

## Citocinas séricas da resposta imune em adultos e neonatos na imunidade treinada induzida por BCG: revisão sistemática

Immune response serum cytokines in adults and neonates in BCG-induced immunity trained: a systematic review

Citoquinas séricas de respuesta inmune en adultos y neonatos en inmunidad inducida por BCG entrenados: una revisión sistemática

Lara Fidelis Vieira Lemes<sup>1</sup>, Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho<sup>1</sup>, Iasmim Ribeiro da Costa<sup>1</sup>, Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva<sup>1</sup>, Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer<sup>1</sup>.

### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar as principais citocinas caracterizadas após a indução da imunidade treinada pela vacina BCG, em adultos e neonatos saudáveis, e verificar se os resultados encontrados nesses dois grupos apresentam semelhanças ou divergências nas citocinas. **Métodos:** Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, utilizando os bancos de dados do NCBI (plataforma PubMed) e Periódicos Capes para busca e seleção dos artigos, utilizando cinco descritores. **Resultados:** Os resultados demonstraram que não há grandes diferenças entre os achados das citocinas dosadas nos adultos e nos neonatos, após a indução da imunidade treinada, pela vacina BCG. Estes resultados sugerem que a imunidade treinada ocorre em qualquer idade. Dois dos estudos selecionados abordavam resultados de citocinas dosadas após um ano, demonstrando a permanência da imunidade treinada induzida pela BCG neste período. A IL-6, IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  foram as citocinas que mais se destacaram nos dez artigos selecionados, pois demonstraram altos níveis séricos na maioria dos estudos. **Considerações finais:** É necessário realizar mais estudos de longo prazo para o melhor entendimento da imunidade treinada, o que beneficiaria o avanço de novas vacinas visando proteção humana contra diferentes tipos de infecções por micro-organismos.

**Palavras-chave:** Imunidade Inata, Citocinas, BCG, Adultos, Neonatos.

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the main cytokines characterized after the induction of immunity trained by the BCG vaccine, in healthy adults and neonates, and to verify if the results found in these two groups present similarities or divergences in the cytokines. **Methods:** This is a systematic literature review, using the NCBI databases (PubMed platform) and Capes Periodicals to search and select articles, using five descriptors. **Results:** The results showed that there are no major differences between the findings of cytokines measured in adults and neonates, after induction of trained immunity by the BCG vaccine. These results suggest that trained immunity occurs at any age. Two of the selected studies addressed the results of cytokines measured after one year, demonstrating the permanence of BCG-induced trained immunity in this period. IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  were the cytokines that stood out the most in the ten selected articles, as they showed high serum levels in most studies. **Final considerations:** More long-term studies are needed to better understand trained immunity, which would benefit the advancement of new vaccines aimed at human protection against different types of infections by microorganisms.

**Key words:** Innate Immunity, Cytokines, BCG, Adults, Neonates.

### RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar las principales citoquinas caracterizadas luego de la inducción de inmunidad entrenada por la vacuna BCG, en adultos y neonatos sanos, y verificar si los resultados encontrados en estos dos grupos presentan similitudes o divergencias en las citoquinas. **Métodos:** Se trata de una revisión sistemática de la literatura, utilizando las bases de datos NCBI (plataforma PubMed) y Capes Periodicals para buscar y seleccionar artículos, utilizando cinco descriptores. **Resultados:** Los resultados mostraron

<sup>1</sup> Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia – GO.

que no existen grandes diferencias entre los hallazgos de citoquinas medidos en adultos y neonatos, luego de la inducción de inmunidad entrenada por la vacuna BCG. Estos resultados sugieren que la inmunidad entrenada ocurre a cualquier edad. Dos de los estudios seleccionados abordaron los resultados de las citoquinas medidas después de un año, demostrando la permanencia de la inmunidad entrenada inducida por BCG en este período. IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  fueron las citocinas que más se destacaron en los diez artículos seleccionados, ya que demostraron niveles séricos elevados en la mayoría de los estudios. **Consideraciones finales:** Se necesitan más estudios a largo plazo para comprender mejor la inmunidad entrenada, lo que beneficiaría el avance de nuevas vacunas destinadas a la protección humana contra diferentes tipos de infecciones por microorganismos.

**Palabras clave:** Inmunidad Innata, Citocinas, BCG, Adultos, Neonatos.

## INTRODUÇÃO

O sistema imunitário dos vertebrados, quando estimulado por um antígeno, produz uma resposta frente ao mesmo que é classicamente dividida em: resposta imune inata e resposta imune adaptativa. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do nosso organismo, ao encontrar um patógeno, gerando uma resposta rápida e pouco específica. A resposta imune adaptativa é a segunda linha de defesa do nosso organismo, que, embora mais lenta para responder, desenvolve resposta específica frente ao patógeno, além de gerar a memória imunológica (NETEA MG, et al., 2017).

A capacidade de produzir memória imunológica já foi descrita como exclusiva do sistema imune adaptativo. Contudo, vários experimentos comprovaram que o sistema imune inato também é capaz de criar memória imunológica, denominando-se imunidade treinada ou imunidade inata treinada (RUSEK P, et al., 2018). A memória imunológica adaptativa clássica é diferente da memória utilizada no contexto da imunidade inata treinada. A resposta da imunidade treinada é acentuada em uma infecção secundária, podendo responder para o mesmo microorganismo ou para um diferente, gerando proteção cruzada (NETEA MG e VAN JDM, 2011).

