relatórios voluntários realizados pela *World Animal Health Organization* (OIE) e por existir maior notificação em países que apresentam melhores recursos para a vigilância sanitária. Ainda assim, este é o único banco de dados completo que compila estas estatísticas, cujas mais recentes são referentes ao ano de 2014. Neste documento, o Brasil apresentou notificação de 1.142 eventos de surtos de *B. abortus* (**Figura 6**). O México é o país com mais surtos notificados, no total 5.514, dentre eles 5.174 originados pela *B. abortus* e 340 pela *B. melitensis* (HULL, N. C. *et al.*, 2018).

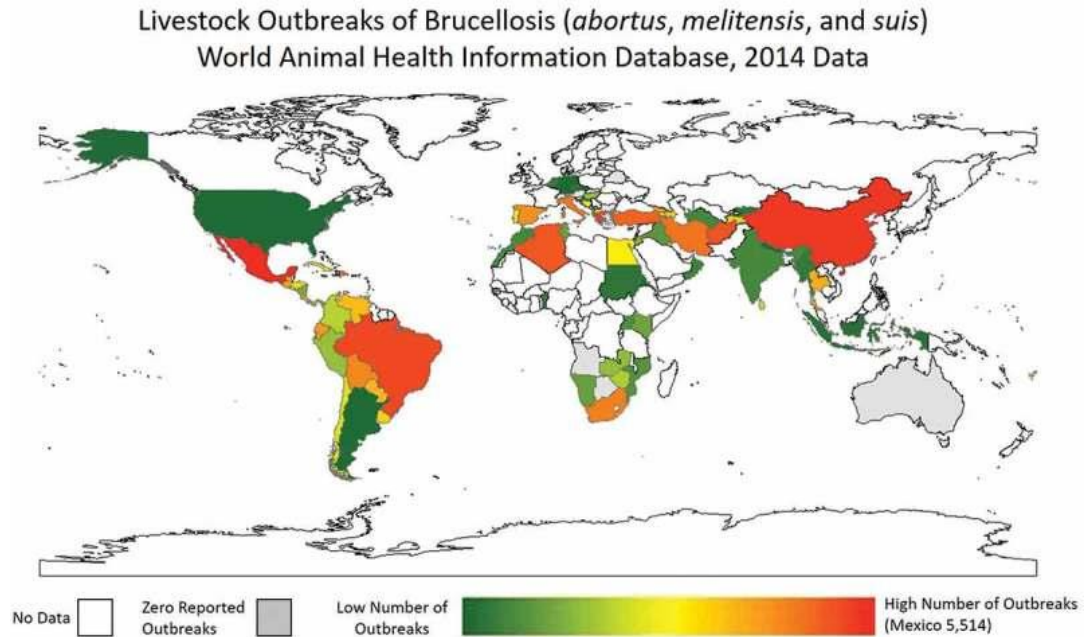


Figura 6. A brucelose animal é uma doença amplamente distribuída no mundo, com alta incidência de infecção pela *B. abortus* no Brasil. Segundo os dados do *World Animal Health Information Database Interface*, o México é o país que mais registrou surtos de brucelose animal, o que totaliza 5.514 surtos registrados em 2014, sendo eles 5.174 originados pela *B. abortus*, 340 pela *B. melitensis* e 0 pela *B. suis*. A China registrou um total de 2.138, sendo eles 2.126 originados pela *B. abortus*, 0 pela *B. melitensis* e 12 pela *B. suis*. O Brasil registrou 1.142 surtos, todos eles originados pela *B. abortus*. Fonte da imagem (HULL, N. C. *et al.*, 2018).

No Brasil, a brucelose bovina ocasionada pela *B. abortus* está amplamente distribuída por todo território e é responsável pela redução de rebanhos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A., 2006). Essa redução está vinculada ao tropismo por órgãos reprodutivos do animal (ANDERSON, T. D. *et al.*, 1986), levando ao aborto espontâneo em ruminantes, uma marca da infecção (OLSEN, S. C. *et al.*, 2014), e ao possível quadro de esterilidade permanente em uma de cada cinco fêmeas infectadas (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A., 2006). Os tecidos fetais e placentários associados aos fluidos expelidos nos eventos de aborto é a principal rota de transmissão entre a população animal (FRANC, K. A. *et al.*, 2018; POESTER, F. P. *et al.*, 2013). Além disso, o reservatório animal da doença é globalmente negligenciado (HULL, N. C. *et al.*, 2018). A infecção pela *B. abortus* promove redução na produção de leite e carne (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A., 2006), além do impedimento desses produtos

pelas barreiras sanitárias do mercado internacional, o que gera o prejuízo de milhões de dólares ao ano para a economia brasileira (POESTER, F. P. *et al.*, 2002).

As principais formas de transmissão zoonótica de *B. abortus* é a partir da ingestão de produtos derivados de animais, como laticínios contaminados que não foram submetidos ao processo de pasteurização (LINDAHL-RAJALA, E. *et al.*, 2017) e carne crua proveniente de animais infectados (CASALINUOVO, F. *et al.*, 2016), além do contato direto com tecidos animais infectados e inalação de aerossóis que contêm o patógeno (PAPPAS, G. *et al.*, 2005). A contaminação de pesquisadores, agropecuaristas, açougueiros, trabalhadores de matadouros e médicos veterinários pode ocorrer em ambiente laboratorial e ocupacional (SELEEM, M. N. *et al.*, 2010; SINGH, K., 2009). A brucelose é reconhecida como a infecção mais comum adquirida em laboratórios (SINGH, K., 2009), isso porque a dose infecciosa é baixa, $\leq 10^2$ células bacterianas por aerossol ou rota subcutânea (HULL, N. C. *et al.*, 2018; MENSE, M. G. *et al.*, 2004).

As maiores taxas de incidência de brucelose em humanos são atualmente encontrados em regiões da África, Ásia, América Latina e Oriente Médio (FRANC, K. A. *et al.*, 2018). A brucelose em humanos raramente é fatal, porém é uma doença que apresenta tendência à cronicidade e persistência (ATLURI, V. L. *et al.*, 2011; WHO, 2006). Esta patologia é severamente debilitante e incapacitante, sendo que qualquer órgão ou tecido do organismo pode ser acometido com incidência variável (ATLURI, V. L. *et al.*, 2011). Dentre os sintomas e as alterações mais comuns, podem ser citados febre, fadiga, artralgia, suores, linfadenopatia, hepatomegalia e esplenomegalia. As manifestações osteoarticulares como artrite periférica, sacroilíte e espongilite são as formas localizadas mais comuns da doença (PAPPAS, G. *et al.*, 2005; POURBAGHER, A. *et al.*, 2006). Além disso, a brucelose potencialmente pode causar diversas morbidades, dentre elas: febre ondulante provocada devido a episódios de bacteremia seguido por novo foco de infecção, artrite, endocardite, osteomielite e complicações

neurológicas (BALDI, P. C. *et al.*, 2013; FRANC, K. A. *et al.*, 2018). Pela diversidade de sintomas parecidos com outras patologias, a brucelose é de difícil diagnóstico (WHO, 2006). É suposto que a incidência desta doença seja cinco vezes superior aos dados oficiais, principalmente devido ao não diagnóstico e ao não cumprimento de notificação obrigatória (WHO, 2006). O paciente acometido é submetido a regime de tratamento com antibióticos, com alta taxa de recaída. Não há vacinas para seres humanos (WHO, 2006). Por apresentar dificuldade de detecção, fácil disseminação e patogênese prolongada, o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) norte-americano classificou o gênero *Brucella* como categoria B, o que significa se tratar de organismos com risco de uso como arma biológica e bioterrorismo (SARKAR-TYSON, M. *et al.*, 2011).

1.5 Interação entre a *Brucella abortus* e o sistema imunológico do hospedeiro

Nas etapas iniciais de infecção pela *B. abortus*, os mecanismos de evasão do sistema imunológico são imprescindíveis para patogênese da brucelose. Tais mecanismos englobam a capacidade de sobreviver e proliferar dentro de fagócitos, como células dendríticas (DCs) e macrófagos, estes últimos considerados o melhor nicho replicativo para esta bactéria (ARCHAMBAUD, C. *et al.*, 2010; CELLI, J., 2015). Uma vez fagocitada, a *B. abortus* é envolta por um vacúolo de membrana dupla, conhecido como vacúolo contendo *Brucella* (BCV). Dentro do BCV, a *B. abortus* é capaz de alterar a rota natural intracelular de degradação e estruturar seu nicho replicativo (CELLI, J., 2015). No seu processo intracelular de estabelecimento e crescimento existem sucessivas alterações moleculares no BCV, que ocorrem mediante à interação do vacúolo com diferentes rotas celulares: eBCVs (BCV endossomal), rBCV (BCV replicativo) e por fim aBCV (BCV relacionado à autofagia) (**Figura 7**) (CELLI, J., 2015; COMERCI, D. J. *et al.*, 2001; STARR, T. *et al.*, 2008).

Inicialmente, este vacúolo interage com a via endocítica (eBCV) e adquire moléculas características de endossomos iniciais, que posteriormente darão lugar à presença de marcadores

de endossomos tardios (BELLAIRE, B. H. *et al.*, 2005; CELLI, J. *et al.*, 2003; STARR, T. *et al.*, 2008). Concomitantemente a este processo, a rápida acidificação do vacúolo ocorre devido à fusão controlada com lisossomos (STARR, T. *et al.*, 2008). Apesar da acidificação resultar em morte de grande parcela de bactérias, ela é essencial para a expressão do seu maior determinante de virulência – o sistema de secreção do tipo IV *virB* (T4SS), responsável pela injeção de efetores no citoplasma celular (BOSCHIROLI, M. L. *et al.*, 2002; CELLI, J., 2015; CELLI, J. *et al.*, 2003). O T4SS modula as funções do hospedeiro envolvidas na via secretória primária, permitindo a biogênese do rBCV através da fusão do eBCV maduro com cisternas do retículo endoplasmático (ER) (CELLI, J. *et al.*, 2003; CELLI, J. *et al.*, 2005; STARR, T. *et al.*, 2008). A extensa replicação dessas bactérias é iniciada no rBCV e seguida pelo englobamento dos rBCVs em estruturas multimembranares semelhantes aos autofagossomos (aBCV) (STARR, T. *et al.*, 2012). Esse processo de conversão do rBCV em aBCV envolve as proteínas de iniciação autofágica Beclin1, ULK1 e ATG14L (CELLI, J., 2015). O aBCV é importante na liberação da *B. abortus* da célula do hospedeiro após a sua multiplicação e, portanto, fundamental na conclusão do ciclo intracelular da bactéria (STARR, T. *et al.*, 2012). A sobrevivência e o crescimento da *B. abortus* dentro de fagócitos profissionais resulta na disseminação sistêmica desse patógeno, o qual posteriormente infecta outras células da linhagem mieloide como macrófagos do fígado e do baço, nos quais pode persistir em lesões granulomatosas (ATLURI, V. L. *et al.*, 2011).

Na superfície celular da *B. abortus* estão presentes moléculas que são fatores essenciais para a sua patogenicidade. Uma delas é o LPS não-usual apresentado por cepas lisas e virulentas (SANGARI, F. J. *et al.*, 1996). A porção do lipídeo A dessa molécula apresenta cadeias mais longas, o que diminui suas propriedades endotóxicas, visto que essas cadeias longas não são eficientemente reconhecidas por TLR4 (TSOLIS, R. M. *et al.*, 2008). Diferente de outras endotoxinas, o LPS de *Brucella* não é pirogênico e falha em ativar o complemento. Além disso,

são necessárias concentrações 100 vezes maiores de LPS de *Brucella* para levar o hospedeiro a óbito, quando comparado ao LPS de enterobactérias (GIAMBARTOLOMEI, G. H. *et al.*, 2004). Dessa forma, as peculiaridades do LPS da *B. abortus* podem representar uma estratégia de evasão do sistema imune por essa bactéria (TSOLIS, R. M. *et al.*, 2008).

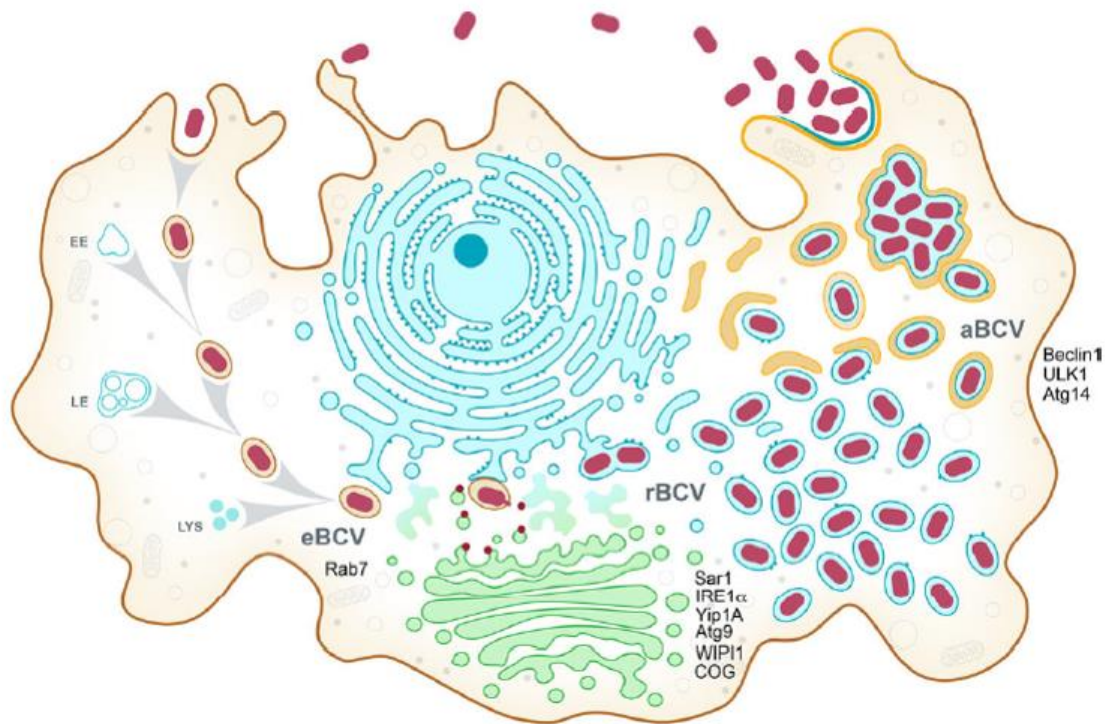


Figura 7. Subversão de vias intracelulares do hospedeiro para origem do nicho replicativo da *Brucella abortus* no interior de macrófagos e posterior egresso para disseminação em células vizinhas. A *Brucella abortus* no ambiente intracelular interage com as rotas naturais de degradação. A capacidade de usufruir de mecanismos do hospedeiro sustenta a sua permanência. A acidificação do endossomo tardio ativa a expressão do seu maior fator de virulência: o sistema de secreção do tipo IV virB (T4SS). O T4SS é um mecanismo de evasão essencial para *Brucella*, que permite sua intensa replicação após fusão de eBCVs com as cisternas do ER (rBCV). Após intensa replicação nessa organela, a *Brucella* utiliza proteínas da via autofágica (Beclin 1, ULK1 e ATG14L) como subsídio para seu egresso de uma célula, para então infecção de uma outra vizinha. Fonte da imagem (CELLI, J., 2019).

Outra classe de molécula pertencente à *B. abortus* são as lipoproteínas de membrana externa (Omp - *outer membrane proteins*), como as Omp16 e Omp19, que são capazes de se ligar aos receptores TLR2 e TLR4, e desencadear a produção das citocinas TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-10, evento importante para o controle inicial da infecção (GIAMBARTOLOMEI, G. H. *et al.*, 2004; PASQUEVICH, K. A. *et al.*, 2010). Além de modular o sistema imune inato do

hospedeiro, a *B. abortus* apresenta capacidade de interferir no papel da imunidade adaptativa e, portanto, pode persistir e estabelecer uma infecção crônica (BARRIONUEVO, P. *et al.*, 2019). Após a apresentação de antígenos para células T CD4⁺ mediada pelas DCs, esses linfócitos migram para órgãos alvos, porém não conseguem erradicar a *Brucella* do organismo hospedeiro (BARRIONUEVO, P. *et al.*, 2019). A permanência da *Brucella* no hospedeiro pode ser parcialmente atribuída ao seu potencial em diminuir a expressão de MHC-II induzido por IFN- γ , o que interfere no processamento e na apresentação de antígenos pela linhagem monócitos/macrófagos para linfócitos TCD4⁺ (BARRIONUEVO, P. *et al.*, 2019; VELASQUEZ, L. N. *et al.*, 2017). A inibição da expressão do MHC-II na infecção pela *B. abortus* é dependente da ligação prolongada do inibidor-chave desse processo – Omp19 - ao receptor TLR2 (BARRIONUEVO, P. *et al.*, 2008; VELASQUEZ, L. N. *et al.*, 2017). Além disso, a *B. abortus* pode inibir a apresentação de antígenos pelo MHC-II através do seu LPS não-canônico que é capaz de formar macrodomínios na membrana plasmática de APCs (FORESTIER, C. *et al.*, 2000). Esses mecanismos que envolvem o escape intracelular de macrófagos, têm impacto significativo na alteração da resposta imune adaptativa em pacientes com brucelose (BARRIONUEVO, P. *et al.*, 2008).

Os inflamassomas atuam como complexos citoplasmáticos multiproteicos induzidos por meio de PAMPs e DAMPs. Essas plataformas controlam a ativação da enzima proteolítica caspase-1. A caspase-1 é responsável pela maturação de citocinas pró-inflamatórias da família IL-1, o que inclui a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-18 (IL-18) (LATZ, E. *et al.*, 2013). Dois sinais são necessários para a produção de IL-1 β e IL-18. O primeiro sinal regula a expressão dos componentes do inflamassoma, assim como a síntese de pró-IL-1 β e pró-IL-18. O segundo sinal promove a montagem e ativação do inflamassoma (JO, E. K. *et al.*, 2016). Durante o processo de ativação, os inflamassomas recrutam a proteína adaptadora ASC (*Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a CARD*), que atua como uma ponte

molecular entre uma proteína sensora (NLRP1, NLRP3, NLRP12, NAIP1, NAIP2, NAIP5 ou AIM2) e a proteína pró-caspase-1. O recrutamento de pró-caspase-1 desencadeia a sua autocatálise em caspase-1 (HOSS, F. *et al.*, 2017; MARIM, F. M. *et al.*, 2017). O sensor molecular determina a especificidade do inflamassoma em relação à detecção de produtos microbianos ou sinais de estresse celular (MARIM, F. M. *et al.*, 2017). A ativação do inflamassoma NLRP3 é mediada por uma variedade de DAMPs. Um desses sinais é o aumento do efluxo de potássio que pode ser promovido por toxinas formadoras de poros, como a nigericina (HORNUNG, V. *et al.*, 2008). Outros DAMPs são também capazes de ativar o inflamassoma NLRP3, como o estresse do RE e a disfunção mitocondrial. Além disso, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) induz a ativação deste inflamassoma (ELLIOTT, E. I. *et al.*, 2015).

Recentemente, foi elucidado em nosso laboratório a ativação do inflamassoma NLRP3 através da via não-canônica dependente de caspase-11 na infecção pela *B. abortus*. O LPS não-canônico de *B. abortus* escapa da vigilância da superfície celular pelo TLR4, entretanto, quando presente no citosol, ele é reconhecido por meio da caspase-11. O nosso grupo demonstrou que caspase-11 reconhece o LPS de *B. abortus* e ativa a piroptose em macrófagos com auxílio da proteína ligadora de guanilato GBP5, que contribui se associando aos BCVs e atuando no rompimento do vacúolo e liberação de PAMPs para o citoplasma (**Figura 8**) (CERQUEIRA, D. M. *et al.*, 2018; GOMES, M. T. R. *et al.*, 2019). É sugerido que após clivagem da gasdermina-D (GSDMD) pela caspase-11 ativada pelo LPS, a subunidade N-terminal oligomerize para formação de poros na membrana celular, através dos quais ocorre o efluxo de K^+ . O efluxo de K^+ ativa o inflamassoma NLRP3, o que desencadeia o recrutamento e ativação de caspase-1, e então a produção e liberação de IL-1 β (CERQUEIRA, D. M. *et al.*, 2018; GOMES, M. T. R. *et al.*, 2019). Nosso grupo, também já demonstrou que camundongos deficientes para NLRP3, ASC, caspase 1, caspase 11, GSDMD e IL-1R são mais susceptíveis

à infecção pela *B. abortus* (CERQUEIRA, D. M. *et al.*, 2018; GOMES, M. T. *et al.*, 2013). Portanto, a produção de IL-1 β está associada ao controle da replicação desta bactéria, o que inclui a ativação do inflamassoma NLRP3 pela via não-canônica.

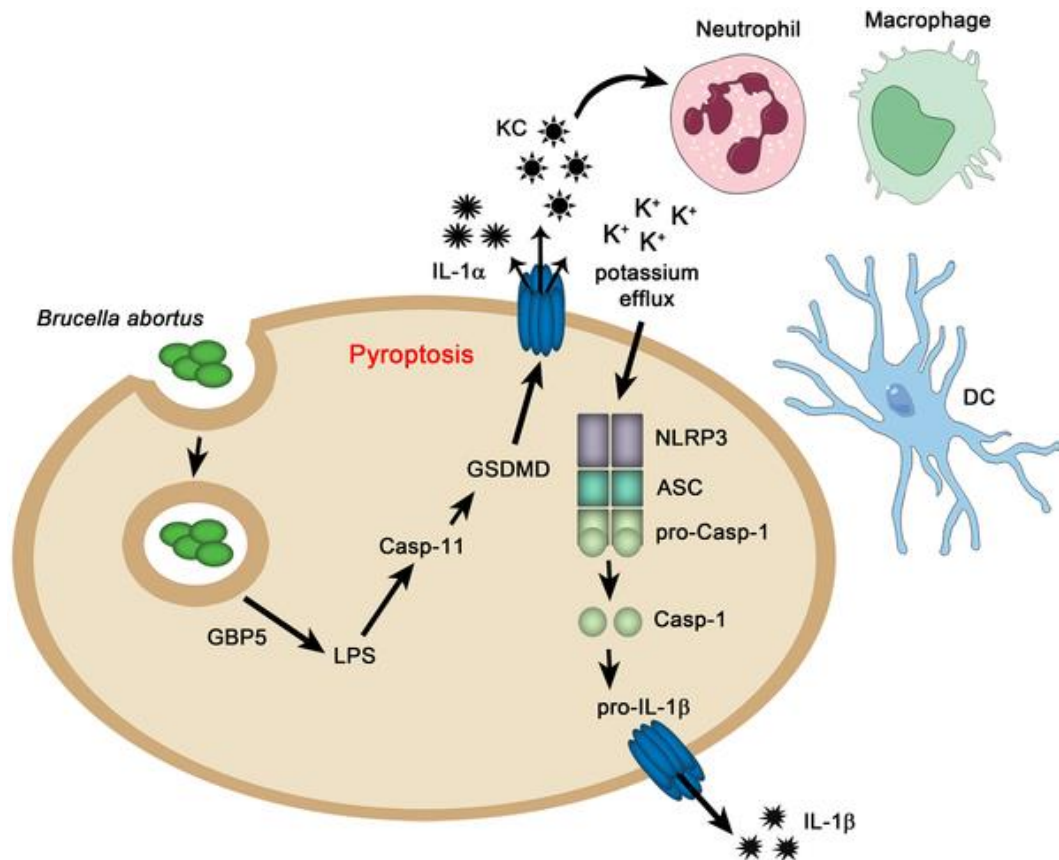


Figura 8. A ativação não-canônica mediada pela caspase-11 culmina em formação de poros na membrana, efluxo de K^+ e consequentemente na ativação do inflamassoma NLRP3. Este modelo demonstra que após ser fagocitada, a *B. abortus* se estabelece no interior do BCV. Com auxílio da GBP5, o LPS é liberado no ambiente citoplasmático e ativa caspase-11. Em seguida, caspase-11 cliva GSDMD e a porção N-terminal desta molécula oligomeriza e forma poros na membrana plasmática por meio dos quais há o efluxo de potássio. Este último ativa NLRP3. Fonte da imagem (CERQUEIRA, D. M. *et al.*, 2018).

Diante do exposto, torna-se evidente que a *B. abortus* apresenta mecanismos eficientes de subversão do sistema imune inato e adaptativo conferidos pelas características “silenciadoras” deste patógeno até estabelecimento da infecção. Uma vez que a linhagem monócitos/macrófagos é o principal nicho replicativo dessa bactéria, acreditamos que a imunidade treinada induzida pelo BCG nessas células possa potencializar os mecanismos de controle contra a infecção pela *B. abortus*. Este estudo está pautado na hipótese de que o BCG

Moreau é capaz de induzir imunidade treinada em células da medula óssea, que se diferenciarão em macrófagos mais responsivos à *B. abortus*, o que contribuirá para um melhor controle da infecção.

2.0 JUSTIFICATIVA

Além de ser a vacina utilizada para controle da tuberculose desde 1921, o BCG é utilizado na terapia contra o câncer de bexiga após remoção cirúrgica como forma de evitar recidivas da doença. Esta bactéria atenuada tem sido alvo de pesquisa devido à sua capacidade de desencadear efeitos benéficos não-específicos contra doenças neurodegenerativas e infecções não-relacionadas. Esses efeitos têm sido associados à atividade potencializada do sistema imune inato, principalmente macrófagos e células NK, fenômeno denominado de imunidade treinada. Outra característica importante é a capacidade adjuvante conferida pela administração do BCG. O BCG é um ativador do sistema imune, sendo capaz de desencadear uma resposta polarizada Th1. Esta vacina é estável, de baixo custo e apresenta segurança para administração em recém-nascidos. Levando em consideração as propriedades do BCG já discutidas até então, este estudo visa investigar se os efeitos desencadeados pela imunidade treinada induzida pelo BCG podem resultar na proteção contra a infecção pela bactéria patogênica *Brucella abortus*. Esta bactéria é responsável por causar a brucelose, uma zoonose difundida mundialmente e negligenciada, que acomete a saúde humana e animal. Além da possível contaminação dos consumidores de produtos de origem animal, a brucelose pode causar perda da produtividade em rebanhos bovinos e tornar a carne, leite e seus derivados vulneráveis às barreiras sanitárias no mercado internacional. Embora negligenciada, a brucelose no Brasil representa um problema de saúde pública devido aos custos de tratamento e ao impacto social, que pode levar à incapacidade dos pacientes acometidos, à redução da qualidade de vida e, em menor frequência, ao óbito. Além disso, essa patologia leva à uma perda de 32 milhões de dólares para a economia brasileira anualmente (POESTER, F. P. *et al.*, 2002) e uma perda anual de mais de 600 milhões de dólares para a América Latina (HERRERA, E. *et al.*, 2008). Ademais, existe uma demanda da WHO por estratégias alternativas ao uso de antibióticos, principalmente contra bactérias Gram-negativas, devido à aquisição de resistência bacteriana ser mais rápida do que o

desenvolvimento de novas drogas (WHO, 2020), nesse sentido a imunidade treinada pode ser uma alternativa viável. A elucidação dos possíveis efeitos protetores desencadeados pela imunidade treinada da linhagem monócitos/macrófagos que resultem no controle da brucelose é de fundamental importância para que novas estratégias profiláticas e terapêuticas possam ser desenvolvidas. Os macrófagos treinados pelo BCG podem resultar em um maior controle do crescimento intracelular bacteriano, contribuir para uma resposta imune inata mais eficaz e impactar na melhora da comunicação entre sistema imune inato e sistema imune adaptativo. A imunidade treinada representa uma nova abordagem na perspectiva de memória imunológica e o entendimento dos seus mecanismos pode contribuir para aplicações futuras, como, por exemplo, na tecnologia do desenvolvimento de vacinas que atualmente é baseada na memória imune clássica.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o papel da imunidade treinada induzida pelo BCG em macrófagos contra a infecção mediada pela bactéria patogênica *Brucella abortus* e elucidar os mecanismos envolvidos nesse processo.

3.2 Objetivos específicos

- (i) Avaliar se macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) provenientes de camundongos treinados com o BCG apresentam maior responsividade à bactéria *B. abortus*, determinando o nível de produção de citocinas pró-inflamatórias e de expressão de moléculas coestimuladoras na superfície celular;
- (ii) Investigar a via canônica e não-canônica do inflamassoma em BMDMs treinados pelo BCG no contexto da infecção pela *B. abortus*, por meio da avaliação de moléculas constituintes dessas vias, como NLRP3, pró-IL-1 β , caspase-1, caspase-11 e GSDMD;
- (iii) Avaliar se BMDMs treinados pelo BCG apresentam perfil metabólico alterado, a nível de ativação da via Akt/mTOR/S6K, antes e durante a infecção pela bactéria *B. abortus*;
- (iv) Avaliar o perfil inflamatório de BMDMs treinados pelo BCG durante a infecção pela *B. abortus*, através da determinação do nível de transcritos e da expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e arginase 1 (ARG1), além de determinar os níveis de óxido nítrico (NO) produzidos por essas células;
- (v) Avaliar se BMDMs treinados pelo BCG apresentam alteração na capacidade de controle do crescimento intracelular da *B. abortus in vitro*;
- (vi) Investigar se camundongos C57BL/6 selvagens e RAG^{-/-} treinados pelo BCG controlam diferencialmente a infecção desencadeada pela *B. abortus*, por meio da avaliação da carga

bacteriana em órgãos acometidos, assim como pela avaliação do peso relativo destes órgãos;

- (vii) Confirmar se os efeitos mediados pela imunidade treinada induzida pelo BCG *in vivo* envolvem a medula óssea, via transferência passiva deste órgão de camundongos previamente treinados para camundongos naive receptores.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Camundongos e ética

Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil. Camundongos deficientes para a enzima RAG-1 (RAG^{-/-}), e consequentemente desprovidos de imunidade adaptativa, foram gerados na linhagem C57BL/6 e gentilmente fornecidos pela Dra. Ana Caetano de Faria (AGUIAR, S. L. F. *et al.*, 2017). Todos os animais foram alojados em um sistema de rack ventilada e em um ciclo padrão de 12/12h claro/escuro. Camundongos fêmeas e machos de seis a oito semanas de idade foram utilizados e distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais. O enriquecimento ambiental padronizado (iglu vermelho e forrageamento) foi utilizado visando o bem-estar animal. O Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG aprovou os procedimentos experimentais com os camundongos sob nº de protocolo 45/2018.

4.2 Cepas bacterianas e condições de crescimento

A cepa *Mycobacterium bovis* BCG Moreau e a cepa virulenta *Brucella abortus* S2308 foram utilizadas para os experimentos *in vitro* e *in vivo*. O BCG foi cultivado em meio Difco™ Middlebrook 7H9 (BD Biosciences) enriquecido com 0,05% de Tween 80 (Synth), 0,2% de glicerol (Synth) e 10% de ácido oleico-albumina-dextrose-catalase (OADC) até a fase logarítmica (OD_{600nm} = 0,7-0,8; aproximadamente 21 dias), conforme descrito anteriormente (MARINHO, F. V. *et al.*, 2020). A *B. abortus* foi cultivada em meio *Brucella Broth* (BB) (BD Biosciences) por 3 dias sob agitação constante (180 r.p.m, 37°C). Ambas as suspensões bacterianas foram peletizadas (4000 r.p.m, 4°C), suspensas em glicerol 10% e congeladas a -80°C até o uso.

Para quantificação do estoque de BCG, alíquotas foram serialmente diluídas em solução aquosa contendo 0,05% de Tween 80, plaqueadas em meio Difco™ Middlebrook 7H11 (BD

Biosciences) e incubadas a 37°C durante 21-35 dias. Após incubação, foi contado o número de unidades formadoras de colônia (CFUs). Para quantificação do estoque de *B. abortus*, alíquotas foram serialmente diluídas em solução salina, plaqueadas em meio BB ágar e incubadas a 37°C durante 3 dias. Após incubação, foi contado o número de CFUs.

4.3 Modelo de indução de imunidade treinada

A imunidade treinada foi induzida em camundongos C57BL/6 através da imunização intravenosa (i.v.) com 1×10^6 CFUs de BCG. Todos os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com xilazina (dosagem: 12,5 mg/kg) e cetamina (dosagem: 100 mg/kg) antes da imunização. Após 30 dias de imunização, visando a eliminação do BCG dos animais, foi administrado um tratamento pela via oral, em que a água para ingestão foi suplementada com 100 mg/L de Isoniazida (INH; Sigma-Aldrich) e 100 mg/L de Rifampicina (RIF; Sigma-Aldrich). O tratamento oral com INH/RIF perdurou 30 dias adicionais e foi seguido por um período de *washout*, em que houve o retorno do fornecimento de água pura durante 15 dias (KAUFMANN, E. *et al.*, 2018). Os camundongos não treinados seguiram o mesmo protocolo, exceto para imunização com o BCG. Como controle interno do experimento, 1×10^7 células da medula óssea (BM) e células do baço foram plaqueadas em meio ágar Middlebrook 7H11 (BD Biosciences) suplementado com 0,5% de glicerol e 10% de OADC a fim de conferir a eficácia do tratamento com INH/RIF.

4.4 Desafio dos camundongos com a *B. abortus*, determinação de CFUs e mensuração do peso relativo de órgãos

Camundongos C57BL/6 e RAG^{-/-}, treinados com o BCG e não treinados, foram desafiados i.p com 1×10^6 CFUs de *B. abortus*. Os camundongos foram eutanasiados 7 ou 15 dias após infecção (d.p.i). O baço e o fígado foram coletados assepticamente de cada animal. Ambos os órgãos foram pesados e os resultados estão apresentados como porcentagem do peso corporal (% BW). Um terço do baço e do fígado foram macerados em solução salina (NaCl

0,9%) com o auxílio de pequenas telas de aço, diluídos serialmente e plaqueados em duplicata em BB ágar. Após 3 dias de incubação a 37°C, o número de CFUs foi determinado conforme descrito anteriormente (CERQUEIRA, D. M. *et al.*, 2018). Os resultados estão apresentados como média de CFU por órgão.

4.5 Geração de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)

Para obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs), camundongos C57BL/6 treinados com o BCG e não treinados foram eutanasiados para a extração de fêmures e tíbias. As células da BM foram coletadas em PBS frio e cultivadas em 10 mL de DMEM (Gibco) suplementado com 10% de FBS (Gibco), 1% de HEPES (Gibco) e 20% de meio condicionado de células L929 (LCCM), como fonte de M-CSF. Após 4 dias de incubação a 37°C em atmosfera de 5% CO₂, foram adicionados 10 mL de DMEM fresco e suplementado. No dia 7, os BMDMs foram coletados por meio de incubação com PBS suplementado com 1% de EDTA (Gibco) por 20 min a 4°C (10 mL/placas de Petri).

4.6 Cinética de crescimento da *B. abortus*

Para experimentos de cinética de crescimento bacteriano, os BMDMs foram cultivados em placas de 24 poços (5x10⁵ células/poço), contendo DMEM enriquecido com 10% de FBS e 1% de HEPES. Antes de ser utilizada para infecção, *B. abortus* foi crescida em meio BB por 1 dia a 37°C sob agitação constante. No dia seguinte, a densidade óptica (OD) foi utilizada como referência para a carga bacteriana (OD_{600nm} 1 = 3x10⁹ CFU/mL). A suspensão bacteriana foi centrifugada (5000 r.p.m, 10 minutos, TA), suspendida em DMEM e usada para infecção de BMDMs (MOI 10:1) em 300 µL/poço. Alternativamente, o estímulo com IFN-γ (10 ng/mL) foi conduzido *overnight* antes da infecção pela *B. abortus*. As placas foram brevemente centrifugadas (1200 r.p.m), visando garantir o contato entre *B. abortus* e BMDMs. Após 4 horas de incubação a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, os BMDMs foram lavados duas vezes com PBS aquecido para remover as bactérias não engolfadas e incubados em DMEM

suplementado por até 48 horas. Para quantificação do número de bactérias intracelulares, os macrófagos foram lisados com H₂O estéril nos tempos 0, 24 e 48 horas pós-infecção. Diluições seriadas do lisado celular foram plaqueadas em BB contendo 1,5% de ágar. Após 3 dias de incubação a 37°C, o número de CFUs foi determinado.

4.7 Desafio de BMDMs com a *B. abortus*

BMDMs foram cultivados em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço) com DMEM suplementado com 1% de FBS e 1% de HEPES. O desafio de BMDMs foi realizado com *B. abortus* (MOI 100:1) por 8, 12 ou 18 horas. Como controle positivo geral, as células foram estimuladas com 1 µg/mL de LPS de *E. coli* (Sigma-Aldrich). Como controle positivo para ativação do inflamassoma, as células foram estimuladas com 1 µg/mL de LPS de *E. coli* (Sigma-Aldrich) por 4 horas, seguido pela adição de 20 µM de nigericina (Sigma-Aldrich) nos 45 minutos finais da incubação.

4.8 Análise do perfil transcricional por RT-qPCR

BMDMs provenientes de camundongos treinados com o BCG ou não treinados foram utilizados para os experimentos de RT-qPCR antes da estimulação e após o desafio *in vitro* com *B. abortus* por 8 ou 18 horas. A extração do RNA foi realizada com TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante. 1 µg do RNA total foi transcrito reversamente (RT), usando oligo-dT em uma concentração final de 0,125 µg/µL, dNTPs 0,625 mM, DTT 0,01 M, transcriptase reversa 0,1 U, tampão de transcriptase reversa 1x e água livre de nuclease para um volume final de 20 µL. Os parâmetros de ciclagem utilizados foram 42°C por 60 min e 70°C por 15 min. A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), oligo-dT cDNA, 0,5 µM de *primers* e água livre de nuclease para um volume final de 10 µL. A reação de PCR foi realizada em um instrumento QuantStudio3 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os parâmetros de ciclagem utilizados foram 60°C por 10 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C

por 15s e 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 *primers* foram usados para amplificar um fragmento específico correspondente a genes murinos alvos, conforme mostrado na **Tabela 2**. Todos os dados estão apresentados como unidades de expressão relativa após normalização com o gene constitutivo β -actina (método $2^{-\Delta\Delta CT}$). As medições foram realizadas em triplicata.

Tabela 2. Primers usados para as análises de RT-qPCR

Primer	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
Nlrp3	TGCTCTTCACTGCTATCAAGCCCT	ACAAGCCTTTGCTCCAGACCCTAT
Nos2/iNOS	AGCACTTTGGGTGACCACCAGGA	AGCTAAGTATTAGAGCGGCGGCA
Arg1	TGACATCAACACTCCCCTGACAAC	GCCTTTTCTTCCCTTCCCAGCAG
Actb/ β -actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

4.9 Análise de proteínas por western blotting

O lisado celular proveniente de cultura de BMDMs foi coletado antes da estimulação e após o desafio *in vitro* com *B. abortus* por 12 e 18 horas. Alternativamente, o lisado celular foi coletado 10 e 30 minutos após o desafio para análise de p-Akt. A lise celular foi realizada com o *Mammalian Protein Extraction Reagent* (M-PER) (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF e 1:100 de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich). Quantidades iguais de proteína (25 μg de lisado celular) ou volumes iguais de sobrenadante (20 μL) foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida. Para proteínas com peso molecular maior ou igual a 100 kDa, foram utilizados géis de 10%. Para proteínas com peso molecular inferior a 100 kDa, foram utilizados géis de 15%. As proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), estas foram bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com TBS-T (TBS + 0,1% de Tween 20) contendo 5% de leite em pó desnatado e incubadas *overnight* com anticorpo primário. Subsequentemente, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas por 1 hora e 30

minutos a temperatura ambiente com anticorpo secundário IgG anti-rabbit ou anti-mouse em uma diluição de 1:1000. Os anticorpos primários anti-mouse usados estão mencionados na

Tabela 3.

As bandas imunorreativas foram visualizadas usando o *Luminol chemiluminescent HRP substrate* (Millipore, Billerica, MA, EUA) em um Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Os dados foram obtidos em relação ao nível de BMDMs não treinados e infectados com *B. abortus* por 18 horas. Portanto, BMDMs não treinados e infectados por 18 horas tiveram o valor arbitrário de 1.0, como descrito previamente (SILVEIRA, T. N. *et al.*, 2017). A intensidade das bandas foi quantificada e normalizada usando o software ImageJ.

Tabela 3. Anticorpos primários utilizados para análises por western blotting

Antibody	Clone	Manufacturer
Rabbit mAb p-Akt (Thr308)	244F9	Cell Signaling Technology
Rabbit mAb p-mTOR (Ser2448)	D9C2	Cell Signaling Technology
Rabbit Ab p-p70 S6K (Thr389)	-	Cell Signaling Technology
Mouse mAb Akt	40D4	Cell Signaling Technology
Mouse mAb mTOR	L27D4	Cell Signaling Technology
Rabbit p-p70 S6K	-	Cell Signaling Technology
Mouse mAb IL-1 β	3A6	Cell Signaling Technology
Mouse mAb p20 subunit of caspase 1	Casper 1	Adipogen
Mouse mAb NLRP3	Cryo-2	Adipogen
Mouse mAb Caspase 11	Flamy-1	Adipogen
Rabbit mAb GSDMD	EPR19828	Abcam
Rabbit mAb β -actin	13E5	Cell Signaling Technology

* A detecção do controle (β -actin) foi conduzida com o uso do anticorpo primário a uma diluição de 1:5000. Para a detecção das proteínas-alvo, os anticorpos primários foram utilizados a uma diluição de 1:1000.

4.10 Dosagem de citocinas por ELISA

BMDMs provenientes de camundongos treinados com o BCG ou não treinados foram desafiados com *B. abortus in vitro* por 18 horas. A produção de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-12p40 foi mensurada em sobrenadantes de cultura de BMDMs por ELISA usando kit comercial (R&D Diagnostic, Minneapolis, MN, Estados Unidos), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.11 Mensuração de nitrito pelo ensaio de Griess

Os sobrenadantes de BMDMs provenientes de camundongos treinados com BCG ou não treinados, estimulados com *B. abortus* por 18 horas, foram usados para medição de nitrito. A concentração de nitrito (NO₂⁻), um metabólito estável do NO, foi avaliada usando reagente de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% de dicloridrato de naftiletilenodiamina em 2,5% de ácido fosfórico). Resumidamente, 50 μ L de sobrenadantes provenientes de cultura de células foram misturados com 50 μ L de reagente de Griess em placa de 96 poços. Posteriormente, a mistura foi incubada por 20 minutos, protegida da luz, à temperatura ambiente e a absorbância foi medida a 550 nm em um leitor de microplacas. Meio de cultura fresco foi usado como branco. A quantidade de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) (DE QUEIROZ, N. *et al.*, 2021).

