

## ARTÍCULO ORIGINAL

---

### Inmunidad entrenada y micobacterias: hacia el futuro de la salud global Trained immunity and mycobacteria: towards the future of global health

Marta Pérez-Sancho<sup>1,2</sup>, Teresa García-Seco<sup>1</sup>, Lidia Sánchez-Morales<sup>1,2</sup>, Inmaculada Moreno<sup>3</sup>, Mercedes Domínguez<sup>3</sup>, Joaquín Goyache<sup>2,4</sup>, Lucas Domínguez<sup>1,2,4</sup>  
[maperezs@ucm.es](mailto:maperezs@ucm.es) (Coord.)

#### RESUMEN

Una vez más, la evidencia ha demostrado que hasta los dogmas más asentados pueden ser cuestionados: la dualidad inmunidad innata/sin memoria inmunológica e inmunidad adquirida/con memoria inmunológica se ha visto desafiada en los últimos años al ponerse de manifiesto la existencia de ciertos rasgos de memoria en la respuesta innata. Por ello, ha emergido un nuevo concepto en el campo de la inmunología: la inmunidad entrenada. Esta respuesta inmunitaria tendría su fundamento en la reprogramación epigenética/metabólica de ciertas células inmunitarias innatas (como monocitos y macrófagos) y supondría una mejora de la respuesta innata frente a agentes microbianos. En los últimos años, se ha investigado sobre la existencia de ciertos agentes (p.ej. BCG) que pueden inducir resistencia tras un primer estímulo frente a microorganismos heterólogos (e incluso células tumorales) siendo la inmunidad entrenada uno de los mecanismos propuestos de este proceso. El grupo de investigación UCM Vigilancia Sanitaria tiene una línea de investigación para evaluar el impacto que las micobacterias, como agentes inmunomoduladores de la inmunidad entrenada, pueden tener en la respuesta a patógenos heterólogos, procesos oncológicos y procesos frente a bacterias multirresistentes. En este artículo exploraremos los conceptos y bases de la inmunidad entrenada, así como la relación entre esta y las micobacterias, con especial énfasis en su aplicación en veterinaria y la potencial aplicación de la BCG en la lucha contra SARS-CoV-2.

**PALABRAS CLAVE:** Inmunidad innata, inmunidad entrenada, *Mycobacterium*, BCG.

#### ABSTRACT

Once again, evidence has shown that even the most established dogmas can be questioned: the duality of innate immunity/no-immunological memory and acquired immunity/immunological memory has been challenged in recent years by revealing the existence of certain memory traits in the innate response. For this reason, a new concept has emerged in the immunology field: trained immunity. This immune response would be based on the epigenetic/metabolic reprogramming of certain innate immune cells (such as monocytes and macrophages) and would imply an improvement in the innate response to microbial agents. In recent years, there has been speculation about the existence of certain agents (e.g. BCG) that can induce resistance upon re-stimulation against heterologous microorganisms (and even tumor cells), being trained immunity proposed as one of the possible mechanisms of this process. The UCM Health Surveillance research group has a line of research to evaluate the impact that mycobacteria, as immunomodulatory agents of trained immunity, can have on the response to heterologous pathogens, oncological processes and processes against multidrug-resistant bacteria. In this article we will explore the concepts and bases of trained immunity, as well as the relationship between it and mycobacteria, with special emphasis on its application in veterinary medicine and the potential application of BCG in the fight against SARS-CoV-2.

**KEYWORDS:** Innate immunity, trained immunity, *Mycobacterium*, BCG.

---

<sup>1</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET-UCM. 28040-Madrid, España

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. 28040-Madrid, España.

<sup>3</sup> Unidad de Inmunología Microbiana, Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) Madrid, España.

<sup>4</sup> Real Academia de Doctores de España, España.