Esse processo envolve programação epigenética no núcleo das células de origem mieloide, ocasionando mudanças no comportamento metabólico e fenotípico, o que promove uma resposta imune intensa a estímulos secundários (MULDER WJ, et al., 2020). A reprogramação epigenética, induzida pela vacina Bacilo Calmette-Guérin (BCG) nas células da imunidade inata, leva a uma produção aumentada das citocinas inflamatórias, resultando em uma ação mais ativa após a reestimulação (ARTS RJ, et al., 2018).

Para a indução da imunidade treinada, utilizam-se estímulos efetores como: Bacilo Calmette-Guérin,  $\beta$ -glucana, quitina, lipopolissacarídeo (LPS) (RUSEK P, et al., 2018). A vacina BCG é uma variante atenuada do *Mycobacterium bovis*, que causa tuberculose (TB), em bovinos (MULDER WJ, et al., 2020).

O estudo dos efeitos heterólogos da vacinação com BCG forneceu subsídios para a descoberta da imunidade treinada (NETEA MG e VAN JDM, 2017). Em 1959, a vacina BCG foi utilizada como produto imunoterapêutico para o tratamento do câncer. O seu uso foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), dos EUA, para o tratamento do câncer de bexiga, além de outras doenças malignas, como: linfoma e melanoma (MULDER WJ, et al., 2020).

A reprogramação epigenética e metabólica das células são dependentes uma da outra, ou seja, para que a reprogramação epigenética ocorra, é necessário que vários metabólitos atuem como cofatores induzindo modificações na cromatina e DNA (NETEA MG, et al., 2016). Após o primeiro contato ou estímulo, a Proteína Quinase Serina/Treonina (Akt) é fosforilada ativando a via do *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR), estimulando a mudança imunometabólica, além de promover a tradução e ativação da proteína *hypoxia-inducible factor* (HIF), importante regulador na resposta imune contra patógenos intracelulares. O HIF atua aumentando a glicólise e a codificação da IL-1 $\beta$  e receptor de *Toll-like-2* (TLR2) e TLR4 (LIU Y, et al., 2020).

O metabolismo da glutamina junto ao Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA) liberam metabólitos importantes (citrato e fumarato) para a indução do fenótipo treinado. O citrato é convertido em oxalacetato e Acetilcoenzima A (Acetil-CoA), atuando como doador de acetil para as histonas acetil transferases. O

fumarato atua inibindo a lisina demetilase 5 (KDM5) histona demetilase, promovendo a acessibilidade para alteração na cromatina, enriquecendo a marca epigenética H3K4me3 (BEKKERING S, et al., 2018).

A vacina BCG é aplicada em recém-nascidos, logo após o nascimento ou alguns dias após. Sua eficácia está acima de 70% contra a meningite tuberculosa e a TB miliar. Em contrapartida, a TB pulmonar resulta em proteção de 52% (COVIÁN C, et al., 2019). A vacinação com a BCG reduziu a mortalidade em crianças, em decorrência da proteção cruzada não específica, gerada por essa vacina a outros patógenos. A primeira evidência descrita desse fenômeno foi em 1927, na Suécia, por Carl Näslund, que relatou uma taxa de mortalidade três vezes menor em recém-nascidos vacinados com BCG, quando comparados aos não vacinados (AABY P e BENN CS, 2012).

Há diversas evidências sobre os efeitos protetores da vacinação e de estudos experimentais, com a BCG, induzindo a imunidade treinada em animais (KAUFMANN E, et al., 2018) e humanos. A utilização da vacina BCG apresenta aplicações importantes, comprovadas em tratamentos imunoterapêuticos, e em efeitos protetores não específicos contra infecções virais, bacterianas e/ou fúngicas (MOORLAG SJ, et al., 2019).

A imunidade treinada tem mudado nossa visão sobre o entendimento do sistema imunitário inato, além de diferentes formulações de vacinas, visando, futuramente, a produção de vacinas com proteção ampla, contra vários patógenos ao mesmo tempo. Nos últimos 10 anos, tem crescido bastante o conhecimento científico para compreender melhor como funciona a imunidade treinada (GOURBAL B, et al., 2018).

Desse modo, o objetivo do estudo foi analisar se há relação do aumento dos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias, após indução da imunidade treinada pela BCG e proteção/ memória imunológica contra infecções secundárias em neonatos e adultos saudáveis.

## MÉTODOS

Trata-se de uma revisão sistemática da literatura sobre o sistema imunitário de adultos e neonatos saudáveis, após a indução da imunidade treinada pela BCG, nas células imunes inatas, sendo avaliada a responsividade pela análise da dosagem de citocinas. Este estudo possui cadastro pela plataforma International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO), apresentando o registro CDR42022341391.