4.12 Experimento de transferência de medula óssea (BMT)

A transferência de medula óssea (BMT) foi realizada de camundongos C57BL/6, submetidos ao modelo de indução de imunidade treinada, para camundongos receptores naive C57BL/6. Os camundongos receptores foram submetidos à duas doses de irradiação de 4,5 Gy, com um intervalo de 3 horas entre as doses. No dia da irradiação, as células da BM foram extraídas de camundongos treinados com BCG ou não treinados e 3×10^7 células da BM foram injetadas i.v em cada camundongo receptor. A avaliação da depleção de células BM seguida de

sua reconstituição foi realizada por contagem de leucócitos no sangue periférico semanalmente. A contagem de leucócitos no sangue foi realizada em câmara de Neubauer com o corante Turk (1:20). Um mês após a BMT, quando o compartimento hematopoiético havia sido reconstituído, os camundongos quiméricos foram desafiados i.p com 1×10^6 CFUs de *B. abortus*. Os camundongos quiméricos foram eutanasiados 7 d.p.i. O CFU de *B. abortus* no baço foi avaliado, como anteriormente descrito.

4.13 Análise por citometria de fluxo

BMDMs provenientes de camundongos treinados com o BCG ou não treinados foram cultivados em placas de 96 poços (1×10^5 células/poço) com DMEM suplementado com 1% de FBS e 1% de HEPES. O desafio de BMDMs *in vitro* foi realizado com *B. abortus* (MOI 100:1) por 18 horas. As células foram incubadas com anticorpo anti-CD16/32 (FcBlock) (BD Biosciences) em tampão de FACS (PBS, 0,25% BSA, 1 mM NaN_3) por 20 minutos a 4°C. Para marcação intracelular, as células foram fixadas e permeabilizadas usando o BD Cytotfix/Cytoperm Kit (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. Os painéis de marcação foram utilizados a fim de avaliar o estado de ativação e o perfil inflamatório de macrófagos. Os anticorpos conjugados anti-mouse que foram utilizados se encontram na **Tabela 4**.

Tabela 4. Anticorpos conjugados utilizados para análise de citometria de fluxo

Antibody	Clone	Manufacturer
PE CD40	3/23	BD Biosciences
PE-Cy7 iNOS	CXNFT	Invitrogen
APC-ARG1	A1exF5	eBioscience
APC MHC-II	AF6-120.1	BD Biosciences
APC-Cy7 CD11b	M1/70	BD Biosciences
biotinylated F4/80	BM8	eBioscience

A estreptavidina conjugada com PerCP-Cy5.5 (Thermo Fisher Scientific) foi usada quando necessário. Os controles de isotipo apropriados foram utilizados. O equipamento *Attune Acoustic Focusing Cytometer* (Life Technologies) foi utilizado para coletar aproximadamente 100.000 eventos e os dados foram analisados usando o software FlowJo (Tree Star). Como estratégia de análise, as células totais foram selecionadas após *gating* em células duplo-positivas CD11b⁺F4/80⁺. Em seguida, a frequência de células CD40⁺, MHC-II⁺, iNOS⁺ e ARG1⁺ foi analisada (**Figura 9**). A intensidade média de fluorescência (MFI) foi também avaliada dentro da população de células duplamente positivas CD11b⁺F4/80⁺.

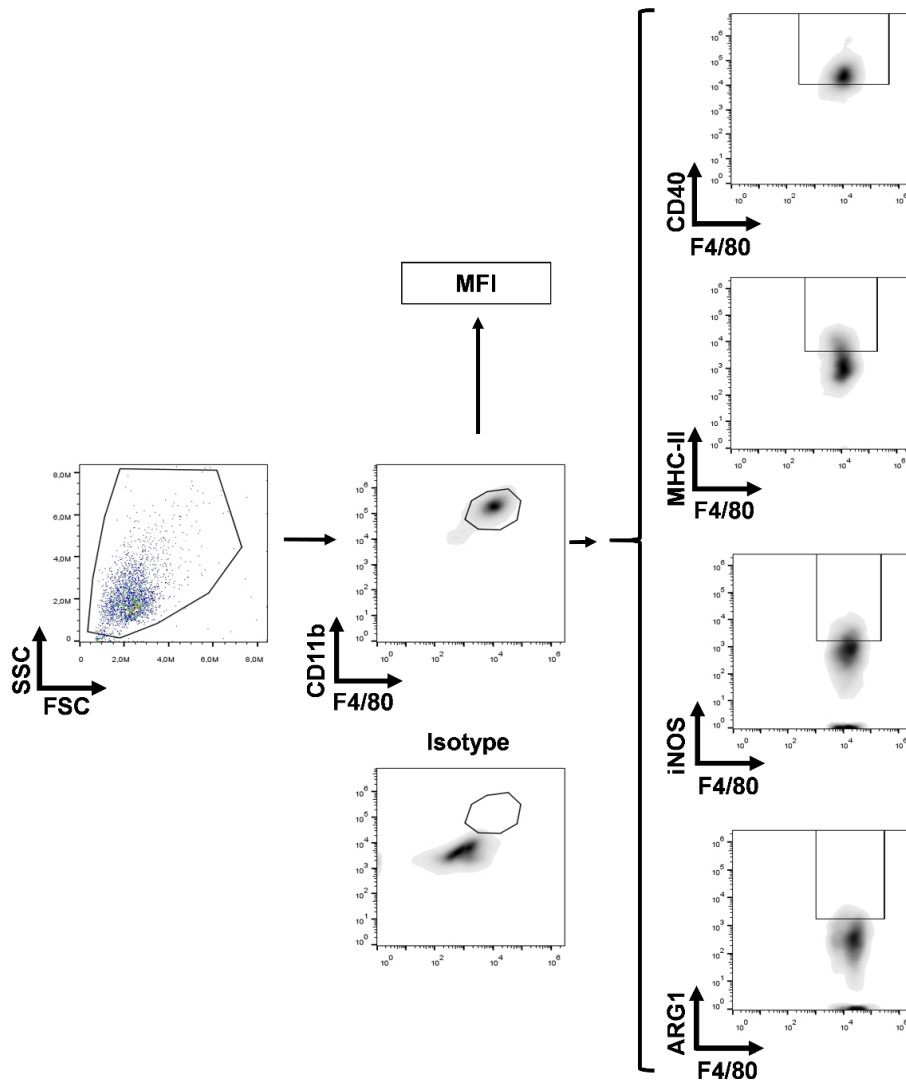


Figura 9. Estratégia de *gating* para avaliação da ativação de macrófagos e do perfil inflamatório dessas células. As células duplamente positivas CD11b⁺F4/80⁺ foram

selecionadas após a delimitação das células totais em gráficos SSC x FSC. Em seguida, foi analisada a frequência de células CD40⁺, MHC-II⁺, iNOS⁺ e ARG⁺. A intensidade média de fluorescência (MFI) foi avaliada dentro da população de células duplamente positivas CD11b⁺F4/80⁺.

4.14 Análise estatística

Antes da realização dos testes de hipóteses, os conjuntos de dados foram submetidos a testes de normalidade e igualdade de variância. As diferenças de médias dos conjuntos de dados obtidos foram testadas por two-way ANOVA seguido por teste post hoc de Bonferroni ($p < 0,05$), one-way ANOVA seguido por teste post hoc de Tukey ($p < 0,05$) ou teste t-Student ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.0 RESULTADOS

5.1 O treinamento com o BCG potencializa a resposta de macrófagos contra a infecção pela *B. abortus*

O BCG induz a expansão e a diferenciação de células tronco hematopoiéticas (HSCs) em precursores mieloides, que posteriormente podem se diferenciar em macrófagos mais eficientes no controle de infecções heterólogas (CIROVIC, B. *et al.*, 2020; KAUFMANN, E. *et al.*, 2018; ZHANG, B. Z. *et al.*, 2022). Nesse sentido, um trabalho pioneiro demonstrou que a administração do BCG pela via intravenosa (i.v) resultou em alterações celulares, imunes e epigenéticas na medula óssea (BM), levando a uma maior capacidade de resposta de macrófagos derivados contra a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. De forma importante, essas alterações se mantiveram mesmo após a eliminação do BCG do organismo (KAUFMANN, E. *et al.*, 2018). Esta abordagem confere uma memória imune inata com potencial de longa duração devido ao tempo de vida e a capacidade proliferativa das HSCs. A fim de induzir a imunidade treinada com o BCG, camundongos C57BL/6 foram imunizados com 1×10^6 CFUs de BCG pela via intravenosa (i.v). Após 30 dias, os camundongos foram tratados com os antibióticos antimicobacterianos, isoniazida (INH) e rifampicina (RIF), pela via oral. Este regime de tratamento foi conduzido por 30 dias adicionais para alcançar a eliminação do BCG em camundongos (**Figura 10A**). Posteriormente, foi iniciado um período de *washout*, no qual houve o retorno do fornecimento de água pura por 15 dias. O crescimento de BCG foi verificado na medula óssea (BM) e nas células do baço de camundongos imunizados com BCG, submetidos ao tratamento com INH/RIF ou não. O plaqueamento desses sítios anatômicos em meio apropriado mostrou que o tratamento com INH/RIF levou à eliminação do BCG (**Figura 10B-C**), o que sugere que qualquer fenótipo observado por meio deste modelo não está relacionado à presença residual do BCG. Além disso, nenhuma alteração

na obtenção de macrófagos após a diferenciação *in vitro* de células da BM foi observada entre os grupos treinado com o BCG e não treinado (**Figura 10D**).

A partir do término do *washout*, dois protocolos foram aplicados: (1) os BMDMs foram gerados *in vitro* e infectados com a *B. abortus* (MOI 100:1) ou (2) camundongos C57BL/6 foram infectados com 1×10^6 CFUs de *B. abortus* intraperitonealmente (i.p). A *B. abortus* apresenta mecanismos de evasão que prejudicam tanto a resposta do sistema imune inato quanto do adaptativo (CELLI, J., 2015; FORESTIER, C. *et al.*, 2000), levando à sua persistência no hospedeiro e à cronicidade da infecção (ATLURI, V. L. *et al.*, 2011). Uma vez que a imunidade treinada potencialmente leva ao aumento da expressão de moléculas inflamatórias, nós avaliamos se os macrófagos treinados com o BCG apresentam uma resposta potencializada contra a infecção pela *B. abortus*. A análise de ativação de macrófagos demonstrou que BMDMs treinados com o BCG têm uma frequência maior de células positivas para o MHC-II (MHCII⁺CD11b⁺F480⁺) quando comparado à população de macrófagos não treinados em resposta à *B. abortus* (**Figura 11A-B**). A intensidade média de fluorescência (MFI) para este marcador também foi significativamente aumentada na população de macrófagos treinados com o BCG, sugerindo uma maior expressão por célula (**Figura 11C**). Em relação à molécula coestimuladora CD40, o treinamento com o BCG aumentou significativamente a frequência de células positivas (CD40⁺CD11b⁺F480⁺), assim como o MFI em resposta à *B. abortus* quando comparado com células não treinadas (**Figura 11D-F**). Além da maior expressão de moléculas de superfície, o treinamento com o BCG induziu o aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (**Figura 11G**) e IL-12p40 (**Figura 11H**) após a infecção com a *B. abortus*. Surpreendentemente, não foi observada diferença no nível de TNF- α (**Figura 11I**). Em conjunto, esses resultados demonstram que a imunidade treinada induzida pelo BCG aumentou a expressão de marcadores de ativação e a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos em resposta à *B. abortus*.

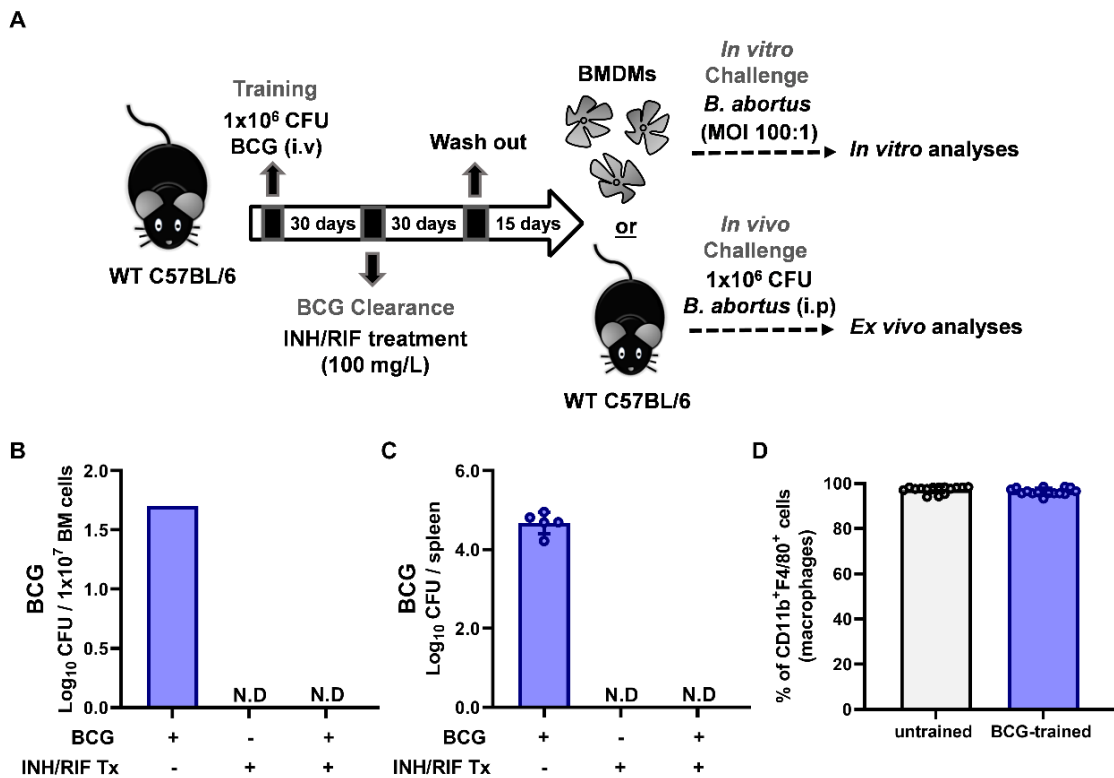


Figura 10. Modelo de indução de imunidade treinada mediada pelo BCG *in vivo*. (A) Layout do modelo *in vivo* de indução de imunidade treinada mediada pelo BCG. Resumidamente, a imunidade treinada foi induzida por imunização *i.v* com o BCG, seguido por tratamento com antibióticos e período de *washout*. Posteriormente, BMDMs foram obtidos para investigação *in vitro* ou camundongos foram desafiados com *B. abortus* para análises *in vivo*. O grupo não treinado seguiu o mesmo protocolo, exceto pela imunização com o BCG. (B) Camundongos C57BL/6 imunizados com o BCG ou não imunizados, submetidos ou não ao tratamento com INH/RIF, tiveram sua medula óssea extraída e 1×10^7 células da BM foram plaqueadas em meio 7H11 apropriado para BCG. (C) Baços de camundongos C57BL/6 treinados com o BCG ou não treinados, submetidos ou não ao tratamento com INH/RIF, foram macerados individualmente, diluídos e plaqueados em meio 7H11 apropriado para BCG. A ausência de crescimento do BCG dentre as células plaqueadas demonstra a eficiência do tratamento com INH e RIF para eliminação do BCG residual. (D) Após a diferenciação em macrófagos, cerca de 95% das células recuperadas apresentaram marcadores característicos de macrófagos (CD11b⁺F4/80⁺) para ambos os grupos, treinado com o BCG ou não treinado. Os dados mostrados são representativos de três experimentos independentes. (N.D: não detectado; Tx: tratamento).

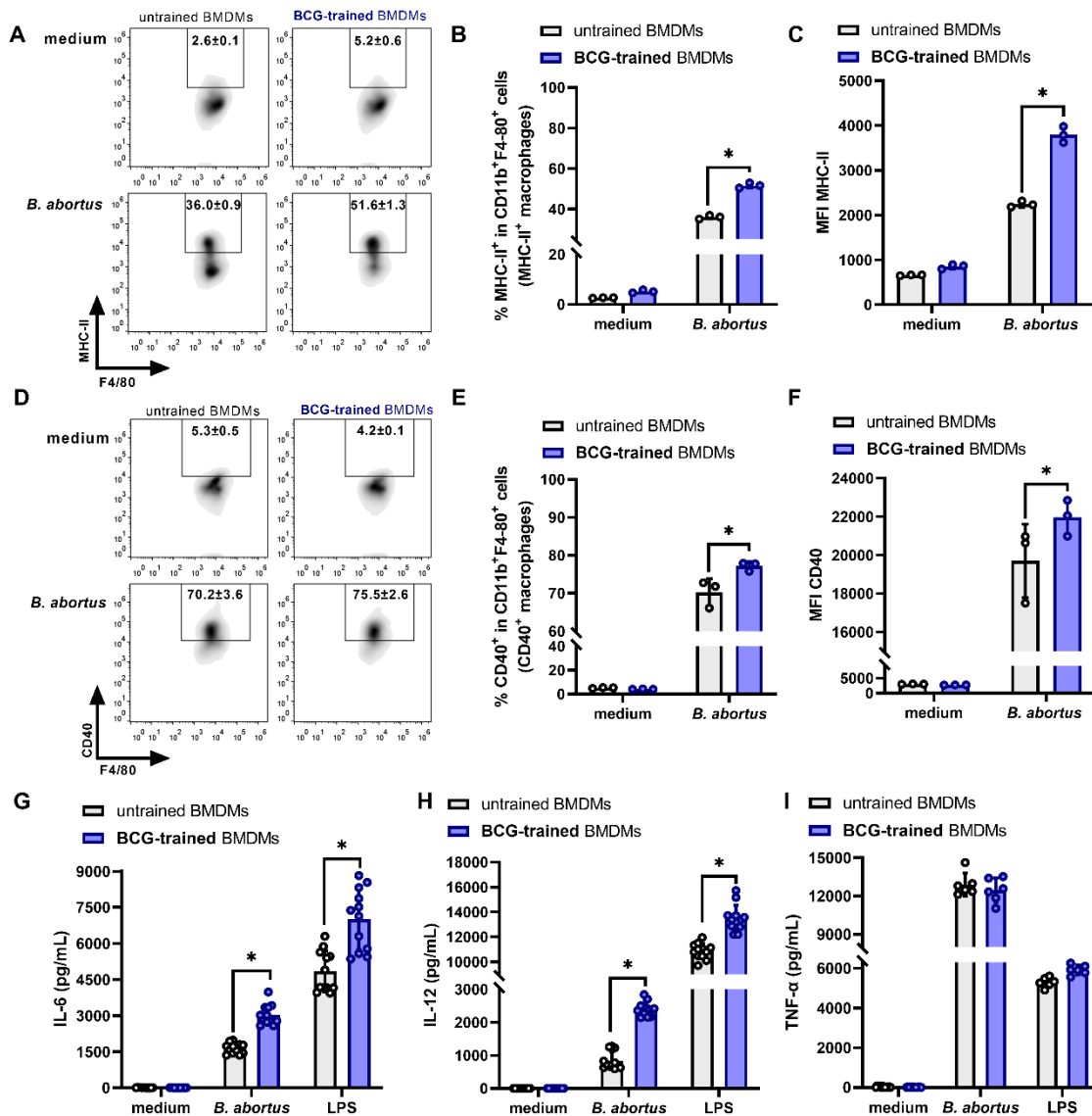


Figura 11. Macrófagos treinados pelo BCG são mais responsivos à bactéria patogênica *B. abortus*. Os macrófagos de camundongos C57BL/6 treinados com o BCG ou não treinados foram desafiados com *B. abortus* por 18 horas. Posteriormente, a expressão dos marcadores de superfície foi avaliada por citometria de fluxo. **(A-B)** Frequência de células MHCII⁺CD11b⁺F480⁺ (macrófagos MHCII⁺) e **(C)** intensidade média de fluorescência (MFI) dos macrófagos para MHC-II. **(D-E)** Frequência de células CD40⁺CD11b⁺F480⁺ e **(F)** MFI dos macrófagos para CD40. A produção das citocinas pró-inflamatórias **(G)** IL-6, **(H)** IL-12p40 e **(I)** TNF-α por BMDMs provenientes de camundongos C57BL/6 treinados com o BCG ou não-treinados foi avaliada no sobrenadante celular por meio de ELISA. Os dados estão apresentados como média ± SD. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o teste Two-way ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni. * p < 0,05 comparação entre BMDMs treinados com o BCG ou não treinados submetidos ao mesmo estímulo. O LPS foi utilizado como um controle positivo e interno do experimento. Os dados mostrados são representativos de três experimentos independentes.

5.2 Macrófagos treinados com o BCG apresentam enriquecimento da via canônica e não-canônica do inflamassoma durante a infecção pela *B. abortus*

Os inflamassomas são complexos citoplasmáticos multiproteicos que são induzidos por PAMPs e DAMPs. Eles controlam a ativação da procaspase-1. Esta enzima proteolítica é autoclivada na subunidade caspase-1 p20, que por sua vez é responsável pela conversão da pró-IL-1 β em IL-1 β madura (LATZ, E. *et al.*, 2013). Além disso, a subunidade caspase-1 p20 cliva GSDMD em GSDMD p30 (porção N-terminal) que se oligomeriza na membrana plasmática. Este evento pode desencadear morte celular por piroptose (CERQUEIRA, D. M. *et al.*, 2018; GOMES, M. T. *et al.*, 2013; GOMES, M. T. R. *et al.*, 2021). A ativação do inflamassoma NLRP3 e a secreção de IL-1 β contribuem para a resposta imunológica contra a infecção pela *B. abortus* (GOMES, M. T. *et al.*, 2013). Para entender como o treinamento pelo BCG influencia a via do inflamassoma em macrófagos no contexto desta infecção, nós primeiramente investigamos se houve alterações nos constituintes da via canônica. Os macrófagos treinados com o BCG apresentaram aumento da secreção de IL-1 β quando comparado ao grupo não treinado (**Figura 12A**). Além disso, uma expressão significativamente maior de pró-IL-1 β foi observada em macrófagos treinados pelo BCG, 12 e 18 horas após a infecção (**Figura 12B-C**). A avaliação de caspase-1 demonstrou que houve um aumento da sua subunidade p20 ativa em macrófagos treinados pelo BCG após infecção pela *B. abortus* (**Figura 12D-E**). Ademais, o treinamento com o BCG induziu uma maior transcrição de Nlrp3 em resposta à *B. abortus* (**Figura 12F**). Vale ressaltar que o próprio treinamento com o BCG (sem desafio com a *B. abortus*) resultou em uma maior transcrição de Nlrp3 em macrófagos (**Figura 13A-B**).

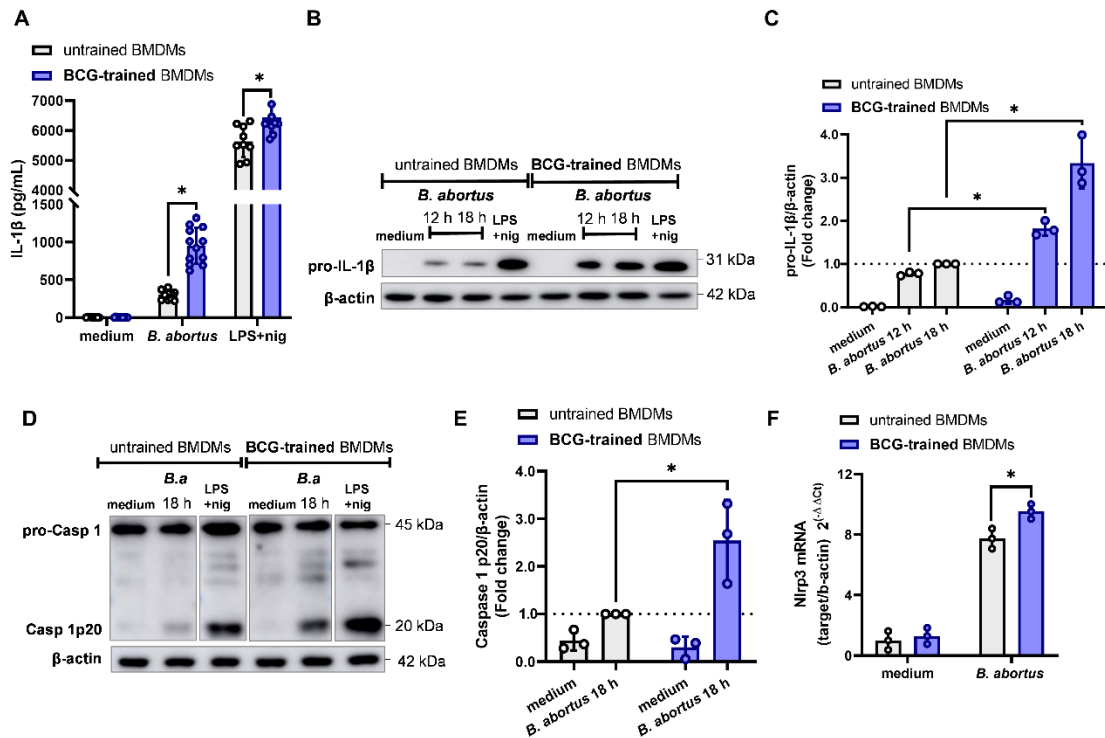


Figura 12. Macrófagos treinados com o BCG apresentam enriquecimento da via canônica do inflamassoma em resposta à *B. abortus*. (A) A produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β por BMDMs provenientes de camundongos C57BL/6 treinados com o BCG ou não-treinados foi avaliada no sobrenadante celular, após 18 horas de estimulação por meio de ELISA. (B) A expressão do zimogênio da IL-1 β (pró-IL-1 β) foi avaliada em BMDMs provenientes de camundongos C57BL/6 treinados com o BCG ou não-treinados no lisado celular, após 12 e 18 horas de estimulação. (C) A quantificação da pró-IL-1 β por densitometria está representada como o alvo em relação a proteína constitutiva β -actina. (D) Caspase-1 p20 foi mensurada no sobrenadante celular de BMDMs provenientes de camundongos C57BL/6 treinados com o BCG ou não-treinados, após 18 horas de estimulação. (E) A quantificação de caspase-1 p20 por densitometria está representada como o alvo em relação a proteína constitutiva β -actina. (F) O nível de transcritos de Nlrp3 foi determinado por meio da análise de RT-qPCR, após 8 horas de estimulação, usando o método $\Delta\Delta C_T$. Os dados gráficos estão apresentados como média \pm SD. A análise estatística foi conduzida utilizando o teste Two-way ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação aos macrófagos provenientes de camundongos não treinados submetidos ao mesmo estímulo e no mesmo período de estimulação. Como representado pela linha tracejada, os dados provenientes das análises de densitometria foram obtidos relativos aos BMDMs não treinados e infectados com *B. abortus* por 18 horas. Portanto, esta amostra está representada arbitrariamente com o valor de 1.0. O LPS+nig foi utilizado como um controle positivo para ativação do inflamassoma. Os dados mostrados em A e F são representativos de três experimentos independentes. Os gráficos das análises de densitometria (C e E) representam dados agrupados provenientes de três experimentos independentes.

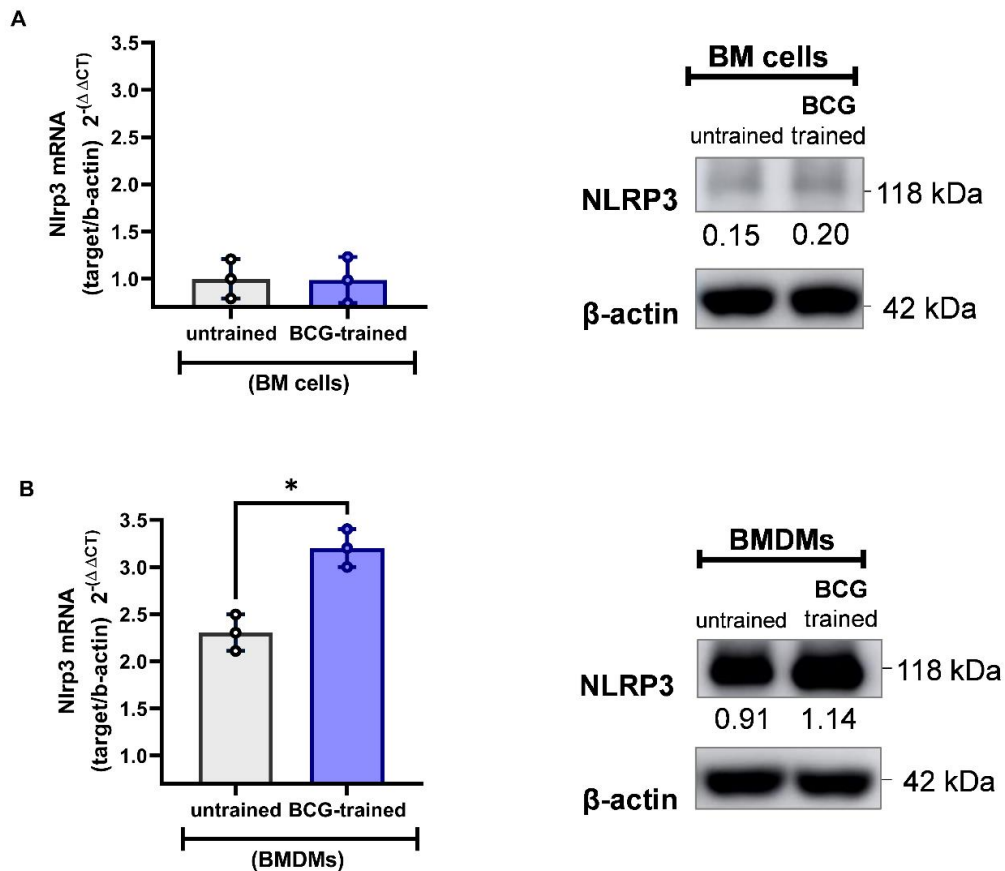


Figura 13. Macrófagos treinados pelo BCG apresentaram aumento da expressão de NLRP3 antes mesmo da infecção pela *B. abortus*. (A) A expressão de NLRP3 em células da medula óssea (*BM cells*) e (B) em BMDMs, provenientes de camundongos C57BL/6 treinados com o BCG ou não-treinados, foi mensurada no lisado celular por meio da análise de RT-qPCR usando o método $\Delta\Delta C_T$ e através da análise de western blotting. Os dados gráficos estão apresentados como média \pm SD. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student, * $p < 0,05$; comparando as células da BM ou BMDMs treinados com o BCG e não treinados. Os dados mostrados são representativos de três experimentos independentes.

A ativação não canônica do inflamassoma mediada pela caspase-11 é fundamental para a resposta imune contra a *B. abortus*. A caspase-11 reconhece o LPS de *B. abortus* no citoplasma e cliva GSDMD, levando à formação de poros e consequente ativação do inflamassoma NLRP3 (CERQUEIRA, D. M. *et al.*, 2018). Os macrófagos Casp11^{-/-} apresentam formação de poros atrasada e significativamente reduzida na membrana plasmática em resposta a esta bactéria (CERQUEIRA, D. M. *et al.*, 2018). Nós avaliamos a expressão de caspase-11 em macrófagos treinados com o BCG após a infecção pela *B. abortus*. Uma maior expressão de ambas as

isoformas p43 e p38 foi observada em células treinadas com o BCG quando comparado com células não treinadas (**Figura 14A-C**). Além disso, os macrófagos treinados com o BCG mostraram uma conversão ligeiramente aumentada de GSDMD *full length* (p53) em GSDMD p30 18 horas após a infecção pela *B. abortus* (**Figura 14D-E**). Esses dados, que incluem o aumento da secreção de IL-1 β , o maior processamento de caspase-1 e o aumento da expressão de caspase-11, sugerem que as vias canônica e não canônica do inflamassoma estão enriquecidas em macrófagos treinados pelo BCG em resposta à *B. abortus*. A ativação do inflamassoma não canônico mediada pela caspase-11 pode representar um mecanismo importante na imunidade treinada induzida pelo BCG contra *B. abortus*. Por fim, o aumento do nível transcricional de Nlrp3 sugere que o receptor possa estar envolvido na oligomerização do inflamassoma e consequente ativação da caspase-1, levando a uma maior secreção de IL-1 β .

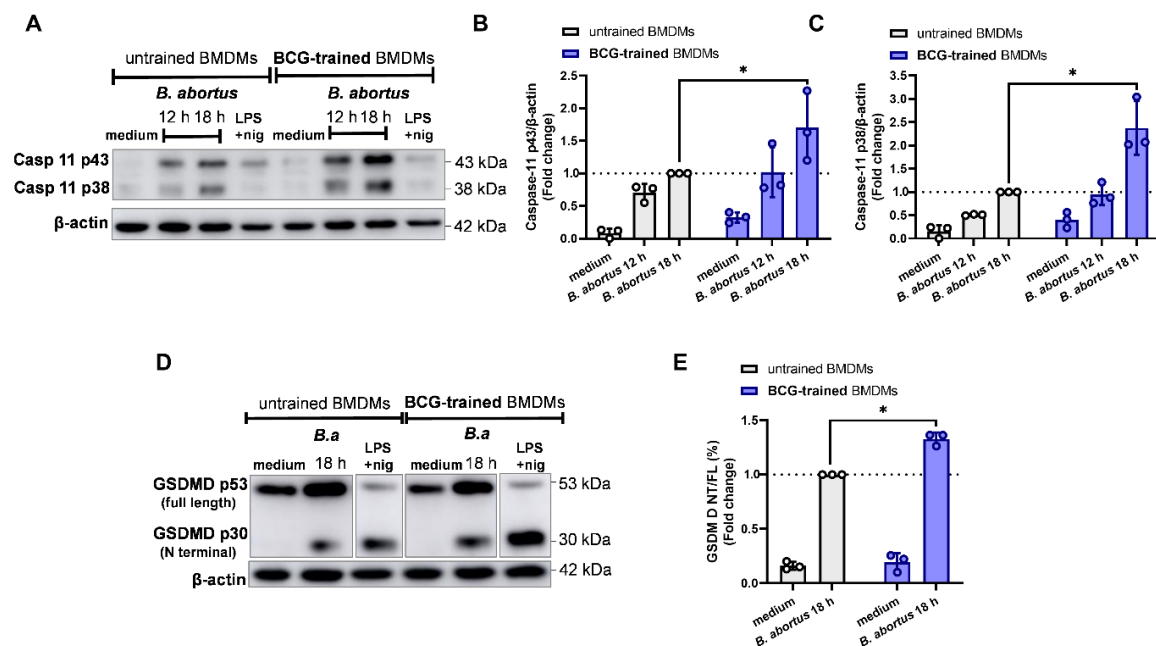


Figura 14. O inflamassoma não canônico mediado pela caspase 11 é enriquecido em macrófagos treinados pelo BCG em resposta à infecção pela *B. abortus*. Macrófagos provenientes de camundongos C57BL/6 treinados com o BCG ou não treinados foram desafiados com a *B. abortus* por 12 e 18 horas. **(A)** A expressão das isoformas p43 e p38 de caspase 11 foram mensuradas nos lisados celulares por western blotting. **(B)** A quantificação de caspase 11 p43 e **(C)** caspase 11 p38 por densitometria estão expressas como alvo em relação à proteína constitutiva β -actina. **(D)** GSDMD full length (FL) e GSDMD p30 (N-terminal ou NT) foram detectadas nos lisados celulares por western blotting. **(E)** A conversão de GSDMD FL em GSDMD NT foi quantificada por densitometria. Os dados gráficos estão apresentados

como média \pm SD. As análises estatísticas foram realizadas por Two-way ANOVA seguido pelo teste post hoc de Bonferroni, * $p < 0,05$ comparando BMDMs treinados com o BCG e não treinados submetidos ao mesmo estímulo. Como representado pela linha tracejada, os dados provenientes das análises de densitometria foram obtidos relativos aos BMDMs não treinados e infectados com *B. abortus* por 18 horas. Portanto, esta amostra está representada arbitrariamente com o valor de 1.0. LPS+nigericina foi utilizado como controle positivo para ativação do inflamassoma. Os gráficos das análises de densitometria (B, C e E) representam dados agrupados provenientes de três experimentos independentes.

5.3 O treinamento com o BCG desencadeia a ativação da via Akt/mTOR/S6K em macrófagos em resposta à *B. abortus*

O *mammalian target of rapamycin* (mTOR) é uma enzima quinase importante para a regulação do metabolismo celular. Dois complexos distintos de proteínas contêm o mTOR como constituinte de suas unidades catalíticas: mTORC1 e mTORC2 (BYLES, V. *et al.*, 2013; MUKHOPADHYAY, S. *et al.*, 2016). Após estimulação, a fosforilação da enzima serina-treonina quinase Akt leva à ativação de mTORC1 (WEICHHART, T. *et al.*, 2015). Em seguida, a fosforilação da proteína ribossômica p70 S6 quinase (S6K) na Thr389, um alvo canônico a jusante do mTORC1, resulta na ativação de transcrição e tradução de muitos processos celulares (MUKHOPADHYAY, S. *et al.*, 2016). Além disso, o complexo mTORC1 desempenha um papel fundamental na mudança imunometabólica para um perfil inflamatório em macrófagos contra diferentes infecções bacterianas (HALOUL, M. *et al.*, 2019; LACHMANDAS, E. *et al.*, 2016; LIN, L. R. *et al.*, 2018). Nossos resultados demonstram o eixo Akt/mTOR/S6K enriquecido em células da medula óssea treinadas pelo BCG e em macrófagos derivados dessas células antes da infecção bacteriana (**Figura 15A-B**). Adicionalmente, após a detecção de *B. abortus*, a ativação de Akt foi significativamente aumentada em macrófagos treinados pelo BCG quando comparado aos macrófagos não treinados (**Figura 16A-B**). Além disso, houve um aumento significativo na fosforilação de mTOR mediada por Akt, e consequentemente, na ativação de p70 S6K nessas células treinadas pelo BCG após desafio com a *B. abortus* (**Figura**

16C-E). Em conjunto, esses dados demonstram que o eixo Akt/mTOR/S6K é ativado antes e após o desafio com a *B. abortus* em macrófagos treinados pelo BCG.

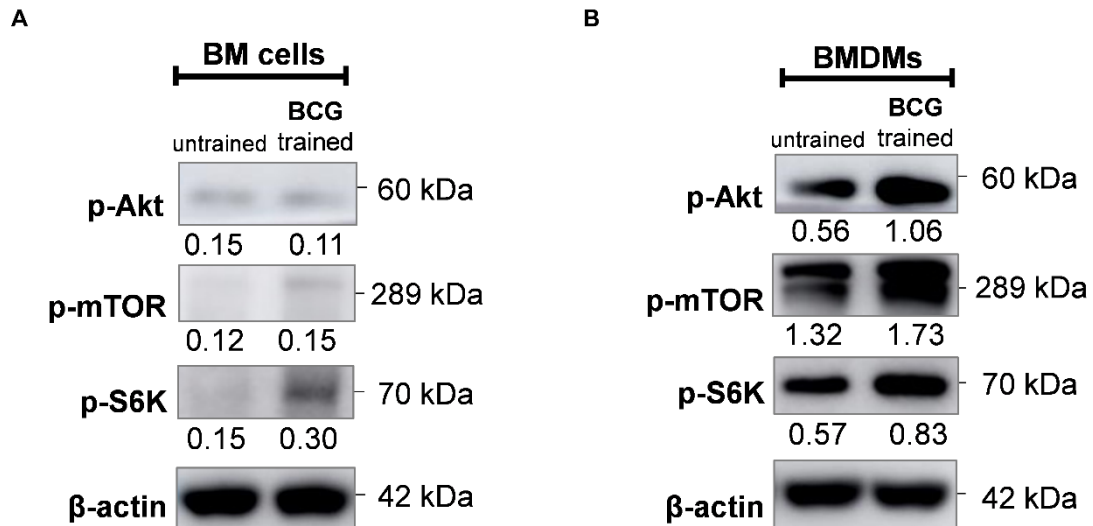


Figura 15. Macrófagos treinados pelo BCG apresentaram enriquecimento da via Akt/mTOR/S6K antes mesmo da infecção pela *B. abortus*. A fosforilação de Akt em Thr308 (p-Akt), a fosforilação de mTOR em Ser2448 (p-mTOR) e a fosforilação de S6K em Thr389 (p-S6K) foram mensuradas nos lisados celulares provenientes de (A) células da medula óssea (*BM cells*) e (B) BMDMs (antes da estimulação bacteriana) pela análise de western blotting. Os dados mostrados são representativos de três experimentos independentes.