## 1. CONCEPTOS Y BASES DE LA INMUNIDAD ENTRENADA

---

Tradicionalmente, se ha considerado que un vertebrado tiene dos principales estrategias de defensa frente a la infección por patógenos: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La inmunidad adaptativa se basa en la expansión clonal y la diferenciación de células de memoria, que pueden reconocer un patógeno y reaccionar al mismo a través de linfocitos T y B con memoria para actuar de una manera más rápida y eficaz en infecciones posteriores. Por el contrario, la inmunidad innata requiere un menor tiempo de reacción, pero se considera menos específica ya que se basa en mecanismos de defensa generales, es decir, mecanismos cuyo funcionamiento es el mismo independientemente del número de exposiciones previas al mismo estímulo. Algunos ejemplos de los variados integrantes del sistema inmunitario innato son la saliva, las mucosas, el sistema del complemento o diferentes poblaciones celulares como macrófagos, monocitos y células NK. El conocimiento de la existencia de la respuesta inmune innata se remonta, como mínimo, a las observaciones de Ilya Mechnikov (premio Nobel en 1908) si bien su interés se ha visto eclipsado por los grandes descubrimientos en el campo de la inmunidad adaptativa hasta hace dos décadas. El papel de la inmunidad innata reside, entre otros aspectos, en su capacidad para limitar el establecimiento del agente infeccioso en las primeras etapas de infección, así como en su papel modulador de la respuesta inmune adaptativa protectora. En este punto, es importante recordar que la respuesta innata es anterior y concomitante a la respuesta inmune adaptativa. Ambas respuestas están orientadas al reconocimiento de lo propio y lo ajeno pero el grado de especificidad y los mecanismos de reconocimiento son muy diferentes. Como anteriormente se ha comentado, tradicionalmente se ha considerado que una segunda exposición con el agente infeccioso tiene la misma magnitud y características que la primera en el caso de la respuesta inmune innata (y al contrario que la respuesta adaptativa). Sin embargo, desde hace poco más de 10 años se han descrito una serie de cambios epigenéticos observados en células del sistema inmune innato que parecen dotar de rasgos de “memoria inmunológica” a la respuesta innata. Esto ha motivado la emergencia de un nuevo concepto en el campo de la inmunología: la inmunidad entrenada. Este término fue propuesto por Netea *et al.* en 2011 y ha supuesto una revolución en el campo de la inmunología abriendo nuevas líneas de investigación, algunas de las cuales abordamos en esta revisión.

Se asocia el desarrollo de una inmunidad entrenada con cambios a nivel epigenético, remodelación de la cromatina molecular/modificaciones a nivel de histona [p.ej. incremento de la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) a nivel del cromosoma], modificaciones metabólicas (p.ej. reorganización del metabolismo de la glucosa) en monocitos y macrófagos maduros (Arts *et al.*, 2016, Kleinnijenhuis *et al.*, 2012) y modificaciones en vías de señalización. Por lo tanto, los cambios en el metabolismo celular influyen en la

reprogramación epigenética de las células inmunitarias innatas y ello a su vez influye en la producción de citocinas y especies reactivas de oxígeno. El primer estímulo podría inducir la reprogramación funcional dentro de las células inmunitarias innatas que mantienen estas células en un estado funcional "listas para reaccionar" durante períodos de tiempo prolongados. La reprogramación conlleva, entre otras consecuencias, un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  ante estímulos secundarios. Todo ello, capacita a estas células del sistema innato para poder responder de una manera más eficaz frente a ciertos agentes microbianos después de una primera exposición.

Algunos estudios han sugerido que poblaciones como neutrófilos (Moorlag *et al.*, 2020), células madre hematopoyéticas (HSPCs) de la médula ósea (Kauffman *et al.*, 2018), células mieloides (Bekkering *et al.*, 2021) o células dendríticas (Hole *et al.*, 2019) pueden jugar un papel en la inmunidad entrenada (revisado por Brueggerman *et al.*, 2022). Algunos autores implican la actividad de micro-ARNs y ARNs no codificantes largos en la reprogramación epigenética en unas células inmunes entrenadas (revisado por Angulo and Angulo, 2022).