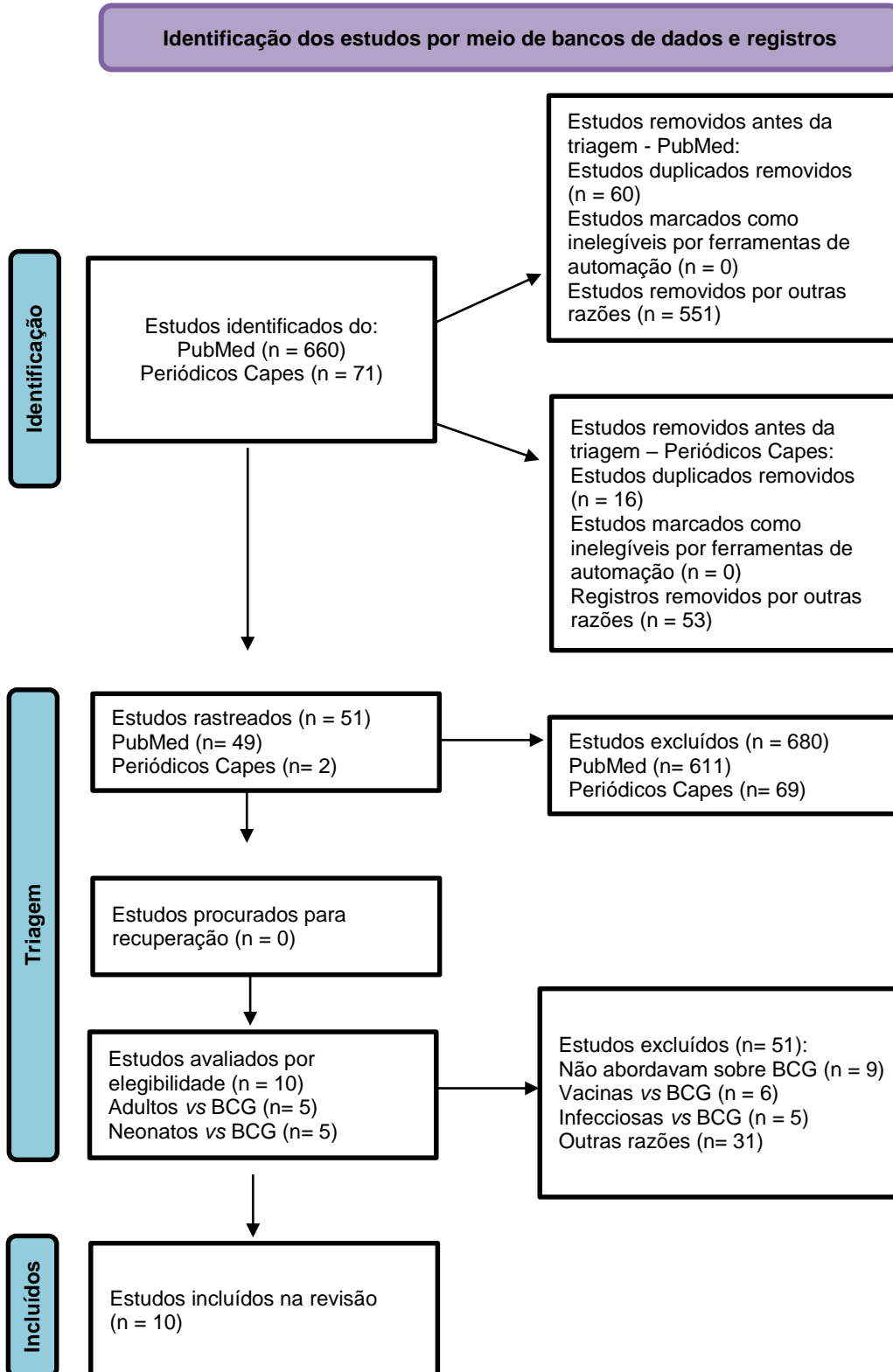
Para a seleção dos estudos, foram adotados, como critérios de inclusão: artigos com *abstract*, revisado por pares, no período de 2010 a 2021, com tema principal de imunidade treinada induzida por BCG e estudos experimentais em células imunes humanas. Como critérios de exclusão, foram retirados: estudos experimentais com animais, estudos voltados para doenças de origem não infecciosa e com comorbidades.

As bases de dados escolhidas para busca foram: *National Center for Biotechnology Information* – utilizando a plataforma do PubMed e Periódicos Capes, pois indexam grande quantidade de revistas de vários países. As buscas pela PubMed foram iniciadas no dia 26 de abril e finalizadas no dia 21 de maio de 2021, enquanto as buscas pelo Periódicos Capes se iniciaram e terminaram no dia 28 de julho de 2021.

Foram utilizados os mesmos descritores e filtros nas bases de dados: Pubmed e Periódicos Capes. Os cinco descritores escolhidos foram: *trained immunity*; *innate memory*; *trained innate immunity*; *innate immunity memory*; e *trained immunity in monocytes*. Os filtros usados foram: operador booleano – aspas (“”), recorte temporal no período de 2010 a 2021, com *abstract* e revisado por pares.

Ao fim da busca, foram obtidos 51 estudos (49 da PubMed e 2 do Periódicos Capes) para seleção, duas revisoras fizeram a análise dos estudos manualmente de forma independente e depois em conjunto. Foram analisados a metodologia e os resultados de todos os estudos, separando-os em 2 grupos: (1) adultos e BCG (5 estudos); e neonatos e BCG (5 estudos). Após a seleção dos 10 estudos mencionados anteriormente, se iniciou o processo de coleta de dados, avaliando cada estudo de forma independente. Detalhamos como foi realizada a identificação dos estudos (**Figura 1**), através do diagrama de fluxo disponibilizado pelo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (PAGE MG, et al., 2021).

**Figura 1** – Diagrama de fluxo do processo de identificação, triagem e estudos incluídos para a revisão sistemática.



**Legenda:** Todos os filtros citados anteriormente foram usados e contribuíram para que não houvesse estudos procurados para recuperação. As outras razões não detalhadas dos estudos excluídos são: estudos que não tinham dosagem de citocinas, dosagem de citocinas antes da vacinação com BCG e estudos com animais. **Fonte:** Lemes LFV, et al., 2022.