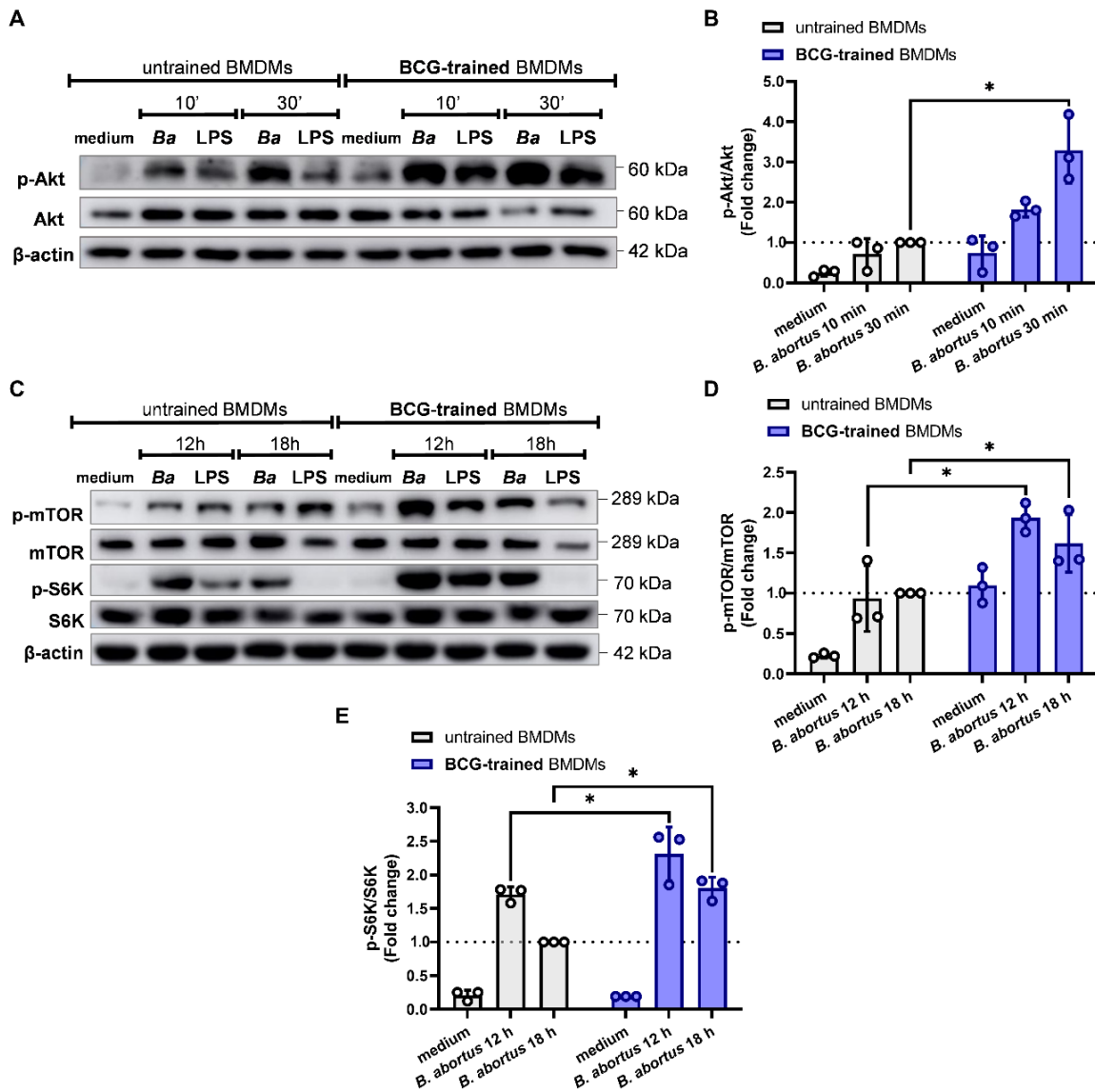


Figura 16. A via Akt/mTOR/S6K é mais ativa em macrófagos treinados pelo BCG após o desafio com a *B. abortus*. (A) A fosforilação de Akt em Thr308 (p-Akt) foi mensurada em BMDMs de camundongos C57BL/6 treinados com o BCG ou não treinados nos lisados celulares após 10 e 30 minutos de estimulação, por meio da análise de western blotting. (B) A quantificação de p-Akt por densitometria é expressa como alvo em relação à proteína total Akt. (C) A fosforilação de mTOR na Ser2448 (p-mTOR), que é mediada por Akt, bem como a fosforilação de S6K na Thr389 (p-S6K), foram avaliadas em BMDMs de camundongos C57BL/6 treinados com o BCG ou não treinados nos lisados celulares após 12 e 18 horas de estimulação, por meio da análise de western blotting. (D) A quantificação de p-mTOR e (E) p-S6K por densitometria estão expressas como alvo em relação às proteínas totais mTOR e S6K, respectivamente. Os dados gráficos estão apresentados como média \pm SD. As análises estatísticas foram realizadas por Two-way ANOVA seguido do teste post hoc de Bonferroni, * $p < 0,05$ comparando BMDMs treinados com o BCG e não treinados submetidos ao mesmo estímulo. Como representado pela linha tracejada, os dados provenientes das análises de densitometria foram obtidos relativos aos BMDMs não treinados e infectados com *B. abortus* por 30 minutos ou 18 horas. Portanto, estas amostras estão representadas arbitrariamente com o valor de 1.0. O LPS foi usado como controle positivo e interno do experimento. Os gráficos

das análises de densitometria (B, D e E) representam dados agrupados provenientes de três experimentos independentes.

5.4 O treinamento com o BCG potencializa a capacidade de controle da replicação intracelular da *B. abortus* pelos macrófagos

Dentre os mecanismos que regem a plasticidade dos macrófagos, as vias de sinalização são marcantes para caracterizar a heterogeneidade dessas células. Estímulos diferentes podem levar a perfis transcricionais e funcionais contrastantes (LOCATI, M. *et al.*, 2020). Nesse sentido, os macrófagos inflamatórios são caracterizados por elevada produção de citocinas inflamatórias, maior expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e aumento da produção de NO, uma importante molécula antimicrobiana (GOMES, M. T. R. *et al.*, 2021). Uma maior frequência de células positivas para iNOS (iNOS⁺CD11b⁺F480⁺) (**Figura 17A-B**), associado à uma maior MFI de iNOS (**Figura 17C-D**) foram observadas na população de macrófagos treinados pelo BCG versus macrófagos não treinados em resposta à *B. abortus*. Além disso, nós observamos que a imunidade treinada mediada pelo BCG induziu um nível transcricional de iNOS mais elevado em macrófagos em resposta à *B. abortus* (**Figura 17E**). O aumento da expressão de iNOS culminou em uma maior produção de NO pelas células treinadas (**Figura 17F**). Apesar de estudos prévios demonstrarem que a infecção pela *B. abortus* leva à uma redução na expressão da enzima arginase 1 (ARG1) (GOMES, M. T. R. *et al.*, 2021), não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos treinado pelo BCG e não treinado para esta molécula (**Figura 18A-C**).

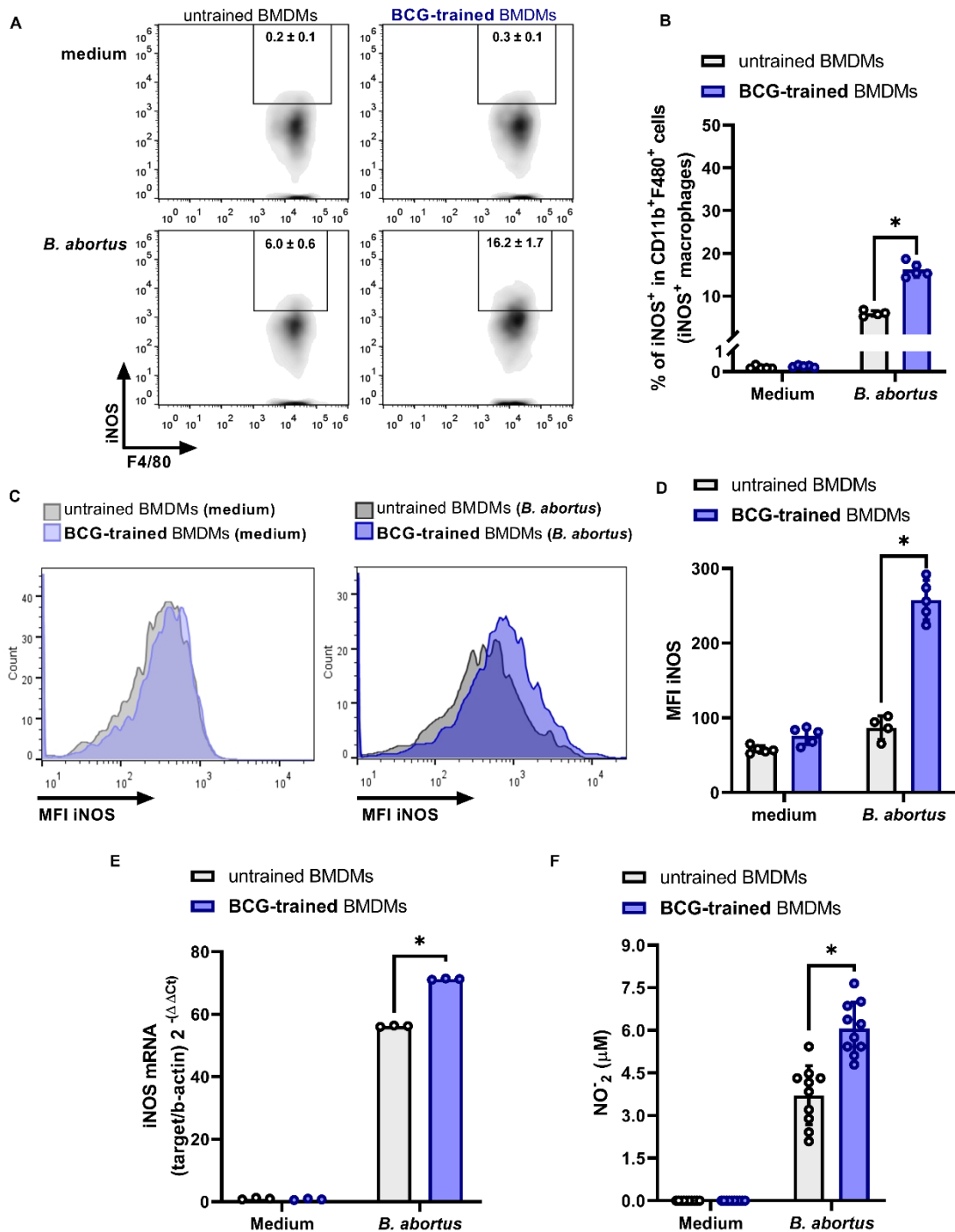


Figura 17. O treinamento com o BCG potencializa o perfil inflamatório em macrófagos em resposta à *B. abortus*. (A-B) Frequência de células iNOS⁺CD11b⁺F480⁺ (macrófagos iNOS⁺) e (C-D) MFI de iNOS em macrófagos após 18 horas de estimulação. (E) O nível transcricional de iNOS foi determinado por RT-qPCR após 18 horas de estimulação usando o método $\Delta\Delta Ct$. O resultado está expresso como o alvo em relação ao gene constitutivo β -actina. (F) A medição de acúmulo de nitrito (NO₂⁻) foi realizada em BMDMs de camundongos C57BL/6 treinados com o BCG ou não treinados, nos sobrenadantes da cultura de células, após 18 horas de estimulação pela reação de Griess. Os dados estão apresentados como média \pm SD. As análises estatísticas foram realizadas usando Two-way ANOVA seguido do teste post hoc de Bonferroni, * $p < 0,05$ comparando BMDMs treinados com o BCG e não treinados submetidos ao mesmo estímulo. Os dados mostrados são representativos de três experimentos independentes.

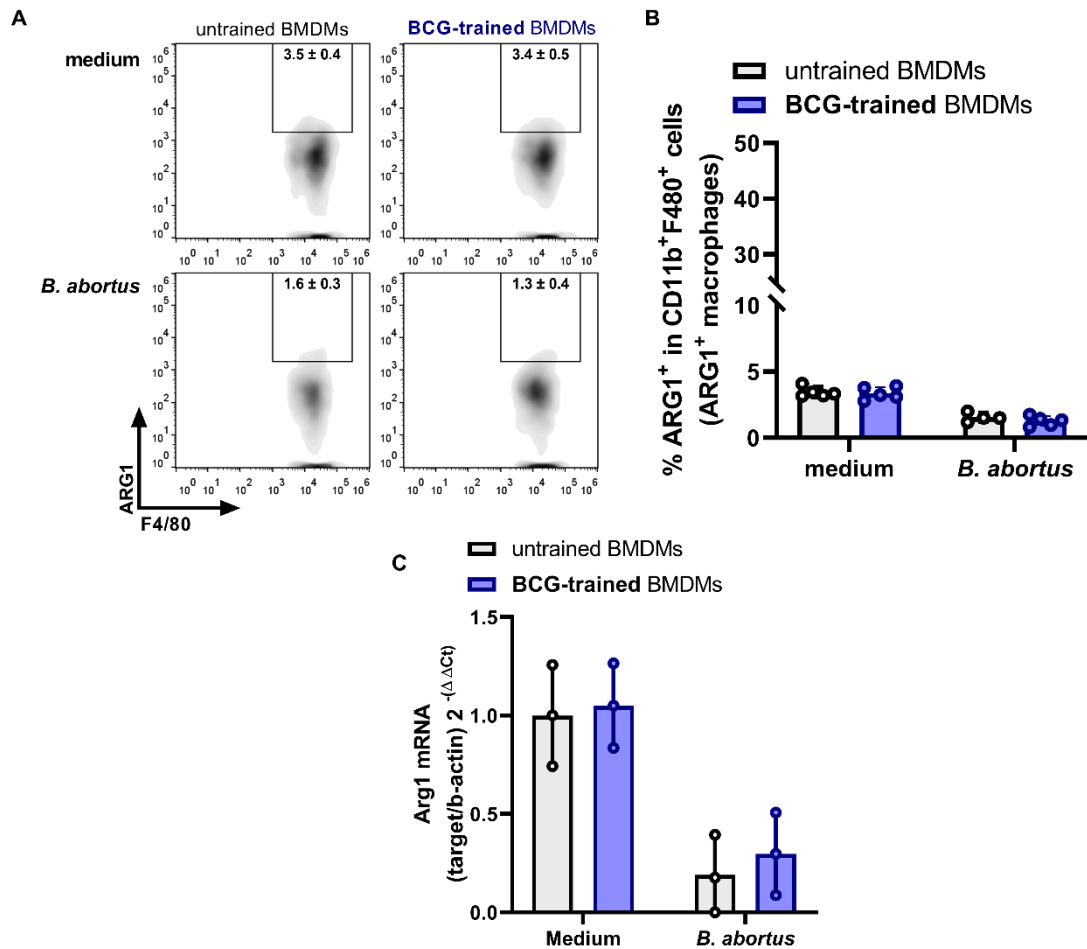


Figura 18. O treinamento com o BCG não influenciou a expressão da molécula ARG1 em resposta à *B. abortus*. (A-B) Frequência de células ARG1⁺CD11b⁺F480⁺ (macrófagos ARG1⁺) após 18 horas de estimulação. (C) O nível transcricional de ARG1 foi determinado por RT-qPCR após 18 horas de estimulação usando o método $\Delta\Delta\text{CT}$. O resultado está expresso como o alvo em relação ao gene constitutivo β -actina. Os dados estão apresentados como média \pm SD. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando Two-way ANOVA seguido do teste post hoc de Bonferroni. Os dados mostrados são representativos de três experimentos independentes.

Em seguida, nosso objetivo foi avaliar se o treinamento com o BCG influencia no controle do crescimento intracelular de *B. abortus* pelos macrófagos. Nós demonstramos que o treinamento com o BCG aumenta a capacidade de controle do crescimento intracelular de *B. abortus* pelos macrófagos, conforme observado pela redução da carga bacteriana após 48 horas de infecção (**Figura 19**). Uma diferença de aproximadamente 0,5 log₁₀ CFU/mL de *B. abortus* foi observada entre os macrófagos treinados com o BCG e não treinados. Além disso, os macrófagos sob condição de treinamento exibiram uma melhoria adicional na capacidade de

controle do crescimento intracelular da *B. abortus* após a ativação mediada pelo IFN- γ (Figura 19), com uma diferença de cerca de 1,0 log₁₀ CFU/mL entre os grupos treinado e não treinado. Esses dados demonstram que os macrófagos treinados com o BCG apresentam expressão aumentada de iNOS, uma produção mais elevada de NO e estas células possuem uma capacidade aprimorada de controlar o crescimento intracelular de *B. abortus*, sobretudo sob ativação mediada por IFN- γ .

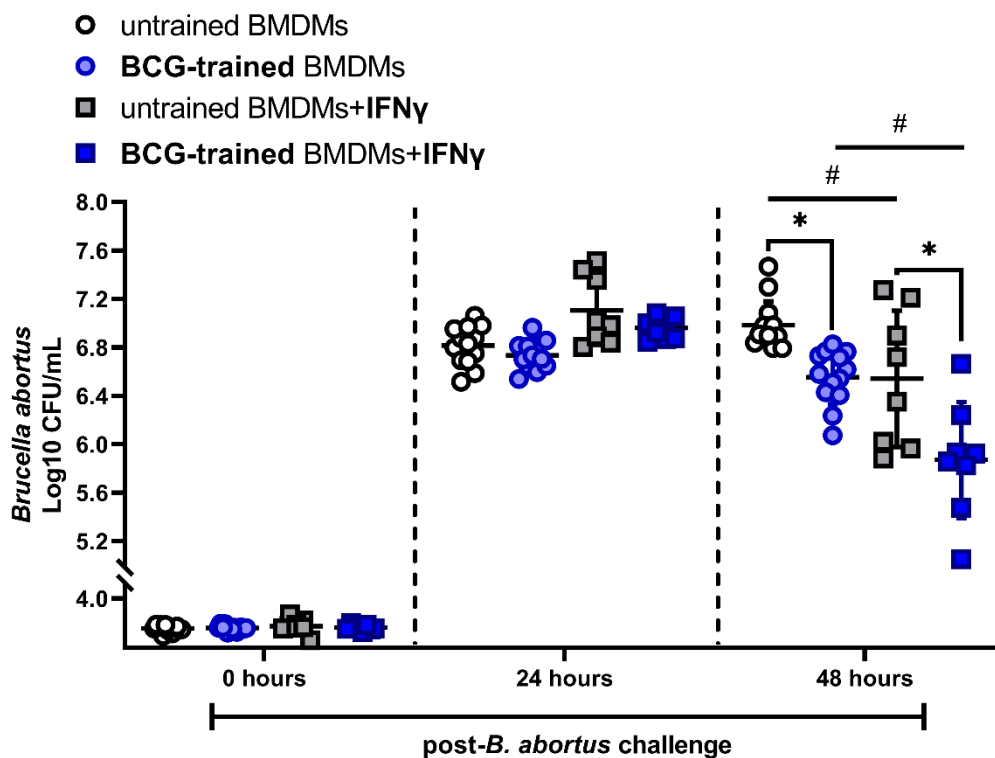


Figura 19. Macrófagos treinados com o BCG apresentam maior capacidade de controle do crescimento intracelular de *B. abortus*. BMDMs foram lavados para remoção de bactérias extracelulares após 4 horas de infecção pela *B. abortus*. O crescimento bacteriano foi monitorado até 48 horas por contagem de CFUs. Alternativamente, os BMDMs foram estimulados *overnight* com IFN- γ antes da infecção pela *B. abortus*. A contagem de CFUs de *B. abortus* foi realizada como mencionado anteriormente. Os dados estão apresentados como média \pm SD. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando Two-way ANOVA seguido do teste post hoc de Bonferroni, * $p < 0,05$ comparando BMDMs treinados com o BCG e não treinados, # $p < 0,05$, comparando BMDMs treinados com o BCG ou não-treinados com os respectivos grupos submetidos a estimulação exógena com IFN- γ . O gráfico representa dados agrupados provenientes de pelo menos dois experimentos independentes.

5.5 A imunidade treinada mediada pelo BCG confere maior resistência aos camundongos C57BL/6 contra à infecção pela *B. abortus*

A infecção ocasionada pela *B. abortus* tende a ser crônica e persistente. Dentre as alterações mais comuns nesta doença estão a esplenomegalia e a hepatomegalia. A sobrevivência e o crescimento de *B. abortus* dentro dos fagócitos levam à sua disseminação sistêmica. Posteriormente, esta bactéria estende a infecção para outras células da linhagem mielóide, como macrófagos do fígado e do baço (ATLURI, V. L. *et al.*, 2011; PAPPAS, G. *et al.*, 2005). Inicialmente, nós investigamos se a imunização com o BCG por si só influencia no controle da *B. abortus*. Dessa forma, 30 dias após a injeção de BCG i.v, camundongos C57BL/6 e RAG^{-/-} foram infectados com 1x10⁶ CFUs de *B. abortus* i.p, a fim de mimetizar a disseminação sistêmica desta bactéria. Nós observamos que a vacinação prévia com o BCG contribuiu para a redução da carga de *B. abortus* no baço de camundongos C57BL/6 em 7 e 15 dias após a infecção (d.p.i) (**Figura 20A**). Além disso, os camundongos C57BL/6 previamente imunizados apresentaram menor peso relativo do baço e do fígado em comparação ao grupo controle não imunizado em 7 e 15 d.p.i (**Figura 20B-C**). Como a esplenomegalia e a hepatomegalia são alterações comuns observadas na brucelose (PAPPAS, G. *et al.*, 2005), esses resultados sugerem que os animais foram menos comprometidos pela doença. É importante ressaltar que a imunização prévia com o BCG resultou em uma capacidade elevada de controle da carga de *B. abortus* no baço de camundongos RAG^{-/-} quando comparado ao grupo controle não imunizado em 7 d.p.i (**Figura 20D**). Em conjunto, esses dados sugerem que o BCG é capaz de ativar o sistema imunológico, desencadeando uma resposta imune protetora contra *B. abortus* em camundongos. A redução da carga de *B. abortus* no baço de camundongos RAG^{-/-} sugere ainda um papel importante do sistema imune inato neste modelo, devido ao fato desses camundongos não apresentarem sistema imune adaptativo funcional.

A fim de descartar a coinfeção como um fator de proteção, o modelo de imunidade treinada mediado pelo BCG foi conduzido conforme mostrado na **Figura 10**, o que inclui o tratamento com os antibióticos INH/RIF para garantir a remoção de qualquer estimulação decorrente da presença remanescente do BCG. Posteriormente, camundongos C57BL/6 foram infectados com 1×10^6 CFUs de *B. abortus* i.p. Para investigar principalmente a relevância da imunidade inata nesse modelo, foram realizadas análises em 7 d.p.i, quando a resposta imune inata é preponderante. Camundongos C57BL/6 treinados com o BCG mostraram maior capacidade de controle do número de *B. abortus* no baço (**Figura 21A**) e no fígado (**Figura 21B**) quando comparado ao grupo controle. Além disso, camundongos treinados com o BCG apresentaram menores pesos relativos do baço (**Figura 21C**) e do fígado (**Figura 21D**). Esses dados sugerem que a imunidade treinada induzida pelo BCG favorece o controle da infecção pela *B. abortus* em camundongos C57BL/6, mesmo após a eliminação residual do BCG do organismo.

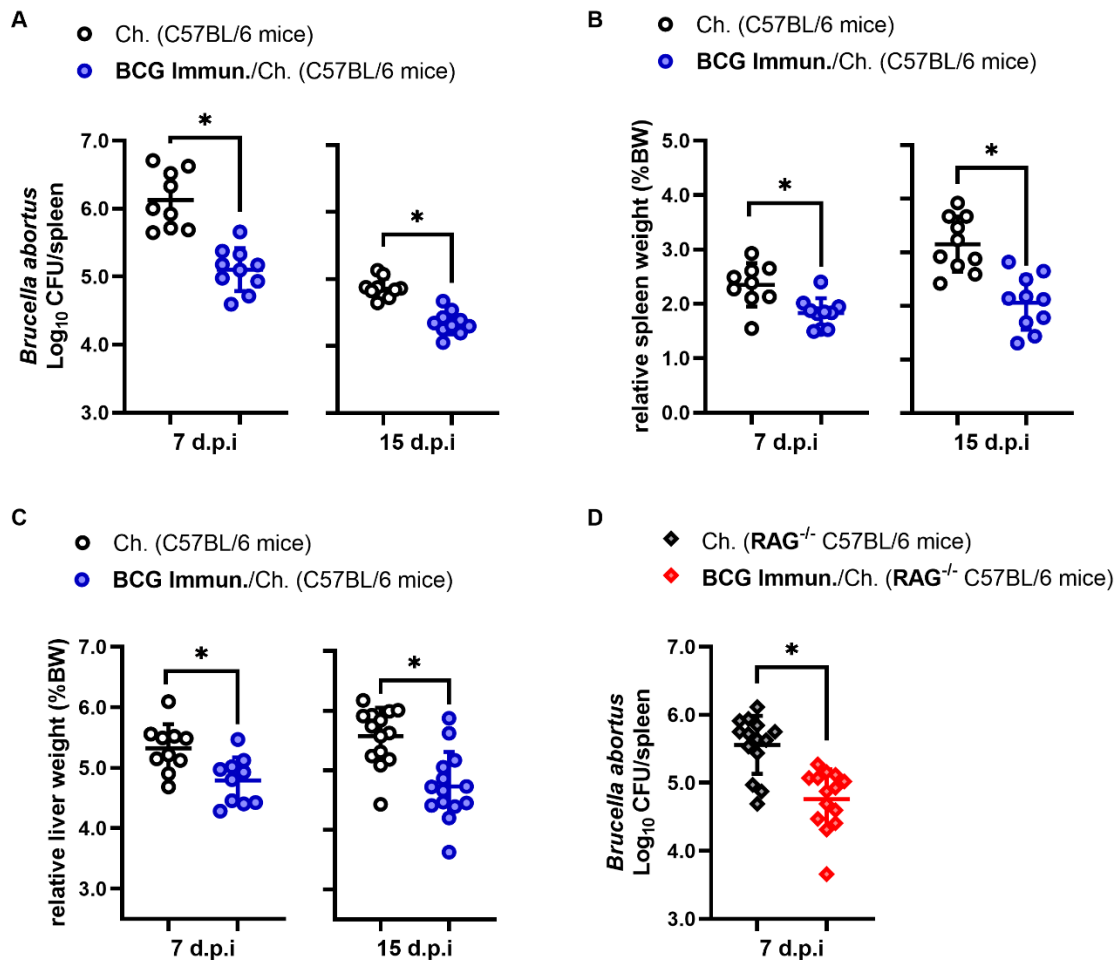


Figura 20. A imunização prévia com o BCG desencadeia uma resposta imune protetora contra *B. abortus* em camundongos. (A) O baço de camundongos C57BL/6 previamente imunizados com o BCG ou não imunizados foi macerado individualmente, diluído e plaqueado em 7 e 15 d.p.i pela *B. abortus*. A carga bacteriana foi avaliada por meio da contagem de CFUs. **(B)** O peso relativo do baço e **(C)** do fígado estão representados como porcentagem do peso corporal (% BW). **(D)** O baço de camundongos C57BL/6 $RAG^{-/-}$ previamente imunizados com o BCG ou não imunizados foi macerado individualmente, diluído e plaqueado em 7 d.p.i pela *B. abortus*. A carga bacteriana foi medida por meio da contagem de CFUs. Os dados estão apresentados como média \pm SD. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student, * $p < 0,05$ comparando camundongos C57BL/6 ou $RAG^{-/-}$ previamente imunizados com o BCG e não imunizados submetidos ao mesmo período de infecção (7 ou 15 d.p.i). (Ch: camundongos naive desafiados com a *B. abortus*; Immun/Ch: camundongos imunizados com o BCG e após 30 dias desafiados com a *B. abortus*). Os gráficos representam dados agrupados provenientes de pelo menos dois experimentos independentes, ($n = 10 - 14$).

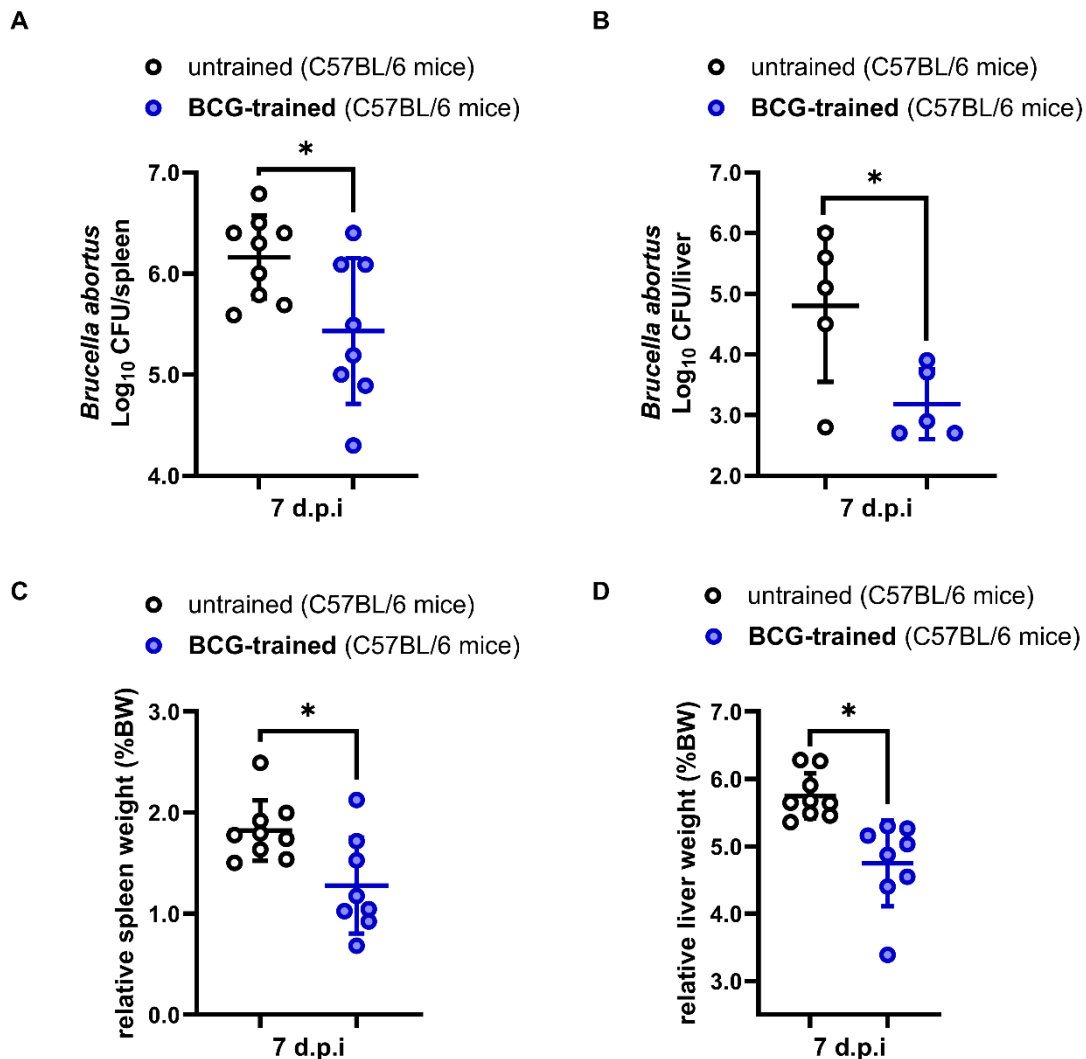


Figura 21. Camundongos C57BL/6 treinados pelo BCG apresentam controle potencializado da *B. abortus* em 7 d.p.i. (A) O baço e (B) o fígado de camundongos C57BL/6 treinados com o BCG ou não treinados foram macerados individualmente, diluídos serialmente e plaqueados 7 d.p.i com *B. abortus*. A carga bacteriana foi avaliada por meio da contagem de CFUs. (C) O peso relativo do baço e (D) do fígado foram avaliados como porcentagem do peso corporal (% BW). Os dados estão apresentados como média \pm SD. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student, * $p < 0,05$ comparando camundongos treinados com o BCG e não treinados após infecção pela *B. abortus*. Os gráficos A, C e D representam dados agrupados provenientes de dois experimentos independentes, ($n = 8 - 9$). O gráfico B representa um único experimento conduzido, ($n = 5$).

5.6 A transferência de medula óssea (BMT) para camundongos naive pode transmitir a proteção fornecida pelo treinamento com o BCG

Os mecanismos relacionados à imunidade treinada induzida pelo BCG no microambiente da medula óssea são complexos e ainda representam uma lacuna na ciência. A fim de confirmar

se o compartimento da medula óssea desempenha um papel na proteção mediada pela imunidade treinada induzida pelo BCG *in vivo* contra a infecção pela *B. abortus*, nós submetemos camundongos C57BL/6 à irradiação mieloablativa, consistindo em duas irradiações de 4,5 Gy, com um intervalo de 3 horas entre as doses (**Figura 22A**). Subsequentemente, 3×10^7 células da medula óssea (BM) foram transferidas (BMT) de camundongos doadores treinados com o BCG ou não treinados para camundongos receptores naive irradiados. Com o objetivo de acompanhar os camundongos durante todo o processo de restauração da medula óssea, nós realizamos contagens de leucócitos no sangue periférico semanalmente. Nós observamos que o nível de leucócitos diminuiu consideravelmente 72 horas após a irradiação (dia 3) (**Figura 22B**). Os camundongos receptores (BMT treinados com o BCG e não treinados) retornaram a um nível de leucócitos semelhante ao basal 30 dias após o BMT. Como controle interno, camundongos irradiados que não receberam medula óssea (não-BMT) morreram na segunda semana após a irradiação, conforme previsto. Tendo em vista a recuperação dos camundongos BMT, a infecção com 1×10^6 CFUs da *B. abortus* i.p. foi conduzida. Animais receptores de medula óssea treinada pelo BCG apresentaram menor carga bacteriana no baço quando comparado aos camundongos receptores de medula óssea não treinada em 7 d.p.i (**Figura 22C**). Esses dados sugerem que a capacidade protetora *in vivo* conferida pela imunidade treinada induzida pelo BCG contra *B. abortus* pode ser encontrada no compartimento da medula óssea e pode ser transferida para receptores naive.

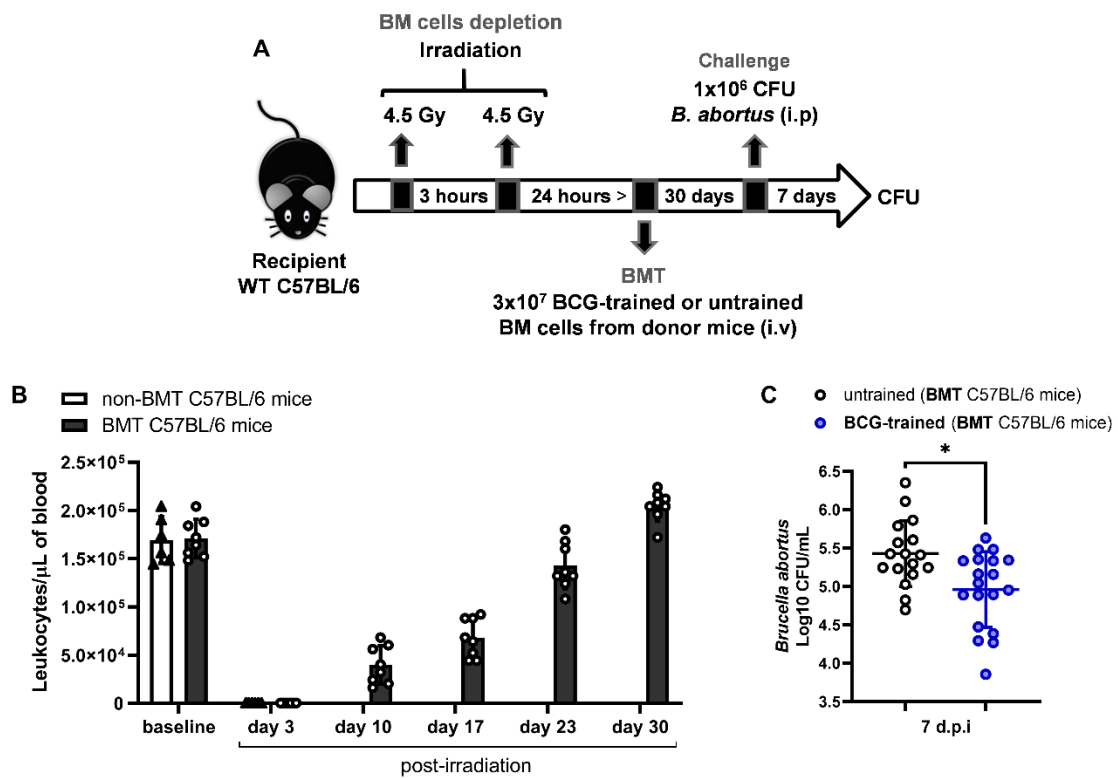


Figura 22. Os efeitos protetores associados ao treinamento com o BCG podem ser transferidos de camundongos treinados para receptores naive via medula óssea. **(A)** Modelo de transferência de medula óssea (BMT) de camundongos doadores treinados com o BCG ou não treinados para camundongos naive receptores. **(B)** A avaliação da depleção de células da medula óssea seguida de sua reconstituição foi realizada pela contagem de leucócitos no sangue semanalmente. **(C)** O baço de camundongos C57BL/6 treinados com o BCG ou não treinados foi macerado individualmente, diluído e plaqueado em 7 d.p.i pela *B. abortus*. A carga bacteriana foi avaliada por meio da contagem de CFUs. Os dados estão apresentados como média \pm SD. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student, * $p < 0,05$ comparando camundongos receptores de medula óssea treinada com o BCG (*BCG-trained BMT*) e camundongos receptores de medula óssea não treinada (*untrained BMT*) após infecção pela *B. abortus*. Especificamente para a contagem de leucócitos (B), as coletas de sangue foram conduzidas de forma alternada. Dessa forma, cada camundongo teve o sangue coletado dentro de um intervalo de 15 dias. Os gráficos representam dados agrupados provenientes de três experimentos independentes, ($n = 17 - 19$).

6.0 DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos têm demonstrado associações entre a vacinação com o BCG e a proteção contra infecções heterólogas, principalmente doenças infecciosas do trato respiratório (GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. *et al.*, 2020; MOORLAG, S. *et al.*, 2019). Um pilar importante dos efeitos não específicos é a imunidade treinada, um fenômeno de memória imunológica associado ao sistema imune inato de mamíferos (GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. *et al.*, 2020; NETEA, M. G. *et al.*, 2011). A imunidade treinada é caracterizada como uma resposta potencializada, decorrente da produção elevada de citocinas, alterações metabólicas e epigenéticas em resposta a um estímulo secundário não relacionado (NETEA, M. G. *et al.*, 2011). Células inatas como neutrófilos (MOORLAG, S. *et al.*, 2020), DCs (HOLE, C. R. *et al.*, 2019) e principalmente células NK, monócitos e macrófagos têm a capacidade de potencializar a resposta imune à reinfeção (ARTS, R. J. W. *et al.*, 2018; DOS SANTOS, J. C. *et al.*, 2019; KAUFMANN, E. *et al.*, 2018). Diferentes cepas de BCG, como a BCG-TICE (KAUFMANN, E. *et al.*, 2018) e BCG-SSI (ARTS, R. J. W. *et al.*, 2018), já foram relatadas como indutoras desse fenômeno. No entanto, o BCG Moreau ainda não havia sido testado. Neste estudo, nós induzimos imunidade treinada com esta cepa, abrindo caminho para o uso do BCG Moreau como agente terapêutico/profilático contra doenças heterólogas.

A proteção mediada pela imunidade treinada pode variar, dependendo da via de inoculação do BCG, da metodologia de indução e do patógeno usado no desafio (ARTS, R. J. W. *et al.*, 2018; DOS SANTOS, J. C. *et al.*, 2019; KAUFMANN, E. *et al.*, 2018). Kaufmann e colegas, em 2018, demonstraram a importância da via de administração do BCG para o treinamento de HSCs (KAUFMANN, E. *et al.*, 2018). O BCG inoculado pela via intravenosa atingiu a medula óssea e estimulou extracelularmente essas células. Esse estímulo favoreceu a expansão e o comprometimento das HSCs com a linhagem mielóide, havendo o pico da fase proliferativa aos 30 dias após a vacinação (KAUFMANN, E. *et al.*, 2018). Apesar do crescente

número de estudos envolvendo imunidade treinada, há uma escassez de estudos relatados na literatura sobre o treinamento de HSCs. Devido à sua capacidade de autorrenovação, essas células podem ser responsáveis pelo fenômeno de imunidade treinada de longa duração (KHADER, S. A. *et al.*, 2019). A imunidade treinada induzida pelo BCG *in vivo* seguida de tratamento com INH/RIF é um método eficaz para elucidar seus mecanismos. Este modelo visa retornar o organismo ao estado basal a fim de observar fenótipos treinados sem replicação do BCG e estimulação concomitante do sistema imunológico. Apesar dos avanços significativos na compreensão do fenômeno da imunidade treinada, a base exata, bem como quais eventos intracelulares controlam as respostas imunes treinadas, permanecem sob investigação.

Neste estudo, nós avaliamos a imunidade treinada induzida pelo BCG em BMDMs provenientes de camundongos C57BL/6 após infecção pela *B. abortus*. Nós demonstramos um aumento na produção de IL-6, IL-12 e IL-1 β em macrófagos treinados com o BCG. Surpreendentemente, não observamos alteração na produção de TNF- α , ao contrário de outros estudos que demonstram aumento da produção dessa citocina por macrófagos treinados após desafio (ARTS, R. J. W. *et al.*, 2018; CIARLO, E. *et al.*, 2019). Além disso, os fagócitos treinados com o BCG apresentaram uma expressão aumentada das moléculas CD40 e MHC-II na superfície celular em resposta à *B. abortus*. A maior emissão de MFI para CD40 e MHC-II dentro da população de macrófagos treinados com o BCG demonstra que cada célula treinada expressou individualmente uma quantidade maior dessas moléculas em comparação com o controle não treinado. O aumento da expressão de moléculas coestimuladoras na superfície do macrófago pode amplificar a comunicação entre os sistemas imune inato e adaptativo. Estudos *in vitro* suportam que a interação CD40/CD40L que ocorre entre macrófagos e células T durante infecção promove a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como a produção de NO e a expressão de MHC-II pelos macrófagos (SUTTLES, J. *et al.*, 2009). Devido ao aumento significativo da expressão de MHC-II em macrófagos treinados com o BCG, nós sugerimos que

o processo de treinamento mediado pelo BCG supera os efeitos inibidores da via de MHC-II exercidos pela *B. abortus*. A persistência da *Brucella* no hospedeiro é parcialmente atribuída ao seu potencial em diminuir a expressão de MHC-II induzida por IFN- γ (VELASQUEZ, L. N. *et al.*, 2017). Esse mecanismo interfere no processamento e na apresentação de antígeno pela linhagem de monócitos/macrófagos aos linfócitos T CD4⁺ (BARRIONUEVO, P. *et al.*, 2019; VELASQUEZ, L. N. *et al.*, 2017). A inibição da expressão de MHC-II pela *B. abortus* é dependente da ligação prolongada da lipoproteína Omp19 ao receptor TLR2 (BARRIONUEVO, P. *et al.*, 2008). Além disso, o LPS não-canônico de *B. abortus* forma macrodomínios em regiões que contêm MHC-II na superfície das APCs, inibindo a apresentação de antígenos (FORESTIER, C. *et al.*, 2000). Esses eventos, que envolvem o escape intracelular da apresentação de antígenos, têm um impacto significativo na magnitude da resposta imune adaptativa em pacientes acometidos pela brucelose (BARRIONUEVO, P. *et al.*, 2008). Os linfócitos T CD4⁺ Th1 são cruciais para o controle de *B. abortus*, sendo o IFN- γ a principal citocina produzida por essas células (DORNELES, E. M. *et al.*, 2015; PAPPAS, G. *et al.*, 2005).