Uno de los aspectos que han suscitado más interés en el estudio de la inmunidad entrenada es conocer si se puede modular, es decir, si existen moléculas o agentes que puedan inducir (activar o disminuir) este tipo de respuesta. Si echamos la vista atrás, encontramos que ya en 1964, MacKanness observó que la infección con algunas bacterias se traducía en un cierto nivel de resistencia cruzada frente a patógenos heterólogos (MacKanness, 1964). Desde entonces, son muchos los investigadores que han especulado sobre el papel que el  $\beta$ -glucano, la BCG, el LPS -endotoxina-, la quitina o la flagelina puedan jugar en la inducción de una protección "general" mediante la reprogramación de las células inmunitarias innatas (Kleinnijenhuis *et al.*, 2012, Kleinnijenhuis *et al.*, 2014, Netea *et al.*, 2016). Recientemente, Cao *et al.* han desarrollado una base de datos sobre genes relacionados con la inmunidad entrenada (TRID, *trained immunity database*) (Cao *et al.*, 2021).

La mayoría de los estudios sobre inmunidad entrenada (observacionales o experimentales, *in vivo* o *ex vivo*) se han desarrollado en modelo de ratón o de humanos. Por ejemplo, Ciarlo *et al.* demostraron que los ratones inoculados con el glucano zymosan o levaduras inactivadas de la especie *Candida albicans* mostraban una protección de amplio espectro frente a la infección por *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Citrobacter rodentium* y *Pseudomonas aeruginosa* (Ciarlo *et al.*, 2020).

A excepción del ratón como modelo experimental para medicina humana, la inmunidad entrenada y su aplicación en la prevención de enfermedades infecciosas en veterinaria han sido poco exploradas. Las diferencias especie-específicas del sistema inmune innato o el metabolismo dificultan trasladar directamente todos los avances en el conocimiento de la inmunidad entrenada en ratones y humanos a otras especies animales (Byrne *et al.*, 2020).

No obstante, se ha observado en diferentes especies animales como ciertos agentes o moléculas son capaces de inducir una estimulación de una inmunidad frente a agentes heterólogos. Hay que partir de la base de que la mayoría de los estudios no se han diseñado específicamente para evaluar la inmunidad entrenada en animales domésticos, aunque su valor es también manifiesto (Angulo y Angulo, 2022). En el caso de rumiantes, diferentes autores han demostrado que la capacidad de agentes como micobacterias o levaduras para estimular la respuesta inmune innata tanto *in vitro* (Juste *et al.*, 2016; Guerra-Maupome *et al.*, 2019) como *in vivo* (Angulo *et al.*, 2020; Bastos *et al.*, 2022). En concreto, el  $\beta$ -glucano ha demostrado ser un agente con amplios beneficios para la salud en cerdos (revisado por Byrne *et al.*, 2020) aunque su efecto frente a *Streptococcus suis* no resultó exitoso (Dritz *et al.*, 1995). Igualmente, se ha sugerido que las micobacterias como Bacillus Calmette-Guérin (BCG) pueden tener un efecto sobre la inmunidad en cerdos (Jensen *et al.*, 2019) sin parecer dicha actividad asociada a una acción de la BCG sobre los neutrófilos (Coe *et al.*, 1992). El papel de otras micobacterias diferentes a la BCG sobre la inmunidad entrenada en cerdos también ha sido explorado (Vaz-Rodrigues *et al.*, 2022). Terminando con los mamíferos, no se pueden olvidar trabajos como los de Paris *et al.* en perros donde observaron la posibilidad de inducir inmunidad entrenada en macrófagos caninos tras su estimulación con  $\beta$ -glucano e, incluso, el efecto potenciador de este compuesto en la inmunogenicidad de la vacuna contra la rabia (Paris *et al.*, 2020a, Paris *et al.*, 2020b). Respecto a no mamíferos, en concreto, las aves de corral, hay aún menos estudios publicados y además los resultados son controvertidos como ocurre con el  $\beta$ -glucano en la estimulación de una protección inespecífica en diferentes etapas productivas (revisado por Byrne *et al.*, 2020). Dos trabajos recientes (Verwoolde *et al.*, 2020; Verwoolde *et al.*, 2021) ponen de manifiesto aspectos de una inmunidad entrenada en aves llevando a cabo estudios *in vitro* entrenando monocitos con  $\beta$ -glucano y/o IL-4. En el extremo contrario encontramos los peces, donde la inmunidad inespecífica ha sido objeto de una amplia investigación tanto en los animales en etapas larvales (Zhang *et al.*, 2019) como en adultos en diferentes especies [p.ej. carpa (*Cyprinus carpio*) (Petit *et al.*, 2019), pez cebra (Juste *et al.*, 2022) y rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Librán-Pérez *et al.*, 2018)]. Esta protección también se ha estudiado en crustáceos (*Procambarus clarkii*) (Ren *et al.*, 2023).