## RESULTADOS

Dentre os 10 estudos selecionados para análise, Kleinnijenhuis J (2012), Kleinnijenhuis J (2013) e Kleinnijenhuis J (2014) foram os únicos que não descreveram o tipo de vacina BCG que foi utilizada nos seus estudos. As vacinas BCG; utilizadas nos demais estudos foram de dois tipos: a primeira vem de uma estirpe dinamarquesa com numeração 1331 (BCG 1331 Danish), e a segunda foi feita pelo Laboratório Intervax, na Bulgária (BCG Bulgaria Intervax). Ambas utilizam o *M. tuberculosis* vivo atenuado (SISCO MC, et al., 2020).

Na **Tabela 1**, há a descrição dos 5 estudos selecionados, apresentando resumidamente o tema ou título abordado, o autor, o ano da publicação, a quantidade de voluntários, adultos saudáveis e as citocinas dosadas. Optamos por demonstrar os resultados em forma de tabela para facilitar a visualização e entendimento de todos os artigos.

**Tabela 1** - Características gerais dos estudos selecionados abordando as citocinas dosadas após indução da imunidade inata treinada em voluntários adultos saudáveis.

TÍTULO	AUTOR E ANO	Nº PARTICIPANTES	CITOCINAS DOSADAS
(1) Long-Lasting Effects of BCG Vaccination on Both Heterologous Th1/Th17 Responses and Innate Trained Immunity.	KLEINNIJENHUIS J, et al. (2013).	18 voluntários	TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22.
(2) BCG-induced trained immunity in NK cells: role for non-specific protection to infection.	KLEINNIJENHUIS J, et al. (2014).	29 voluntários (dosagem de citocinas em 20 voluntários)	TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\beta$ e IFN $\gamma$ .
(3) BCG Vaccination in Humans Elicits Trained Immunity via the Hematopoietic Progenitor Compartment.	CIROVIC B, et al. (2020).	20 voluntários	IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, TNF, e IL-1Ra.
(4) Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes.	KLEINNIJENHUIS J, et al. (2012).	20 voluntários	TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN $\gamma$ .
(5) BCG Vaccination Induces Long-Term Functional Reprogramming of Human Neutrophils.	MOORLAG SJ, et al. (2020).	25 voluntários antes da vacinação e 23 após a vacinação	IL-8, TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .

**Legenda:** IL (interleucina), TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa),  $\beta$  (beta), IFN $\gamma$  (interferon gama), IL-1Ra.

**Fonte:** Lemes LFV, et al., 2022.

A **Tabela 2** apresenta as mesmas descrições da **Tabela 1**, só que o público-alvo é de neonatos. Todos os estudos aqui selecionados foram aprovados por comitês de ética em pesquisa e tinham a autorização por escrito dos pais.



**Tabela 2** - Características gerais dos estudos selecionados abordando as citocinas dosadas após indução da imunidade inata treinada em neonatos saudáveis.

TÍTULO	AUTOR E ANO	Nº PARTICIPANTES	CITOCINAS DOSADAS
(6) BCG-induced non-specific effects on heterologous infectious disease in Ugandan neonates: an investigator-blind randomized controlled trial.	PRENTICE S, et al. (2021).	462 neonatos (dosagem de citocinas em 31 neonatos)	TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IFN $\gamma$ .
(7) Whole Blood Profiling of Bacillus calmette-guérin-induced Trained innate immunity in infants identifies epidermal growth Factor, il-6, Platelet-Derived growth Factor-aB/BB, and natural Killer cell activation.	SMITH SG, et al. (2017).	21 neonatos (11 vacinados e 10 não vacinados)	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ .
(8) Bacillus Calmette-Guérin vaccination at birth and in vitro cytokine responses to non-specific stimulation. A randomized clinical trial.	NISSEN TN, et al. (2017)	144 neonatos (76 vacinados e 68 não vacinados)	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17, IL-22.
(9) Neonatal BCG vaccination influences cytokine responses to Toll-like receptor ligands and heterologous antigens.	FREYNE B, et al. (2018).	212 neonatos (119 vacinados e 93 não vacinados)	IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$ .
(10) Monocytes from neonates and adults have a similar capacity to adapt their cytokine production after previous exposure to BCG and $\beta$ -glucan.	NAMAKULA R, et al. (2020).	30 voluntários adultos e 15 neonatos.	IL-6, IL-10 e TNF.

**Fonte:** Lemes LFV, et al., 2022.

Nos estudos envolvendo a estimulação da imunidade treinada pela BCG em adultos foram utilizadas amostras de sangue total, para separação e cultivo celular das células imunes inatas. Após a estimulação com agentes microbianos foi realizada a dosagem das citocinas.

Em todos os 5 estudos dos adultos e a BCG, a metodologia escolhida para a coleta e análise dos experimentos ocorreu em 3 etapas. A primeira coleta foi realizada antes da vacinação dos voluntários saudáveis e virgens de BCG; a segunda coleta foi realizada após 2 semanas da vacinação com BCG; e a terceira após 3 meses. Apenas Kleinnijenhuis J (2013), optaram por fazer uma quarta coleta, após 1 ano da vacinação com BCG.

As citocinas dosadas nos adultos foram: IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-22, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . As três citocinas que apresentaram altos níveis nos experimentos dos adultos vacinados com BCG foram: IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (**Tabela 3**).

Para todos os estudos com neonatos, houve uma média de 84,6 ( $\pm$ 88,8) participantes, com variação de 15 até 212. Para os estudos com adultos, foi constatada uma média de 26,0 ( $\pm$  11,6) participantes, com variação de 18 até 48.