Estudos conduzidos por nosso grupo mostraram que os macrófagos NLRP3^{-/-} e ASC^{-/-} têm menor secreção de IL-1 β e menor ativação de caspase-1 em comparação às células WT após infecção pela *B. abortus* (GOMES, M. T. *et al.*, 2013). Nossa equipe de pesquisa também demonstrou que a produção de IL-1 β durante a infecção pela *B. abortus* é em parte dependente da ativação do inflamassoma NLRP3 pela via não canônica (CERQUEIRA, D. M. *et al.*, 2018). Neste contexto, o LPS de *B. abortus* é reconhecido pela caspase-11, que culmina na clivagem de GSDMD e formação de poros na membrana plasmática de macrófagos. O efluxo de K⁺ facilitado pelos poros induzidos por GSDMD p30 leva à ativação de NLRP3 e secreção de IL-1 β (CERQUEIRA, D. M. *et al.*, 2018). Além disso, camundongos IL-1R^{-/-} são mais suscetíveis à infecção pela *B. abortus* (GOMES, M. T. *et al.*, 2013). Dessa forma, a secreção de IL-1 β

contribui para uma resposta imune efetiva contra a infecção pela *B. abortus*. Neste estudo, nós notamos um aumento na expressão de pró-IL-1 β , na clivagem de caspase-1 e na secreção de IL-1 β pelos macrófagos murinos treinados com o BCG após infecção pela *B. abortus*. Nós também demonstramos uma expressão elevada de caspase-11 e maior clivagem de GSDMD em macrófagos treinados com o BCG. Além disso, o nosso grupo e outros demonstraram o papel da caspase-11 e da GSDMD no controle da infecção pela *Brucella* e na patologia relacionada à esta doença (CERQUEIRA, D. M. *et al.*, 2018; LACEY, C. A. *et al.*, 2018). Aqui, nós demonstramos que a imunidade treinada induzida pelo BCG leva a um aumento nas vias canônicas e não canônicas do inflamassoma durante a infecção pela *B. abortus*. Esse enriquecimento da via do inflamassoma aqui observado pode contribuir para a restrição dessa bactéria. O aumento do nível de expressão de NLRP3 visto mesmo antes da infecção pela *B. abortus* sugere que esse receptor é importante nas respostas treinadas com o BCG. Esses resultados reúnem evidências que contribuem para um campo investigativo que relaciona inflamassomas e imunidade treinada.

O aumento da glicólise, da glutaminólise e da fosforilação oxidativa (OXPHOS) foram recentemente demonstrados em macrófagos treinados com o BCG (ARTS, R. J. W. *et al.*, 2016). A inibição da glicólise previamente induzida pelo mTORC1 reduz a ativação da caspase-1 e a produção de IL-1 β . Além disso, a inibição da piruvato quinase, enzima que catalisa a última etapa da via glicolítica, suprime a ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos (MOON, J. S. *et al.*, 2015; XIE, M. *et al.*, 2016). De fato, o mTORC1, a glicólise e o inflamassoma NLRP3 estão positivamente interconectados em macrófagos. Akt/mTORC1/S6K é um eixo metabólico central que está ligado ao perfil inflamatório de macrófagos contra doenças bacterianas (HALOUL, M. *et al.*, 2019; LACHMANDAS, E. *et al.*, 2016; LIN, L. R. *et al.*, 2018). Além disso, esta via é fundamental para o treinamento de BCG em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) durante infecção viral (ARTS, R. J. W.

et al., 2016; ARTS, R. J. W. *et al.*, 2018). No presente trabalho, macrófagos treinados com o BCG mostraram uma via de sinalização Akt/mTORC1/S6K aprimorada. É importante ressaltar que todos os componentes desse eixo de sinalização celular foram ativados após a infecção com *B. abortus*. O perfil de macrófagos durante a infecção pela *B. abortus* é crucial para a persistência bacteriana ou restrição da infecção no hospedeiro (GOMES, M. T. R. *et al.*, 2021). Os macrófagos inflamatórios controlam com mais eficiência a infecção pela *B. abortus* (GOMES, M. T. R. *et al.*, 2021). Nós observamos uma capacidade aumentada de macrófagos treinados com o BCG em restringir o crescimento intracelular de *B. abortus*, principalmente após a ativação mediada por IFN- γ . Além disso, o treinamento com o BCG culminou em uma produção superior de nitrito por essas células em resposta à *B. abortus*. Portanto, a maior expressão de iNOS e a maior ativação da via de sinalização Akt/mTOR/S6K foram associadas com o aumento da produção de nitrito e IL-1 β , sugerindo que o treinamento com o BCG induz um perfil inflamatório de macrófagos mais eficiente para o controle de *B. abortus* (GOMES, M. T. R. *et al.*, 2021; HU, H. *et al.*, 2020).

Para transpor os dados *in vitro* para o modelo *in vivo*, camundongos submetidos ao protocolo de treinamento com o BCG foram infectados com *B. abortus*. A imunidade treinada induzida pelo BCG resultou em controle parcial da infecção em 7 e 15 d.p.i. A carga bacteriana foi restrita no baço e no fígado, assim como foi observada uma redução nos pesos relativos dos órgãos. Os menores pesos relativos de órgãos provenientes de camundongos treinados com o BCG corroboram com a redução na carga de *B. abortus* (ROSET, M. S. *et al.*, 2014). A menor carga bacteriana e conseqüentemente a menor quantidade de PAMPs levam à diminuição da produção de mediadores inflamatórios e ao menor recrutamento de células imunes para o local da infecção (ROSET, M. S. *et al.*, 2014). Neste estudo, camundongos treinados com o BCG controlam melhor a infecção desencadeada pela *B. abortus* em 7 e 15 d.p.i. Além disso, nós também demonstramos um aumento da defesa do hospedeiro em camundongos RAG^{-/-}

imunizados com o BCG nos estágios iniciais da infecção, pois uma maior redução da carga de *B. abortus* foi observada no baço em 7 d.p.i. De fato, esse resultado confirma que o sistema imune inato impulsiona o controle aprimorado contra *B. abortus*, pois a ausência de linfócitos não compromete o fenótipo de treinamento. Com isso, o aumento das vias inflamatórias em macrófagos aqui demonstrado poderia levar ao controle precoce de *B. abortus in vivo*. Além disso, camundongos quiméricos que receberam células treinadas da medula óssea também apresentaram melhor controle da carga de *B. abortus* no baço em 7 d.p.i. Dessa forma, a transferência de células da medula óssea treinada com o BCG aumentou a proteção contra esse patógeno em camundongos naive receptores. Esta proteção demonstra que a imunidade treinada induzida na medula óssea é responsável pelo controle parcial de *B. abortus in vivo*.

Coletivamente, nossos achados demonstram que a imunidade treinada mediada pelo BCG em camundongos C57BL/6 resulta em melhor controle da infecção pela *B. abortus*. Os macrófagos de camundongos C57BL/6 exibiram produção aumentada de citocinas inflamatórias, maior expressão de CD40 e MHC-II na superfície celular, maior ativação do inflamassoma, aumento da produção de nitrito e enriquecimento do eixo Akt/mTOR/S6K, resultando em maior controle do crescimento intracelular de *B. abortus*. A proteção resultante da imunidade treinada induzida pelo BCG contra a *B. abortus* foi descrita aqui pela primeira vez. Nós também demonstramos em primeira mão que a via não canônica do inflamassoma é enriquecida com o treinamento pelo BCG. Embora o envolvimento do NLRP3 no treinamento desencadeado pela dieta ocidental tenha sido relatado anteriormente (CHRIST, A. *et al.*, 2018), seu papel na imunidade treinada mediada pelo BCG não foi demonstrado (TORRE, C. *et al.*, 2022). Neste estudo, nossas evidências sugerem um papel do NLRP3 na polarização em direção a um perfil inflamatório em macrófagos treinados pelo BCG, sendo que este papel pode estar ligado à via Akt/mTOR/S6K. Além disso, a proteção baseada no treinamento com o BCG pode

auxiliar no controle de outras bactérias silenciosas que desencadeiam patologias crônicas, similares ao que ocorre na brucelose.

7.0 CONCLUSÃO E MODELO DO ESTUDO

Neste estudo, a vacinação de camundongos C57BL/6 com o BCG Moreau promoveu a ativação inespecífica do sistema imune, desencadeando o controle mais eficiente da replicação da bactéria *B. abortus* no baço e no fígado, órgãos que são comumente afetados pela brucelose (Figura 23).

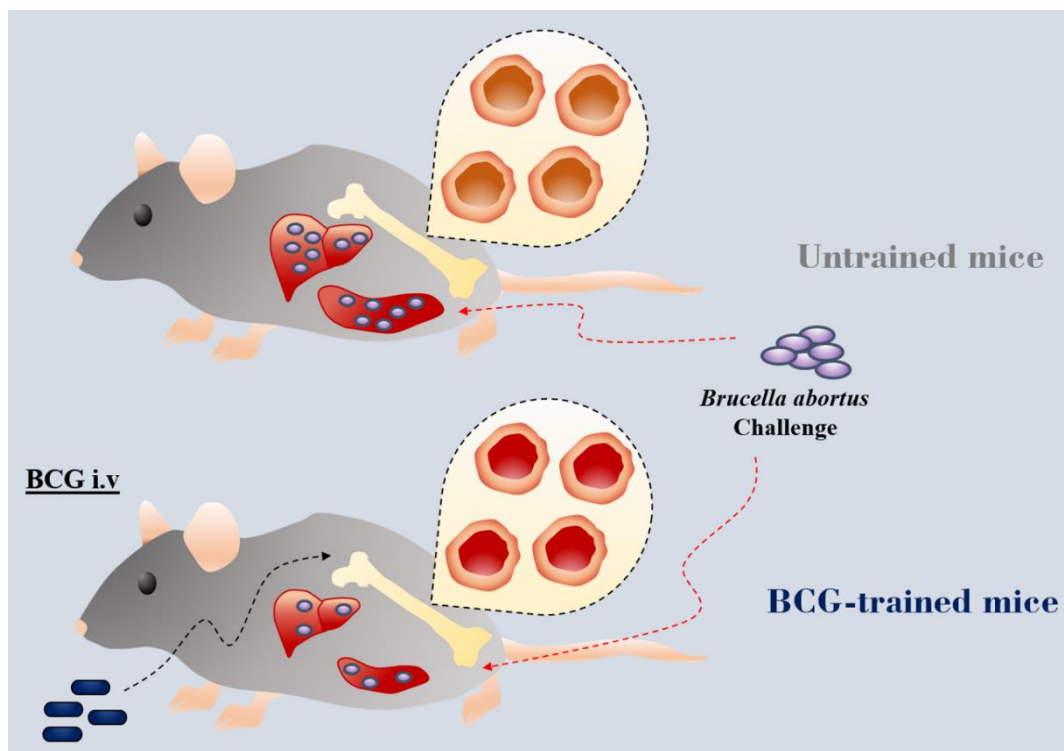


Figura 23. Camundongos treinados com o BCG Moreau são mais resistentes à infecção pela *B. abortus*. Após a vacinação com o BCG pela via intravenosa, camundongos C57BL/6 apresentaram menor carga de *B. abortus* no baço e no fígado, além de apresentarem menor peso relativo de ambos os órgãos.

Utilizando o modelo *in vitro* para investigação dos mecanismos, nós observamos que os macrófagos derivados da medula óssea treinada pelo BCG controlaram de maneira mais eficiente o crescimento intracelular da *B. abortus*. Estes fagócitos exibiram maior expressão das moléculas CD40 e MHC-II na superfície celular, maior capacidade de produção de citocinas inflamatórias, enriquecimento da via do inflamassoma, maior produção de NO pela iNOS e enriquecimento do eixo metabólico Akt/mTOR/S6K (Figura 24). Além disso, a transferência adotiva de células da medula óssea treinada pelo BCG garantiu proteção aos camundongos

receptores naive contra a *B. abortus*. Por fim, camundongos RAG^{-/-} previamente imunizados com o BCG foram também capazes de controlar com maior capacidade a carga de *B. abortus* no baço. Esses resultados sugerem uma atividade protetora *in vivo* e *in vitro* mediada pelas células inatas derivadas da medula óssea.

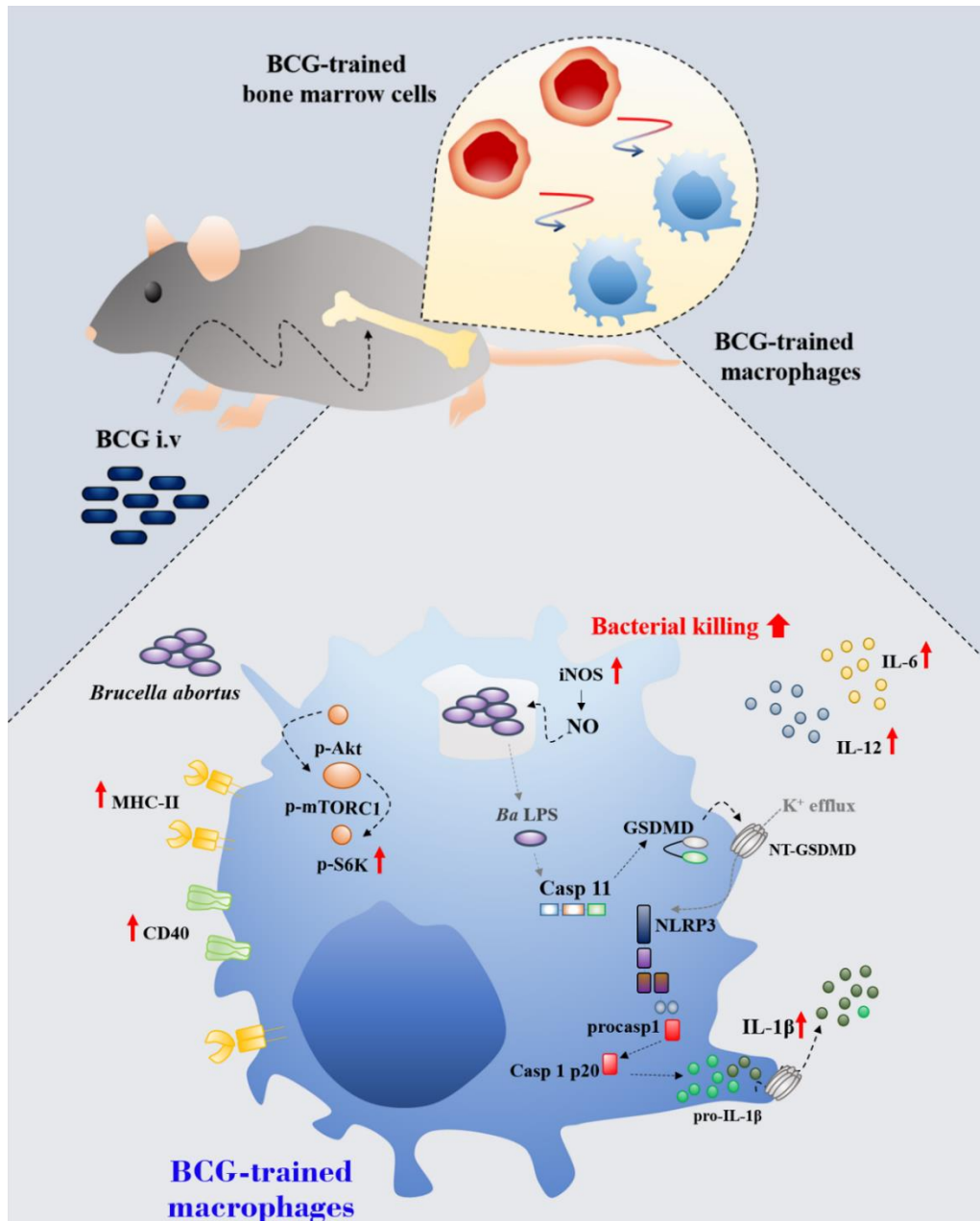


Figura 24. Os macrófagos derivados da medula óssea treinada com o BCG Moreau apresentaram enriquecimento metabólico e funcional em resposta à *B. abortus*. Macrófagos derivados *in vitro*, apresentaram aumento da resposta inflamatória mediada pela maior produção de citocinas, aumento da expressão de MHC-II e CD40, elevada produção de NO devido à função da iNOS e enriquecimento da via Akt/mTOR/S6K, culminando em maior controle do crescimento intracelular da *B. abortus*.

8.0 PERSPECTIVAS PARA ESTUDOS POSTERIORES

O enriquecimento de vias imunes e metabólicas em macrófagos treinados pelo BCG foi encontrado neste estudo após infecção pela *B. abortus*. Nós observamos que o aumento da ativação do inflamassoma, da via Akt/mTOR/S6K, além do aumento da expressão de iNOS, MHC-II e CD40 estão associados ao maior controle da *B. abortus* pelos macrófagos *in vitro*. Entretanto, nós não compreendemos se estas vias estão interconectadas na imunidade treinada induzida pelo BCG e quais delas estão associadas diretamente a este perfil protetor. Por exemplo, para investigação de uma interconexão entre as vias Akt/mTOR/S6K e inflamassoma, é possível utilizar inibidores químicos da primeira via, como rapamicina ou Torin-1, e avaliar o processamento de caspase-1. Ainda, com o artifício do uso dos inibidores, podemos avaliar se estas vias estão associadas à proteção contra a *B. abortus* por meio da mensuração da carga bacteriana.

Outra abordagem nesse sentido seria a utilização de um inibidor do NLRP3, como o MCC950, para posterior avaliação da ativação da via Akt/mTOR/S6K, do processamento de caspase-1 e da carga de *B. abortus*, sendo factível demonstrar de forma direta se há a participação do NLRP3 no treinamento pelo BCG. Além disso, inferir se existe uma interferência mútua na ativação dessas vias ou se a interferência é unidirecional é uma possibilidade. Em adição, um meio extracelular rico em K^+ é uma alternativa para inibição da ativação de NLRP3, sendo também viável o uso de camundongos NLRP3^{-/-} e caspase-11^{-/-}. A avaliação das marcas epigenéticas associadas à ativação da transcrição, como a acetilação na lisina 27 da histona 3 (H3K27ac), e à heterocromatina, como a trimetilação na lisina 9 da histona 3 (H3K9me3) em regiões promotoras específicas dos genes NLRP3 e iNOS por meio da técnica de CHIP-qPCR também é uma perspectiva associada a este estudo.

Do ponto de vista do ciclo intracelular da *B. abortus*, a investigação da expressão de marcadores do endossoma inicial, do endossoma tardio, do rBCV e do aBCV em macrófagos

treinados pelo BCG e a colocalização dessas moléculas com a *Brucella* fluorescente seria importante, a fim de comparar o controle desta bactéria pelos macrófagos treinados e possíveis alterações nas rotas intracelulares, com conseqüente mudança na interação deste patógeno com o hospedeiro.

Como já mencionado, nós demonstramos o aumento da capacidade de controle da carga de *B. abortus* pelos macrófagos treinados com o BCG *in vitro*. Uma maneira de transpor esses resultados do *in vitro* para o *in vivo* seria a transferência adotiva de macrófagos treinados pelo BCG previamente infectados com a *B. abortus* para camundongos C57BL/6 RAG^{-/-} naive, a fim de confirmar se o maior controle da *B. abortus* por essas células tem impacto no organismo vivo. Outra perspectiva é a depleção dos macrófagos após indução da imunidade treinada pelo BCG *in vivo*, que pode ser conduzida através da injeção de lipossomas de clodronato.

Neste estudo, nós observamos que a carga bacteriana em animais RAG^{-/-} após vacinação com o BCG é reduzida, demonstrando que o sistema imune inato apresenta uma capacidade aumentada de controle da *B. abortus* mediante à ativação por esta vacina. Entretanto, a viabilidade de treinamento em animais RAG^{-/-}, ou seja, aumento da resposta da medula óssea após o tratamento com INH/RIF ainda precisa ser elucidado. Existem evidências robustas que demonstram um papel importante de IFN- γ no treinamento da medula óssea de animais C57BL/6 (KAUFMANN, E. *et al.*, 2018; KHAN, N. *et al.*, 2020). Além disso, já foi demonstrado que o aumento da mielopoiese em detrimento da linfopoiese é uma marca da imunidade treinada induzida pelo BCG (KAUFMANN, E. *et al.*, 2018) e pelo β -glucano (MITROULIS, I. *et al.*, 2018). Estímulos que aumentam a linfopoiese e reduzem a mielopoiese prejudicam as respostas imunes treinadas (KHAN, N. *et al.*, 2020). Dessa forma, apesar do sistema imune inato responder de forma aprimorada após ativação mediada pelo BCG, os mecanismos que levam ao treinamento da medula óssea *in vivo* permanecem sob elucidação, havendo o questionamento de como a taxa de células comprometidas com a linhagem mieloide

versus linfóide impactaria em camundongos $RAG^{-/-}$ frente à complexidade inerente a este compartimento.

REFERÊNCIAS

- AABY, P.,ROTH, A. *et al.* Randomized trial of BCG vaccination at birth to low-birth-weight children: beneficial nonspecific effects in the neonatal period? **J Infect Dis**, 204, n. 2, p. 245-252, Jul 15 2011.
- ADESANYA, O. A.,UCHE-ORJI, C. I. *et al.* Bacillus Calmette-Guerin (BCG): the adroit vaccine. **AIMS Microbiol**, 7, n. 1, p. 96-113, 2021.
- AGUIAR, S. L. F.,MIRANDA, M. C. G. *et al.* High-Salt Diet Induces IL-17-Dependent Gut Inflammation and Exacerbates Colitis in Mice. **Front Immunol**, 8, p. 1969, 2017.
- ANDERSON, T. D.,MEADOR, V. P. *et al.* Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and histologic lesions. **Vet Pathol**, 23, n. 3, p. 219-226, May 1986.
- ANGELIDOU, A.,DIRAY-ARCE, J. *et al.* BCG as a Case Study for Precision Vaccine Development: Lessons From Vaccine Heterogeneity, Trained Immunity, and Immune Ontogeny. **Front Microbiol**, 11, p. 332, 2020.
- ARCHAMBAUD, C.,SALCEDO, S. P. *et al.* Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary *Brucella* infection. **Eur J Immunol**, 40, n. 12, p. 3458-3471, Dec 2010.
- ARTS, R. J.,JOOSTEN, L. A. *et al.* Immunometabolic circuits in trained immunity. **Semin Immunol**, 28, n. 5, p. 425-430, Oct 2016.
- ARTS, R. J. W.,CARVALHO, A. *et al.* Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. **Cell Rep**, 17, n. 10, p. 2562-2571, Dec 6 2016.
- ARTS, R. J. W.,MOORLAG, S. *et al.* BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. **Cell Host Microbe**, 23, n. 1, p. 89-100 e105, Jan 10 2018.
- ATLURI, V. L.,XAVIER, M. N. *et al.* Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. **Annu Rev Microbiol**, 65, p. 523-541, 2011. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review.
- BABJUK, M.,BOHLE, A. *et al.* EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. **Eur Urol**, 71, n. 3, p. 447-461, Mar 2017.
- BALDI, P. C.; GIAMBARTOLOMEI, G. H. Pathogenesis and pathobiology of zoonotic brucellosis in humans. **Rev Sci Tech**, 32, n. 1, p. 117-125, Apr 2013.

BANG, B. Bacillus Abortus of Bang, the Cause of Contagious Abortion in Cattle. **Oxford Journals** 7, p. 469-475, 1910.

BARRIONUEVO, P.; GIAMBARTOLOMEI, G. H. Inhibition of antigen presentation by Brucella: many more than many ways. **Microbes Infect**, 21, n. 3-4, p. 136-142, Apr - May 2019.

BARRIONUEVO, P., CASSATARO, J. *et al.* Brucella abortus inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. **Infect Immun**, 76, n. 1, p. 250-262, Jan 2008.

BEKKERING, S., ARTS, R. J. W. *et al.* Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway. **Cell**, 172, n. 1-2, p. 135-146 e139, Jan 11 2018.

BELLAIRE, B. H., ROOP, R. M., 2nd *et al.* Opsonized virulent Brucella abortus replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. **Infect Immun**, 73, n. 6, p. 3702-3713, Jun 2005. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

BOHLE, A., BUTTNER, H. *et al.* Primary treatment of condylomata acuminata with viable bacillus Calmette-Guerin. **J Urol**, 165, n. 3, p. 834-836, Mar 2001.

BOSCHIROLI, M. L., OUAHRANI-BETTACHE, S. *et al.* The Brucella suis virB operon is induced intracellularly in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 3, p. 1544-1549, Feb 5 2002. Research Support, Non-U.S. Gov't.

BRUCE, D. Note on the discovery of microorganism in Malta Fever. **Therapeutics and Public Health**, 39, p. 161-170, 1887.

BYLES, V., COVARRUBIAS, A. J. *et al.* The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. **Nat Commun**, 4, p. 2834, 2013.

CALMETTE, A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, p. 94, 1931.

CASALINUOVO, F., CIAMBRONE, L. *et al.* Contamination of Bovine, Sheep and Goat Meat with Brucella Spp. **Ital J Food Saf**, 5, n. 3, p. 5913, Jun 3 2016.

CELLI, J. The changing nature of the Brucella-containing vacuole. **Cell Microbiol**, 17, n. 7, p. 951-958, Jul 2015.

CELLI, J. The Intracellular Life Cycle of Brucella spp. **Microbiol Spectr**, 7, n. 2, Mar 2019.

CELLI, J.,SALCEDO, S. P. *et al.* Brucella coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, n. 5, p. 1673-1678, Feb 1 2005. Research Support, Non-U.S. Gov't.

CELLI, J.,DE CHASTELLIER, C. *et al.* Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. **J Exp Med**, 198, n. 4, p. 545-556, Aug 18 2003.

CERQUEIRA, D. M.,GOMES, M. T. R. *et al.* Guanylate-binding protein 5 licenses caspase-11 for Gasdermin-D mediated host resistance to Brucella abortus infection. **PLoS Pathog**, 14, n. 12, p. e1007519, Dec 2018.

CESPEDES, P. F.,REY-JURADO, E. *et al.* A single, low dose of a cGMP recombinant BCG vaccine elicits protective T cell immunity against the human respiratory syncytial virus infection and prevents lung pathology in mice. **Vaccine**, 35, n. 5, p. 757-766, Feb 1 2017.

CHENG, S. C.,QUINTIN, J. *et al.* mTOR- and HIF-1alpha-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. **Science**, 345, n. 6204, p. 1250684, Sep 26 2014.

CHRIST, A.,GUNTHER, P. *et al.* Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. **Cell**, 172, n. 1-2, p. 162-175 e114, Jan 11 2018.

CIARLO, E.,HEINONEN, T. *et al.* Trained immunity confers broad-spectrum protection against bacterial infections. **J Infect Dis**, Dec 31 2019.

CIARLO, E.,HEINONEN, T. *et al.* Trained Immunity Confers Broad-Spectrum Protection Against Bacterial Infections. **J Infect Dis**, 222, n. 11, p. 1869-1881, Nov 9 2020.

CIROVIC, B.,DE BREE, L. C. J. *et al.* BCG Vaccination in Humans Elicits Trained Immunity via the Hematopoietic Progenitor Compartment. **Cell Host Microbe**, 28, n. 2, p. 322-334 e325, Aug 12 2020.

COMERCI, D. J.,MARTINEZ-LORENZO, M. J. *et al.* Essential role of the VirB machinery in the maturation of the Brucella abortus-containing vacuole. **Cell Microbiol**, 3, n. 3, p. 159-168, Mar 2001.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. **Emerg Infect Dis**, 3, n. 2, p. 213-221, Apr-Jun 1997.

DE BOLLE, X.,CROSSON, S. *et al.* Brucella abortus Cell Cycle and Infection Are Coordinated. **Trends Microbiol**, 23, n. 12, p. 812-821, Dec 2015.

DE QUEIROZ, N.,MARINHO, F. V. *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.

DORNELES, E. M.,TEIXEIRA-CARVALHO, A. *et al.* Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. **Vaccine**, 33, n. 31, p. 3659-3666, Jul 17 2015.

DOS SANTOS, J. C.,BARROSO DE FIGUEIREDO, A. M. *et al.* beta-Glucan-Induced Trained Immunity Protects against *Leishmania braziliensis* Infection: a Crucial Role for IL-32. **Cell Rep**, 28, n. 10, p. 2659-2672 e2656, Sep 3 2019.

ELLIOTT, E. I.; SUTTERWALA, F. S. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. **Immunol Rev**, 265, n. 1, p. 35-52, May 2015.

FORESTIER, C.,DELEUIL, F. *et al.* *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. **J Immunol**, 165, n. 9, p. 5202-5210, Nov 1 2000.

FRANC, K. A.,KRECEK, R. C. *et al.* Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. **BMC Public Health**, 18, n. 1, p. 125, Jan 11 2018.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.,TSILIKA, M. *et al.* Activate: Randomized Clinical Trial of BCG Vaccination against Infection in the Elderly. **Cell**, 183, n. 2, p. 315-323 e319, Oct 15 2020.

GIAMBARTOLOMEI, G. H.,ZWERDLING, A. *et al.* Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. **J Immunol**, 173, n. 7, p. 4635-4642, Oct 1 2004.

GOMES, M. T.,CAMPOS, P. C. *et al.* Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to *Brucella abortus* infection. **J Immunol**, 190, n. 7, p. 3629-3638, Apr 1 2013.

GOMES, M. T. R.,CERQUEIRA, D. M. *et al.* Guanylate-binding proteins at the crossroad of noncanonical inflammasome activation during bacterial infections. **J Leukoc Biol**, 106, n. 3, p. 553-562, Sep 2019.

GOMES, M. T. R.,GUIMARAES, E. S. *et al.* STING regulates metabolic reprogramming in macrophages via HIF-1alpha during *Brucella* infection. **PLoS Pathog**, 17, n. 5, p. e1009597, May 2021.

GONZALEZ-PEREZ, M.,SANCHEZ-TARJUELO, R. *et al.* The BCG Vaccine for COVID-19: First Verdict and Future Directions. **Front Immunol**, 12, p. 632478, 2021.

HALOUL, M., OLIVEIRA, E. R. A. *et al.* mTORC1-mediated polarization of M1 macrophages and their accumulation in the liver correlate with immunopathology in fatal ehrlichiosis. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 14050, Oct 1 2019.

HERRERA, E., PALOMARES, G. *et al.* Milk production increase in a dairy farm under a six-year Brucellosis control program. **Ann N Y Acad Sci**, 1149, p. 296-299, Dec 2008.

HOLE, C. R., WAGER, C. M. L. *et al.* Induction of memory-like dendritic cell responses in vivo. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 2955, Jul 4 2019.

HORNUNG, V., BAUERNFEIND, F. *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nat Immunol**, 9, n. 8, p. 847-856, Aug 2008.

HOSS, F., RODRIGUEZ-ALCAZAR, J. F. *et al.* Assembly and regulation of ASC specks. **Cell Mol Life Sci**, 74, n. 7, p. 1211-1229, Apr 2017.

HU, H., TIAN, M. *et al.* Brucella Infection Regulates Thioredoxin-Interacting Protein Expression to Facilitate Intracellular Survival by Reducing the Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. **J Immunol**, 204, n. 3, p. 632-643, Feb 1 2020.

HU, Z., LU, S. H. *et al.* Trained immunity: A Yin-Yang balance. **MedComm (2020)**, 3, n. 1, p. e121, Mar 2022.

HULL, N. C.; SCHUMAKER, B. A. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. **Infect Ecol Epidemiol**, 8, n. 1, p. 1500846, 2018.

JO, E. K., KIM, J. K. *et al.* Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. **Cell Mol Immunol**, 13, n. 2, p. 148-159, Mar 2016.

KAUFMANN, E., SANZ, J. *et al.* BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. **Cell**, 172, n. 1-2, p. 176-190 e119, Jan 11 2018.

KHADER, S. A., DIVANGAHI, M. *et al.* Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination. **J Clin Invest**, 129, n. 9, p. 3482-3491, Sep 3 2019.

KHAN, N., DOWNEY, J. *et al.* M. tuberculosis Reprograms Hematopoietic Stem Cells to Limit Myelopoiesis and Impair Trained Immunity. **Cell**, 183, n. 3, p. 752-770 e722, Oct 29 2020.

KLEINNIJENHUIS, J., QUINTIN, J. *et al.* Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. **Proc Natl**

Acad Sci U S A, 109, n. 43, p. 17537-17542, Oct 23 2012. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't.

KONERU, G.,BATIHA, G. E. *et al.* BCG Vaccine-Induced Trained Immunity and COVID-19: Protective or Bystander? **Infect Drug Resist**, 14, p. 1169-1184, 2021.

LACEY, C. A.,MITCHELL, W. J. *et al.* Caspase-1 and Caspase-11 Mediate Pyroptosis, Inflammation, and Control of Brucella Joint Infection. **Infect Immun**, 86, n. 9, Sep 2018.

LACHMANDAS, E.,BEIGIER-BOMPADRE, M. *et al.* Rewiring cellular metabolism via the AKT/mTOR pathway contributes to host defence against Mycobacterium tuberculosis in human and murine cells. **Eur J Immunol**, 46, n. 11, p. 2574-2586, Nov 2016.

LANCIONE, S.,ALVAREZ, J. V. *et al.* Tracking changes in national BCG vaccination policies and practices using the BCG World Atlas. **BMJ Glob Health**, 7, n. 1, Jan 2022.

LATZ, E.,XIAO, T. S. *et al.* Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol**, 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013.

LIN, L. R.,GAO, Z. X. *et al.* Akt, mTOR and NF-kappaB pathway activation in Treponema pallidum stimulates M1 macrophages. **Int Immunopharmacol**, 59, p. 181-186, Jun 2018.

LINDAHL-RAJALA, E.,HOFFMAN, T. *et al.* Detection and characterization of Brucella spp. in bovine milk in small-scale urban and peri-urban farming in Tajikistan. **PLoS Negl Trop Dis**, 11, n. 3, p. e0005367, Mar 2017.

LIU, Y.,LIANG, S. *et al.* BCG-induced trained immunity in macrophage: reprogramming of glucose metabolism. **Int Rev Immunol**, p. 1-14, Jan 14 2020.

LOCATI, M.,CURTALE, G. *et al.* Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. **Annu Rev Pathol**, 15, p. 123-147, Jan 24 2020.

LUCA, S.; MIHAESCU, T. History of BCG Vaccine. **Maedica (Bucur)**, 8, n. 1, p. 53-58, Mar 2013.

MARCHANT, A.,GOETGHEBUER, T. *et al.* Newborns develop a Th1-type immune response to Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination. **J Immunol**, 163, n. 4, p. 2249-2255, Aug 15 1999.

MARIM, F. M.,FRANCO, M. M. C. *et al.* The role of NLRP3 and AIM2 in inflammasome activation during Brucella abortus infection. **Semin Immunopathol**, 39, n. 2, p. 215-223, Feb 2017.

MARINHO, F. V.,FAHEL, J. S. *et al.* Guanylate binding proteins contained in the murine chromosome 3 are important to control mycobacterial infection. **J Leukoc Biol**, 108, n. 4, p. 1279-1291, Oct 2020.

MENSE, M. G.,BORSCHHEL, R. H. *et al.* Pathologic changes associated with brucellosis experimentally induced by aerosol exposure in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Am J Vet Res**, 65, n. 5, p. 644-652, May 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. e. A. Programa nacional de controle e erradicação da Brucelose e da Tuberculose animal (PNCEBT). **Brasil**, p. 1-181, 2006.

MITROULIS, I.,RUPPOVA, K. *et al.* Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. **Cell**, 172, n. 1-2, p. 147-161 e112, Jan 11 2018.

MOON, J. S.,HISATA, S. *et al.* mTORC1-Induced HK1-Dependent Glycolysis Regulates NLRP3 Inflammasome Activation. **Cell Rep**, 12, n. 1, p. 102-115, Jul 7 2015.

MOORLAG, S.,RORING, R. J. *et al.* The role of the interleukin-1 family in trained immunity. **Immunol Rev**, 281, n. 1, p. 28-39, Jan 2018.

MOORLAG, S.,ARTS, R. J. W. *et al.* Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. **Clin Microbiol Infect**, 25, n. 12, p. 1473-1478, Dec 2019.

MOORLAG, S.,RODRIGUEZ-ROSALES, Y. A. *et al.* BCG Vaccination Induces Long-Term Functional Reprogramming of Human Neutrophils. **Cell Rep**, 33, n. 7, p. 108387, Nov 17 2020.

MOUHOUB, E.,DOMENECH, P. *et al.* The Diverse Applications of Recombinant BCG-Based Vaccines to Target Infectious Diseases Other Than Tuberculosis: An Overview. **Front Microbiol**, 12, p. 757858, 2021.

MUKHOPADHYAY, S.,FRIAS, M. A. *et al.* The Enigma of Rapamycin Dosage. **Mol Cancer Ther**, 15, n. 3, p. 347-353, Mar 2016.

NEMES, E.,GELDENHUYS, H. *et al.* Prevention of *M. tuberculosis* Infection with H4:IC31 Vaccine or BCG Revaccination. **N Engl J Med**, 379, n. 2, p. 138-149, Jul 12 2018.

NETEA, M. G.,QUINTIN, J. *et al.* Trained immunity: a memory for innate host defense. **Cell Host Microbe**, 9, n. 5, p. 355-361, May 19 2011.

NETEA, M. G.,JOOSTEN, L. A. *et al.* Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. **Science**, 352, n. 6284, p. aaf1098, Apr 22 2016.

OLSEN, S. C.; PALMER, M. V. Advancement of knowledge of Brucella over the past 50 years. **Vet Pathol**, 51, n. 6, p. 1076-1089, Nov 2014.

PAPPAS, G., AKRITIDIS, N. *et al.* Brucellosis. **N Engl J Med**, 352, n. 22, p. 2325-2336, Jun 2 2005.

PASCO, S. T.; ANGUIA, J. Lessons from Bacillus Calmette-Guerin: Harnessing Trained Immunity for Vaccine Development. **Cells**, 9, n. 9, Sep 16 2020.

PASQUEVICH, K. A., GARCIA SAMARTINO, C. *et al.* The protein moiety of Brucella abortus outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuncting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. **J Immunol**, 184, n. 9, p. 5200-5212, May 1 2010.

PERCIN, D. Microbiology of Brucella. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, 8, n. 1, p. 13-17, Apr 2013.

POESTER, F. P., GONCALVES, V. S. *et al.* Brucellosis in Brazil. **Vet Microbiol**, 90, n. 1-4, p. 55-62, Dec 20 2002. Research Support, Non-U.S. Gov't.

POESTER, F. P., SAMARTINO, L. E. *et al.* Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. **Rev Sci Tech**, 32, n. 1, p. 105-115, Apr 2013.

POURBAGHER, A., POURBAGHER, M. A. *et al.* Epidemiologic, clinical, and imaging findings in brucellosis patients with osteoarticular involvement. **AJR Am J Roentgenol**, 187, n. 4, p. 873-880, Oct 2006.

ROSET, M. S., IBANEZ, A. E. *et al.* Brucella cyclic beta-1,2-glucan plays a critical role in the induction of splenomegaly in mice. **PLoS One**, 9, n. 7, p. e101279, 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't.

SALEM, A., NOFAL, A. *et al.* Treatment of common and plane warts in children with topical viable Bacillus Calmette-Guerin. **Pediatr Dermatol**, 30, n. 1, p. 60-63, Jan-Feb 2013.

SANGARI, F. J.; AGUERO, J. Molecular basis of Brucella pathogenicity: an update. **Microbiologia**, 12, n. 2, p. 207-218, Jun 1996.

SARKAR-TYSON, M.; ATKINS, H. S. Antimicrobials for bacterial bioterrorism agents. **Future Microbiol**, 6, n. 6, p. 667-676, Jun 2011.

SELEEM, M. N., BOYLE, S. M. *et al.* Brucellosis: a re-emerging zoonosis. **Vet Microbiol**, 140, n. 3-4, p. 392-398, Jan 27 2010.

SILVEIRA, T. N., GOMES, M. T. *et al.* NLRP12 negatively regulates proinflammatory cytokine production and host defense against *Brucella abortus*. **Eur J Immunol**, 47, n. 1, p. 51-59, Jan 2017.

SINGH, A. K., NETEA, M. G. *et al.* BCG turns 100: its nontraditional uses against viruses, cancer, and immunologic diseases. **J Clin Invest**, 131, n. 11, Jun 1 2021.

SINGH, K. Laboratory-acquired infections. **Clin Infect Dis**, 49, n. 1, p. 142-147, Jul 1 2009.

STARR, T., NG, T. W. *et al.* *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. **Traffic**, 9, n. 5, p. 678-694, May 2008.

STARR, T., CHILD, R. *et al.* Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. **Cell Host Microbe**, 11, n. 1, p. 33-45, Jan 19 2012.

SUTTLES, J.; STOUT, R. D. Macrophage CD40 signaling: a pivotal regulator of disease protection and pathogenesis. **Semin Immunol**, 21, n. 5, p. 257-264, Oct 2009.

TORRE, C.; BOYER, L. Effector-Triggered Trained Immunity: An Innate Immune Memory to Microbial Virulence Factors? **Toxins (Basel)**, 14, n. 11, Nov 17 2022.

TSOLIS, R. M., YOUNG, G. M. *et al.* From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. **Nat Rev Microbiol**, 6, n. 12, p. 883-892, Dec 2008.

VELASQUEZ, L. N., MILILLO, M. A. *et al.* *Brucella abortus* down-regulates MHC class II by the IL-6-dependent inhibition of CIITA through the downmodulation of IFN regulatory factor-1 (IRF-1). **J Leukoc Biol**, 101, n. 3, p. 759-773, Mar 2017.

WEICHHART, T., HENGSTSCHLAGER, M. *et al.* Regulation of innate immune cell function by mTOR. **Nat Rev Immunol**, 15, n. 10, p. 599-614, Oct 2015.