El potencial impacto de la inmunidad entrenada en la salud global no se limita al ámbito de las enfermedades infecciosas, también se ha explorado en campos como los procesos oncológicos (ver más adelante) y aquellos causados por bacterias multirresistentes. Respecto a este último punto, Gu *et al.* observaron que la inoculación intranasal de *Acinetobacter baumannii* (inactivada) inducía un entrenamiento de macrófagos alveolares que se detectaba, por ejemplo, en un incremento de la producción de TNF- $\alpha$  en modelo ratón traduciéndose no solo en una protección frente a la neumonía causada por *A. baumannii* sino también frente a otras bacterias resistentes a antibióticos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Gu *et al.*, 2021).

Se ha de considerar que la activación de la inmunidad entrenada (y consecuente activación de una respuesta proinflamatoria) puede conllevar consecuencias desfavorables también; así algunos autores (Bekkering *et al.*, 2021, Jeljeli *et al.*, 2019) han sugerido que en ciertas enfermedades cardiovasculares o inflamatorias la inducción de este tipo de respuesta puede producir un impacto negativo en la progresión de la patología.

## 2. MICOBACTERIAS E INMUNIDAD ENTRENADA

---

En el campo de microorganismos o moléculas asociadas a los mismos con capacidad para inducir una respuesta inmune entrenada (revisado en Sánchez-Ramón *et al.*, 2018), se han realizado muchos estudios en micobacterias (bacteria completa o proteínas derivadas).

Las micobacterias pueden actuar como inmunomoduladores de la respuesta inmune innata y mejorar a través de ésta la respuesta adaptativa frente a la vacunación contra diferentes patógenos. Así, se ha evidenciado que tras la estimulación *in vitro* de monocitos con micobacterias, estos manifestaban una mayor respuesta a una posterior exposición frente a microorganismos tanto homólogos como heterólogos a los utilizados en la estimulación (Juste *et al.*, 2016; Netea *et al.*, 2020). En este mismo sentido, se encuentran los experimentos de Jensen *et al.* (2019), en los que se evidenció una respuesta aumentada asociada a inmunidad innata tras el desafío con *Actinobacillus pleuropneimoniae* en cerdos previamente vacunados con *Mycobacterium paratuberculosis* inactivado. Además, otros reguladores de la memoria innata como los ya citados  $\beta$ -glucanos no mejorarían la resistencia a *Streptococcus suis* al ser desafiados posteriormente con este agente (Dritz *et al.*, 1995).

Volviendo a las micobacterias, la BCG, probablemente el agente más estudiado en relación con la inducción de inmunidad entrenada es una vacuna atenuada de *Mycobacterium bovis* [(con más de 14 deleciones genéticas (Brosch *et al.*, 2000)] utilizada en la lucha contra la tuberculosis (TB) desde hace 100 años. Es la única vacuna autorizada contra la TB en humanos. Además, en 2010, la BCG se registró en el Reino Unido para su administración intramuscular en tejonos como medida de control para limitar la propagación de la infección al ganado doméstico (Buddle *et al.*, 2018). Esta vacuna fue obtenida por Albert Calmette y Camille Guérin a partir de una cepa virulenta de *M. bovis* después de 231 pases seriados a lo largo de 13 años (Abate y Hoft, 2014). Después de eso, se distribuyeron cepas derivadas en diferentes partes del mundo, siendo propagadas y mantenidas con diferentes estrategias de cultivo, lo que llevó a la descripción de más de 13 cepas diferentes de BCG (Behr *et al.*, 1999; Ritz *et al.*, 2008). Por lo tanto, la cepa original de BCG y diferentes cepas derivadas sufrieron pases en serie no regulados hasta que se introdujo un sistema de regulación a mediados del siglo XX.