**Tabela 3** - Metodologia aplicada e resultados das citocinas após estimulação específica e não específica nos voluntários adultos saudáveis vacinados pela BCG.

AUTOR	AMOSTRA/COLETA	EXPERIMENTO	AUMENTO DAS CITOCINAS	NÃO ALTERAÇÃO DAS CITOCINAS
(1) KLEINNIJENHUI S J, et al. (2013).	Sangue venoso, coleta antes da vacinação, 2 semanas, 3 meses e 1 ano após a vacinação.	Separação celular, estimulação com <i>M. tuberculosis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .	Após vacinação: IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .	-
(2) KLEINNIJENHUI S J, et al. (2014).	Sangue venoso, coleta antes da vacinação, 2 semanas, 3 meses após a vacinação.	Separação celular, estimulação com <i>M. tuberculosis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> .	Após a vacinação: IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ .	IFN $\beta$ estava abaixo do limite de detecção e o IFN- $\gamma$ não teve aumento significativo.
(3) CIROVIC B, et al. (2020).	Sangue venoso, coleta antes da vacinação, 2 semanas, 3 meses após a vacinação.	Separação celular, estimulação com placebo e <i>C. albicans</i> .	Após vacinação: IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, IL-10, IFN- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .	TNF e IL-6 não apresentaram diferença antes e depois da vacinação.
(4) KLEINNIJENHUI S J, et al. (2012).	Sangue venoso, coleta antes da vacinação, 2 semanas, 3 meses após a vacinação.	Separação celular, estimulação com <i>M. tuberculosis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> .	Após vacinação: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ .	IL-6 estava abaixo do limite de detecção.
(5) MOORLAG SJ, et al. (2020).	Sangue venoso, coleta antes da vacinação, 2 semanas, 3 meses após a vacinação.	Separação celular, estimulação com <i>M. tuberculosis</i> , <i>C. albicans</i> e LPS.	Após vacinação: IL-8.	IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ estavam abaixo do limite de detecção.

**Legenda:** *M. tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*), *S. pneumoniae* (*Streptococcus pneumoniae*), *C. albicans* (*Candida albicans*), *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*), *E. coli* (*Escherichia coli*) e LPS (Lipopolissacarídeo bacteriano).

**Fonte:** Lemes LFV, et al., 2022.

Nos estudos envolvendo a estimulação da imunidade treinada pela BCG em neonatos, para verificação da dosagem de citocinas foram utilizados sangue venoso e/ou sangue do cordão umbilical para realização dos experimentos. As citocinas dosadas nos neonatos foram: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IL-22, IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ 2, TNF, TNF $\alpha$  e TNF $\beta$ . As três citocinas que apresentaram altos níveis nos experimentos foram: IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ .

Prentice S (2021) realizaram a coleta em dois grupos: neonatos vacinados após o nascimento e neonatos vacinados de forma tardia (após 6 semanas). As coletas foram realizadas após 5 dias da vacinação. Os neonatos vacinados no nascimento tiveram sua primeira coleta de sangue após 5 dias e após 6 semanas. No grupo tardio da vacinação, a primeira coleta foi realizada na sexta semana após alguns dias já vacinados e em 10 semanas. Houve diferença significativa no aumento das citocinas dos neonatos vacinados no nascimento, em comparação com os neonatos vacinados tardiamente.

Smith SG (2017) dividiram seu experimento em dois grupos: neonatos vacinados com BCG após 6 semanas e neonatos não vacinados. Dentre as citocinas dosadas, a IL-6 foi a única que teve aumento estatisticamente significativo nos estímulos específicos, com o *M. tuberculosis* e, também, nos estímulos não específicos.

Nissen TN (2017) avaliaram dois grupos: neonatos vacinados e não vacinados. A vacinação foi feita em até 7 dias após o nascimento e após 4 dias foi feita a primeira coleta desse grupo, seguindo depois o protocolo de coleta após 3 meses da vacinação com BCG e 13 meses. Dentre as citocinas dosadas, o IFN- $\gamma$  e a IL-22 obtiveram aumento estatisticamente significativo com o estímulo da BCG, após 13 meses.

No estudo de Freyne B (2018), foi feita a vacinação com BCG do primeiro grupo em até 10 dias após o nascimento e a coleta de sangue foi realizada após 7 dias da vacinação, nos neonatos vacinados, e nos neonatos não vacinados. As citocinas que apresentaram aumento estatisticamente significativo (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-1Ra) foram dos neonatos vacinados e de mães que também haviam sido vacinadas pela BCG, em algum momento de suas vidas.

Namakula R (2020) fizeram a coleta de sangue dos neonatos pelo cordão umbilical no nascimento, e, nos adultos, foram realizadas coletas de sangue venoso. Os estímulos foram realizados utilizando a BCG, LPS e  $\beta$ -glucana. A IL-6 apresentou aumento estatisticamente significativo, após o estímulo com BCG, nos adultos e nos neonatos, e o TNF teve aumento somente nos adultos (**Tabela 4**).

**Tabela 4** - Metodologia aplicada e resultados das citocinas após estimulação específica e não específica nos neonatos saudáveis vacinados pela BCG.