WELLEN, K. E., HATZIVASSILIOU, G. *et al.* ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. **Science**, 324, n. 5930, p. 1076-1080, May 22 2009.

WHO. Brucellosis in Humans and Animals. **World Health Organization**, p. 1-102, 2006.

WHO. BCG vaccines: WHO position paper – February 2018. **Weekly epidemiological report**, 93, n. 8, p. 73-96, 2018 2018.

WHO. Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. 2020.

WHO. Global tuberculosis report 2021. **Geneva: World Health Organization**, p. 1-43, 2021.

XIE, M., YU, Y. *et al.* PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. **Nat Commun**, 7, p. 13280, Oct 25 2016. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't.

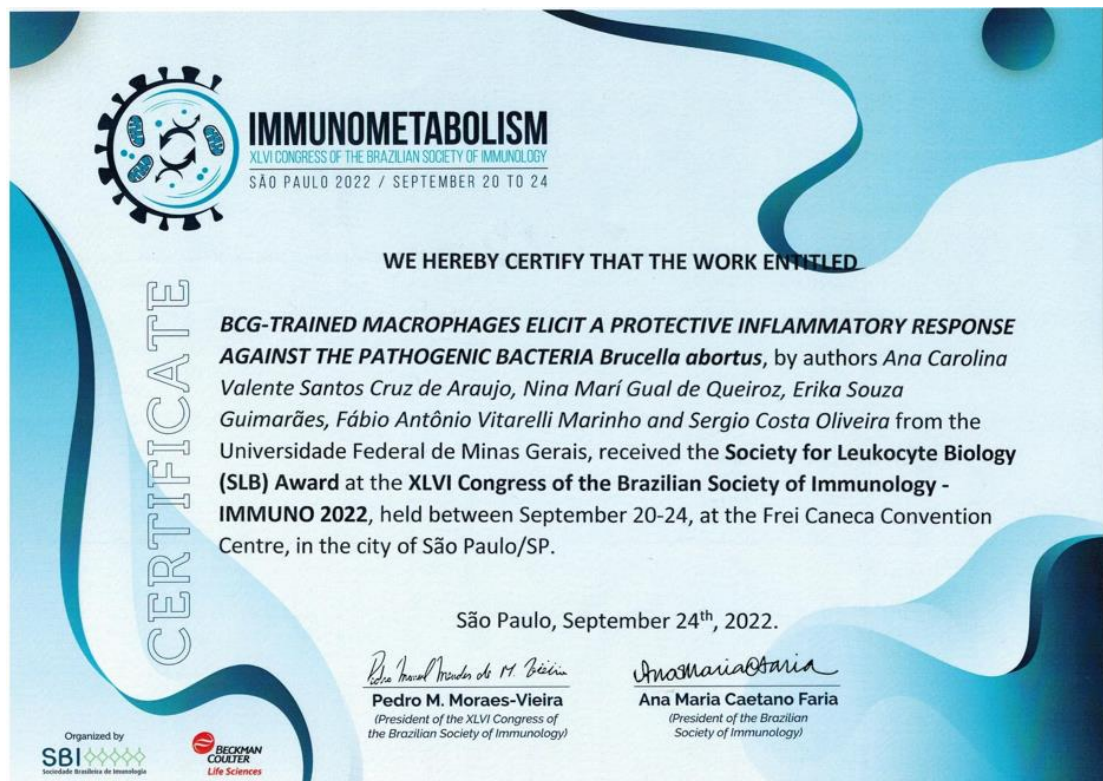
ZHANG, B. Z., SHUAI, H. *et al.* Bacillus Calmette-Guerin-induced trained immunity protects against SARS-CoV-2 challenge in K18-hACE2 mice. **JCI Insight**, Apr 21 2022.

ZWERLING, A., BEHR, M. A. *et al.* The BCG World Atlas: a database of global BCG vaccination policies and practices. **PLoS Med**, 8, n. 3, p. e1001012, Mar 2011.

APÊNDICE A – Atividades relevantes realizadas no período do Doutorado

➤ Prêmios:

- **2022** - Recebimento do prêmio *Society for Leukocyte Biology Award for Young Investigators* no *Immunometabolism 2022* referente ao trabalho apresentado em formato oral, intitulado: *BCG-trained macrophages elicit a protective inflammatory response against the pathogenic bacteria Brucella abortus*. Prêmio concedido pela sociedade internacional: *Society for Leukocyte Biology*.



- **2023** - Premiação na Mostra de Trabalhos do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, referente ao trabalho apresentado em formato oral, intitulado: Os macrófagos treinados pelo BCG apresentam uma resposta inflamatória protetora contra a bactéria intracelular *Brucella abortus*. Prêmio concedido pelo Programação de Pós-graduação em Genética (PPGen), Universidade Federal de Minas Gerais.



Mostra de trabalhos da Pós-Graduação em Genética da UFMG

CERTIFICADO DE PREMIAÇÃO

Certificamos que **Ana Carolina Valente Santos Cruz de Araújo** recebeu a premiação de **segundo lugar** na categoria DOUTORADO da área GENÉTICA DE MICRORGANISMOS E BIOTECNOLOGIA no I GenEXpo, com a apresentação do trabalho intitulado "OS MACRÓFAGOS TREINADOS PELO BCG APRESENTAM UMA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PROTETORA CONTRA A BACTÉRIA INTRACELULAR *Brucella abortus*", promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, no dia 29/06/2023.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Genética



➤ Patente:

- **2022** - Patente de invenção depositada intitulada: “PROTEÍNAS RECOMBINANTES E BACTÉRIA *Mycobacterium bovis* BCG GENETICAMENTE MODIFICADA, IMUNOGÊNICAS CONTRA SARS-COV-2, FORMULAÇÕES VACINAIS E USOS”.

Data do Depósito: 11/04/2022 - Número do Pedido: BR1020220069840.

Titular (es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC / INSTITUTO BUTANTAN

Inventor (es): Sérgio Costa Oliveira / Fábio Mambelli Silva / Fábio Antônio Vitarelli Marinho / Juvana Moreira Andrade / **Ana Carolina Valente Santos Cruz de Araujo** / André Luiz Barbosa Báfica / Daniel Santos Mansur / Greicy Brisa Malaquias Dias / Luciana Cezar de Cerqueira Leite / Alex Issamu Kanno.

➤ Publicações (colaborações):

- **2021** – DE QUEIROZ, N. P.; MARINHO, F. V.; **DE ARAUJO, A. C. V.**; FAHEL, J. S.; OLIVEIRA, S. C. *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.
- **2023** - MAMBELLI, FÁBIO S.; MARINHO, F. V.; ANDRADE, J. M.; **DE ARAUJO, ANA CAROLINA V. S. C.**; ABUNA, R. P. F.; FABRI, V. M. R.; SANTOS, B. P. O.; SILVA, J. S.; DE MAGALHÃES, MARIANA T.Q.; HOMAN, E. JANE; LEITE, L. C. C.; DIAS, G. B. M.; MANSUR, D. S.; BAFICA, A.; OLIVEIRA, S. C. *Recombinant BCG expressing SARS-CoV-2 chimeric protein protects K18-hACE2 mice against viral challenge*. JOURNAL OF IMMUNOLOGY, v. 210, p. 1925-1937, 2023.

➤ **Publicações (primeira autoria):**

- **2023 - DE ARAUJO, ANA CAROLINA V. S. C.; DE QUEIROZ, NINA M. G. P.; MARINHO, FÁBIO V.; OLIVEIRA, SERGIO C.** *Bacillus Calmette-Guérin-Trained Macrophages Elicit a Protective Inflammatory Response against the Pathogenic Bacteria Brucella abortus.* JOURNAL OF IMMUNOLOGY, v. ji220, 2023. (**APÊNDICE B**).
- **2023 - DE ARAUJO, ANA CAROLINA V. S. C.; MAMBELLI, F.; SANCHES, R. O.; MARINHO, F. V.; OLIVEIRA, S. C.** *Current Understanding of Bacillus Calmette-Guérin-Mediated Trained Immunity and Its Perspectives for Controlling Intracellular Infections.* PATHOGENS, v. 12, p. 1386, 2023 (**APÊNDICE C**).

APÊNDICE B – Artigo publicado em revista internacional referente aos dados desta tese

The Journal of Immunology

Bacillus Calmette-Guérin–Trained Macrophages Elicit a Protective Inflammatory Response against the Pathogenic Bacteria *Brucella abortus*

Ana Carolina V. S. C. de Araujo,^{*,†} Nina M. G. P. de Queiroz,[†] Fábio V. Marinho,^{†,1} and Sergio C. Oliveira^{*,†,‡,§,1}

The bacillus Calmette-Guérin (BCG) can elicit enhanced innate immune responses against a wide range of infections, known as trained immunity. *Brucella abortus* is the causative agent of brucellosis, a debilitating disease that affects humans and animals. In this study, we demonstrate that C57BL/6 mouse bone marrow–derived macrophages under BCG training enhance inflammatory responses against *B. abortus*. BCG-trained macrophages showed increased MHC class II and CD40 expression on the cell surface and higher IL-6, IL-12, and IL-1 β production. The increase in IL-1 β secretion was accompanied by enhanced activation of canonical and noncanonical inflammasome platforms. We observed elevated caspase-11 expression and caspase-1 processing in BCG-trained macrophages in response to *B. abortus* compared with untrained cells. In addition, these BCG-trained cells showed higher NLRP3 expression after *B. abortus* infection. From a metabolic point of view, signaling through the Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase pathway was also enhanced. In addition, BCG training resulted in higher inducible NO synthase expression and nitrite production, culminating in an improved macrophage-killing capacity against intracellular *B. abortus*. In vivo, we monitored a significant reduction in the bacterial burden in organs from BCG-trained C57BL/6 mice when compared with the untrained group. In addition, previous BCG immunization of RAG-1–deficient mice partially protects against *Brucella* infection, suggesting the important role of the innate immune compartment in this scenario. Furthermore, naive recipient mice that received BM transfer from BCG-trained donors showed greater resistance to *B. abortus* when compared with their untrained counterparts. These results demonstrate that BCG-induced trained immunity in mice results in better control of intracellular *B. abortus* in vivo and in vitro. *The Journal of Immunology*, 2023, 211: 1–13.

The bacillus Calmette-Guérin (BCG) is an attenuated strain derived from virulent *Mycobacterium bovis*, being the most used vaccine worldwide (1). Currently, BCG is the only licensed vaccine against tuberculosis (2). A growing body of evidence has been suggesting that BCG is able to elicit preventive or therapeutic nonspecific effects against unrelated pathogens, cancer, or even neurodegenerative diseases (1, 3). These data open a range of possibilities involving the investigation of mechanisms induced by this vaccine and its applications. Innate and/or adaptive immune responses are responsible for the overall beneficial effects induced by BCG. Heterologous lymphocyte-mediated responses may involve CD4⁺ or CD8⁺ memory lymphocytes that can mediate cross-reactivity. These responses may assist in polarizing a Th1 response to a secondary nonmycobacterial stimulus (4). However, biological evidence highlights the ability of innate immune cells to respond

effectively during a second unrelated infection by enhanced intracellular mechanisms that remain after clearance of the primary stimulus (5). For example, the protection conferred by BCG against unrelated infections is present in SCID (4, 6) and in RAG-1–deficient (RAG^{-/-}) mice (7), both of which lack functional T and B lymphocytes. These findings demonstrate that the protective effect induced by BCG is linked to the innate immune compartment, at least partially. The immunological memory phenomenon associated with the innate immune system was termed trained immunity in 2011 (8), and its mechanisms are currently the subject of intense research.

Naive innate immune cells undergo epigenetic and metabolic rewiring during the induction of trained immunity, which is related to potentiated secondary responses (9, 10). The metabolic changes in BCG-mediated trained immunity include the enrichment of the glycolysis and glutamine pathways (11). Cooperatively, the increase

*Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; †Departamento de Bioquímica e Imunologia, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; and ‡Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

¹F.V.M. and S.C.O. are cosenior authors.

ORCID: 0000-0003-1045-2249 (A.C.V.S.C.d.A.); 0000-0002-9789-1035 (N.M.G.P.d.Q.); 0000-0001-6885-3438 (F.V.M.); 0000-0003-4062-5577 (S.C.O.).

Received for publication August 29, 2022. Accepted for publication June 30, 2023.

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant 303044/2020-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Grants APQ 01945/17 and Rede Mineira de Imunobiológicos 00140-16), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grants 2022/15358-7 and 2023/02577-5), Pro-Reitoria de Pesquisa-Universidade de São Paulo (Pro-Reitoria de Pesquisa USP), and National Institutes of Health (Grant R01 AI116453).

A.C.V.S.C.d.A., F.V.M., and S.C.O. conceptualized this study. A.C.V.S.C.d.A., F.V.M., and N.M.G.P.d.Q. were responsible for the investigation. A.C.V.S.C.d.A. and F.V.M. were in charge of data curation and formal analysis. A.C.V.S.C.d.A., F.V.M., and S.C.O. wrote the original draft and the final manuscript. F.V.M. and S.C.O. were supervisors.

Address correspondence and reprint requests to Prof. Sergio C. Oliveira, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, São Paulo, SP, 05508-000, Brazil. E-mail address: scozeus1@gmail.com

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: BB, *Brucella* broth; BCG, bacillus Calmette-Guérin; BM, bone marrow; BMDM, bone marrow–derived macrophage; BMT, bone marrow transfer; d.p.i., days postinfection; GSDMD, gasdermin-D; HSC, hematopoietic stem cell; INH, isoniazid; iNOS, inducible NO synthase; MFI, mean fluorescence intensity; MHC-II, MHC class II; MOI, multiplicity of infection; mTOR, mammalian target of rapamycin; mTORC, mammalian target of rapamycin complex; RAG^{-/-}, RAG-1–deficient; RIF, rifampicin; RT-qPCR, real-time quantitative PCR; S6K, S6 kinase; UFMG, Federal University of Minas Gerais; WT, wild-type C57BL/6.

Copyright © 2023 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/23/\$37.50

in these pathways allows the accumulation of metabolites from the tricarboxylic acid cycle, which in turn act by inhibiting or activating histone-modifying enzymes (12). Trained macrophages show enrichment of histone markers that confer increased chromatin accessibility in regulatory regions. This remodeling on promoter regions and strategic enhancers is related to increased transcriptional levels and production of inflammatory cytokines, culminating in a higher capacity to eliminate pathogens (5). Therefore, the interconnection of metabolic and epigenetic reprogramming is a hallmark of this immune phenomenon. An important approach about BCG training is its ability to stimulate myelopoiesis from hematopoietic stem cells (HSCs) in the bone marrow (BM). Hence macrophages derived from these cells have a specific epigenetic program and enhanced responsiveness (5, 13). This is a key mechanism due to the self-renewal capacity of HSCs, which can provide long-term protection (14). It is worth mentioning that trained immunity induction by BCG or β -glucan is associated with improved immune response and ability to control infection against *Staphylococcus aureus* (11), *Mycobacterium tuberculosis* (5), *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (15), *Candida albicans* (10), and *Leishmania braziliensis* (16).

Brucella abortus is a Gram-negative bacterium that causes brucellosis (17). This disease is the most widespread bacterial zoonosis and one of the most neglected (18), causing an annual loss of ~\$600 million in Latin America (19). Regions of Africa, Asia, Latin America, and the Middle East possess the highest incidence index in humans (20). This illness is severely debilitating, tending to chronicity, although rarely fatal (18, 21). Among the morbidities that this infection can potentially cause are undulant fever, arthritis, endocarditis, osteomyelitis, and neurological complications (20, 22). The most common symptoms are fever, fatigue, arthralgia, sweating, lymphadenopathy, hepatomegaly, and splenomegaly (23). The affected patient undergoes multiple regimens of antibiotic treatment with a high relapse rate. There is no vaccine for humans (18). In the early steps of the *B. abortus* infection, bacterial immune evasion mechanisms are essential to bacterial pathogenesis. Such mechanisms encompass the ability to survive and proliferate within APCs, such as dendritic cells and macrophages, the latter considered the best replicative niche for this pathogen (24, 25). *Brucella*'s survival and growth within APCs enable its systemic spread (21). Its noncanonical LPS is less endotoxic, because its longer chains are not efficiently recognized by TLR4 (26). In addition, this molecule forms macrodomains on the plasma membrane of APCs at specific regions containing MHC class II (MHC-II). This event leads to reduced Ag presentation to CD4⁺ T lymphocytes (27).

Inflammasomes are multiprotein cytoplasmic complexes induced by pathogen-associated molecular patterns and damage-associated molecular patterns. They control the activation of procaspase-1. This proteolytic enzyme is self-cleaved into the caspase-1 p20 subunit, which in turn is responsible for converting pro-IL-1 β into mature IL-1 β (28). In addition, the caspase-1 p20 subunit cleaves gasdermin-D (GSDMD) into GSDMD p30 (N-terminal portion), which oligomerizes in the plasma membrane. This event can trigger cell death by pyroptosis (29–31). NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β secretion contribute to the immunological response against *B. abortus* infection (31). Moreover, LPS from *B. abortus* in the cytoplasm activates the caspase-11-mediated noncanonical inflammasome pathway, which culminates in K⁺ efflux through GSDMD pores and consequent NLRP3 inflammasome activation (29). Both canonical and noncanonical pathways are important for this pathogen control, because caspase-11^{-/-}, GSDMD^{-/-} (29), and IL-1R^{-/-} mice are more susceptible to infection (31). Furthermore, inflammatory macrophages with increased glycolysis, NO, and IL-1 β production inhibit *B. abortus* replication (30).

There is a rapid emergence of multidrug-resistant bacteria, mainly Gram negative, as opposed to the slow development of new antibiotics (32). This scenario requires alternatives, and trained immune responses may represent a possibility to solve this demand. Because the monocyte/macrophage lineage is the main replicative niche for *B. abortus*, BCG-mediated trained immunity induced at the level of BM cells may be able to improve the immune responses elicited by derived macrophages against *B. abortus* infection through functional, transcriptional, and epigenetic reprogramming. This approach may result in better control of this stealthy bacterium. In this study, we show that BM-derived macrophages (BMDMs) from C57BL/6 mice trained with BCG exhibited improved capacity of inflammatory cytokine production, higher expression of cell-surface molecules, enrichment of the inflammasome pathway, higher nitrite production, and enhanced signaling through the Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR)/S6K metabolic axis, which culminates in greater control of *B. abortus* intracellular growth. Collectively, we found that macrophages from BCG-trained animals with an inflammatory profile lead to reduction of *B. abortus* burden in macrophages and mice.

Materials and Methods

Mice and ethics

Wild-type C57BL/6 (WT) mice were obtained from the Federal University of Minas Gerais (UFMG) animal facility in Brazil. RAG^{-/-} mice were generated in the C57BL/6 background and were provided by Dr. A. M. Caetano de Faria (UFMG) (33). All animals were housed in a ventilated rack system and at a standard 12/12 h light/dark cycle. Six- to eight-week-old female and male mice were used and randomly distributed in experimental groups. Standardized environmental enrichment (red mouse igloo and foraging) was used for animal welfare. The Institutional Animal Care and Use Committee of UFMG approved the animal experimental procedures under permit #45/2018.

Bacterial strains and growth conditions

M. bovis BCG Moreau strain and *B. abortus* virulent S2308 strain were used for the in vitro and in vivo experiments. BCG was grown in Difco Middlebrook 7H9 (BD Biosciences) broth enriched with 0.05% Tween 80 (Synth), 0.2% glycerol (Synth), and 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase until midlog phase (OD_{600nm} = 0.7–0.8; ~21 d), as described previously (34). *B. abortus* was grown in *Brucella* broth (BB; BD Biosciences) for 3 d under constant agitation (180 rpm, 37°C). Both bacterial suspensions were recovered (4000 rpm, 4°C), suspended in glycerol 10%, and frozen at –80°C until use.

Trained immunity induction model

Trained immunity was induced in WT mice by i.v. immunization with 1×10^6 CFUs BCG for up to 30 d. All mice were anesthetized i.p. with xylazine (dosage: 12.5 mg/kg) and ketamine (dosage: 100 mg/kg) before immunization. To eliminate BCG from the animals, we administered a 30-d oral treatment by supplementing the drinking water with 100 mg/l isoniazid (INH; Sigma-Aldrich) and 100 mg/l rifampicin (RIF; Sigma-Aldrich). The INH-RIF oral treatment was followed by a 15-d washout period with a return to pure water supply (5). Untrained counterparts followed the same protocol, except for BCG immunization. As an internal control of the experiment, 1×10^7 BM cells and 1×10^7 spleen cells were plated on Middlebrook 7H11 agar medium (BD Biosciences) that was supplemented with 0.5% glycerol and 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase to verify the clearance of bacteria.

B. abortus challenge of mice and burden measurement

BCG-trained and untrained WT and RAG^{-/-} mice were challenged i.p. with 1×10^6 CFUs *B. abortus*. Mice were euthanized at 7 or 15 d postinfection (d.p.i.). The spleen and liver were harvested aseptically from each animal. Both organs were weighed, and the results are shown as percentage of body weight. One-third of the spleen was macerated in saline (NaCl 0.9%), serially diluted, and plated in duplicate on BB agar. After 3 d of incubation at 37°C, the number of CFUs was determined as described previously (29, 31). The results are shown as CFU mean per organ.

Generation of BMDMs

To obtain BMDMs, we euthanized BCG-trained and untrained WT mice for the extraction of femurs and tibias. The BM cells were harvested in cold PBS and cultured in 10 ml DMEM (Life Technologies) supplemented with 10% FBS (Life Technologies), 1% HEPES (Life Technologies), and 20%

L929 cell conditioned medium, as the source of M-CSF. After 4 d of incubation at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂, 10 ml of fresh and supplemented DMEM was added. On day 7, BMDMs were harvested by removing the supernatant and adding PBS supplemented with 1% EDTA (Life Technologies) for 20 min at 4°C (10 ml/petri dish).

Kinetics of *B. abortus* growth

For bacterial growth, BMDMs were seeded at 5×10^5 cells/well on 24-well plates containing DMEM enriched with 10% FBS and 1% HEPES. Before being used to infection, *B. abortus* was grown in BB for 1 d at 37°C under constant agitation. The next day, OD was used to measure bacterial load ($OD_{600nm} = 3 \times 10^9$ CFUs/ml). *B. abortus* was centrifuged (4800 rpm, 4°C), suspended in DMEM, and used to infect BMDMs at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1 in 300 μ l/well. Alternatively, stimulation with IFN- γ (10 ng/ml) overnight was performed before *B. abortus* infection. The plates were briefly centrifuged (1200 rpm), aiming to ensure contact between *B. abortus* and BMDMs. After 4 h of incubation at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂, BMDMs were washed twice with warm PBS to remove nonengulfed bacteria and incubated in supplemented DMEM for up to 48 h. To quantify the number of intracellular bacteria, we lysed macrophages with sterile H₂O at the time 0, 24, and 48 h postinfection. Serial dilutions of lysates were plated on BB containing 1.5% agar. The number of CFUs was determined after 3 d of incubation at 37°C.

B. abortus infection of macrophages

BMDMs were seeded at 5×10^5 cells/well on 24-well plates with DMEM supplemented with 1% FBS and 1% HEPES. Infection of BMDMs was performed with *B. abortus* (MOI 100:1) for 8, 12, or 18 h. As a positive control for immunological assays, cells were stimulated with 1 μ g/ml *E. coli* LPS (Sigma-Aldrich). As a positive control for inflammasome activation, cells were primed with 1 μ g/ml *E. coli* LPS (Sigma-Aldrich) for 4 h with addition of 20 μ M nigericin sodium salt (Sigma-Aldrich) in the last 45 min of incubation.

Real-time quantitative PCR

BMDMs from BCG-trained or untrained mice were used for real-time quantitative PCR (RT-qPCR) experiments before stimulation and after in vitro challenge with *B. abortus* for 8 or 18 h. The RNA extraction was carried out with TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. A total of 1 μ g from total RNA was reverse transcribed using a final concentration of 0.125 μ g/ μ l oligo-dT, 0.625 mM dNTPs, 0.01M DTT, 0.1 U reverse transcriptase, 1 \times reverse transcriptase buffer, and nuclease-free water to a final volume of 20 μ l. The cycling parameters used were 42°C for 60 min and 70°C for 15 min. Quantitative PCR was performed using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), oligo-dT cDNA as the PCR template, and 0.5 μ M primers and nuclease-free water to a final volume of 10 μ l. The PCR was performed in a QuantStudio3 Real-Time PCR instrument (Applied Biosystems). The cycling parameters used were 60°C for 10 min, 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min and a dissociation stage of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, 95°C for 15 s, and 60°C for 15 s. Primers were used to amplify a specific fragment corresponding to specific murine gene targets as shown in Table I. All data are presented as relative expression units after normalization to the β -actin gene. Measurements were conducted in triplicate.

Western blotting analysis

Cell lysate from BMDM cultures was harvested before stimulation and after in vitro infection with *B. abortus* for 12 and 18 h. Alternatively, cell lysate was harvested 10 and 30 min after the challenge for p-Akt analysis. Cell lysis was performed with Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, and 1:100 of protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich). Equal protein amounts (25 μ g of cell lysate) or equal supernatant volumes (20 μ l) were subjected to electrophoresis on a polyacrylamide gel, followed by Western blotting according to standard techniques. For proteins with a molecular mass \geq 100 kDa,

10% gels were used. For proteins with a molecular mass <100 kDa, 15% gels were used. Among the anti-mouse primary Abs used are those mentioned in Table II. Immunoreactive bands were visualized using Lumi-nol chemiluminescent HRP substrate (Millipore, Billerica, MA) in an Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Buckinghamshire, U.K.). The intensity of bands was quantified and normalized using ImageJ software. Data were obtained relative to the level of untrained BMDMs infected with *B. abortus* for 18 h assigned arbitrarily with the value of 1.0, as described previously (35).

Cytokine measurements

BMDMs from BCG-trained or untrained mice were infected with *B. abortus* in vitro for 18 h. The production of murine IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IL-12 was measured on supernatants from BMDM culture by ELISA using a commercial kit (R&D Diagnostic, Minneapolis, MN), according to the manufacturer's recommendations.

Nitrite measurement by Griess

The supernatants of BMDMs, stimulated for 18 h with *B. abortus*, from BCG-trained or untrained mice were used for nitrite measurement. The concentration of nitrite (NO₂⁻), a stable metabolite of NO, was measured using Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% naphthyl ethylenediamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid). In brief, 50 μ l of cell culture supernatants was mixed with 50 μ l of Griess reagent in a 96-well plate. Subsequently, the mixture was incubated and protected from light at room temperature for 20 min, and the absorbance was measured at 550 nm in a microplate reader. Fresh culture medium was used as blank. The quantity of nitrite was determined from a sodium nitrite (NaNO₂) standard curve (3, 34).

BM transfer experiment

BM transfer (BMT) was performed from WT mice, submitted or not to the BCG-trained immunity induction model, to WT naive recipient mice. The recipient mice were subjected to 4.5 Gy irradiation twice, with a 3-h interval between doses. On the irradiation day, BM cells were extracted from BCG-trained or untrained mice, and 3×10^7 BM cells were injected i.v. into each recipient mouse. The assessment of BM cell depletion followed by its reconstitution was conducted by counting leukocytes in the blood weekly. Each mouse had its blood collected within a 15 d-interval to increase animal welfare. Thus, blood collections were performed alternately. Leukocyte count in the blood was performed in the Neubauer chamber using the Turk dye (1:20). One month after BMT when the hematopoietic compartment had been reconstituted, the chimeric mice were infected i.p. with 1×10^6 CFUs *B. abortus*. The chimeric mice were euthanized 7 d.p.i. with *B. abortus*. The CFUs of *B. abortus* in the spleen were evaluated as described earlier.

Flow cytometry analysis

BMDMs from BCG-trained or untrained mice were seeded at 1×10^6 cells/well on 96-well plates with DMEM supplemented with 1% FBS and 1% HEPES. The in vitro infection of BMDMs was performed with *B. abortus* (MOI 100:1) for 18 h. All cells were incubated with anti-mouse CD116/32 (Fc Block) (BD Biosciences) in FACS buffer (PBS, 0.25% BSA, 1 mM Na₃N) for 20 min at 4°C. For enzyme staining, cells were fixed and permeabilized using BD Cytotfix/Cytoperm Kit (BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Staining panels were used to measure activation status and inflammatory profile of macrophages. Among the conjugated anti-mouse Abs used are those mentioned in Table III. PE-Cy5.5-conjugated streptavidin (Thermo Fisher Scientific) was used when necessary. The appropriate isotype controls were used. Attune Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies) was used to collect ~100,000 events, and data were analyzed using FlowJo Software (Tree Star) (34). Total cells were selected after gating on CD11b⁺F4/80⁺ double-positive cells. Frequencies of CD40⁺, MHC-II⁺, CD80⁺ inducible NO synthase (iNOS)-positive, and CD163⁺arginase 1⁺ cells were analyzed. The mean fluorescence intensity (MFI) was evaluated within the entire CD11b⁺F4/80⁺ double-positive cell population.

Table I. Primers used for quantitative PCR analysis

Primer	Forward (5'–3')	Reverse (5'–3')
Nlrp3	TGC TCT TCA CTG CTA TCA AGC CCT	ACA AGC CTT TGC TCC AGA CCC TAT
Nos2	AGC ACT TTG GGT GAC CAC CAG GA	AGC TAA GTA TTA GAG CGG CGG CA
Arg1	TGA CAT CAA CAC TCC CCT GAC AAC	GCC TTT TCT TCC TTC CCA GCA G
Actb	GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG	CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T

All primer pairs were designed to amplify a specific region of the target murine genes. Arg1, arginase 1.

Table II. Primary Abs used for Western blotting analysis

Ab	Clone	Manufacturer
Rabbit mAb p-Akt (Thr308)	244F9	Cell Signaling Technology
Rabbit mAb p-mTOR (Ser2448)	D9C2	Cell Signaling Technology
Rabbit Ab p-p70 S6K (Thr389)	–	Cell Signaling Technology
Mouse mAb Akt	40D4	Cell Signaling Technology
Mouse mAb mTOR	L27D4	Cell Signaling Technology
Rabbit p-p70 S6K	–	Cell Signaling Technology
Mouse mAb IL-1 β	3A6	Cell Signaling Technology
Mouse mAb p20 subunit of caspase-1	Casper 1	Adipogen
Mouse mAb NLRP3	Cryo-2	Adipogen
Mouse mAb caspase-11	Flamy-1	Adipogen
Rabbit mAb GSDMD	EPR19828	Abcam
Rabbit mAb β -actin	13E5	Cell Signaling Technology

Loading control (β -actin) was performed using primary Ab at a 1:5000 dilution. For detection of the other targets, the primary Abs were used at 1:1000 dilution.

Statistical analysis

Results are presented as the mean \pm SD. Statistically significant differences among the results obtained were evaluated by two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test ($p < 0.05$), one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test ($p < 0.05$), or the Student t test ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

BCG training potentiates macrophage response against *B. abortus* infection

BCG induces HSC expansion and differentiation into myeloid precursors that can give rise to macrophages more efficient to control infections (5, 13, 36). Pioneering work revealed that i.v. BCG administration resulted in trained immunity induced at the BM level, leading to enhanced responsiveness from derived macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*, even after BCG elimination (5). This approach confers an innate immune memory with long-lasting potential because of the life span and proliferative ability of HSCs. To induce BCG-trained immunity, we immunized WT mice with 1×10^6 CFUs BCG i.v. After 30 d, mice were treated with INH and RIF antimycobacterial antibiotics orally. This treatment regimen was conducted for an additional 30 d to achieve BCG clearance from the mice (Supplemental Fig. 1A). Subsequently, a washout period was initiated, in which there was a return to the supply of pure water for 15 d. BCG growth was tested in BM and in spleen cells from BCG-immunized mice, submitted or not to INH/RIF treatment. Plating these anatomical sites on a selective medium showed that INH/RIF treatment led to BCG clearance (Supplemental Fig. 1B, 1C), which suggests any phenotype observed using this model is not related to an extended presence of the BCG. No change in the expression of macrophage markers between BCG-trained and untrained groups was observed after in vitro differentiation of BM cells (Supplemental Fig. 1D; Tables I, II, III).

After this period, BMDMs were generated in vitro and infected with *B. abortus* (MOI 100:1), or WT mice were infected with 1×10^6 CFUs *B. abortus* i.p. *B. abortus* presents evasion mechanisms that reduce the activation of both innate and adaptive immune systems (25, 27), leading to its persistence in the host and chronicity of

infection (21). Because trained immunity potentially leads to increased expression of inflammatory molecules, we evaluated whether BCG-trained macrophages have improved response against *B. abortus* infection. Analysis of macrophage activation status revealed BCG-trained BMDMs have significantly higher frequency of positive cells for MHC-II (MHCII⁺CD11b⁺F480⁺) when compared with the untrained macrophage population in response to *B. abortus* (Fig. 1A, 1B). The gating strategy used in this analysis can be found in Supplemental Fig. 2A. The MFI for MHC-II was also significantly increased in the population of BCG-trained macrophages, suggesting higher expression per cell (Supplemental Fig. 2B). Regarding the CD40 costimulatory molecule, BCG training significantly increased the frequency of positive cells (CD40⁺CD11b⁺F480⁺), as well as the MFI in response to *B. abortus* (Fig. 1C, 1D, Supplemental Fig. 2C). In addition to the higher expression of cell-surface molecules, BCG training induced increased production of the proinflammatory cytokines IL-6 (Fig. 1E) and IL-12 (Fig. 1F) postinfection with *B. abortus*. Surprisingly, no difference was observed in TNF- α level (Supplemental Fig. 2D). Taken together, these results demonstrate BCG-mediated trained immunity increased expression of activation markers and production of proinflammatory cytokines by macrophages in response to *B. abortus*.

BCG-trained macrophages show canonical and noncanonical inflammasome pathway enrichment upon *B. abortus* infection

To understand how BCG training influences the inflammasome pathway in macrophages in the context of *B. abortus* infection, first we investigated whether there is an alteration in the canonical pathway components. BCG-trained macrophages showed increased IL-1 β secretion when compared with untrained group (Fig. 2A). Besides, a significantly higher pro-IL-1 β expression was observed in BCG-trained macrophages at 12 and 18 h postinfection (Fig. 2B, 2C). Assessment of caspase-1 demonstrated an increase in its active p20 subunit in BCG-trained macrophages upon *B. abortus* infection (Fig. 2D, 2E). Moreover, BCG training induced higher NLRP3 transcription in response to *B. abortus* (Fig. 2F). It is worth mentioning that BCG training itself (without *B. abortus* infection) resulted in greater NLRP3 expression (Supplemental Fig. 3A, 3B).

Noncanonical inflammasome activation mediated by caspase-11 is pivotal to the immune response against *B. abortus*. Caspase-11 recognizes *B. abortus* LPS in the cytoplasm and cleaves GSDMD, leading to pore formation and consequent NLRP3 inflammasome activation (29). Caspase-11^{-/-} macrophages have shown delayed and significantly reduced pore formation in the plasma membrane in response to this bacterium (29). We assessed caspase-11 expression in BCG-trained macrophages infected with *B. abortus*. A higher expression of both p43 and p38 isoforms was observed in BCG-trained cells when compared with untrained counterparts (Fig. 2G–I). We noticed a slight increase of GSDMD p30 at 18 h after BCG-trained macrophages were

Table III. Conjugated Abs used for flow cytometry analysis

Ab	Clone	Manufacturer
PE CD40	3/23	BD Biosciences
PE-Cy7 iNOS	CXNFT	Invitrogen
Allophycocyanin ARG1	A1exF5	eBioscience
Allophycocyanin MHC-II	AF6-120.1	BD Biosciences
Allophycocyanin-Cy7 CD11b	M1/70	BD Biosciences
Biotinylated F4/80	BM8	eBioscience

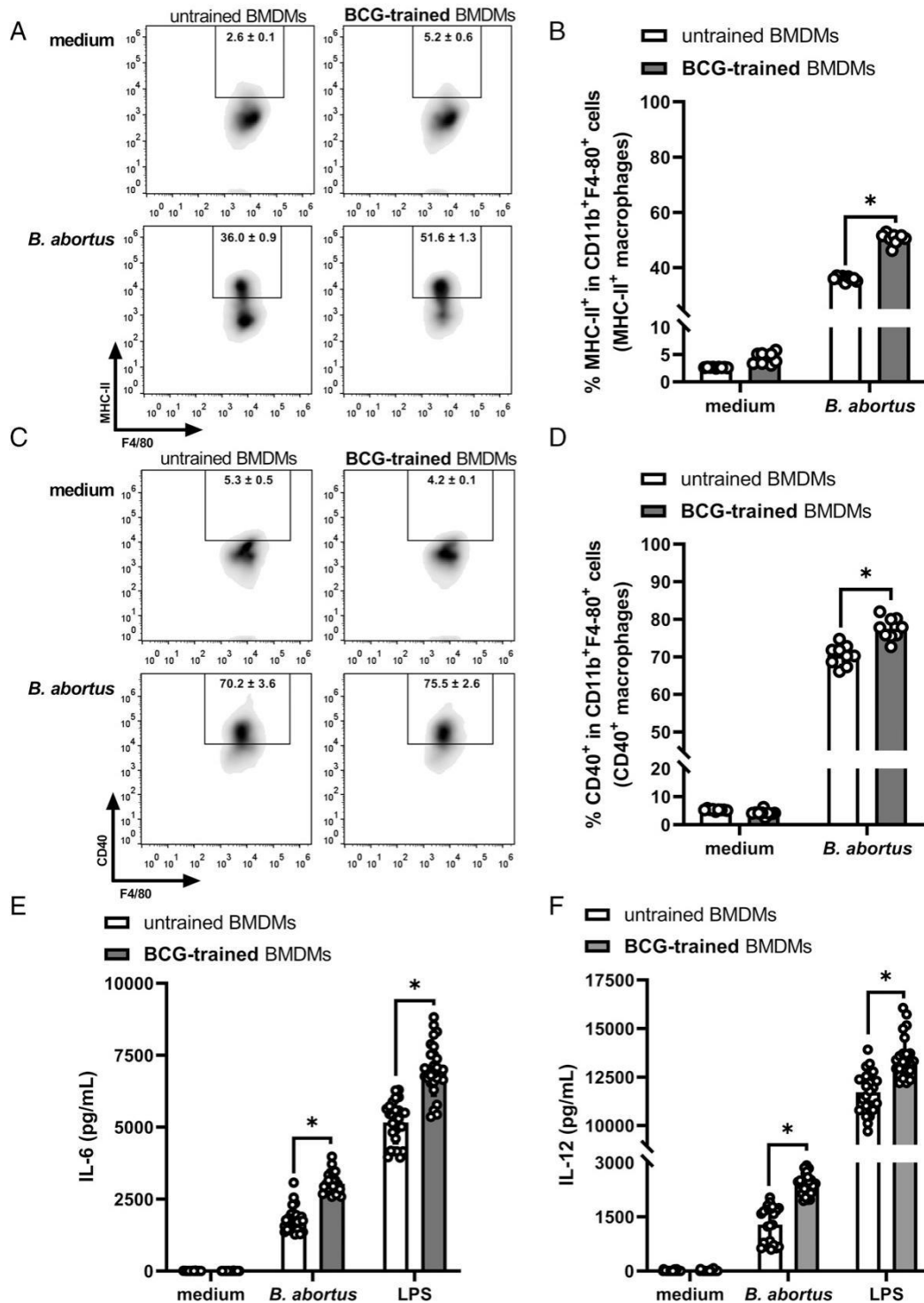


FIGURE 1. BCG training improves macrophage responsiveness upon *B. abortus* infection. Macrophages from BCG-trained or untrained C57BL/6 mice were challenged with *B. abortus* for 18 h. Afterward, the expression of surface markers was assessed by flow cytometry. (**A** and **B**) Frequency of MHCII⁺ CD11b⁺F480⁺ cells (MHCII⁺ macrophages). (**C** and **D**) Frequency of CD40⁺CD11b⁺F480⁺ cells (CD40⁺ macrophages). (**E** and **F**) Production of the proinflammatory cytokines IL-6 (**E**) and IL-12 (**F**) was measured in culture supernatants by ELISA. Data are presented as mean ± SD. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test, **p* < 0.05 comparing BCG-trained and untrained BMDMs submitted to the same stimulus. LPS was used as a positive and internal control of the experiment. Data shown were pooled from three independent experiments.