Casi desde los principios de su implementación se observó (especialmente en países de África) que la BCG administrada en niños también tenía un efecto protector frente a agentes heterólogos como malaria (Berendsen *et al.*, 2019), infecciones respiratorias (Stensballe *et al.*, 2005) o lepra (Pönnighaus *et al.*, 1992) que se reflejaba en una reducción de la mortalidad neonatal e infantil (revisado por Aaby *et al.*, 2014). Es precisamente en esta población infantil donde se ha estudiado particularmente la protección inducida por estas micobacterias frente a agentes infecciosos heterólogos. Aunque existe cierto debate (Fine *et al.*, 2012) y algunos autores no han observado estos beneficios (Messina *et al.*, 2021), se ha estudiado el efecto beneficioso que las micobacterias pueden ejercer sobre la respuesta inmune frente a otros patógenos en niños, tal y como recogen diferentes estudios observacionales sobre el impacto de la vacunación con BCG en la mortalidad infantil [revisado en Blok *et al.* (2015)]. Pero este impacto no se limitaría a la población infantil: la protección inducida por BCG se ha observado también en poblaciones de diferente rango de edades en Europa y EE. UU. (Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2020).

Los mecanismos que subyacen tras el efecto inespecífico de la BCG no han sido completamente dilucidados si bien se especula sobre una combinación de factores que afecten a la respuesta innata y a la adaptativa (Trunk *et al.*, 2023). Diferentes estudios han demostrado que esta protección heteróloga está relacionada, en parte, con la inmunidad entrenada inducida por BCG. Uno de los estudios que avalan esta hipótesis es el desarrollado por Kleinnijenhuis *et al.* en el cual observaron que ratones con inmunodeficiencia severa combinada (ausencia de células B y T maduros) que habían sido vacunados con BCG, mostraron mejores índices de supervivencia y una menor carga de patógenos tras un desafío con *Candida albicans* (Kleinnijenhuis *et al.*, 2012). Otra posible razón para explicar esta protección podría estar asociada con la existencia de antígenos que indujeran una protección cruzada en células T frente a otros patógenos. Por ejemplo, Mathurin *et al.* demostraron la existencia de una inmunidad cruzada entre BCG y poxvirus mediada por linfocitos T CD4 en modelo ratón (Mathurin *et al.*, 2009). Además de la respuesta inmune innata, algunos estudios han demostrado que la BCG puede mejorar la respuesta adaptativa mediada por células T, a través de una mejorada respuesta inmune innata al incrementarse los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en monocitos conllevando un aumento de la liberación de IL-1 $\beta$  (Kleinnijenhuis *et al.*, 2014).

Uno de los principales mecanismos de los que depende la inducción de la inmunidad entrenada por BCG está relacionado con el dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2 (NOD2), habiéndose demostrado que los macrófagos deficientes en NOD2 no presentaban modificaciones en la producción de citoquinas a pesar de ser entrenados con BCG (Kleinnijenhuis *et al.*, 2012). La reprogramación epigenética inducida por la BCG se basa en modificaciones de histonas, por ejemplo, un incremento de H3K4me3 que se traduce en una regulación positiva de la expresión de receptores de



reconocimiento de patrones (PRR, *Pattern Recognition Receptor*) que reconocen PAMP (p.ej. receptores de tipo Toll o receptores de tipo NOD) u otro desencadenante que se asocia con promotores de genes de citoquinas proinflamatorias IL-6 o TNF (revisado por Du *et al.*, 2023) o un incremento de H3K27ac en vías de señalización como PI3K/AKT (Fosfoinositol 3-cinasa) (Arts *et al.*, 2018). También se ha asociado con un incremento de la liberación de especies reactivas de oxígeno y un aumento de la capacidad fagocítica tras el contacto con agentes heterólogos (Kaur *et al.*, 2022). Diferentes estudios (Kleinnijenhuis *et al.*, 2012; Brueggeman *et al.*, 2022) han asociado la BCG con una activación de células del sistema inmune para producir IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. También se ha observado que la BCG también induce modificaciones metabólicas (consecuencia de las modificaciones de la cromatina) como es el incremento de la glicólisis o el de la concentración de metabolitos de la glutamina (Arts *et al.*, 2016).