AUTOR	COLETA/AMOSTRA	EXPERIMENTO	AUMENTO DAS CITOCINAS	NÃO ALTERAÇÃO DAS CITOCINAS
(6) PRENTICE S, et al. (2020).	Sangue venoso, 5 dias após randomização, 6 semanas e 10 semanas.	Separação celular, estimulação com <i>E. coli</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> .	Nos bebês vacinados no nascimento: IL-6, TNF e IL-1 $\beta$ .	IL-10 e IFN- $\gamma$ não foram divulgados.
(7) SMITH SG, et al. (2017).	Sangue venoso, após 4 meses de vida.	Separação celular, estimulação com LPS, <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>M. tuberculosis</i> e PPD.	IL-8, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12p40, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-1 $\alpha$ , IL-1Ra, IL-5, TNF- $\alpha$ , IFN $\alpha$ 2 e TNF $\beta$ .	IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-4, IL-9, IL-12p70 e IL-15.
(8) NISSEN TN, et al. (2017).	Sangue venoso após 4 dias da randomização, 3 meses e 13 meses.	Separação celular, estimulação com LPS, <i>E. coli</i> , <i>S. pneumoniae</i> , BCG, <i>C. albicans</i> e PHA.	IFN- $\gamma$ e IL-22 – c/ estímulo da BCG.	IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17.
(9) FREYNE B, et al. (2018).	Sangue venoso após $\pm$ 17 dias do nascimento.	Separação celular, estimulação com <i>M. tuberculosis</i> , LPS, <i>E. coli</i> , <i>S. pneumoniae</i> , BCG, <i>C. albicans</i> , <i>H. influenzae</i> , S. grupo B, <i>L. monocytogenes</i> , Peptídeo glucano e Pam3csk4.	IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-1Ra.	IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-8, TNF- $\alpha$ .
(10) NAMAKULA R, et al. (2020).	Sangue umbilical e sangue venoso dos adultos.	Separação celular, estimulação com LPS, BCG, <i>C. albicans</i> e $\beta$ -glucano.	Adultos: IL-6 e TNF. Neonatos: IL-6.	Adultos: IL-10. Neonatos: IL-10 e TNF.

**Legenda:** PPD ((S)-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser(S)-Lys4-OH), PHA (phytohemagglutinin), *H. influenzae* (*Haemophilus influenzae*), *L. monocytogenes* (*Listeria monocytogenes*), S. grupo B (*Streptococcus* do grupo B.),  $\beta$ -glucano (beta-glucano).

**Fonte:** Lemes LFV, et al., 2022.

Em todos os 10 estudos analisados, não houve diminuição das citocinas durante os experimentos. Utilizamos o termo na **Tabela 3** e na **Tabela 4** de “não alteração das citocinas”, representando as citocinas



que não puderam ser dosadas por estarem abaixo do nível de detecção, e para aquelas que não ultrapassaram o limite do controle. Curiosamente, nenhum estudo teve diminuição das citocinas durante o experimento, apenas mantiveram-se nos mesmos níveis do controle.

A metodologia aplicada aos estudos com neonatos foi diferente da aplicada com os adultos, principalmente, pela dificuldade da coleta e quantidade permitida de extração sanguínea. Portanto, dos 5 artigos selecionados, Smith SG (2017), Freyne B (2018) e Namakula R (2020) fizeram apenas uma coleta. Namakula R (2020) optaram por fazer a coleta pelo cordão umbilical dos neonatos, logo após o nascimento e não foi identificado se as mães eram vacinadas com BCG. Prentice P (2021) conseguiram fazer 2 coletas e o Nissen TN (2017) conseguiram fazer 3 coletas.

## DISCUSSÃO

A reprogramação epigenética promove mudança nos sítios promotores das citocinas pró-inflamatórias. O resultado dessa ação é o aumento da produção de citocinas, que acarreta na potencialização da ação da resposta imune contra o invasor, eliminando-o com mais rapidez e eficácia (ARTS RJ, et al., 2018). As principais citocinas descritas na característica da imunidade treinada foram as citocinas pró-inflamatórias, como: TNF- $\alpha$  e IL-6, e as anti-inflamatórias, como: IL-10 e IL-1Ra (BEKKERING S, et al., 2016).

Após a análise dos 10 artigos, as principais citocinas que apresentaram aumento estatisticamente significativo após os experimentos, tanto nos adultos vs. BCG, quanto nos neonatos vs. BCG foram as mesmas: IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Esses resultados encontrados estavam de acordo com os resultados apresentados por Netea MG (2011), Cheng SC (2015) e Merini LR (2012), como as principais citocinas no papel da imunidade inata treinada.

Kleinnijenhuis J (2013) demonstraram que as respostas de potencialização inespecíficas, geradas pela imunidade inata treinada, se manifestaram por pelo menos 1 ano após estímulo específico (*M. tuberculosis*) e não específicos (*C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*), em adultos vacinados com a BCG. Nissen TN (2017) também demonstraram a mesma capacidade das células imunes inatas treinadas de manterem a resposta por pelo menos 1 ano com estímulo específico do *M. tuberculosis* após a vacinação com BCG, só que em neonatos. Podemos supor que talvez a imunidade treinada não tenha diferença no quesito de idade, entre neonatos e adultos, pois estão mantendo os níveis altos de citocinas, após um ano.

O estudo de Namakula R (2020) foi o único artigo que fez os experimentos com voluntários adultos e neonatos ao mesmo tempo. Os resultados demonstraram uma magnitude semelhante nas respostas das citocinas dos adultos e neonatos, principalmente, para a IL-6. Esses dados são similares aos artigos desta revisão, pois a IL-6 foi a que mais apresentou aumento estatisticamente significativo nos experimentos, com os neonatos, e em segundo com os adultos.