6

BCG-TRAINED MACROPHAGES PROTECT AGAINST BRUCELLOSIS

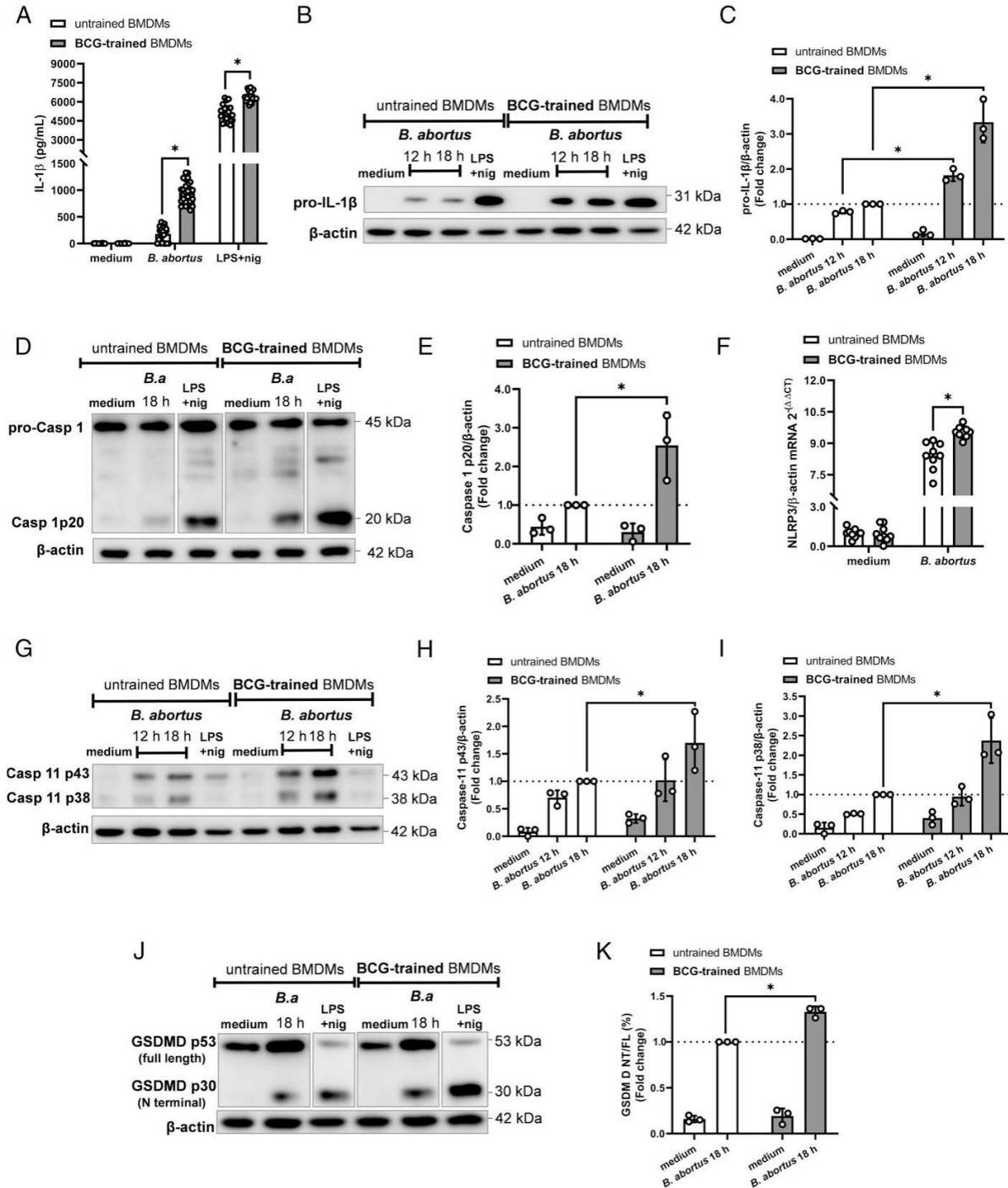


FIGURE 2. BCG-trained macrophages present enrichment of canonical and noncanonical inflammasome pathways in response to *B. abortus* infection. (A) IL-1 β production by BMDMs from BCG-trained or untrained C57BL/6 mice was measured in culture supernatants at 18 h poststimulation by ELISA. (B) Pro-IL-1 β expression by BMDMs from BCG-trained or untrained C57BL/6 mice was measured in cell lysates at 12 or 18 h poststimulation. (C) Pro-IL-1 β quantification by densitometry, expressed as target relative to the housekeeping protein β -actin. (D) p20 subunit of caspase-1 was measured in supernatants of BMDMs from BCG-trained or untrained C57BL/6 mice at 18 h poststimulation. (E) p20 subunit of caspase-1 quantification by densitometry, expressed as target relative to the housekeeping protein β -actin. (F) NLRP3 transcriptional level was determined by RT-qPCR at 8 h poststimulation. The result is expressed as target relative to the housekeeping gene β -actin. (G) p43 and p38 isoforms of caspase-11 expression were measured in cell lysates at 12 or 18 h poststimulation. (H and I) p43 (H) and p38 (I) caspase-11 quantifications by densitometry are expressed as target relative to the housekeeping protein β -actin. (J) Full-length GSDMD (FL) and GSDMD p30 (N-terminal [NT]) were detected in cell lysates at 12 or 18 h poststimulation. (Figure legend continues)

infected with *B. abortus* (Fig. 2J, 2K). These findings associated with increased IL-1 β secretion and higher caspase-1 processing show enriched canonical and noncanonical inflammasome pathways in BCG-trained macrophages against *B. abortus*. Caspase-11-mediated noncanonical inflammasome activation may represent an important mechanism in BCG-mediated trained immunity against *B. abortus*.

BCG training triggers Akt/mTOR/S6K pathway activation in macrophages after B. abortus infection

The mTOR is a kinase important to cellular metabolism regulation. Two distinct known protein complexes contain mTOR as a constituent of their catalytic units: mTOR complex (mTORC) 1 and mTORC2 (37, 38). Upon stimulation, Akt phosphorylation leads to mTORC1 activation (39). Afterward, the ribosomal protein p70 S6 kinase (S6K) phosphorylation at Thr389, a canonical downstream target of mTORC1, results in activation of transcription and translation of many cellular processes (37). The complex mTORC1 plays a key role in the immunometabolic shift toward an inflammatory profile on macrophages upon different bacterial infections (40–42). We found an enriched Akt/mTOR/S6K axis in BCG-trained BM cells and derived macrophages before bacterial infection (Supplemental Fig. 3B, 3C). In addition, Akt activation was significantly increased in BCG-trained macrophages upon *B. abortus* sensing when compared with untrained macrophages (Fig. 3A, 3B). Furthermore, there was a significant augmentation in Akt-mediated mTOR phosphorylation and consequently in p70 S6K activation in these BCG-trained cells at 12 and 18 h after *B. abortus* infection (Fig. 3C–E). Altogether, these data suggest that the Akt/mTOR/S6K axis is activated before and upon *B. abortus* infection in BCG-trained macrophages.

BCG training potentiates the killing capacity of macrophages against B. abortus

Among the mechanisms that drive macrophage plasticity, signaling pathways are pillars for contextualizing the heterogeneity of these cells. Different stimuli can lead to contrasting transcriptional and functional profiles (43). Therefore, inflammatory macrophages are characterized by elevated production of inflammatory cytokines, higher expression of iNOS, and increased nitrite production, an important antimicrobial molecule (30). A greater iNOS MFI (Fig. 4A, 4B), along with a higher frequency of iNOS⁺ cells (iNOS⁺CD11b⁺F480⁺) (Supplemental Fig. 4A, 4B), was observed in the BCG-trained versus untrained macrophage population in response to *B. abortus*. In addition, we found that BCG-mediated trained immunity leads to a higher iNOS transcriptional level in macrophages against *B. abortus* (Fig. 4C). The increased iNOS expression culminated in greater nitrite production by BCG-trained cells (Fig. 4D). Although previous study demonstrated that *B. abortus* infection leads to a reduction in arginase 1 expression (30), no statistical difference was observed between BCG-trained and untrained groups for this molecule (Supplemental Fig. 4C–E). Next, we aimed to assess whether BCG training influences the intracellular killing of *B. abortus* by macrophages. BCG training improves macrophage killing of intracellular *B. abortus*, as shown by the reduction of bacterial burden at 48 h postinfection (Fig. 4E). Approximately 0.6 log₁₀ difference was observed between BCG-trained and untrained macrophages. Interestingly, BCG-trained macrophages exhibited an additional improvement in killing ability upon exogenous

IFN- γ -mediated activation (Fig. 4F), with a difference of around 1.4 log₁₀ between the groups. These data suggest that BCG-trained macrophages have increased iNOS expression, elevated nitrite production, and improved ability to kill intracellular *B. abortus*.

BCG immunization enhances the resistance of WT mice against B. abortus

The infection occasioned by *B. abortus* tends to be chronic and persistent. Among the most common alterations in this disease are splenomegaly and hepatomegaly. *B. abortus* survival and growth within phagocytes lead to its systemic spread. Subsequently, this bacterium extends the infection to other cells of the myeloid lineage, such as liver and spleen macrophages (21, 23). Initially, we addressed whether BCG immunization influences the immune system to improve the control of *B. abortus*. Thus, 30 d after BCG i.v. injection, WT and RAG^{-/-} mice were infected i.p. with 1×10^6 CFUs to mimic *B. abortus* systemic dissemination. We observed that previous BCG vaccination resulted in lower *B. abortus* burden in the spleen of WT mice at 7 and 15 d.p.i. (Fig. 5A). Furthermore, immunized mice presented lower spleen and liver relative weights compared with the nonimmunized control group (Fig. 5B, 5C). Because splenomegaly and hepatomegaly are common signs observed in brucellosis (23), these results suggest that BCG immunization reduced organ alterations in mice affected by this disease. Importantly, previous BCG immunization resulted in an elevated capacity to control *B. abortus* load in the spleen of RAG^{-/-} mice at 7 d.p.i. when compared with unimmunized control animals (Fig. 5D). Taken together, these data suggest BCG is able to activate the immune system, triggering a protective immune response against *B. abortus* in mice. The reduction of *B. abortus* burden in the spleen of RAG^{-/-} mice further suggests an important role of the innate immune system in this protective scenario.

BMT to naive mice can transmit the protection provided by BCG training

The mechanisms related to BCG-induced trained immunity at the BM microenvironment level are complex and still represent a gap in the immunology field. To confirm whether the BM compartment plays a role in the protection mediated by BCG-trained immunity in vivo against *B. abortus* infection, we submitted naive WT mice to myeloablative irradiation consisting of 4.5 Gy irradiation twice, with a 3-h interval between doses (Fig. 6A). Subsequently, 3×10^7 BM cells were transferred (BMT) from BCG-trained or untrained donor mice to irradiated naive recipient mice. Aiming to monitor mice throughout the BM restoration process, we performed peripheral blood leukocyte counts weekly. We observed that 72 h postirradiation (day 3), leukocyte level declined considerably (Fig. 6B). Recipient mice (BCG-trained and untrained BMT) returned to a similar baseline leukocyte level 30 d post-BMT. As an internal control, irradiated mice that did not receive BM (non-BMT) perished in the second week postirradiation, as predicted. Given the BMT mice recovery, infection with 1×10^6 CFUs *B. abortus* was conducted i.p. BCG-trained BMT recipient mice showed lower *B. abortus* burden in the spleen when compared with untrained BMT recipient mice at 7 d.p.i. (Fig. 6C). These data suggest that protective capacity in vivo, conferred by BCG-mediated trained immunity against *B.*

(K) The conversion of GSDMD FL into GSDMD NT was quantified by densitometry. As represented by dashed lines, data from densitometry analyses were obtained relative to the level of untrained BMDMs infected with *B. abortus* for 18 h assigned arbitrarily with the value of 1.0. Graphical data are presented as mean \pm SD. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test, * $p < 0.05$ comparing BCG-trained and untrained BMDMs submitted to the same stimulus. LPS+nigericin was used as a positive control for inflammasome activation. Data shown were pooled from three independent experiments.

8

BCG-TRAINED MACROPHAGES PROTECT AGAINST BRUCELLA

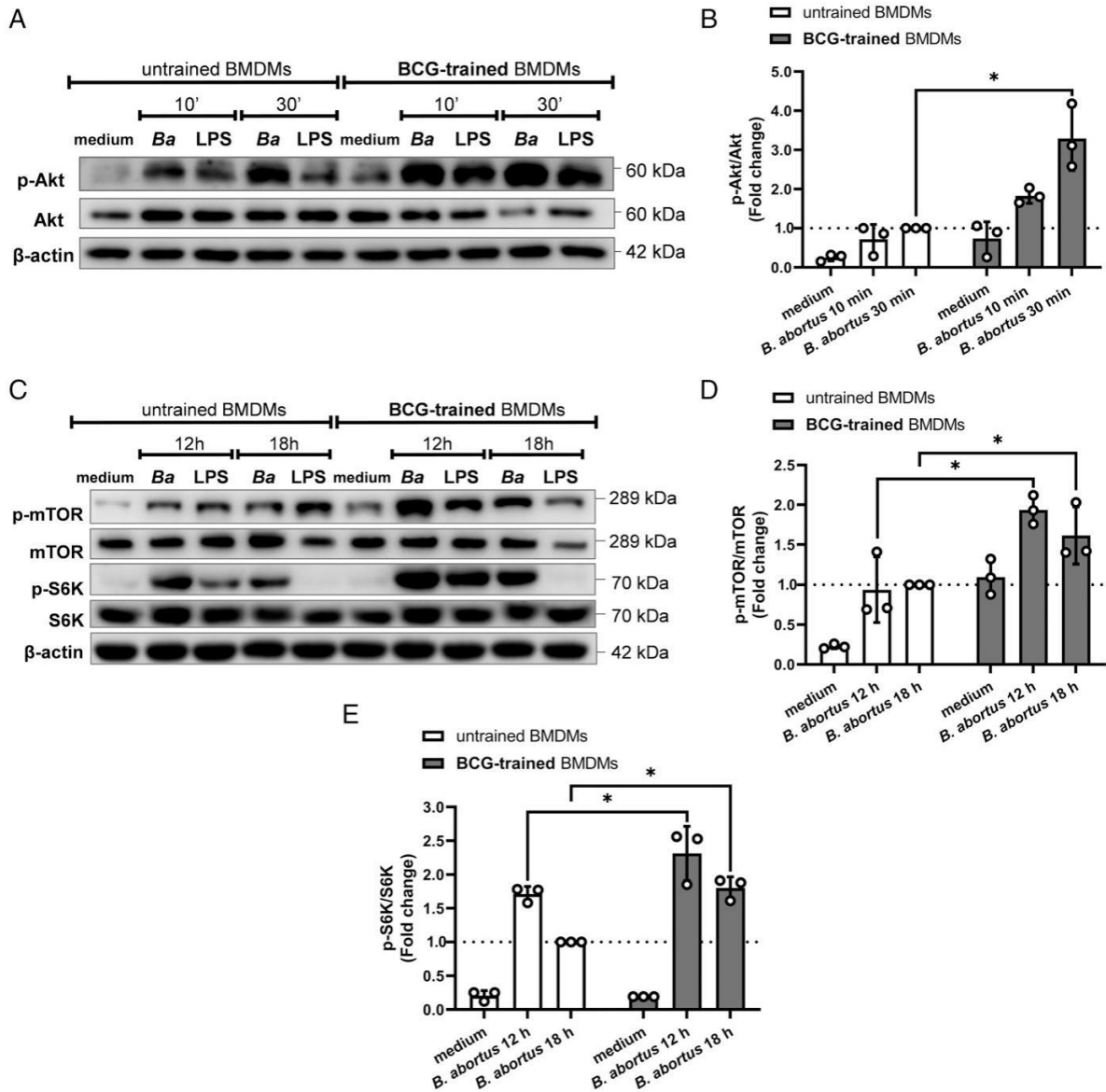


FIGURE 3. Akt/mTOR/S6K pathway is enhanced in BCG-trained macrophages upon *B. abortus* infection. **(A)** Akt phosphorylation at Thr308 (p-Akt) was measured in BMDMs from BCG-trained or untrained C57BL/6 mice at 10 and 30 min poststimulation in cell lysates by Western blot analysis. **(B)** p-Akt quantification by densitometry is expressed as target relative to the total Akt protein. **(C)** mTOR phosphorylation at Ser2448 (p-mTOR), which is mediated by Akt, and S6K phosphorylation at Thr389 (p-S6K) were measured in BMDMs from BCG-trained or untrained C57BL/6 mice at 12 and 18 h poststimulation in cell lysates by Western blot analysis. **(D and E)** p-mTOR (D) and p-S6K (E) quantifications by densitometry are expressed as target relative to the total mTOR and total S6K protein, respectively. As represented by dashed lines, data were obtained relative to the level of untrained BMDMs infected with *B. abortus* for 18 h assigned arbitrarily with the value of 1.0. Graphical data are presented as mean \pm SD. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test, $*p < 0.05$ comparing BCG-trained and untrained BMDMs submitted to the same stimulus. LPS was used as a positive and internal control of the experiment. Data shown were pooled from three independent experiments.

abortus, resides in the BM compartment and can be transferred to naive recipients.

Discussion

Epidemiological studies have revealed associations between BCG vaccination and protection against heterologous infections, mainly respiratory infectious diseases (4, 44). An important cornerstone of nonspecific effects is trained immunity, an immunological memory

phenomenon associated with the innate immune system of mammals (8, 44). Trained immunity is characterized as a potentiated response, arising from elevated cytokine production and metabolic and epigenetic changes against an unrelated secondary stimulus (8). Innate cells such as neutrophils (45), dendritic cells (46), and mainly NK cells, monocytes, and macrophages have the ability to potentiate the immune response to reinfection (5, 10, 16). Different BCG strains, termed BCG-TICE (5) and BCG-SSI (10), have already been reported to induce this phenomenon. However, BCG Moreau had

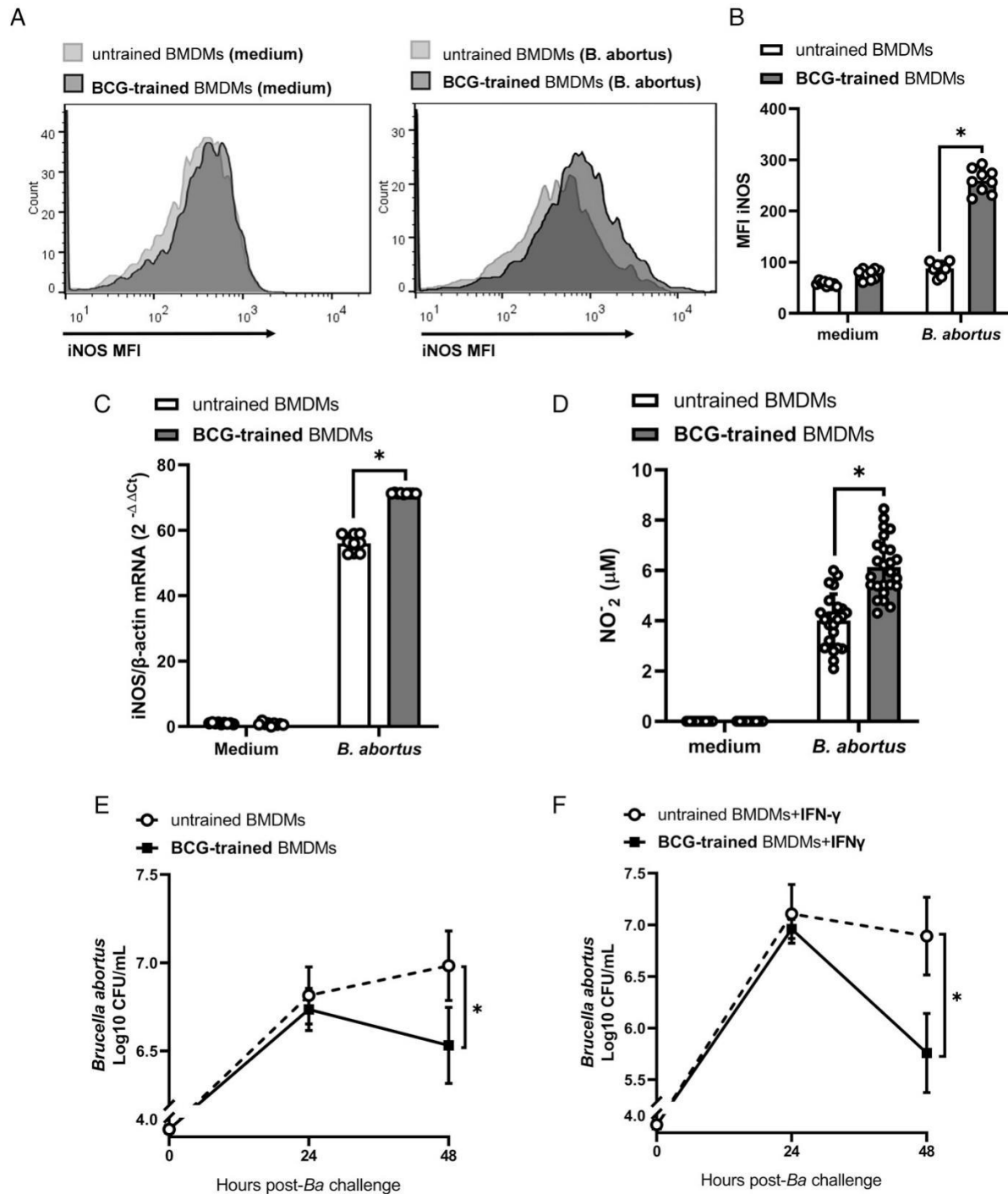


FIGURE 4. BCG training induces an inflammatory profile and potentiated killing capacity of macrophages against *B. abortus*. (**A** and **B**) MFI of iNOS expression in macrophages at 18 h poststimulation. (**C**) iNOS transcriptional level was determined by RT-qPCR at 18 h poststimulation. The result is expressed as target relative to the housekeeping gene β -actin. (**D**) Nitrite (NO_2^-) accumulation measurement was performed in BMDMs from BCG-trained or untrained C57BL/6 mice in culture supernatants at 18 h poststimulation by Griess reaction. (**E**) BMDMs were washed to remove extracellular bacteria at 4 h postinfection with *B. abortus*. Bacterial growth was monitored for up to 48 h by CFU counting. (**F**) Alternatively, BMDMs were stimulated overnight with IFN- γ before *B. abortus* infection. CFU counting of *B. abortus* was performed as aforementioned. Data are presented as mean \pm SD. Statistical analyses for (**B**)–(**D**) were performed using two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test, $*p < 0.05$ comparing BCG-trained and untrained BMDMs submitted to the same stimulus. For (**E**) and (**F**), statistical analyses were performed by Student *t* test, $*p < 0.05$ comparing BCG-trained and untrained BMDMs. Data shown were pooled from three independent experiments.

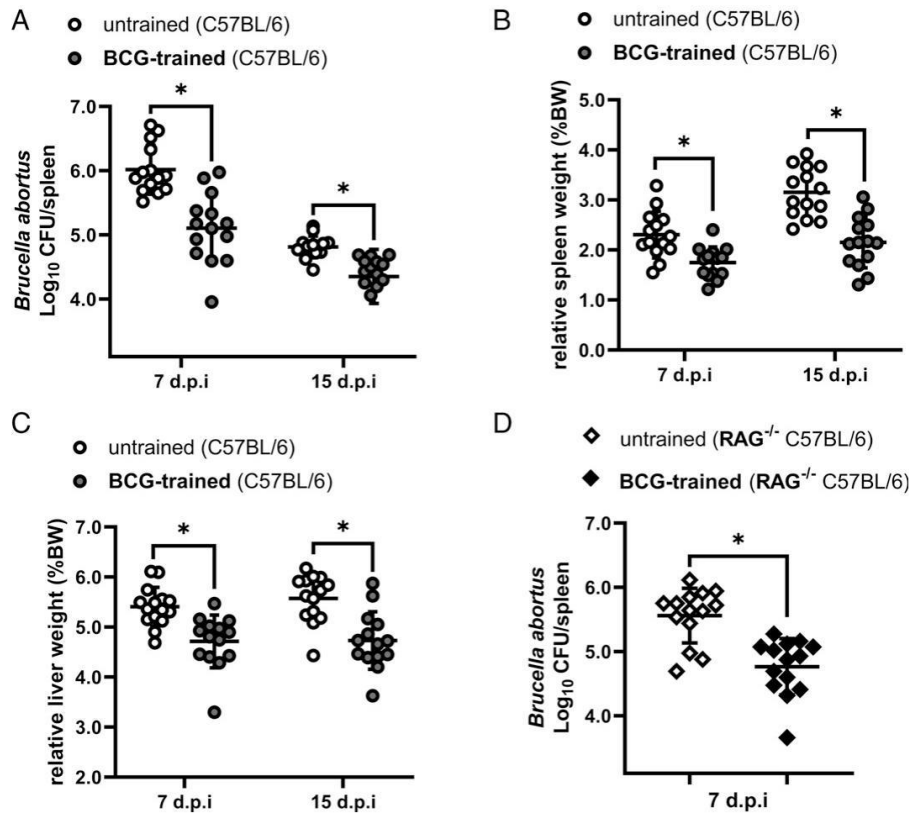


FIGURE 5. BCG-trained C57BL/6 and $RAG^{-/-}$ mice present improved control of *B. abortus* infection. **(A)** Spleen from BCG-trained or untrained C57BL/6 mice were individually macerated, serially diluted, and plated at 7 and 15 d.p.i. with *B. abortus*. Bacterial burden was measured by CFU counting. **(B and C)** Spleen (B) and liver (C) relative weights were assessed as percentage of body weight (% BW). **(D)** Splens from BCG-trained or untrained $RAG^{-/-}$ mice were macerated individually, diluted, and plated at 7 d.p.i. with *B. abortus*. Data are presented as mean \pm SD. Statistical analyses were performed by Student *t* test, $*p < 0.05$ comparing BCG-trained and untrained C57BL/6 or $RAG^{-/-}$ mice submitted to the same infection period (7 or 15 d.p.i.) ($n = 14$ mice/group). Data shown were pooled from three independent experiments.

not been tested so far. In this study, we successfully induced trained immunity with this strain, opening the venue for BCG Moreau's use as a therapeutic/prophylactic agent against heterologous diseases.

Trained immunity-mediated protection may vary depending on BCG inoculation route, induction methodology, and pathogen used at challenge (5, 10, 16). Kaufmann and colleagues (5) in 2018 demonstrated the importance of the BCG administration route for training HSCs. BCG inoculated i.v. reached BM and stimulated extracellularly these cells. This stimulus favored HSC expansion and commitment to the myeloid lineage, having the proliferative phase peak at 30 d after vaccination (5). Despite the growing number of studies involving trained immunity, there is a scarcity of trials reported in the literature about the training of HSCs. Due to their ability to self-renew, these cells may be responsible for the long-lasting trained immunity phenomenon (14). BCG-induced trained immunity in vivo followed by INH/RIF treatment is an effective method for elucidating its mechanisms. This model aims to return the organism to the steady state to observe trained phenotypes without BCG replication and immune system concurrent stimulation. Despite significant advances in understanding the trained immunity phenomenon, the exact basis and which intracellular events control trained immune responses remain under investigation.

In this study, we assessed BCG-mediated trained immunity in BMDMs from WT mice infected with *B. abortus*. We demonstrated an increased production of IL-6, IL-12, and IL-1 β in BCG-trained

macrophages. Surprisingly, we did not observe an alteration in TNF- α production, unlike other studies that demonstrated an increase in this cytokine by trained macrophages after challenge (10, 15). Furthermore, BCG-trained phagocytes showed an increased expression of CD40 and MHC-II molecules on the cell surface in response to *B. abortus*. Greater MFI emission for CD40 and MHC-II within the BCG-trained macrophage population shows that each individually trained cell expressed a higher amount of these molecules compared with the untrained controls. Increased expression of activating molecules on the macrophage's surface may amplify the communication between innate and adaptive immune systems. In vitro studies suggest that CD40/CD40L interaction that occurs between macrophages and T cells in infection promotes the production of proinflammatory cytokines, as well as NO production and MHC-II expression by macrophages (47). Due to significantly increased MHC-II expression in BCG-trained macrophages, we suggest that the BCG-training process overcomes the MHC-II pathway-inhibiting effects exerted by *B. abortus*. *Brucella* persistence in the host is partially attributed to its potential of decreasing IFN- γ -induced MHC-II expression (48). This mechanism interferes with processing and Ag presentation by monocyte/macrophage lineage to T CD4⁺ lymphocytes (48, 49). Inhibition of MHC-II expression by *B. abortus* is dependent on prolonged binding of Omp19 lipoprotein to the TLR2 receptor (50). In addition, non-canonical LPS from *B. abortus* forms macromolecules in regions that contain MHC-II on the APC surface, inhibiting Ag presentation (27).

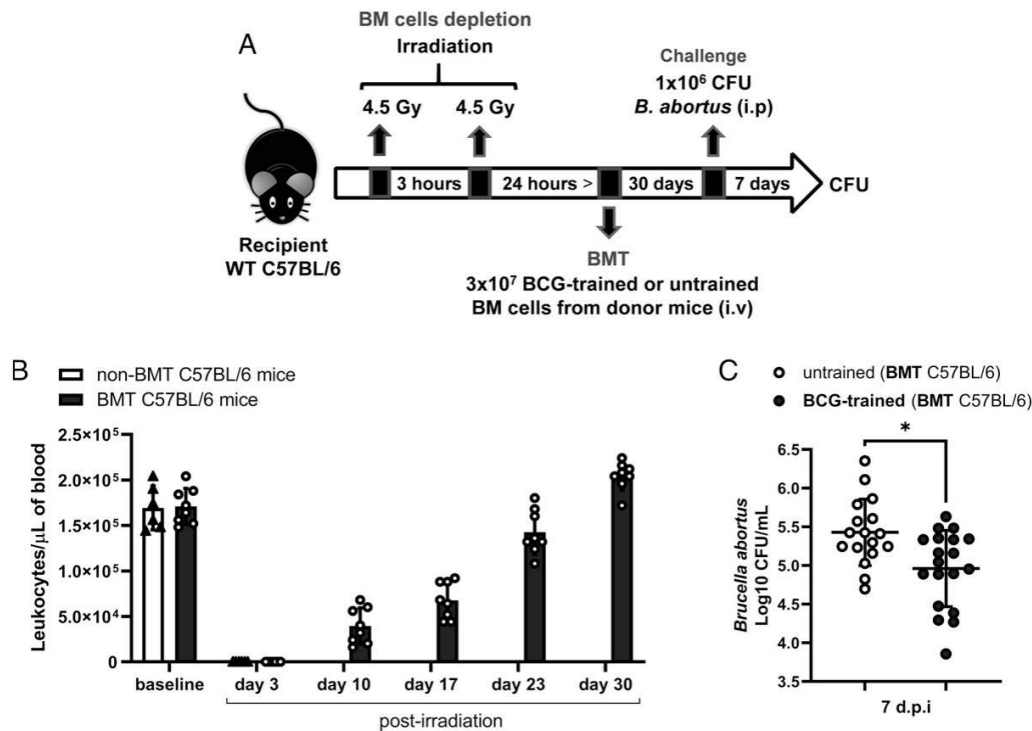


FIGURE 6. The protective effect associated with BCG training can be transferred from BCG-trained mice to naive recipients via BM. **(A)** Schematic view of BMT model from BCG-trained or untrained donor mice to recipient naive mice. **(B)** The assessment of BM cell depletion followed by its reconstitution was conducted by counting leukocytes in the blood weekly. **(C)** Splens from BCG-trained or untrained C57BL/6 mice were individually macerated, diluted, and plated at 7 d.p.i. with *B. abortus*. Bacterial burden was measured by CFU counting. Data are presented as mean \pm SD. Statistical analyses were performed by Student *t* test, **p* < 0.05 comparing BCG-trained BMT recipient mice and untrained BMT recipient mice after *B. abortus* infection (*n* = 17–19 mice/group). Data shown were pooled from three independent experiments.

These events that involve intracellular escape of Ag presentation have a significant impact on the magnitude of adaptive immune response in patients affected by brucellosis (50). T CD4⁺ Th1 lymphocytes are crucial for the control of *B. abortus*, with IFN- γ being the main cytokine produced by these cells (23, 51).

Studies conducted by our group have shown that NLRP3^{-/-} and ASC^{-/-} macrophages have lower IL-1 β secretion and caspase-1 activation compared with WT cells after *B. abortus* infection (31). Our research team also demonstrated that IL-1 β production during *B. abortus* infection is in part dependent on NLRP3 inflammasome activation by the noncanonical pathway (29). LPS from *B. abortus* is recognized by caspase-11, which culminates in GSDMD cleavage and pore formation in the plasma membrane of macrophages. K⁺ efflux facilitated by GSDMD p30-induced pores leads to NLRP3 activation and IL-1 β secretion (29). In addition, IL-1R^{-/-} mice are more susceptible to *B. abortus* infection (31). Thus, IL-1 β secretion contributes to an effective immune response against *B. abortus* infection. In this study, we noticed an increase in pro-IL-1 β expression, caspase-1 cleavage, and IL-1 β secretion in BCG-trained murine macrophages upon *B. abortus* infection. We also demonstrated in this study an elevated caspase-11 expression and GSDMD cleavage in BCG-trained macrophages. In addition, our group and others have shown the role of caspase-11 and GSDMD in the control of *Brucella* infection and pathology related to this disease (29, 52). In this article, we demonstrate that BCG-induced trained immunity leads to an increase in canonical and noncanonical inflammasome pathways during *B. abortus* infection. This inflammasome pathway enrichment observed in this study may contribute to the

restriction of this bacterium. The increased NLRP3 expression level demonstrated even before *B. abortus* infection suggests this receptor is important in BCG-trained responses. These results bring together evidence that contributes to an investigative field linking inflammasomes and trained immunity.

Increased glycolysis, glutamine pathway, and oxidative phosphorylation have been recently demonstrated in BCG-trained macrophages (9). Inhibition of mTORC1-mediated glycolysis reduces caspase-1 activation and IL-1 β production. Besides, inhibition of pyruvate kinase, an enzyme that catalyzes the last step of the glycolytic pathway, suppresses NLRP3 inflammasome activation in macrophages (53, 54). Indeed, mTORC1, glycolysis, and NLRP3 inflammasome are positively interconnected in macrophages. Akt/mTORC1/S6K is a central metabolic axis that is linked to the inflammatory macrophage profile against bacterial diseases (40–42). Furthermore, this pathway is pivotal for BCG training in human PBMCs during viral infection (9, 10). In this work, BCG-trained macrophages showed an enhanced Akt/mTORC1/S6K signaling pathway. Importantly, all components of this cell signaling axis were activated postinfection with *B. abortus*. The macrophage profile during *B. abortus* infection is crucial for bacterial persistence or infection restriction in the host (30). Inflammatory macrophages control more effectively *B. abortus* infection (30). We observed an enhanced ability by BCG-trained macrophages in restricting *B. abortus* intracellular growth, notably after IFN- γ -mediated activation. Moreover, BCG training culminated in a superior nitrite production by these cells in response to *B. abortus*. Thus, the improvement of iNOS expression and the Akt/mTOR/S6K signaling

pathway correlated with increased nitrite and IL-1 β production, suggesting that BCG training induces an inflammatory macrophage profile that is more efficient for *B. abortus* control (30, 55).

To translate the in vitro data to the in vivo model, we infected mice submitted to the BCG-training protocol with *B. abortus*. BCG-mediated trained immunity resulted in partial control of infection at 7 and 15 d.p.i. Bacterial burden was restricted in the spleen, and a reduction in the relative organ weights was observed. The lower relative organ weights of BCG-trained mice corroborate with the reduction in the *B. abortus* burden (56). The lower bacterial load and consequently lower amount of pathogen-associated molecular patterns lead to a diminished inflammatory mediators production and a lessened immune cell recruitment to the infection site (56). In this study, BCG-trained mice control better the *B. abortus* infection at 7 and 15 d.p.i. In addition, we also demonstrated increased host defense in BCG-immunized RAG^{-/-} mice in early stages of infection, because a greater reduction of *B. abortus* burden was observed in the spleen at 7 d.p.i. Indeed, this result confirms that the innate immune system drives enhanced control against *B. abortus*, because the absence of lymphocytes does not compromise training phenotype. Therefore, the increase of inflammatory pathways in macrophages demonstrated in this study might lead to *B. abortus* early control in vivo. Furthermore, chimeric mice that received trained BM cells also showed improved control of *B. abortus* load in the spleen at 7 d.p.i. Thus, BCG-trained BM cell transfer enhanced protection against this pathogen in recipient naive mice. This protection demonstrates that trained immunity induced at the BM level is responsible for partial control of *B. abortus* in vivo.

Collectively, our findings demonstrate that BCG-trained immunity induced in C57BL/6 mice results in improved control of *B. abortus* infection. Macrophages from C57BL/6 mice exhibited improved production of inflammatory cytokines, higher CD40 and MHC-II expression on cell surface, higher inflammasome activation, enhanced nitrite production, and Akt/mTOR/S6K axis enrichment, resulting in greater control of *B. abortus* intracellular growth. To our knowledge, the protection achieved by BCG-mediated trained immunity against *B. abortus* was described for the first time in this article. We also demonstrated firsthand that the noncanonical inflammasome pathway is enriched upon BCG training. Although the NLRP3 involvement in Western diet-triggered training had been previously reported (57), its role in BCG-mediated trained immunity had not been demonstrated (58). In this article, our evidences suggest a role for NLRP3 in shifting toward an inflammatory profile in BCG-trained macrophages that could be linked to the Akt/mTOR/S6K pathway. In addition, the protection based on BCG training could help control other stealthy and pathogenic bacteria that trigger chronic pathologies, such as brucellosis.

Acknowledgments

We acknowledge the “Laboratório de Irradiação Gama” from the “Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear” at the UFMG. We are thankful to Dr. Ana Caetano de Faria (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG) for kindly providing the RAG^{-/-} mice.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Singh, A. K., M. G. Netea, and W. R. Bishai. 2021. BCG turns 100: its nontraditional uses against viruses, cancer, and immunologic diseases. *J. Clin. Invest.* 131: e148291.
- WHO. 2021. *Global tuberculosis report 2021*. World Health Organization, Geneva, p. 1–43.
- de Queiroz, N. M. G. P., F. V. Marinho, A. C. V. S. C. de Araujo, J. S. Fahel, and S. C. Oliveira. 2021. MyD88-dependent BCG immunotherapy reduces tumor and regulates tumor microenvironment in bladder cancer murine model. *Sci. Rep.* 11: 15648.
- Moorlag, S., R. J. W. Arts, R. van Crevel, and M. G. Netea. 2019. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 25: 1473–1478.
- Kaufmann, E., J. Sanz, J. L. Dunn, N. Khan, L. E. Mendonça, A. Pacis, F. Tzelepis, E. Pernet, A. Dumaine, J. C. Grenier, et al. 2018. BCG educates hematopoietic stem cells to generate protective innate immunity against tuberculosis. *Cell* 172: 176–190.e19.
- Kleinmijhuis, J., J. Quintin, F. Preijers, L. A. Joosten, D. C. Iffrim, S. Saeed, C. Jacobs, J. van Loenhout, D. de Jong, H. G. Stunnenberg, et al. 2012. *Candida* Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 17537–17542.
- Quintin, J., S. Saeed, J. H. A. Martens, E. J. Giamarellos-Bourboulis, D. C. Iffrim, C. Logie, L. Jacobs, T. Jansen, B. J. Kullberg, C. Wijmenga, et al. 2012. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe* 12: 223–232.
- Netea, M. G., J. Quintin, and J. W. van der Meer. 2011. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9: 355–361.
- Arts, R. J. W., A. Carvalho, C. La Rocca, C. Palma, F. Rodrigues, R. Silvestre, J. Kleinmijhuis, E. Lachmandas, L. G. Gonçalves, A. Belinha, et al. 2016. Immunometabolic pathways in BCG-induced trained immunity. *Cell Rep.* 17: 2562–2571.
- Arts, R. J. W., S. J. C. F. M. Moorlag, B. Novakovic, Y. Li, S. Y. Wang, M. Oosting, V. Kumar, R. J. Xavier, C. Wijmenga, L. A. B. Joosten, et al. 2018. BCG vaccination protects against experimental viral infection in humans through the induction of cytokines associated with trained immunity. *Cell Host Microbe* 23: 89–100.e5.
- Cheng, S. C., J. Quintin, R. A. Cramer, K. M. Shepardson, S. Saeed, V. Kumar, E. J. Giamarellos-Bourboulis, J. H. Martens, N. A. Rao, A. Aghajani-Refah, et al. 2014. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. [Published erratum appears in 2014 *Science* 346: aal1503.] *Science* 345: 1250684.
- Liu, Y., S. Liang, R. Ding, Y. Hou, F. Deng, X. Ma, T. Song, and D. Yan. 2020. BCG-induced trained immunity in macrophage: reprogramming of glucose metabolism. *Int. Rev. Immunol.* 39: 83–96.
- Zhang, B. Z., H. Shuai, H. R. Gong, J. C. Hu, B. Yan, T. T. Yuen, Y. F. Hu, C. Yoon, X. L. Wang, Y. Hou, et al. 2022. *Bacillus Calmette-Guérin*-induced trained immunity protects against SARS-CoV-2 challenge in K18-hACE2 mice. *JCI Insight* 7: e157393.
- Khader, S. A., M. Divangahi, W. Hanekom, P. C. Hill, M. Maeurer, K. W. Makar, K. D. Mayer-Barber, M. M. Mhlanga, E. Nemes, L. S. Schlesinger, et al.; Bill and Melinda Gates Foundation Collaboration for TB Vaccine Discovery Innate Immunity Working Group. 2019. Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination. *J. Clin. Invest.* 129: 3482–3491.
- Ciarlo, E., T. Heinonen, C. Théroude, F. Asgari, D. Le Roy, M. G. Netea, and T. Roger. 2020. Trained immunity confers broad-spectrum protection against bacterial infections. *J. Infect. Dis.* 222: 1869–1881.
- dos Santos, J. C., A. M. Barroso de Figueiredo, M. V. Teodoro Silva, B. Cirovic, L. C. J. de Bree, M. S. M. A. Damen, S. J. C. F. M. Moorlag, R. S. Gomes, M. M. Helsen, M. Oosting, et al. 2019. β -Glucan-induced trained immunity protects against *Leishmania braziliensis* infection: a crucial role for IL-32. *Cell Rep.* 28: 2659–2672.e6.
- Corbel, M. J. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 213–221.
- Corbel, M. J.; Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization & World Organisation for Animal Health. 2006. *Brucellosis in Humans and Animals*. WHO/CDS/EPR/2006.7. World Health Organization, Geneva. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43597>.
- Herrera, E., G. Palomares, and E. Diaz-Aparicio. 2008. Milk production increase in a dairy farm under a six-year Brucellosis control program. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149: 296–299.
- Franc, K. A., R. C. Krecke, B. N. Häslar, and A. M. Arenas-Gamboa. 2018. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. *BMC Public Health* 18: 125.
- Atluri, V. L., M. N. Xavier, M. F. de Jong, A. B. den Hartigh, and R. M. Tsois. 2011. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu. Rev. Microbiol.* 65: 523–541.
- Baldi, P. C., and G. H. Giambartolomei. 2013. Pathogenesis and pathobiology of zoonotic brucellosis in humans. *Rev. Sci. Tech.* 32: 117–125.
- Pappas, G., N. Akritidis, M. Bosilkovski, and E. Tsiianos. 2005. Brucellosis. *N. Engl. J. Med.* 352: 2325–2336.
- Archambaud, C., S. P. Salcedo, H. Lelouard, E. Devillard, B. de Bovis, N. Van Rooijen, J. P. Gorvel, and B. Malissen. 2010. Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary *Brucella* infection. *Eur. J. Immunol.* 40: 3458–3471.
- Celli, J. 2015. The changing nature of the *Brucella*-containing vacuole. *Cell. Microbiol.* 17: 951–958.
- Giambartolomei, G. H., A. Zwerdling, J. Cassataro, L. Bruno, C. A. Fossati, and M. T. Philipp. 2004. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J. Immunol.* 173: 4635–4642.
- Forestier, C., F. Deleuil, N. Lapaque, E. Moreno, and J. P. Gorvel. 2000. *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J. Immunol.* 165: 5202–5210.