Muchos de los estudios que han evaluado la actividad de la BCG sobre la inmunidad heteróloga inducida se han desarrollado en modelo ratón, evaluando su eficacia frente a bacterias [*Streptococcus pneumoniae* (Kang *et al.*, 2023), parásitos [*Plasmodium* (Clark *et al.*, 1976), *Schistosoma* (Civil *et al.*, 1978)], hongos [*Candida* (van't Wout *et al.*, 1992)] y virus [influenza A (Mukherjee *et al.*, 2017, Kauffmann *et al.*, 2022), virus del herpes simple tipo 2 (Starr *et al.*, 1976)]. Aunque este efecto inductor de la BCG en la protección heteróloga se ha estudiado de manera más limitada en otras especies animales, cabe destacar el estudio de Byrne *et al.* en el que recientemente demostraron la inducción de memoria innata por BCG en monocitos porcinos. Los monocitos fueron cultivados en presencia de BCG y posteriormente reestimulados 5 días después con un agonista microbiano heterólogo para determinar la inducción de memoria innata. El entrenamiento con BCG indujo un estado entrenado en los monocitos porcinos ya que la reestimulación con LPS aumentó la expresión génica y la producción de proteínas de IL-1b y TNF- $\alpha$  (Byrne *et al.*, 2020). También se ha observado en rumiantes que la BCG puede inducir una protección inespecífica en bovino (Contreras *et al.*, 2023), otros autores detectaron monocitos entrenados en bovino tras la inmunización mediante aerosoles (Guerra-Maupome *et al.*, 2019). Barakat *et al.*, si bien no desarrollaron estudios de inmunidad entrenada específicamente, asociaron la vacunación con BCG en ovejas con un aumento de la resistencia a la Fiebre del Valle del Rift (Barakat *et al.* 1981). De manera experimental, el impacto de la BCG en el desarrollo de inmunidad inespecífica no solo se ha observado en individuos homeotermos si no también en especies poiquilotermas como el Halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*) (Kato *et al.*, 2012) o la seriola (*Seriola dumerili*) (Kato *et al.*, 2011).

Como se ha comentado previamente, en humanos se ha estudiado la protección frente a la malaria (Walk *et al.*, 2019). Aunque otros estudios han puesto de manifiesto una ausencia de protección de la BCG frente a diferentes infecciones como influenza A (De Bree *et al.*, 2008) o *Salmonella* enteritis (Howard *et al.*, 1959). Las evidencias más recientes parecen

indicar que variables como la cepa (Shan, 2015) o los ciclos circadianos (de Bree *et al.*, 2020) podrían influir en la inmunidad entrenada inducida por la BCG.

Otro de los efectos de la BCG en el control de infecciones heterólogas se ha observado en el impacto beneficioso que tiene en la reacción inducida por otras vacunas, como la vacuna frente a influenza (Leentjens *et al.*, 2015) o frente al virus respiratorio sincitial (Wang *et al.*, 2023). También se ha descrito que la inoculación con BCG de manera previa a la inmunización, por ejemplo, frente al virus de la fiebre amarilla (vacuna atenuada) o frente a *Leishmania major* (vacuna inactivada) tiene efectos en la respuesta inmune inducida como una reducción de la carga infectiva sin modificación de la respuesta serológica o una mayor producción de NO. (Arts *et al.*, 2018; Soudi *et al.*, 2011). Por último, su uso como vector de expresión para antígenos recombinantes ha sido también explorado (revisado por Covian *et al.*, 2002).