Entre os artigos selecionados e analisados, apenas os estudos de Kleinnijenhuis J (2013) e Nissen TN (2017) conseguiram fazer acompanhamento e experimento de até 1 ano. Várias limitações impedem que os estudos se prolonguem por 1 ano ou mais, como: falta de financiamento, mudanças e/ou viagens dos voluntários, doenças infecciosas ou comorbidades, perda do contato, falta de interesse em continuar o estudo, dentre outros.

Vários países que aderiram à vacina BCG, no programa nacional de imunização, têm visto resultados positivos. Na Guiné-Bissau, após a aplicação da vacinação com BCG, em neonatos, a mortalidade neonatal reduziu em 38% (SORENSEN B, et al., 2017). Na África do Sul, após aplicação da vacina BCG, em adolescentes houve diminuição nas infecções do trato respiratório em 73% (NEMES E, et al., 2018). Há ensaios controlados e randomizados, na Holanda e na Austrália, que estão avaliando se a vacina BCG reduz a gravidade e/ou a incidência da COVID-19 (CURTIS N, et al., 2020).

Como citado anteriormente, as citocinas são proteínas que medeiam e/ou regulam todo o sistema imunitário. Durante uma infecção, as células da imunidade inata, que foram treinadas, produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, promovendo resolução mais rápida da infecção (ARTS RJ, et al., 2018; MERINI LR, et al., 2012). O que não se sabe ao certo é, até que ponto o treinamento das células imunes inatas pode trazer somente benefícios, sendo necessário mais estudos no aprofundamento do efeito das citocinas após a indução da imunidade treinada.

A IL-1 $\beta$  atua em diferentes funções biológicas, como o aumento da sinalização durante uma infecção na fase aguda, promovendo o deslocamento das células imunes para o local de infecção e a produção secundária de citocinas (TISONCIK JR, et al., 2012). A regulação da hematopoiese de emergência também é outra função da IL-1 $\beta$ ; sua ação está relacionada à atividade funcional nos progenitores hematopoiéticos da medula óssea, aumentando a sobrevivência das células mielóides maduras (MITROULIS I, et al., 2018). A IL-1 $\beta$  apresentou capacidade de gerar imunidade treinada *in vitro*. Foi utilizada como estimulante em monócitos humanos, demonstrando um fenótipo semelhante ao gerado pelo estímulo da BCG, e apresentou aumento na produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  (ARTS RJ, et al., 2018).

A IL-6 apresenta atividades pró e anti-inflamatórias; sua função protetora está ligada à via de sinalização clássica, onde o receptor da IL-6 (IL-6R) se liga à membrana da célula. A atividade pró-inflamatória é mediada pela via de trans-sinalização, utilizando o receptor de IL-6 solúvel (sIL-6R) (JOHN SR, 2018). Outras funções mediadas pela IL-6 são: regulação metabólica; ação neurotrófica; diferenciação de linfócitos B e células-tronco mielóides em plasmócitos; proliferação de células T (MARQUESI KF, et al., 2018).

O TNF- $\alpha$  apresenta funções homeostáticas benéficas, como: a defesa contra microorganismos, regeneração tecidual, resolução do processo inflamatório, desenvolvimento do órgão linfóide e inibição do crescimento tumoral. Após o início da inflamação, o TNF- $\alpha$  promove a proliferação de células imunes e estimulação do endotélio vascular (KEMANETZOGLOU E e ANDREADOU E, 2017). É considerado um importante regulador nas respostas inflamatórias e está envolvido na patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias (JANG D, et al., 2021).

Durante a busca e seleção dos artigos, uma limitação que encontramos foi que grande parte dos artigos apresentava experimentos em animais. Nossa revisão foi voltada para artigos em que os testes fossem realizados em células humanas saudáveis e com o uso da vacina BCG. Apenas 2 dos artigos selecionados nesta revisão obtiveram resultados até 1 ano de experimento, sendo necessário haver mais estudos a longo prazo para avaliação da mesma.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Países que têm a vacina BCG dentro do programa nacional de imunização apresentam índices de mortalidade menores, em neonatos, e infecções do trato respiratório, em comparação aos países que deixaram de utilizar a vacina. A utilização da vacina BCG em neonatos é aprovada e segura. Nossa recomendação é que ela deve sim continuar sendo aplicada em neonatos e em adultos que não foram vacinados anteriormente, em âmbito global. Entretanto, sua utilização para combate de outros patógenos e produção de vacinas ainda está sendo estudada em ensaios clínicos randomizados. A imunidade treinada é um campo significativo para o melhor entendimento do sistema imunitário, além de beneficiar o avanço de estudos e produção de vacinas, visando à proteção humana contra diferentes tipos de ameaças microbianas. Este estudo contribuiu significativamente para elucidação das principais citocinas alteradas após a indução da imunidade treinada pela BCG em grupos com faixas etárias distintas. Todavia, é necessário ter mais estudos que ultrapassem um ano de teste, para descobrir e apurar as propriedades da imunidade treinada, em longo prazo e utilização de outras células do organismo. Além, de ter estudos no aprofundamento, dos mecanismos e vias, que as citocinas atuam, após treinamento das células imunes inatas.