28. Latz, E., T. S. Xiao, and A. Stutz. 2013. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 397–411.
29. Cerqueira, D. M., M. T. R. Gomes, A. L. N. Silva, M. Rungue, N. R. G. Assis, E. S. Guimarães, S. B. Morais, P. Broz, D. S. Zamboni, and S. C. Oliveira. 2018. Guanylate-binding protein 5 licenses caspase-11 for Gasdermin-D mediated host resistance to *Brucella abortus* infection. *PLoS Pathog.* 14: e1007519.
30. Gomes, M. T. R., E. S. Guimarães, F. V. Marinho, I. Macedo, E. R. G. R. Aguiar, G. N. Barber, P. M. M. Moraes-Vieira, J. C. Alves-Filho, and S. C. Oliveira. 2021. STING regulates metabolic reprogramming in macrophages via HIF-1 α during *Brucella* infection. *PLoS Pathog.* 17: e1009597.
31. Gomes, M. T., P. C. Campos, F. S. Oliveira, P. P. Corsetti, K. R. Bortoluci, L. D. Cunha, D. S. Zamboni, and S. C. Oliveira. 2013. Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to *Brucella abortus* infection. *J. Immunol.* 190: 3629–3638.
32. World Health Organization. 2020. *Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development: An Overview and Analysis*. World Health Organization, Geneva. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303>.
33. Aguiar, S. L. F., M. C. G. Miranda, M. A. F. Guimarães, H. C. Santiago, C. P. Queiroz, P. D. S. Cunha, D. C. Cara, G. Foureaux, A. J. Ferreira, V. N. Cardoso, et al. 2018. High-salt diet induces IL-17-dependent gut inflammation and exacerbates colitis in mice. *Front. Immunol.* 8: 1969.
34. Marinho, F. V., J. S. Fahel, A. C. V. S. C. de Araujo, L. T. S. Diniz, M. T. R. Gomes, D. P. Resende, A. P. Junqueira-Kipnis, and S. C. Oliveira. 2020. Guanylate binding proteins contained in the murine chromosome 3 are important to control mycobacterial infection. *J. Leukoc. Biol.* 108: 1279–1291.
35. Silveira, T. N., M. T. Gomes, L. S. Oliveira, P. C. Campos, G. G. Machado, and S. C. Oliveira. 2017. NLRP12 negatively regulates proinflammatory cytokine production and host defense against *Brucella abortus*. *Eur. J. Immunol.* 47: 51–59.
36. Cirovic, B., L. C. J. de Bree, L. Groh, B. A. Blok, J. Chan, W. J. F. M. van der Velden, M. E. J. Bremmers, R. van Crevel, K. Händler, S. Picelli, et al. 2020. BCG vaccination in humans elicits trained immunity via the hematopoietic progenitor compartment. *Cell Host Microbe* 28: 322–334.e5.
37. Mukhopadhyay, S., M. A. Frias, A. Chatterjee, P. Yellen, and D. A. Foster. 2016. The enigma of rapamycin dosage. *Mol. Cancer Ther.* 15: 347–353.
38. Byles, V., A. J. Covarrubias, I. Ben-Sahra, D. W. Lamming, D. M. Sabatini, B. D. Manning, and T. Horng. 2013. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nat. Commun.* 4: 2834.
39. Weichhart, T., M. Hengstschläger, and M. Linke. 2015. Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nat. Rev. Immunol.* 15: 599–614.
40. Lachmandas, E., M. Beigier-Bompadre, S. C. Cheng, V. Kumar, A. van Laarhoven, X. Wang, A. Ammerdorffer, L. Boutens, D. de Jong, T. D. Kanneganti, et al. 2016. Rewiring cellular metabolism via the AKT/mTOR pathway contributes to host defence against *Mycobacterium tuberculosis* in human and murine cells. *Eur. J. Immunol.* 46: 2574–2586.
41. Haloul, M., E. R. A. Oliveira, M. Kader, J. Z. Wells, T. R. Tominello, A. El Andaloussi, C. C. Yates, and N. Ismail. 2019. mTORC1-mediated polarization of M1 macrophages and their accumulation in the liver correlate with immunopathology in fatal ehrlichiosis. *Sci. Rep.* 9: 14050.
42. Lin, L. R., Z. X. Gao, Y. Lin, X. Z. Zhu, W. Liu, D. Liu, K. Gao, M. L. Tong, H. L. Zhang, L. L. Liu, et al. 2018. Akt, mTOR and NF- κ B pathway activation in *Treponema pallidum* stimulates M1 macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 59: 181–186.
43. Locati, M., G. Curtale, and A. Mantovani. 2020. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Annu. Rev. Pathol.* 15: 123–147.
44. Giamarellos-Bourboulis, E. J., M. Tsilika, S. Moorlag, N. Antonakos, A. Kotsaki, J. Domínguez-Andrés, E. Kyriazopoulou, T. Gkavogianni, M. E. Adami, G. Damoraki, et al. 2020. Activate: randomized clinical trial of BCG vaccination against infection in the elderly. *Cell* 183: 315–323.e9.
45. Moorlag, S. J. C. F. M., Y. A. Rodriguez-Rosales, J. Gillard, S. Fanucchi, K. Theunissen, B. Novakovic, C. M. de Bont, Y. Negishi, E. T. Fok, L. Kalafati, et al. 2020. BCG vaccination induces long-term functional reprogramming of human neutrophils. *Cell Rep.* 33: 108387.
46. Hole, C. R., C. M. L. Wager, N. Castro-Lopez, A. Campuzano, H. Cai, K. L. Wozniak, Y. Wang, and F. L. Wormley, Jr. 2019. Induction of memory-like dendritic cell responses in vivo. *Nat. Commun.* 10: 2955.
47. Suttles, J., and R. D. Stout. 2009. Macrophage CD40 signaling: a pivotal regulator of disease protection and pathogenesis. *Semin. Immunol.* 21: 257–264.
48. Velásquez, L. N., M. A. Milillo, M. V. Delpino, A. Trotta, P. Fernández, R. G. Pozner, R. Lang, L. Balboa, G. H. Giambartolomei, and P. Barriounevo. 2017. *Brucella abortus* down-regulates MHC class II by the IL-6-dependent inhibition of CIITA through the downmodulation of IFN regulatory factor-1 (IRF-1). *J. Leukoc. Biol.* 101: 759–773.
49. Barriounevo, P., and G. H. Giambartolomei. 2019. Inhibition of antigen presentation by *Brucella*: many more than many ways. *Microbes Infect.* 21: 136–142.
50. Barriounevo, P., J. Cassataro, M. V. Delpino, A. Zwerdling, K. A. Pasquevich, C. García Samartino, J. C. Wallach, C. A. Fossati, and G. H. Giambartolomei. 2008. *Brucella abortus* inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. *Infect. Immun.* 76: 250–262.
51. Dorneles, E. M., A. Teixeira-Carvalho, M. S. Araújo, N. Sriranganathan, and A. P. Lage. 2015. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. *Vaccine* 33: 3659–3666.
52. Lacey, C. A., W. J. Mitchell, A. S. Dadelahi, and J. A. Skyberg. 2018. Caspase-1 and caspase-11 mediate pyroptosis, inflammation, and control of *Brucella* joint infection. *Infect. Immun.* 86: e00361-18.
53. Huang, X. H., Y. Ma, M. M. Zheng, N. Chen, M. N. Hu, L. Y. Wu, Y. Zheng, Y. L. Lou, and D. L. Xie. 2020. NLRP3 and mTOR reciprocally regulate macrophage phagolysosome formation and acidification against *Vibrio vulnificus* infection. *Front. Cell Dev. Biol.* 8: 587961.
54. Xie, M., Y. Yu, R. Kang, S. Zhu, L. Yang, L. Zeng, X. Sun, M. Yang, T. R. Billiar, H. Wang, et al. 2016. PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *Nat. Commun.* 7: 13280.
55. Hu, H., M. Tian, P. Li, X. Guan, Z. Lian, Y. Yin, W. Shi, C. Ding, and S. Yu. 2020. *Brucella* infection regulates thioredoxin-interacting protein expression to facilitate intracellular survival by reducing the production of nitric oxide and reactive oxygen species. *J. Immunol.* 204: 632–643.
56. Roset, M. S., A. E. Ibañez, J. A. de Souza Filho, J. M. Spera, L. Minatel, S. C. Oliveira, G. H. Giambartolomei, J. Cassataro, and G. Briones. 2014. *Brucella* cyclic β -1,2-glucan plays a critical role in the induction of splenomegaly in mice. *PLoS One* 9: e101279.
57. Christ, A., P. Günther, M. A. R. Lauterbach, P. Duedwell, D. Biswas, K. Pelka, C. J. Scholz, M. Oosting, K. Haendler, K. Baßler, et al. 2018. Western diet triggers NLRP3-dependent innate immune reprogramming. *Cell* 172: 162–175.e14.
58. Torre, C., and L. Boyer. 2022. Effector-triggered trained immunity: an innate immune memory to microbial virulence factors? *Toxins (Basel)* 14: 798.

APÊNDICE C – Revisão de literatura publicada em revista internacional



Review

Current Understanding of Bacillus Calmette-Guérin-Mediated Trained Immunity and Its Perspectives for Controlling Intracellular Infections

Ana Carolina V. S. C. de Araujo ^{1,2} , Fábio Mambelli ² , Rodrigo O. Sanches ³, Fábio V. Marinho ^{3,†} and Sergio C. Oliveira ^{2,3,*,†}

- ¹ Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; carolvalente97@gmail.com
² Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, SP, Brazil; fabio_mambelli@yahoo.com.br
³ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; rcosanches@gmail.com (R.O.S.); fabiovitarelli@yahoo.com.br (F.V.M.)
 * Correspondence: scozeus1@gmail.com
 † These authors contributed equally to this work.

Abstract: The bacillus Calmette–Guérin (BCG) is an attenuated bacterium derived from virulent *Mycobacterium bovis*. It is the only licensed vaccine used for preventing severe forms of tuberculosis in children. Besides its specific effects against tuberculosis, BCG administration is also associated with beneficial non-specific effects (NSEs) following heterologous stimuli in humans and mice. The NSEs from BCG could be related to both adaptive and innate immune responses. The latter is also known as trained immunity (TI), a recently described biological feature of innate cells that enables functional improvement based on metabolic and epigenetic reprogramming. Currently, the mechanisms related to BCG-mediated TI are the focus of intense research, but many gaps are still in need of elucidation. This review discusses the present understanding of TI induced by BCG, exploring signaling pathways that are crucial to a trained phenotype in hematopoietic stem cells and monocytes/macrophages lineage. It focuses on BCG-mediated TI mechanisms, including the metabolic-epigenetic axis and the inflammasome pathway in these cells against intracellular pathogens. Moreover, this study explores the TI in different immune cell types, its ability to protect against various intracellular infections, and the integration of trained innate memory with adaptive memory to shape next-generation vaccines.

Keywords: BCG; trained immunity; intracellular infections; innate memory



Citation: de Araujo, A.C.V.S.C.; Mambelli, F.; Sanches, R.O.; Marinho, F.V.; Oliveira, S.C. Current Understanding of Bacillus Calmette-Guérin-Mediated Trained Immunity and Its Perspectives for Controlling Intracellular Infections. *Pathogens* **2023**, *12*, 1386. <https://doi.org/10.3390/pathogens12121386>

Academic Editor: Delia Goletti

Received: 1 November 2023
 Revised: 20 November 2023
 Accepted: 23 November 2023
 Published: 24 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccine, developed in the 1920s from virulent *Mycobacterium bovis*, has been administered for more than 100 years worldwide to protect children from severe forms of tuberculosis [1]. It is the only licensed vaccine for *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) control, given to around 100 million newborns annually [2,3]. Interestingly, the long-time usage of BCG in public health provided observations that drew attention to protective heterologous or non-specific effects (NSEs) [4,5]. For about 40 years, BCG has been the recommended intravesical immunotherapy for reducing the risk of tumor recurrence in patients with non-muscle invasive bladder cancer [6]. The BCG therapeutic potential has also been observed in the wart treatment arising from human papillomavirus (HPV) infection, in which patients revealed no recurrence among responders [7]. Moreover, epidemiological studies have shown that giving BCG to children is linked to an average decrease of 50% in infant mortality rates. This reduction is associated with an improvement in the initial immune response against sepsis, respiratory infections, and fever [8]. Other studies have conclusively shown that BCG revaccination significantly reduces the incidence of respiratory tract infections and pneumonia in both adolescents and the elderly [9,10].

Thus, evidence demonstrates that vaccinating humans with BCG can be beneficial against unrelated respiratory tract infections across a wide range of ages and can eliminate lesions, establishing a response similar to immunological memory and avoiding recurrence.

In essence, the BCG is a powerful tool in boosting the responsiveness of innate cells, particularly macrophages and dendritic cells (DCs), which function as antigen-presenting cells (APCs). The innate increased responsiveness leads to the activation of T cells and subsequent production of T helper cell type 1 (Th1) lymphocytes and interferon-gamma (IFN- γ) [11]. Overall, this inflammatory milieu contributes to an environment that favors cross-protection. Accordingly, the NSEs conferred by BCG against heterologous infections may originate from both innate and adaptive immunity responses. The heterologous adaptive immune response could occur by cross-reactivity (recognition of multiple antigens by T and B-memory cells) or bystander activation (activation of memory cells with weak or no costimulation by ongoing immune responses) [12]. Meanwhile, recent evidence emphasizes the importance of innate immune cells responding strongly during a subsequent, unrelated infection. Experiments using recombination activating gene 1 (RAG1) deficient or severe combined immunodeficiency (SCID) mouse strains (both lacking adaptive immune system) were of the utmost importance in this context [13–16], and encouraged further inquiries on how previous stimulation of innate immune cells could provide long-term cross-protection.

Deep research on the matter supported the conceptualization of a new innate immune system characteristic: trained immunity (TI). This term was coined by Netea et al. in 2011 and was well received by the scientific community in order to differentiate TI from the classical adaptive immune memory, historically referred to just as “immune memory” [17]. Among the key differences between TI and classical adaptive immune memory are (1) the maintenance of the memory status by epigenetic reprogramming instead of genetic rearrangement and selection of specific antigen receptors and (2) the lasting response provided by progenitor cells, mostly undifferentiated hematopoietic stem cells (HSCs), contrasting to immune experienced lymphocytes [13–15]. In summary, the TI is initiated by a primary stimulus that leads to epigenetic and metabolic reprogramming (induction phase). The organism or cells then return to their basal level after the initial stimulation is removed (resting phase). During a homologous or heterologous secondary challenge, an increased innate functional response is observed (trained response phase). [18–20]. The cross-protection provided by TI is one of its hallmarks.

The TI investigation exploiting BCG aroused defining important aspects in the field. For instance, the finding that HSCs can transmit the trained phenotype to derived innate cells was achieved using this vaccine as a TI-inducer [15]. This observation supports the presence of a sustained memory due to the transmission of epigenetic signatures from proliferative and long-lasting progenitors to effector cells [15,21]. Afterward, this scenario of HSC-protective imprinting was classified as central-trained immunity, differing from peripheral-trained immunity, which is observed in blood or tissue-resident cells (Figure 1) [22]. In the following sections, this review discusses evidence showing the central and peripheral TI mechanisms across different immune cell types, NSEs-mediated by BCG (including TI and T-lymphocyte heterologous responses) against intracellular pathogens, and detailed perspectives of how these mechanisms could be applied in the vaccine technology.

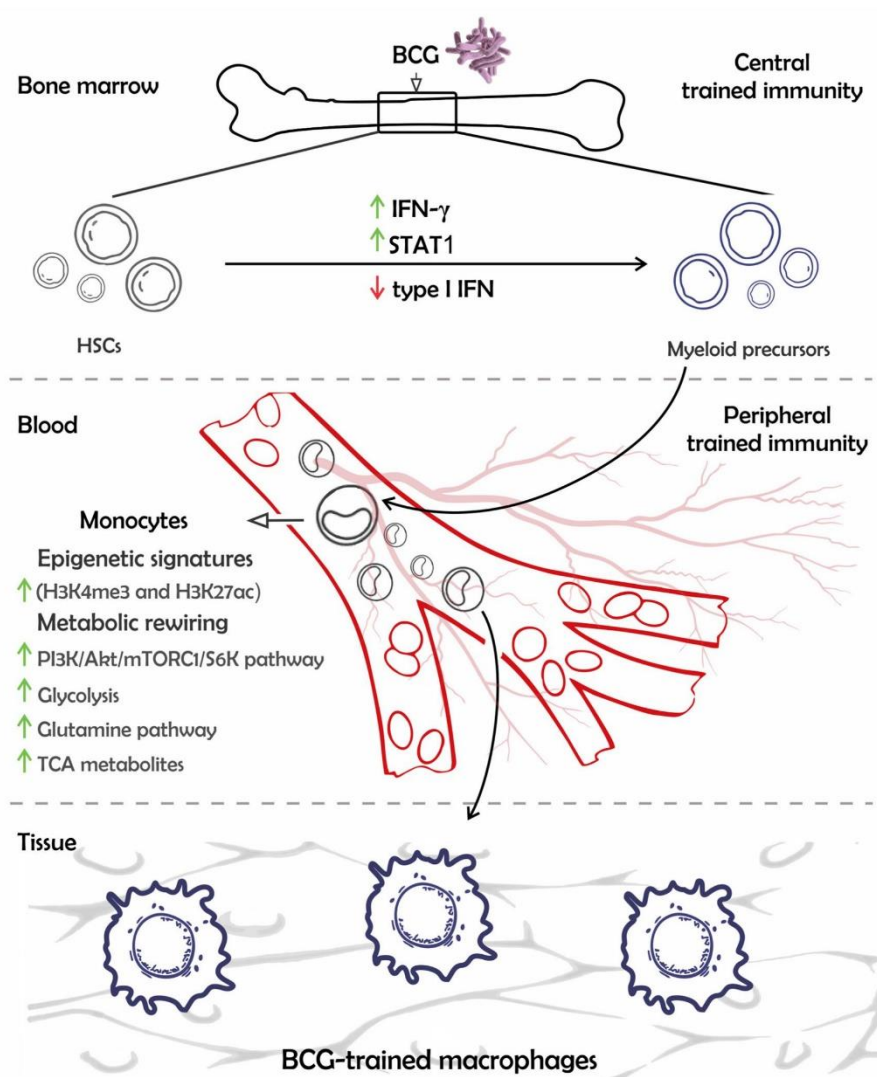


Figure 1. BCG-trained HSCs differentiate into monocytes and macrophages presenting epigenetic and metabolic rewirings. The BCG stimulates HSCs in the bone marrow (BM) microenvironment, inducing STAT1 and IFN- γ signaling. These pathways associated with epigenetic alterations in HSCs lay the foundation for BCG-induced central TI. The training of these cells is the explanation for long-term responses due to effector cells differentiated from HSCs, such as monocytes and macrophages, inheriting chromatin modifications and being prone to responding effectively upon unrelated infections. Differentiated cells also harbor metabolic changes, which help to maintain the epigenetic marks and immunologic enhancement. The understanding of mechanisms related to trained monocytes in blood represents the peripheral TI. [Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), Interferon-gamma (IFN- γ), Histone 3 lysine 4 methylation (H3K4me3), Histone 3 lysine 27 acetylation (H3K27ac), *Mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1), and Tricarboxylic-acid (TCA)].

2. The Mechanisms of BCG-Mediated Trained Immunity in Multipotent Progenitors and Monocytic Lineage

As mentioned above, the BCG can reprogram innate cells, leading to their improved activity against related or unrelated pathogens. Accordingly, it has been demonstrated that BCG intradermally inoculated results in functional alterations of peripheral blood immune cells [23,24]. It was shown later that lasting (months or even years) peripheral trained responses due to intradermal BCG vaccination must be sustained by transcriptomic alterations in HSCs [25]. Additionally, BCG-systemic administration induces the reprogramming of HSCs in the bone marrow (BM) [15]. In these scenarios, TI-related mechanisms are dependent on shifts in metabolic circuits and epigenetic reprogramming [23]. Hence, metabolic and epigenomic rewirings in TI underlie functional changes, preparing cells and organisms to cope more readily when later exposed to different pathogens.

The central BCG-mediated TI is associated with the expansion of HSCs and their commitment to the myeloid lineage in the BM microenvironment [15]. Epigenetic changes induced by BCG in HSCs are indirect, as this bacillus is not able to infect these cells [15,26]. The BCG training of multipotent progenitors in BM is marked by increased STAT1 transcriptional levels, linked to a key role for IFN- γ since IFN- γ receptor (IFNGR)-deficient BM does not present expansion of HSCs upon intravenous (i.v.) BCG stimulation (Figure 1) [15]. Although IFN- γ seems to be critical in inducing BCG-mediated TI, it is not limited to it, as the full landscape of immune responses in BM needs to be assessed. This reasoning is well explained by a recent study by Khan et al., 2020, in which they show BM stimulation with Mtb leads to the activation of immune pathways resembling those induced by BCG, such as STAT1 and IFN- γ signaling. However, Mtb also strongly induces the type I IFN pathway, dysregulates iron metabolism, and depolarizes mitochondrial-membrane potential in a region of difference (RD-1) dependent manner. This scenario compromises myelopoiesis, resulting in the death of these cells by receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3)-induced necroptosis and triggers susceptibility to further challenges with Mtb. Meanwhile, immunization with β -glucan (another well-known TI-inducer) results in myelopoiesis induction in BM dependent on IL-1 pathway activation [27]. Thus, commitment to the myeloid lineage is a trait of the HSC-training process in BM, possibly induced by attenuated bacteria and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Concordantly, the transfer of BCG-trained BM to immune-depleted mice confers greater antimicrobial control against heterologous infections compared to mice receiving naïve BM. It is feasible as trained effector cells will be derived from HSCs. These cells will inherit the epigenetic marks and migrate to the periphery during a heterologous infection (Figure 1). Hence, differentiated cells may show increased inflammatory responses in infected tissues [15,16].

The lower disease rate due to BCG vaccination has been associated with the H3K27ac enrichment (a histone marker observed in active promoters and enhancers) in regulatory regions of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [10]. Accordingly, another study demonstrated that human peripheral blood monocytes, 30 days post-BCG vaccination, exhibited H3K27ac enrichment in several regions associated with the inflammatory response, highlighting the genes related to the PI3K/Akt pathway [23]. Furthermore, greater Akt/mTORC1/S6K pathway activation was observed in BCG-trained monocytes in vitro, being the mTOR phosphorylation required for a metabolic change characterized by increased glycolysis and glutamine pathway. Akt/mTORC1-pathway inhibition abrogated the H3K4me3 enrichment (a marker of activated regulatory regions) and the H3K27me3 reduction (a marker of inactivated regulatory regions) in promoter regions of inflammatory cytokines, such as IL-6 and tumor necrosis factor α (TNF- α) [20]. Given the above, the Akt/mTORC1-axis enhancement is a hallmark of BCG-trained monocytes, driving metabolic, epigenetic, and functional remodeling in these cells, which are integrated into an interdependent circuit (Figure 2). Additionally, a straight association between metabolism and epigenome was elucidated by the contribution of the glutamine pathway to chromatin modifications [20]. The glutamine pathway is responsible for metabolite accumulation in the tricarboxylic-acid (TCA) cycle, such as fumarate and citrate. These

metabolites, after being transported from mitochondria to the cytoplasm, interfere with the histone-modifying enzymes [20,28].

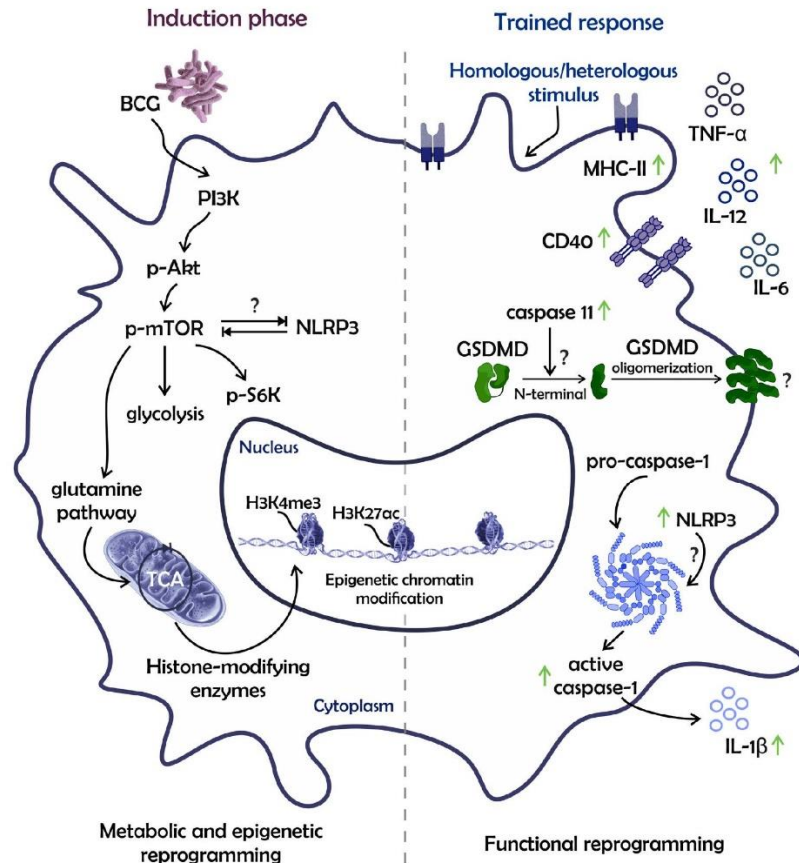


Figure 2. Metabolic, epigenetic, and functional remodeling in BCG-trained macrophages are integrated into an interdependent circuit. The BCG induces metabolic and epigenetic alterations (left) that enable these phagocytes to perform functionally improved responses following stimulation (right). The metabolic shift includes enhancement of the PI3K/Akt/mTORC1 axis, which in turn orchestrates other changes in the metabolism, such as S6K phosphorylation, induction of glycolysis, and glutamine pathway. The last one has a key role in TCA-metabolite accumulation and epigenetic chromatin modifications. Furthermore, there is a higher NLRP3 expression in BCG-trained macrophages when compared to untrained counterparts. The possible crosstalk between mTOR and NLRP3 still needs to be demonstrated in BCG-mediated TI. All these cellular changes contribute to an improved response following a heterologous stimulus. Upon stimulation, these trained cells could exhibit increased expression of costimulatory molecules on the cell surface, inflammatory cytokine release, and inflammasome activation. The non-canonical and canonical inflammasome platforms could be enhanced in BCG-trained macrophages, contributing to IL-1 β secretion. (The interactions marked by the symbol—?—require formal elucidation). [Phosphoinositide-3-kinase (PI3K), *Protein kinase B* (Akt), Mammalian target of rapamycin (mTOR), Ribosomal protein S6 kinase (S6K), *NOD-like receptor (NLR) family pyrin domain-containing 3* (NLRP3), Gasdermin D (GSDMD), *Major histocompatibility complex class II* (MHC-II), Cluster of differentiation (CD), Tumor necrosis factor α (TNF- α), and Interleukin (IL)].

Both BCG-trained human-circulating monocytes and mouse BM-derived macrophages (BMDMs) have a potentialized capacity to control pathogens, namely viruses, bacteria, protozoa, and fungi. The BCG-trained responses elicited by these cells are associated with higher control of Mtb, *Brucella abortus*, *Candida albicans*, *Leishmania braziliensis*, influenza A virus (IAV), yellow fever virus (YFV), and others [15,16,23,29,30]. These BCG-trained phagocytes present an increased expression of costimulatory molecules and secrete high levels of inflammatory cytokines, such as IL-6, TNF- α , IL-12, and IL-1 β in response to unrelated stimulation (Figure 2) [16,20]. The improved ability to produce IL-1 β appears to be a predictive factor of protection in BCG-mediated TI. For instance, trained human monocytes producing higher IL-1 β amounts correlated with lower YFV viremia. Furthermore, genetic polymorphisms in the IL-1 β promoter, IL-1 or IL-18 receptor coding gene, and inflammasome components, such as apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (PYCARD/ASC), are shown to affect the magnitude of BCG-trained responses, leading to lower production of other inflammatory mediators [23]. This evidence is supported by recent findings from our group, which demonstrated that canonical and caspase-11-mediated-non-canonical inflammasome pathways were enriched in BCG-trained BMDMs against *B. abortus* infection. The IL-1 β release occurred along with the expressive caspase-1 processing, higher pro-IL-1 β , caspase-11, NLRP3 expression, and GSDMD cleavage (Figure 2) [16]. Therefore, the IL-1 pathway plays a pivotal role in BCG-mediated TI, being by itself an inflammatory pathway associated with protection against viral and bacterial infections [16,23]. Certainly, higher NLRP3 expression by BCG-trained macrophages suggests the importance of this receptor in the TI establishment. Additionally, NLRP3's role may be related to the mTORC1-complex activity, as both contribute to macrophage polarization towards the type 1 (M1) profile [31–33].

3. Trained Immunity Mechanisms in Neutrophils and Dendritic Cells (DCs)

Although most of the evidence linked to TI is demonstrated in macrophages and natural killer (NK) cells (subject well detailed in—[34–36]), BCG vaccination also induces the elevated functional capacity of peripheral blood neutrophils. Following 90 days post-vaccination with this bacillus, human-circulating neutrophils showed H3K4me3 enrichment in promoter regions of inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-8), mTOR, and phosphofruktokinase (PFK, an enzyme that belongs to the glycolytic pathway). Despite presenting H3K4me3-enriched regulatory regions, chromatin accessibility did not reflect increased gene transcription compared to baseline. This finding suggests that neutrophils remain with more accessible gene regions, even though immune effector production only occurs upon a secondary stimulation [24]. This characteristic is similar to that previously observed in BCG-trained monocytes [23]. An exception to the immune effector production pattern was observed by higher PI3K/Akt-pathway expression upon BCG vaccination, indicating its crucial role in neutrophil training as well. Following in vitro secondary Mtb or *C. albicans* challenge, BCG-trained human neutrophils expressed an increased amount of activation markers, such as CD11b, and a lower quantity of programmed death-ligand 1 (PD-L1, a checkpoint protein associated with immunosuppression). Moreover, these trained cells presented superior degranulation capacity and increased production of reactive oxygen species (ROS), elastase, and lactate accompanied by elevated killing capacity against *C. albicans*, although neutrophil extracellular traps (NETs) production has not changed [24]. Therefore, BCG-trained neutrophils exhibited functional reprogramming based on epigenetic and metabolic changes, readily controlling the growth of heterologous pathogens through enhanced antimicrobial functions.

It is worth mentioning that BCG training in DCs has not been demonstrated so far. Nevertheless, the memory-development capacity of DCs has been reported following intranasal immunization of mice with an experimental strain of *C. neoformans* capable of producing IFN- γ (H99 γ) [37]. DCs isolated from their lungs displayed increased transcriptional levels of IFN- γ , STAT1, IL-12, and nitric oxide synthase 2 (NOS2). Intriguingly, after 70 days of H99 γ immunization, increased inflammatory-cytokine production by DCs from H99- γ -

vaccinated mice was observed specifically against the *C. neoformans* challenge. Following lipopolysaccharide (LPS), *S. aureus*, and *C. albicans* exposure, these cells did not produce superior amounts of cytokines compared to controls. This evidence demonstrates a unique feature of training exhibited by DCs, suggesting a pathogen-specific response [37]. Another study, controversially, demonstrated that even upon exposure to immunomodulatory stimuli, such as IL-4, a type 1 DC profile induced by synergistic stimulation with IFN- γ and TNF- α in vitro was stable and resistant to switching to a type 2 DC profile [38]. H3K4me3 enrichment in promoter regions of inflammatory genes, like *Il12b* and *Nos2*, was also observed in the model. Moreover, the mixed lineage leukemia 1 (MLL1) methyltransferase enzyme mediated these epigenetic changes, and the presence of TNF- α was essential for stabilizing the inflammatory profile in DCs and their myeloid precursors [38]. These findings suggest broad applicability in the context of pathogens that possess immunomodulatory PAMPs responsible for impairing Th1 responses. Thus, whether DC-trained responses are pathogen-specific or broad-spectrum remains a point yet to be investigated. Moreover, whether BCG can induce TI in DCs against heterologous infections is still an open question.

4. Crosstalk between Trained Innate Immune Cells and Lymphocytes

It is supposed that the TI exhibited by innate cells interferes with adaptive immunity activity and vice versa. A piece of evidence is that the adoptive transfer of IFN- γ +TNF- α -trained DCs to TNF- α deficient mice previously infected with *C. neoformans* significantly raised the quantity of IFN- γ -producing T CD4⁺ lymphocytes while reducing the number of IL-5-producing CD4⁺ T lymphocytes [38]. Moreover, it is plausible that the increased production of inflammatory cytokines by BCG-trained macrophages, such as IL-12 and TNF- α , contributes to an environment that favors Th1 response establishment. Another example, demonstrated by our team and others, is that BCG-trained macrophages presented increased MHC-II receptor and costimulatory molecule expressions on the cell surface upon secondary challenge [16,39]. On a two-way street, BCG-trained macrophages can better control bacterial growth upon IFN- γ -exogenous stimulation compared to untrained macrophages. Accordingly, antimicrobial mechanisms exerted by macrophages, such as nitric oxide (NO) production, were enhanced in BCG-trained macrophages [16]. Even though the IFN- γ source can be from innate and adaptive immune systems, it is reasonable that IFN- γ produced by lymphocytes contributes to an increment in TI-effector functions. Further, recent studies have shown that neutrophils play an important role in the neighboring cells, including lymphocytes and macrophages [40,41]. Neutrophils may take part in inducing innate memory in macrophages. Chen et al., 2014, demonstrated that neutrophil depletion abrogated secondary protective responses exhibited by lung macrophages, which presented an elevated capacity to bind and kill pathogens [42]. Lastly, IFN- γ producing CD8⁺ T lymphocytes are indispensable for training alveolar macrophage in the airways [39]. It is still necessary to clarify which cellular interactions are essential in establishing TI and trained responses during heterologous infections. This premise must be considered for central and peripheral TI.

5. The BCG NSEs against Intracellular Pathogens Comprise TI and Heterologous T cell Responses

The BCG administration in infants results in a lower mortality rate during the first month after immunization, which is associated with protection against neonatal sepsis and respiratory infections [8,43]. Furthermore, BCG revaccination in the elderly leads to a reduction in the incidence of unrelated respiratory infections, mainly viral ones [10]. These NSEs have been associated with two main immunological mechanisms: TI and heterologous T cell immunity [44]. Kleinnijenhuis et al., 2013, by immunizing volunteers with BCG, identified the activation of both mechanisms. In this regard, cytokine production, resulting from stimulation of PBMCs with mycobacteria and unrelated pathogens, was evaluated up to one year after BCG immunization. Long-term effects were associated with heterologous Th1 and Th17 responses based on IFN- γ , IL-17, and IL-22 production one

year post-immunization. Otherwise, the short-term effects were associated with TI up to three months after immunization, considering TNF- α and IL-1 β production. Additionally, receptors of the innate immune response also had increased expression in monocytes, up to one year after BCG initial stimulus [45]. In another interesting study, Arts et al., 2018, used vaccination with the YFV as a heterologous infection model (as exemplified previously in Section 2). This is a suitable approach for investigating NSEs since viruses are detected in the circulation after vaccination, and changes in viremia would be essential to attest to the heterologous protection induced by BCG. Indeed, immunization with BCG 28 days before the YFV challenge resulted in a significant reduction in viremia. Moreover, functional alterations were evidenced by a significant increase in IL-1 β and IL-6 production by PBMCs stimulated with LPS, Mtb, and *C. albicans*. Altogether, these findings experimentally certify the NSEs from BCG in humans [23].

Other studies demonstrated that BCG immunization promotes, in different mouse strains, significant protection against viral infections. They reported NSEs from BCG upon infection by IAV [46], Ectromelia virus [47,48], encephalomyocarditis virus [49,50], vaccinia virus (VV) [51], and others [52]. The protection conferred by BCG against encephalomyocarditis virus infection was correlated with macrophages in a lymphocyte-independent manner [49,50]. On the other hand, Mathurin et al., 2009, demonstrated that C57BL/6 mice showed resistance to VV when challenged 28 weeks after BCG immunization. The protective mechanism, however, does not appear to be related to TI but to the action of CD4⁺ T cells and IFN- γ . Notably, animals were subjected to antibiotic clearance before the challenge in this model [51].

Since the COVID-19 pandemic emerged, the use of BCG has been extensively discussed concerning SARS-CoV-2 infection [53,54]. At first, ecological studies raised the hypothesis that countries containing current national BCG vaccination policies for all demonstrate a lower incidence of mortality from COVID-19 [52]. Since then, several studies have explored the protective role of BCG immunization against COVID-19. Recently published studies bring contrasting findings on this issue. Kaufmann et al., 2022, reported that K18-hACE2 mice or Syrian golden hamsters that received BCG i.v. were as susceptible as the unvaccinated group to intranasal (i.n) or intratracheal (i.t) infection with SARS-CoV-2/SB2 (B.4 lineage) [29]. In turn, other studies demonstrated a different outcome [55,56]. Zhang et al., 2022, showed that i.v. BCG immunization of K18-hACE2 mice promotes a decrease in the pulmonary and upper airway viral load following i.n infection with WT SARS-CoV-2 [55]. High HSC proliferation in the BM, along with greater differentiation into myeloid cells and consequent enrichment of macrophages and DCs, supported TI. Furthermore, metabolic evaluation of plasma and PBMCs revealed greater activation of the glycolytic pathway in vaccinated animals [55]. Singh et al., 2022, demonstrated that i.v. BCG immunization in the Syrian golden hamster model elicited protection with reduced lung viral loads and bronchopneumonia. Single-cell transcriptome profiling demonstrated higher recruitment of plasma cells, Th1, Th17, regulatory T cells (Treg), cytotoxic T lymphocytes (CTLs), and memory T cells to the lungs of BCG-immunized mice. These findings were observed together with a transcriptional shift towards antigen presentation and tissue repair [56].

Additionally, Hilligan et al., 2020, reported BCG-mediated protection, when mice were i.v. immunized. Reduced viral loads, ameliorated lung pathology, and decreased cytokine production and inflammatory cell recruitment were observed in the model [57]. However, when mice were immunized subcutaneously (s.c.) with BCG, protection was not achieved. Finally, another study used a non-human primate model [58] where rhesus macaques were immunized with BCG by aerosol administration. Despite the quick induction of monocytes and $\gamma\delta$ -T cells, overall protection was not achieved. As i.v. BCG immunization leads to direct engagement of the BM compartment (opposing local administration); one could suggest that TI induced in immune cell progenitors could account for stronger effects against viral challenge [54,59]. However, the mechanisms behind BCG i.v. immunization

leading or not to protection against SARS-CoV-2 infection in the animal model still requires further elucidation.

As a parallel inquiry, several randomized trials are being conducted worldwide to evaluate whether BCG immunization is protective against COVID-19, but recent reports are still heterogeneous and not conclusive [54,59]. The trials, in general, evaluate the susceptibility and mortality against COVID-19 in countries in which neonatal BCG is a clinical practice and when adults are revaccinated with BCG. Here, several aspects could account for the reported heterogeneous observations. Firstly, immunological differences might be observed from BCG immunization of pre-vaccinated against BCG-naïve individuals. Secondly, the TI effects are expected to last up to 1–2 years [59], but additional influences should be studied throughout the lifespan. Also, susceptibility to infection should differ from healthcare workers to elders, from individuals with different genetic and environmental backgrounds, and also from individuals with comorbidities. All in all, despite these results raising several discussions, further investigation, such as broad meta-analyses, is required to establish a firm conclusion regarding BCG protection against COVID-19.

The NSEs mediated by BCG have also been reported against challenges by pathogens such as fungi and protozoa. SCID mice immunized with BCG and infected with *C. albicans* 2 weeks later presented a higher survival rate when compared to those immunized with PBS. This observation was accompanied by a reduction in the fungal burden in the kidneys. Furthermore, the same immunization-infection regimen generated splenic monocytes with greater capacity to produce TNF- α when stimulated with LPS [14]. The deficiency in T and B cells suggested the TI action as the protective mechanism in this context. This was reinforced by the observation that such protection is partially dependent on NK cells, which, in addition, produced higher IL-1 β levels when stimulated by unrelated pathogens [60]. Concerning protozoa, Silva et al., 2021, demonstrated the relevant impacts of BCG in infections by different species of *Leishmania* spp. in vitro and in vivo. Training of human monocytes was performed with BCG for 24 h, followed by 5 days of resting and infection on the 6th day. The findings showed a significant reduction in the infection index of *L. braziliensis* and *L. infantum*. Additionally, mouse infection following 7 days of BCG i.v. administration promoted decreased *L. braziliensis* load in paw lesions and less *L. amazonensis* or *L. infantum* dissemination to organs such as the spleen and liver. The NSEs from BCG were mainly associated with the production of IL-32 [61]. BCG vaccination also affected the infection of another protozoan, *Plasmodium yoelii* (PyNL). Prior contact with BCG in this context promoted increased expression of antimicrobial molecules such as lactoferrin and cathelicidin, which were then associated with lower parasitemia observed in the animals [62].

Regarding the NSEs from BCG in bacterial infections, a recent study demonstrated that C57BL/6 animals immunized s.c. with BCG are protected against infection by *S. pneumoniae*. In addition to greater survival, animals had lower bacterial load in the lungs and spleen. Similar behavior was evidenced even when the infection was performed 16 weeks post-immunization. The observed protective phenotype was clearly related to the action of neutrophils and a possible contribution of alveolar macrophages [63]. Applying an experimental design slightly different, Mata et al., 2021, reported a heterologous protective effect against *S. pneumoniae*. However, in this approach, the protection and the reduced pathogen spreading were observed only due to BCG immunization by i.v. route [64]. Lastly, a study recently conducted by our team showed protective responses against *B. abortus* infection elicited 10 weeks after i.v. BCG immunization. We demonstrated that BMDMs presented a greater capacity to control intracellular bacterial replication along with potentiated production of inflammatory cytokines and metabolic rewiring. Importantly, we applied an antibiotic treatment following 4 weeks of BCG i.v. immunization, assuring that increased responses were mediated by TI and not due to concurrent stimulation. The reduction in the *B. abortus* burden in the spleen of C57BL/6 RAG^{-/-} mice also confirmed that the protection was associated with enhanced innate immune responses [16]. Given the above, it is clear that the NSEs from BCG have been consolidated over the decades, even

though the TI-related mechanisms underlying such effects are still under elucidation. This clarification can be applied to the improvement of health policies, such as the development of vaccine strategies that take into account TI.