El impacto de la BCG no se limita solo al ámbito de la protección frente a infecciones: en 1959 Old *et al.*, exploraron el efecto antitumoral de la BCG (Old *et al.*, 1959). Desde entonces, la BCG se ha implementado en el tratamiento del cáncer de vejiga (Larsen *et al.*, 2020) y se ha explorado su utilidad para otros tipos de cáncer como el de pulmón (Moreo *et al.*, 2023), el melanoma (Stewart y Levine, 2014) o linfoma (Villumsen *et al.*, 2009). Morra *et al.* observaron un efecto preventivo de la BCG en la reducción del riesgo de leucemia infantil (Morra *et al.*, 2017). Por el contrario, Salmon *et al.* asociaron la vacunación con BCG con un incremento del riesgo de Linfoma de Hodgkin's en individuos menores de 18 años (Salmon *et al.*, 2019) aunque estos mismos autores, tras una revisión sistemática y un metaanálisis sobre el tema, observaron una ausencia de asociación destacando la necesidad de realizar más estudios a este respecto (Salmon *et al.*, 2020).

### 3. BCG EN TIEMPOS DE COVID-19

---

La crisis sanitaria asociada a la pandemia de COVID-19 aceleró el interés por conocer diferentes estrategias de protección frente a patógenos que requieren un abordaje multidisciplinar para su control. El coronavirus SARS-CoV-2 representó un gran desafío a este respecto y el estímulo de la inmunidad entrenada fue una de las alternativas exploradas en la prevención y el tratamiento de su infección (Brueggerman *et al.*, 2022). El potencial impacto de la BCG en la protección frente a COVID-19 ha colmado el interés a este respecto.

Mediante estudios *in silico*, Tomita *et al.* observaron secuencias similares de 9 aminoácidos entre BCG y SARS-CoV-2, planteando la hipótesis de que la BCG podría inducir una respuesta mediada por linfocitos T a través de un reconocimiento cruzado entre ambos antígenos.



Otro estudio en el que se comparó y analizó la similitud de secuencia entre la proteína HSP65 de la cepa BCG y las proteínas espiga (S) y nuclear (N) del SARS-CoV-2 mostró que la secuencia de la proteína HSP65 tiene una alta similitud con la secuencia de las proteínas S y N de SARS-CoV-2. En base a esta similitud podría pensarse que la BCG induciría una respuesta inmune adaptativa cruzada frente a SARS-CoV-2 reduciéndose así la susceptibilidad y la gravedad de la infección por este coronavirus (Finotti, 2021). Para evaluar la protección de la BCG frente a la enfermedad, se llevaron a cabo estudios basados en encuestas poblacionales cuyos resultados sugerían un efecto protector de la BCG frente a la COVID19 revisado por Du *et al.*, 2023 y Brueggerman *et al.*, 2022). El estudio llevado a cabo por Tunk *et al.* indica que, si bien la vacunación con BCG reduce un 44% el riesgo de infecciones respiratorias no tuberculosas, el impacto en la protección frente a COVID-19 no está claro (Trunk *et al.*, 2023) tal y como se ha visto reflejado en un estudio llevado a cabo en trabajadores sanitarios neerlandeses donde se observó la ausencia de efecto de la BCG en la infección por SARS-CoV-2 así como en la severidad y la duración de esta patología (Claus *et al.*, 2023). Unos resultados similares se han obtenido en un estudio llevado a cabo en personal sanitario de Australia, Países Bajos, España, Reino Unido y Brasil, no observándose ningún tipo de efecto de la BCG en la infección (Pittet *et al.*, 2023). Algunos autores han llegado a sugerir que la vacunación con BCG, particularmente en la niñez, podría incrementar el riesgo de padecer COVID-19 (De la Fuente *et al.*, 2021). Para finalizar, hay que destacar que se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos (más de 50, algunos incluso en fases III y IV) para evaluar la eficacia de la vacuna de la BCG frente a SARS-CoV-2 (revisado por: Gong *et al.*, 2021). La aparición de nuevas variantes de este coronavirus ha desafiado la eficacia de algunas de las vacunas (revisado por Zhou *et al.*, 2022) lo que sigue motivando la realización de estudios sobre la utilidad de la BCG como inmunomodulador frente al SARS-CoV-2 (Du *et al.*, 2023).