## REFERÊNCIAS

1. AABY P, BENN CS. Saving lives by training innate immunity with bacille Calmette-Guérin vaccine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012; 109(43): 17317-17318.
2. ARTS RJ, et al. BCG vaccination protects against experimental viral infection in humans through the Induction of Cytokines Associated with trained immunity. Cell Host and Microbe, 2018; 23(1): 89-100.
3. BEKKERING S, et al. In vitro experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes. Clinical and Vaccine Immunology, 2016; 23(12): 926-933.
4. BEKKERING S, et al. Metabolic induction of trained immunity through the mevalonate pathway. Cell, 2018; 172, (1–2): 135-146.e9.
5. CHENG SC, et al. mTOR/HIF1 $\alpha$ -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. Science, 2015; 345(6204): 1-18.

6. CIROVIC B, et al. BCG vaccination in humans elicits trained immunity via the hematopoietic progenitor compartment. *Cell Host and Microbe*, 2020; 28(2): 322-334.e5.
7. COVIÁN C, et al. BCG-Induced cross-protection and development of trained immunity: implication for vaccine design. *Frontiers in Immunology*, 2019; 10(2806): 1-14.
8. CURTIS N, et al. Considering BCG vaccination to reduce the impact of COVID-19. *Elsevier*, 2020; 395: 1-3.
9. FREYNE B, et al. Neonatal BCG vaccination influences cytokine responses to toll-like receptor ligands and heterologous antigens. *The Journal of Infectious Diseases*, 2018; 217(11): 1798-1808.
10. GOUBAL B, et al. Innate immune memory: an evolutionary perspective. *Immunol. Reviews*, 2018; 283(1): 21-40.
11. JANG D, et al. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in autoimmune disease and current TNF- $\alpha$  inhibitors in therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021; 22(2719): 1-16.
12. JOHN SR. Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harbor perspectives in Biology*, 2018; 2: 1-17.
13. KAUFMANN E, et al. BCG educates hematopoietic stem cells to generate protective innate immunity against tuberculosis. *Cell*, 2018; 172 (1–2): 176-190.e19.
14. KEMANETZOGLOU E, ANDREADOU E. CNS demyelination with TNF- $\alpha$  blockers. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2017; 17(36): 1-15.
15. KLEINNIJENHUIS J, et al. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012; 109(43): 17537-17542.
16. KLEINNIJENHUIS J, et al. Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous th1/th17 responses and innate trained immunity. *Journal of Innate Immunity*, 2013; 6(2): 152-158.
17. KLEINNIJENHUIS J, et al. BCG-induced trained immunity in NK cells: role for non-specific protection to infection. *Clinical Immunology*, 2014; 155(2): 213-219.
18. LIU Y, et al. BCG-induced trained immunity in macrophage: reprogramming of glucose metabolism: BCG-induced trained immunity by enhanced glycolysis and glutamine-driven tricarboxylic acid cycle in macrophage. *International Reviews of Immunology*, 2020; 39(3): 83-96.
19. MARQUESI KF, et al. Resposta imune e quimiocinas: breve revisão da literatura autores. *Revista Científica - União das Faculdades dos Grandes Lagos*, 2018; 1(1): 1-8.
20. MERINI LR, et al. Citocinas pró-inflamatórias em artrite induzida por adjuvante: uma revisão da ação imunomoduladora de substâncias bioativas. *Scientia Amazonia*, 2012; 1(3): 27-39.
21. MITROULIS I, et al. Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity. *Cell Press*, 2018; 172: 147–161.
22. MOORLAG SJ, et al. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 2019; 25(12): 1473-1478.
23. MOORLAG SJ, et al. BCG vaccination induces long-term functional reprogramming of human neutrophils. *Cell Reports*, 2020; 33(7): 108387.
24. MULDER WJ, et al. Therapeutic targeting of trained immunity Willem. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2020; 18(7): 553-566.
25. NAMAKULA R, et al. Monocytes from neonates and adults have a similar capacity to adapt their cytokine production after previous exposure to BCG and  $\beta$ -glucan. *PLoS ONE*, 2020; 15(2): 1-8.
26. NEMES E, et al. Prevention of *M. tuberculosis* infection with H4:IC31 vaccine or BCG revaccination. *New England Journal of Medicine*, 2018; 379(2): 138-149.
27. NETEA MG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 2016; 352: 1-27.
28. NETEA MG, VAN JDM. Trained immunity: an ancient way of remembering. *Cell Host and Microbe*, 2017; 21(3): 297-300.
29. NETEA MG, et al. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host and Microbe*, 2011; 9(5): 355-361.
30. NISSEN TN, et al. Bacillus Calmette-Guérin vaccination at birth and in vitro cytokine responses to non-specific stimulation: a randomized clinical trial. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2017; 37(1): 29-41.
31. PAGE MJ, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, 2021; 372(71).
32. PRENTICE S, et al. BCG-induced non-specific effects on heterologous infectious disease in Ugandan neonates: an investigator-blind randomized controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 2021; 21(7): 993-1003.
33. RUSEK P, et al. Infectious agents as stimuli of trained innate immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018; 19(2) 1-13.
34. SISCO MC, et al. Newly sequenced genomes of four bacillus calmette guerin vaccines. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2020; 115(4): 2-5.
35. SMITH SG, et al. Whole blood profiling of Bacillus Calmette–Guérin-Induced trained innate immunity in infants identifies epidermal growth factor, IL-6, platelet-derived growth factor-AB/BB, and Natural Killer cell activation. *Frontiers in Immunology*, 2017; 8: 1-11.
36. SORENSEN B, et al. Early BCG-Denmark and neonatal mortality among Infants weighing <2500 g: a randomized controlled trial. *Clinical Infectious Diseases*, 2017; 65(7): 1183-1190.
37. TISONCIK JR, et al. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012; 76: 16-32.