6. Trained-Immunity-Based Vaccines (TIBVs) and What It Adds to the Field of Vaccinology

Vaccines, as we know (i.e., conventional vaccines), are designed to evoke adaptive immune responses against a specific pathogen and promote long-lasting immune memory (Figure 3A). They are formulated to contain dead or attenuated pathogens, or even their subunits—purified or encoded by nucleic acids. B and T cell-specific responses will be orchestrated, and long-term protection will be marked by the persistence of circulating antibodies and immune memory cells, leading to reactivation upon new pathogen exposure [65]. However, pronounced immune responses might need immunizations containing adjuvants in their formulations for proper DC activation, especially for subunit and nucleic acid vaccines [66]. On the other hand, the so-called trained immunity-based vaccines (TIBVs) can be designed to work as activators of innate immunity, leading to a more responsive immune environment with higher resistance to a secondary insult (related or non-related) (Figure 3B). In essence, epigenetic reprogramming, metabolic alterations, and elevated cytokine production will lay the foundation for a broader-spectrum response, which will not only be beneficial against unrelated pathogens but also lead to an enhanced adaptive response upon subsequent immunizations with a specific antigen of interest. T and B cell proportions and functions (e.g., cell numbers, cytokine production, and proliferative rates) could be altered in this situation [67].

The TIBVs could prompt two scenarios. The first one (Figure 3B, enhanced non-specific response) was intensively discussed due to the COVID-19 pandemic when the use of BCG or Measles–Mumps–Rubella (MMR) vaccines had been postulated to be protective against SARS-CoV-2 infection [53,68]. The hypothesis goes by using a TI-inducer (such as the BCG vaccine) as a suitable ready-to-implement countermeasure in an epidemic-like situation, especially for the most vulnerable individuals, until vaccines that are more appropriate are developed. Here, TI-inducers could comprise the use of whole microorganisms (like bacteria, fungi, or viruses), purified molecules (like flagellins, lipopolysaccharides, or glucans), or even fully inactivated bacterial formulations (such as the MV30) [69–71]. However, licensed vaccines with proven heterologous effects against other pathogens would stand as more practical in order to achieve population, as safety and regulatory measures would have already been addressed. Nevertheless, not limited to epidemic situations, the study of licensed vaccines associations with protection against heterologous infections could significantly add to the health service's arsenal against diseases. For instance, Lee et al., 2018, suggest that the cold-adapted live attenuated influenza vaccine (CAIV) could provide NSEs against unrelated respiratory pathogens [72]. Despite a growing body of reports on the field, unfortunately, most of them lack deep evaluation of the TI mechanisms underlying the observed phenotypes.

The second scenario (Figure 3B, trained immunity + enhanced specific responses) takes place in a more designed process. An immunization regimen could be conceptualized as a two-dose process (the priming dose consisting of a TI-inducer to potentialize the upcoming secondary immunization) or even mixing the inducer to a specific antigen. Leentjens et al., 2015, observed that immunization with the trivalent influenza vaccine (2013–2014 seasonal strains) 14 days after BCG immunization evoked significantly enhanced antibody responses marked by quicker seroconversion in immunized individuals [73]. Similar enhanced phenotypes were observed for vaccines designed against bacteria or their toxins (such as diphtheria, tetanus, and pneumococcal disease) when this BCG-training strategy was applied [74]. These findings highlight the importance of BCG immunization at birth, as it may work as a TI-based strategy for vaccines applied in infants [74,75]. As mentioned above, a methodological alternative for harnessing BCG adjuvant-like properties could be the administration of the antigen in association with the BCG in a one-dose immunization. Counoupas et al., 2021, demonstrated that a formulation containing BCG,

the SARS-CoV-2 Spike protein, and Alum (there termed BCG:CoVac) was responsible for inducing elevated titers of neutralizing antibodies and Th1-biased cytokine response in K18-hACE2 mice [76]. This immunization regimen led to abrupt disease abrogation after the SARS-CoV-2 challenge, marked by a healthy clinical score of the mice, no body-weight loss, and no detectable viral titers in the lungs, with very few signs of tissue inflammation. Interestingly, when mice primed with BCG:CoVac was later boosted with a formulation containing only Spike and Alum, antibody responses were further augmented.

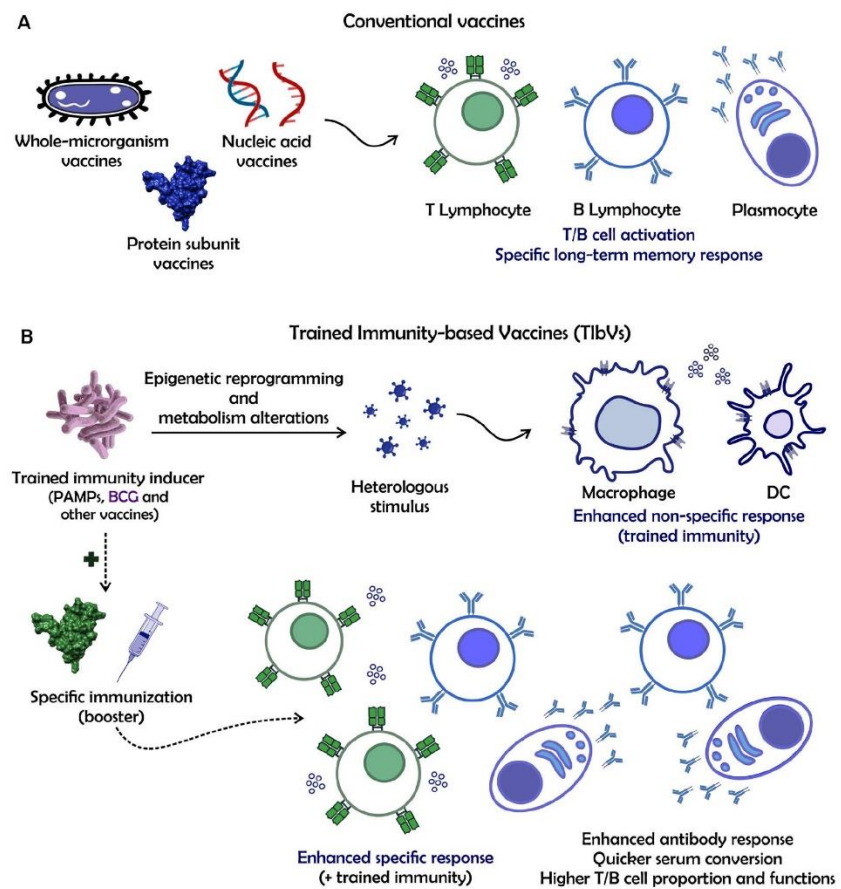


Figure 3. Conventional and trained immunity-based vaccine approaches. Schematic representation of (A) conventional vaccine and (B) trained immunity-based vaccine (TibV) designs. (A) Conventional vaccines are designed to achieve T/B cell activation and specific long-term memory responses against a specific pathogen. (B) On the other hand, by making use of a TI inducer (PAMPs such as glucans or vaccines known to induce TI), TibVs aim to stimulate the innate immune system (straight arrows). Epigenetic reprogramming and metabolism alterations will lead to (upon a secondary stimulus) an enhanced non-specific response orchestrated by the innate immune system. Moreover, this method can also be used to improve the adaptive immune response (dashed arrows) when the TI inducer is followed by a booster immunization with a specific antigen. The more responsive innate immune system will lead to an enhanced adaptive response, with elevated humoral responses, quicker serum conversion, and higher T/B cell proportions and functions.

The previous approach has been investigated in another robust way: using a recombinant BCG (rBCG) strain able to express a specific antigen of interest. This methodology will combine the TI-inducer effects and the adjuvant-like properties of BCG with the adaptive-specific responses of a protein subunit vaccine in one single immunizer able to elicit strong cellular and humoral immune responses [77,78]. As the BCG replicates inside APCs, the initiation of the immune response can be improved, and its polarization may be directed by the BCG dose, as low doses are related to biased Th1 immune responses, while higher doses correlate with mixed Th1/Th2 immune responses [78]. Differently from the strategy of mixing BCG and antigen of interest, rBCG strains can be modified in order to evoke the best of the antigen immunogenicity. These adjustments can involve (1) mycobacterial signal sequences for driving antigen expression to the mycobacterium wall and enhancing recognition [79], (2) the use of stronger promoters for higher levels of antigen expression [80], or (3) the use of strains designed with the listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*, a pore-forming protein which leads to leakage of the mycobacterium antigens, enhancing antigen processing and presentation by the host [81].

In a strategy for an experimental model of pertussis, Nascimento et al., 2000, evaluated a rBCG strain designed to express a genetically detoxified S1 subunit from a pertussis toxin (S1PT) in fusion with a β -lactamase signal sequence (rBCG-S1PT) under the control of a strong promoter [82]. They reported that mice immunized with rBCG-S1PT presented a Th1-dominant immune response, being highly protected against intracerebral challenge with *Bordetella pertussis*. In a different strategy for an experimental model of leprosy, Ohara et al., 2001, assessed a rBCG strain overproducing three components against mycobacterium infection (rBCG/BA51) [83]. They observed that immunization of C57BL/6 and BALB/c mice led to reduced multiplication of the intracellular bacteria *Mycobacterium leprae* in their foot pads and elevated IFN- γ levels in their spleens (when cells were stimulated with *M. leprae* lysate). Not limited to bacterial infections, the rBCG system could be applied to other sorts of antigens, ranging from viral [84] to parasitic [85] molecules with elevated immune results.

Our group has recently demonstrated how combining all the immune features the rBCG system disposes of could potentiate protection against SARS-CoV-2 [86] in the K18-hACE2 murine model. We demonstrated mice immunized with rBCG-ChD6 (an rBCG strain expressing a chimeric protein based on immunodominant epitopes from Nucleocapsid and Spike proteins from SARS-CoV-2) followed by a booster dose containing the purified chimeric protein (rChimera), and Alum presented the best protective phenotypes. This immunization regimen induced the highest levels of antibodies against rChimera, neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and cytokine responses (IFN- γ and IL-6). These results were accompanied by IgG2c/IgG1 isotype switch, no body-weight loss in mice, and no detectable viable virus in their lungs. However, mice immunized with wild-type BCG followed by a booster dose with rChimera associated with Alum presented lower antibody levels, deteriorated clinical phenotype, and significantly higher viral load in their lungs (assessed by qPCR). When mice did not receive any BCG immunization, the detected cellular responses were correspondingly lower. Additionally, a double-dose rBCG-ChD6 immunization (no protein-Alum boost) was not protective. Taken together, these results showed that rBCG expressing target infection-related antigens is a more robust strategy for priming than wild-type BCG in this scenario. Further, rBCG immunization associated with standard specific antigen representation in a priming-boost strategy was crucial to significantly enhanced protection against SARS-CoV-2 infection. In conclusion, TibVs represent a conceptually new field for vaccine design with a variety of possibilities to be explored. The upgrowing body of investigative research on TI mechanisms also highlights the importance of the clinical evaluation of existing vaccines regarding NSEs. Elucidating its mechanisms could aid translational studies, resulting in the rational design of more robust and protective vaccines for the population.

7. Concluding Remarks and Future Directions

The BCG is the most commonly administered vaccine in human history. Traditionally, this attenuated bacterium is used to prevent severe forms of tuberculosis in children. Furthermore, multiple studies have confirmed that this vaccine is indeed capable of triggering non-specific preventive or therapeutic beneficial effects against unrelated pathogens and cancer [6,16,87]. These non-specific BCG-mediated effects have been applied in clinical practice for about 40 years, consisting of the gold-standard intravesical therapy recommended to reduce the recurrence risk of non-muscle invasive bladder cancer after transurethral resection [6]. The mechanisms of bladder cancer treatment using BCG are currently under research. Recent findings suggest an important role for the adapter molecule MyD88 in association with a redundant function of Toll-like receptors (TLRs) 3, 7, and 9 [87].

Both innate and adaptive immune systems play a crucial role in producing heterologous effects. Trained immunity (TI), or innate immune memory, which is mainly demonstrated in myeloid and NK cells, has been shown to elicit an important role in BCG cross-protection against unrelated infections [6]. Moreover, TI can help manage nosocomial infections, such as skin infections and pneumonia. In mouse models, it was shown improved response to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* [88,89]. Therefore, exploring BCG can expand our understanding and application of TI in the clinical setting, which can ultimately lead to an improved quality of life for people.

The BCG-induced epigenetic and metabolic alterations were previously demonstrated in monocytes/macrophages, NK cells, and neutrophils. In addition, BCG also changed $\gamma\delta$ T cells' transcriptional programs and increased their responsiveness to heterologous bacterial and fungal stimuli, including LPS and *Candida albicans* [90]. More immune cell types are being involved in the process of TI, and its applications are increasing day by day. Finally, TI comprehension, including signaling pathways, cell-to-cell interactions, and durability, can be used to develop the next generation of vaccines to prevent or treat various infections and orphan diseases. This review discusses the mechanisms and protective role of TI against intracellular pathogens, focusing on integrating trained innate memory with adaptive memory to shape next-generation vaccines. Two important points for future direction are: (i) to determine new immune cell subpopulations involved in TI, spotlighting their activation process, and (ii) to identify new pathogens or their pathogen-associated molecular pattern as inducers of innate memory.

Author Contributions: A.C.V.S.C.d.A. and F.M. conceptualized this study; A.C.V.S.C.d.A., F.M., R.O.S., F.V.M. and S.C.O. wrote the original draft; A.C.V.S.C.d.A. wrote the final manuscript; A.C.V.S.C.d.A., F.V.M. and S.C.O. revised the manuscript and A.C.V.S.C.d.A., F.M. and R.O.S. made the figures. All authors listed have made a direct and intellectual contribution to the work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants funded by CNPq (grants 303044/2020-9), FAPESP (grants 2017/24832-6, 2023/02577-5, 2023/09226-3 and 2023/03874-3), Pro-Reitoria de Pesquisa-Universidade de São Paulo (Pro-Reitoria de Pesquisa USP), and National Institutes of Health (NIH, grant R01 AI116453).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lobo, N.; Brooks, N.A.; Zlotta, A.R.; Cirillo, J.D.; Boorjian, S.; Black, P.C.; Meeks, J.J.; Bivalacqua, T.J.; Gontero, P.; Steinberg, G.D.; et al. 100 years of Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy: From cattle to COVID-19. *Nat. Rev. Urol.* **2021**, *18*, 611–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Singh, A.K.; Netea, M.G.; Bishai, W.R. BCG turns 100: Its nontraditional uses against viruses, cancer, and immunologic diseases. *J. Clin. Investig.* **2021**, *131*, e148291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. WHO. *Global Tuberculosis Report 2021*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021; p. 43.
4. Butkeviciute, E.; Jones, C.E.; Smith, S.G. Heterologous effects of infant BCG vaccination: Potential mechanisms of immunity. *Future Microbiol.* **2018**, *13*, 1193–1208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Babjuk, M.; Burger, M.; Capoun, O.; Cohen, D.; Comperat, E.M.; Dominguez Escrig, J.L.; Gontero, P.; Liedberg, F.; Masson-Lecomte, A.; Mostafid, A.H.; et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma In Situ). *Eur. Urol.* **2022**, *81*, 75–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. van Puffelen, J.H.; Novakovic, B.; van Emst, L.; Kooper, D.; Zuiverloon, T.C.M.; Oldenhof, U.T.H.; Witjes, J.A.; Galesloot, T.E.; Vrieling, A.; Aben, K.K.H.; et al. Intravesical BCG in patients with non-muscle invasive bladder cancer induces trained immunity and decreases respiratory infections. *J. Immunother. Cancer* **2023**, *11*, e005518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Salem, A.; Nofal, A.; Hosny, D. Treatment of common and plane warts in children with topical viable Bacillus Calmette-Guerin. *Pediatr. Dermatol.* **2013**, *30*, 60–63. [[CrossRef](#)]
8. Aaby, P.; Roth, A.; Ravn, H.; Napirna, B.M.; Rodrigues, A.; Lisse, I.M.; Stensballe, L.; Diness, B.R.; Lausch, K.R.; Lund, N.; et al. Randomized trial of BCG vaccination at birth to low-birth-weight children: Beneficial nonspecific effects in the neonatal period? *J. Infect. Dis.* **2011**, *204*, 245–252. [[CrossRef](#)]
9. Nemes, E.; Geldenhuys, H.; Rozot, V.; Rutkowski, K.T.; Ratangee, F.; Bilek, N.; Mabwe, S.; Makhethe, L.; Erasmus, M.; Toefy, A.; et al. Prevention of M. tuberculosis Infection with H4:IC31 Vaccine or BCG Revaccination. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 138–149. [[CrossRef](#)]
10. Giamarellos-Bourboulis, E.J.; Tsilika, M.; Moorlag, S.; Antonakos, N.; Kotsaki, A.; Dominguez-Andres, J.; Kyriazopoulou, E.; Gkavogianni, T.; Adami, M.E.; Damoraki, G.; et al. Activate: Randomized Clinical Trial of BCG Vaccination against Infection in the Elderly. *Cell* **2020**, *183*, 315–323.e9. [[CrossRef](#)]
11. Marchant, A.; Goetghebuer, T.; Ota, M.O.; Wolfe, I.; Ceesay, S.J.; De Groot, D.; Corrah, T.; Bennett, S.; Wheeler, J.; Huygen, K.; et al. Newborns develop a Th1-type immune response to Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 2249–2255. [[CrossRef](#)]
12. Messina, N.L.; Zimmermann, P.; Curtis, N. The impact of vaccines on heterologous adaptive immunity. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 1484–1493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Quintin, J.; Saeed, S.; Martens, J.H.A.; Giamarellos-Bourboulis, E.J.; Ifrim, D.C.; Logie, C.; Jacobs, L.; Jansen, T.; Kullberg, B.J.; Wijmenga, C.; et al. Candida albicans infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe* **2012**, *12*, 223–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kleinnijenhuis, J.; Quintin, J.; Preijers, F.; Joosten, L.A.; Ifrim, D.C.; Saeed, S.; Jacobs, C.; van Loenhout, J.; de Jong, D.; Stunnenberg, H.G.; et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 17537–17542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kaufmann, E.; Sanz, J.; Dunn, J.L.; Khan, N.; Mendonca, L.E.; Pacis, A.; Tzelepis, F.; Pernet, E.; Dumaine, A.; Grenier, J.C.; et al. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell* **2018**, *172*, 176–190.e19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. de Araujo, A.; de Queiroz, N.; Marinho, F.V.; Oliveira, S.C. Bacillus Calmette-Guerin-Trained Macrophages Elicit a Protective Inflammatory Response against the Pathogenic Bacteria Brucella abortus. *J. Immunol.* **2023**, *211*, 791–803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Netea, M.G.; Quintin, J.; van der Meer, J.W. Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* **2011**, *9*, 355–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Saeed, S.; Quintin, J.; Kerstens, H.H.; Rao, N.A.; Aghajani-refah, A.; Matarese, F.; Cheng, S.C.; Ratter, J.; Berentsen, K.; van der Ent, M.A.; et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* **2014**, *345*, 1251086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Cheng, S.C.; Quintin, J.; Cramer, R.A.; Shepardson, K.M.; Saeed, S.; Kumar, V.; Giamarellos-Bourboulis, E.J.; Martens, J.H.; Rao, N.A.; Aghajani-refah, A.; et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* **2014**, *345*, 1250684. [[CrossRef](#)]
20. Arts, R.J.W.; Carvalho, A.; La Rocca, C.; Palma, C.; Rodrigues, F.; Silvestre, R.; Kleinnijenhuis, J.; Lachmandas, E.; Goncalves, L.G.; Belinha, A.; et al. Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 2562–2571. [[CrossRef](#)]
21. Mitroulis, I.; Ruppova, K.; Wang, B.; Chen, L.S.; Grzybek, M.; Grinenko, T.; Eugster, A.; Troullinaki, M.; Palladini, A.; Kourtzelis, I.; et al. Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell* **2018**, *172*, 147–161.e12. [[CrossRef](#)]
22. Netea, M.G.; Dominguez-Andres, J.; Barreiro, L.B.; Chavakis, T.; Divangahi, M.; Fuchs, E.; Joosten, L.A.B.; van der Meer, J.W.M.; Mhlanga, M.M.; Mulder, W.J.M.; et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 375–388. [[CrossRef](#)]
23. Arts, R.J.W.; Moorlag, S.; Novakovic, B.; Li, Y.; Wang, S.Y.; Oosting, M.; Kumar, V.; Xavier, R.J.; Wijmenga, C.; Joosten, L.A.B.; et al. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host Microbe* **2018**, *23*, 89–100.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Moorlag, S.; Rodriguez-Rosales, Y.A.; Gillard, J.; Fanucchi, S.; Theunissen, K.; Novakovic, B.; de Bont, C.M.; Negishi, Y.; Fok, E.T.; Kalafati, L.; et al. BCG Vaccination Induces Long-Term Functional Reprogramming of Human Neutrophils. *Cell Rep.* **2020**, *33*, 108387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cirovic, B.; de Bree, L.C.J.; Groh, L.; Blok, B.A.; Chan, J.; van der Velden, W.; Bremmers, M.E.J.; van Crevel, R.; Handler, K.; Picelli, S.; et al. BCG Vaccination in Humans Elicits Trained Immunity via the Hematopoietic Progenitor Compartment. *Cell Host Microbe* **2020**, *28*, 322–334.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Khan, N.; Downey, J.; Sanz, J.; Kaufmann, E.; Blankenhaus, B.; Pacis, A.; Pernet, E.; Ahmed, E.; Cardoso, S.; Nijnik, A.; et al. *M. tuberculosis* Reprograms Hematopoietic Stem Cells to Limit Myelopoiesis and Impair Trained Immunity. *Cell* **2020**, *183*, 752–770.e22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Moorlag, S.; Khan, N.; Novakovic, B.; Kaufmann, E.; Jansen, T.; van Crevel, R.; Divangahi, M.; Netea, M.G. beta-Glucan Induces Protective Trained Immunity against Mycobacterium tuberculosis Infection: A Key Role for IL-1. *Cell Rep.* **2020**, *31*, 107634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wellen, K.E.; Hatzivassiliou, G.; Sachdeva, U.M.; Bui, T.V.; Cross, J.R.; Thompson, C.B. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* **2009**, *324*, 1076–1080. [[CrossRef](#)]
29. Kaufmann, E.; Khan, N.; Tran, K.A.; Ulndreaj, A.; Pernet, E.; Fontes, G.; Lupien, A.; Desmeules, P.; McIntosh, F.; Abow, A.; et al. BCG vaccination provides protection against IAV but not SARS-CoV-2. *Cell Rep.* **2022**, *38*, 110502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Dos Santos, J.C.; Barroso de Figueiredo, A.M.; Teodoro Silva, M.V.; Cirovic, B.; de Bree, L.C.J.; Damen, M.; Moorlag, S.; Gomes, R.S.; Helsen, M.M.; Oosting, M.; et al. beta-Glucan-Induced Trained Immunity Protects against Leishmania braziliensis Infection: A Crucial Role for IL-32. *Cell Rep.* **2019**, *28*, 2659–2672.e6. [[CrossRef](#)]
31. Lachmandas, E.; Beigier-Bompadre, M.; Cheng, S.C.; Kumar, V.; van Laarhoven, A.; Wang, X.; Ammerdorffer, A.; Boutens, L.; de Jong, D.; Kanneganti, T.D.; et al. Rewiring cellular metabolism via the AKT/mTOR pathway contributes to host defence against Mycobacterium tuberculosis in human and murine cells. *Eur. J. Immunol.* **2016**, *46*, 2574–2586. [[CrossRef](#)]
32. Lin, L.R.; Gao, Z.X.; Lin, Y.; Zhu, X.Z.; Liu, W.; Liu, D.; Gao, K.; Tong, M.L.; Zhang, H.L.; Liu, L.L.; et al. Akt, mTOR and NF-kappaB pathway activation in Treponema pallidum stimulates M1 macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *59*, 181–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Huang, X.H.; Ma, Y.; Zheng, M.M.; Chen, N.; Hu, M.N.; Wu, L.Y.; Zheng, Y.; Lou, Y.L.; Xie, D.L. NLRP3 and mTOR Reciprocally Regulate Macrophage Phagolysosome Formation and Acidification Against Vibrio vulnificus Infection. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 587961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hammer, Q.; Romagnani, C. About Training and Memory: NK-Cell Adaptation to Viral Infections. *Adv. Immunol.* **2017**, *133*, 171–207. [[CrossRef](#)]
35. Stary, V.; Stary, G. NK Cell-Mediated Recall Responses: Memory-Like, Adaptive, or Antigen-Specific? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Terren, I.; Orrantia, A.; Astarloa-Pando, G.; Amarilla-Irusta, A.; Zenarruzabeitia, O.; Borrego, F. Cytokine-Induced Memory-Like NK Cells: From the Basics to Clinical Applications. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 884648. [[CrossRef](#)]
37. Hole, C.R.; Wager, C.M.L.; Castro-Lopez, N.; Campuzano, A.; Cai, H.; Wozniak, K.L.; Wang, Y.; Wormley, F.L., Jr. Induction of memory-like dendritic cell responses in vivo. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Eastman, A.J.; Xu, J.; Bermik, J.; Potchen, N.; den Dekker, A.; Neal, L.M.; Zhao, G.; Malachowski, A.; Schaller, M.; Kunkel, S.; et al. Epigenetic stabilization of DC and DC precursor classical activation by TNFalpha contributes to protective T cell polarization. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaaw9051. [[CrossRef](#)]
39. Yao, Y.; Jeyanathan, M.; Haddadi, S.; Barra, N.G.; Vaseghi-Shanjani, M.; Damjanovic, D.; Lai, R.; Afkhami, S.; Chen, Y.; Dvorkin-Gheva, A.; et al. Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell* **2018**, *175*, 1634–1650.e17. [[CrossRef](#)]
40. Minns, D.; Smith, K.J.; Findlay, E.G. Orchestration of Adaptive T Cell Responses by Neutrophil Granule Contents. *Mediat. Inflamm.* **2019**, *2019*, 8968943. [[CrossRef](#)]
41. Rosales, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 113. [[CrossRef](#)]
42. Chen, F.; Wu, W.; Millman, A.; Craft, J.F.; Chen, E.; Patel, N.; Boucher, J.L.; Urban, J.F., Jr.; Kim, C.C.; Gause, W.C. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 938–946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Jensen, K.J.; Larsen, N.; Biering-Sorensen, S.; Andersen, A.; Eriksen, H.B.; Monteiro, I.; Hougaard, D.; Aaby, P.; Netea, M.G.; Flanagan, K.L.; et al. Heterologous immunological effects of early BCG vaccination in low-birth-weight infants in Guinea-Bissau: A randomized-controlled trial. *J. Infect. Dis.* **2015**, *211*, 956–967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Moorlag, S.; Arts, R.J.W.; van Crevel, R.; Netea, M.G. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 1473–1478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kleinnijenhuis, J.; Quintin, J.; Preijers, F.; Benn, C.S.; Joosten, L.A.; Jacobs, C.; van Loenhout, J.; Xavier, R.J.; Aaby, P.; van der Meer, J.W.; et al. Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous Th1/Th17 responses and innate trained immunity. *J. Innate Immun.* **2014**, *6*, 152–158. [[CrossRef](#)]
46. Spencer, J.C.; Ganguly, R.; Waldman, R.H. Nonspecific protection of mice against influenza virus infection by local or systemic immunization with Bacille Calmette-Guerin. *J. Infect. Dis.* **1977**, *136*, 171–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Suenaga, T.; Okuyama, T.; Yoshida, I.; Azuma, M. Effect of Mycobacterium tuberculosis BCG infection on the resistance of mice to ectromelia virus infection: Participation of interferon in enhanced resistance. *Infect. Immun.* **1978**, *20*, 312–314. [[CrossRef](#)]
48. Sakuma, T.; Suenaga, T.; Yoshida, I.; Azuma, M. Mechanisms of enhanced resistance of Mycobacterium bovis BCG-treated mice to ectromelia virus infection. *Infect. Immun.* **1983**, *42*, 567–573. [[CrossRef](#)]
49. Lodmell, D.L.; Ewalt, L.C. Enhanced resistance against encephalomyocarditis virus infection in mice, induced by a nonviable Mycobacterium tuberculosis oil-droplet vaccine. *Infect. Immun.* **1978**, *19*, 225–230. [[CrossRef](#)]

50. Lodmell, D.L.; Ewalt, L.C. Induction of enhanced resistance against encephalomyocarditis virus infection of mice by nonviable *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanisms of protection. *Infect. Immun.* **1978**, *22*, 740–745. [[CrossRef](#)]
51. Mathurin, K.S.; Martens, G.W.; Kornfeld, H.; Welsh, R.M. CD4 T-cell-mediated heterologous immunity between mycobacteria and poxviruses. *J. Virol.* **2009**, *83*, 3528–3539. [[CrossRef](#)]
52. Charoenlap, S.; Piromsopa, K.; Charoenlap, C. Potential role of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccination in COVID-19 pandemic mortality: Epidemiological and Immunological aspects. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **2020**, *38*, 150–161. [[CrossRef](#)]
53. Koneru, G.; Batiha, G.E.; Algammal, A.M.; Mabrok, M.; Magdy, S.; Sayed, S.; AbuElmagd, M.E.; Elnemr, R.; Saad, M.M.; Abd Allah, N.H.; et al. BCG Vaccine-Induced Trained Immunity and COVID-19: Protective or Bystander? *Infect. Drug Resist.* **2021**, *14*, 1169–1184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hilligan, K.L.; Namasivayam, S.; Sher, A. BCG mediated protection of the lung against experimental SARS-CoV-2 infection. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1232764. [[CrossRef](#)]
55. Zhang, B.Z.; Shuai, H.; Gong, H.R.; Hu, J.C.; Yan, B.; Yuen, T.T.; Hu, Y.F.; Yoon, C.; Wang, X.L.; Hou, Y.; et al. Bacillus Calmette-Guerin-induced trained immunity protects against SARS-CoV-2 challenge in K18-hACE2 mice. *JCI Insight* **2022**, *7*, e157393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Singh, A.K.; Wang, R.; Lombardo, K.A.; Prahara, M.; Bullen, C.K.; Um, P.; Davis, S.; Komm, O.; Illei, P.B.; Ordonez, A.A.; et al. Dynamic single-cell RNA sequencing reveals BCG vaccination curtails SARS-CoV-2 induced disease severity and lung inflammation. *bioRxiv* **2022**. [[CrossRef](#)]
57. Hilligan, K.L.; Namasivayam, S.; Clancy, C.S.; O'Mard, D.; Oland, S.D.; Robertson, S.J.; Baker, P.J.; Castro, E.; Garza, N.L.; Lafont, B.A.P.; et al. Intravenous administration of BCG protects mice against lethal SARS-CoV-2 challenge. *J. Exp. Med.* **2022**, *219*, e20211862. [[CrossRef](#)]
58. White, A.D.; Sibley, L.; Sarfas, C.; Morrison, A.L.; Bewley, K.; Churchward, C.; Fotheringham, S.; Gkolfinos, K.; Gooch, K.; Handley, A.; et al. Influence of Aerosol Delivered BCG Vaccination on Immunological and Disease Parameters Following SARS-CoV-2 Challenge in Rhesus Macaques. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 801799. [[CrossRef](#)]
59. Netea, M.G.; Ziogas, A.; Benn, C.S.; Giamarellos-Bourboulis, E.J.; Joosten, L.A.B.; Arditi, M.; Chumakov, K.; van Crevel, R.; Gallo, R.; Aaby, P.; et al. The role of trained immunity in COVID-19: Lessons for the next pandemic. *Cell Host Microbe* **2023**, *31*, 890–901. [[CrossRef](#)]
60. Kleinnijenhuis, J.; Quintin, J.; Preijers, F.; Joosten, L.A.; Jacobs, C.; Xavier, R.J.; van der Meer, J.W.; van Crevel, R.; Netea, M.G. BCG-induced trained immunity in NK cells: Role for non-specific protection to infection. *Clin. Immunol.* **2014**, *155*, 213–219. [[CrossRef](#)]
61. Silva, M.V.T.; Dos Santos, J.C.; Figueiredo, A.M.B.; Teufel, L.U.; Pereira, J.X.; Matos, G.G.; Pinto, S.A.; Netea, M.G.; Gomes, R.S.; Joosten, L.A.B.; et al. The role of IL-32 in Bacillus Calmette-Guerin (BCG)-induced trained immunity in infections caused by different *Leishmania* spp. *Microb. Pathog.* **2021**, *158*, 105088. [[CrossRef](#)]
62. Parra, M.; Liu, X.; Derrick, S.C.; Yang, A.; Tian, J.; Kolibab, K.; Kumar, S.; Morris, S.L. Molecular analysis of non-specific protection against murine malaria induced by BCG vaccination. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kang, A.; Ye, G.; Singh, R.; Afkhami, S.; Bavananthasivam, J.; Luo, X.; Vaseghi-Shanjani, M.; Aleithan, F.; Zganiacz, A.; Jeyanathan, M.; et al. Subcutaneous BCG vaccination protects against streptococcal pneumonia via regulating innate immune responses in the lung. *EMBO Mol. Med.* **2023**, *15*, e17084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Mata, E.; Tarancon, R.; Guerrero, C.; Moreo, E.; Moreo, F.; Uranga, S.; Gomez, A.B.; Marinova, D.; Domenech, M.; Gonzalez-Camacho, F.; et al. Pulmonary BCG induces lung-resident macrophage activation and confers long-term protection against tuberculosis. *Sci. Immunol.* **2021**, *6*, eabc2934. [[CrossRef](#)]
65. Gebre, M.S.; Brito, L.A.; Tostanoski, L.H.; Edwards, D.K.; Carfi, A.; Barouch, D.H. Novel approaches for vaccine development. *Cell* **2021**, *184*, 1589–1603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Pulendran, B.; Arunachalam, P.S.; O'Hagan, D.T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 454–475. [[CrossRef](#)]
67. Lee, A.; Wimmers, F.; Pulendran, B. Epigenetic adjuvants: Durable reprogramming of the innate immune system with adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.* **2022**, *77*, 102189. [[CrossRef](#)]
68. Bayram, Z.; Musharrafieh, U.; Bizri, A.R. Revisiting the potential role of BCG and MMR vaccines in COVID-19. *Sci. Prog.* **2022**, *105*, 368504221105172. [[CrossRef](#)]
69. Barton, E.S.; White, D.W.; Cathelyn, J.S.; Brett-McClellan, K.A.; Engle, M.; Diamond, M.S.; Miller, V.L.; Virgin, H.W.T. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* **2007**, *447*, 326–329. [[CrossRef](#)]
70. Ifrim, D.C.; Quintin, J.; Joosten, L.A.; Jacobs, C.; Jansen, T.; Jacobs, L.; Gow, N.A.; Williams, D.L.; van der Meer, J.W.; Netea, M.G. Trained immunity or tolerance: Opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors. *Clin. Vaccine Immunol.* **2014**, *21*, 534–545. [[CrossRef](#)]
71. Guevara-Hoyer, K.; Saz-Leal, P.; Diez-Rivero, C.M.; Ochoa-Grullon, J.; Fernandez-Arquero, M.; Perez de Diego, R.; Sanchez-Ramon, S. Trained Immunity Based-Vaccines as a Prophylactic Strategy in Common Variable Immunodeficiency. A Proof of Concept Study. *Biomedicines* **2020**, *8*, 203. [[CrossRef](#)]
72. Lee, Y.J.; Lee, J.Y.; Jang, Y.H.; Seo, S.U.; Chang, J.; Seong, B.L. Non-specific Effect of Vaccines: Immediate Protection against Respiratory Syncytial Virus Infection by a Live Attenuated Influenza Vaccine. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 83. [[CrossRef](#)]

73. Leentjens, J.; Kox, M.; Stokman, R.; Gerretsen, J.; Diavatopoulos, D.A.; van Crevel, R.; Rimmelzwaan, G.F.; Pickkers, P.; Netea, M.G. BCG Vaccination Enhances the Immunogenicity of Subsequent Influenza Vaccination in Healthy Volunteers: A Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study. *J. Infect. Dis.* **2015**, *212*, 1930–1938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Zimmermann, P.; Donath, S.; Perrett, K.P.; Messina, N.L.; Ritz, N.; Netea, M.G.; Flanagan, K.L.; van der Klis, F.R.M.; Curtis, N.; MIS BAIR Group. The influence of neonatal Bacille Calmette-Guerin (BCG) immunisation on heterologous vaccine responses in infants. *Vaccine* **2019**, *37*, 3735–3744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Libraty, D.H.; Zhang, L.; Woda, M.; Acosta, L.P.; Obcena, A.; Brion, J.D.; Capeding, R.Z. Neonatal BCG vaccination is associated with enhanced T-helper 1 immune responses to heterologous infant vaccines. *Trials Vaccinol.* **2014**, *3*, 1–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Counoupas, C.; Johansen, M.D.; Stella, A.O.; Nguyen, D.H.; Ferguson, A.L.; Aggarwal, A.; Bhattacharyya, N.D.; Grey, A.; Hutchings, O.; Patel, K.; et al. A single dose, BCG-adjuvanted COVID-19 vaccine provides sterilising immunity against SARS-CoV-2 infection. *NPJ Vaccines* **2021**, *6*, 143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Mouhoub, E.; Domenech, P.; Ndao, M.; Reed, M.B. The Diverse Applications of Recombinant BCG-Based Vaccines to Target Infectious Diseases Other Than Tuberculosis: An Overview. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 757858. [[CrossRef](#)]
78. Bastos, R.G.; Borsuk, S.; Seixas, F.K.; Dellagostin, O.A. Recombinant Mycobacterium bovis BCG. *Vaccine* **2009**, *27*, 6495–6503. [[CrossRef](#)]
79. Bastos, R.G.; Dellagostin, O.A.; Barletta, R.G.; Doster, A.R.; Nelson, E.; Osorio, F.A. Construction and immunogenicity of recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing GP5 and M protein of porcine reproductive respiratory syndrome virus. *Vaccine* **2002**, *21*, 21–29. [[CrossRef](#)]
80. Kanno, A.I.; Goulart, C.; Rofatto, H.K.; Oliveira, S.C.; Leite, L.C.C.; McFadden, J. New Recombinant Mycobacterium bovis BCG Expression Vectors: Improving Genetic Control over Mycobacterial Promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 2240–2246. [[CrossRef](#)]
81. Desel, C.; Dorhoi, A.; Bandermann, S.; Grode, L.; Eisele, B.; Kaufmann, S.H. Recombinant BCG DeltaureChly+ induces superior protection over parental BCG by stimulating a balanced combination of type 1 and type 17 cytokine responses. *J. Infect. Dis.* **2011**, *204*, 1573–1584. [[CrossRef](#)]
82. Nascimento, I.P.; Dias, W.O.; Mazzantini, R.P.; Miyaji, E.N.; Gamberini, M.; Quintilio, W.; Gebara, V.C.; Cardoso, D.F.; Ho, P.L.; Raw, I.; et al. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live Bordetella pertussis in mice. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 4877–4883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Ohara, N.; Matsuoka, M.; Nomaguchi, H.; Naito, M.; Yamada, T. Protective responses against experimental Mycobacterium leprae infection in mice induced by recombinant Bacillus Calmette-Guerin over-producing three putative protective antigen candidates. *Vaccine* **2001**, *19*, 1906–1910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Soto, J.A.; Galvez, N.M.S.; Rivera, C.A.; Palavecino, C.E.; Cespedes, P.F.; Rey-Jurado, E.; Bueno, S.M.; Kalergis, A.M. Recombinant BCG Vaccines Reduce Pneumovirus-Caused Airway Pathology by Inducing Protective Humoral Immunity. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2875. [[CrossRef](#)]
85. Bontempi, I.; Leal, K.; Prochetto, E.; Diaz, G.; Cabrera, G.; Bortolotti, A.; Morbidoni, H.R.; Borsuk, S.; Dellagostin, O.; Marcipar, I. Recombinant Mycobacterium bovis BCG is a promising platform to develop vaccines against Trypanosoma cruzi infection. *Clin. Exp. Immunol.* **2020**, *201*, 306–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Mambelli, F.; Marinho, F.V.; Andrade, J.M.; de Araujo, A.; Abuna, R.P.F.; Fabri, V.M.R.; Santos, B.P.O.; da Silva, J.S.; de Magalhaes, M.T.Q.; Homan, E.J.; et al. Recombinant Bacillus Calmette-Guerin Expressing SARS-CoV-2 Chimeric Protein Protects K18-hACE2 Mice against Viral Challenge. *J. Immunol.* **2023**, *210*, 1925–1937. [[CrossRef](#)]
87. de Queiroz, N.; Marinho, F.V.; de Araujo, A.; Fabel, J.S.; Oliveira, S.C. MyD88-dependent BCG immunotherapy reduces tumor and regulates tumor microenvironment in bladder cancer murine model. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 15648. [[CrossRef](#)]
88. Gu, H.; Zeng, X.; Peng, L.; Xiang, C.; Zhou, Y.; Zhang, X.; Zhang, J.; Wang, N.; Guo, G.; Li, Y.; et al. Vaccination induces rapid protection against bacterial pneumonia via training alveolar macrophage in mice. *eLife* **2021**, *10*, e69951. [[CrossRef](#)]
89. Chan, L.C.; Chaili, S.; Filler, S.G.; Miller, L.S.; Solis, N.V.; Wang, H.; Johnson, C.W.; Lee, H.K.; Diaz, L.F.; Yeaman, M.R. Innate Immune Memory Contributes to Host Defense against Recurrent Skin and Skin Structure Infections Caused by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Infect. Immun.* **2017**, *85*, e00876-16. [[CrossRef](#)]
90. Suen, T.K.; Moorlag, S.; Li, W.; de Bree, C.L.J.; Koeken, V.; Mourits, V.P.; Dijkstra, H.; Lemmers, H.; Bhat, J.; Xu, C.J.; et al. BCG vaccination induces innate immune memory in gamma delta T cells in humans. *J. Leukoc. Biol.* **2023**, qiad103. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.