De los estudios experimentales en ratón (principalmente con el modelo modificado genéticamente, k18-hACE2), de nuevo, se han obtenido resultados contradictorios muy diversos, apreciándose desde un efecto protector por parte de la BCG frente al SARS-CoV-2 (Hilligan *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022) hasta la ausencia de este (Kaufmann *et al.*, 2022). Además, en un estudio experimental reciente de nuestro grupo de investigación (Sánchez-Morales *et al.*, 2024), se observó que, bajo unas condiciones experimentales concretas, la presencia de la BCG se asociaba con una mayor severidad de las lesiones principalmente cerebrales. Las diferencias observadas en diferentes estudios experimentales en este modelo ratón pueden deberse a diferentes variables como, por ejemplo, la variante de SARS-CoV-2 empleada, la cepa de BCG o la vía de administración. Todo ello hace pensar que son necesarios más estudios epidemiológicos y experimentales que permitan clarificar el efecto protector, nulo o perjudicial de este inmunomodulador en la enfermedad.

#### 4. CONCLUSIONES

---

El descubrimiento de la inmunidad entrenada ha evidenciado una facultad omitida de la inmunidad innata dotándola de “memoria” inmunológica. A pesar del indiscutible avance del conocimiento en este campo, quedan muchas incógnitas por dilucidar. Se vislumbra la potencial utilización de nuevas herramientas que permitan modular la inmunidad entrenada activándola, por ejemplo, para el control las enfermedades infecciosas o inhibiéndola, como en el caso de enfermedades autoinmunes de base inflamatoria. No obstante, es aún temprano para implementar esta práctica. En el campo de la veterinaria, uno de los potenciales intereses de la inmunidad entrenada reside en el diseño de vacunas que puedan inducir una protección de amplio espectro (Sánchez-Ramón *et al.*, 2018). Todo ello vendría motivado no solo a través de una protección mediada por la inmunidad innata entrenada, si no también mejorando la que otorga la inmunidad adaptativa. No hay que olvidar que ambas, innata y adaptativa, actúan en concordancia e interdependencia tanto en la respuesta del hospedador frente a la infección como en mantener la homeostasis del organismo. Por último, el diseño de vacunas donde la inmunidad innata y adaptativa estén involucradas podría dar lugar a nuevas vacunas efectivas frente a patógenos donde las vacunas tradicionales han fracasado.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

---

El presente trabajo se ha realizado gracias a los fondos y conocimientos generados en el marco del proyecto PID2020-112966RB-I00 financiado por MCIN/AEI /10.13039/501100011033.

#### 6. REFERENCIAS

---

1. AABY, P., KOLLMANN, T. & BENN, C. Nonspecific effects of neonatal and infant vaccination: public-health, immunological and conceptual challenges. *Nat Immunol* 15, 895–899 (2014). <https://doi.org/10.1038/ni.2961>
2. ABATE G, HOFT DF. Variations between bacillus Calmette-Guérin strains: lessons from tuberculosis prevention. *Eur Urol.* 2014 Oct;66(4):692-3. doi: 10.1016/j.eururo.2014.06.006.

3. ANGULO M, REYES-BECERRIL M, CEPEDA-PALACIOS R, ANGULO C. Oral administration of *Debaryomyces hansenii* CBS8339- $\beta$ -glucan induces trained immunity in newborn goats. *Dev Comp Immunol*. 2020 Apr;105:103597. doi: 10.1016/j.dci.2019.103597.
4. ANGULO M, ANGULO C. Trained immunity against diseases in domestic animals. *Acta Trop*. 2022 May;229:106361. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106361.
5. ARTS RJ, JOOSTEN LA, NETEA MG. Immunometabolic circuits in trained immunity. *Semin Immunol*. 2016 Oct;28(5):425-430. doi: 10.1016/j.smim.2016.09.002.
6. ARTS RJW, CARVALHO A, LA ROCCA C, PALMA C, RODRIGUES F, SILVESTRE R, KLEINNIJENHUIS J, LACHMANDAS E, GONÇALVES LG, BELINHA A, CUNHA C, OOSTING M, JOOSTEN LAB, MATARESE G, VAN CREVEL R, NETEA MG. Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep*. 2016 Dec 6;17(10):2562-2571. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.011.
7. ARTS, R.J.; MOORLAG, S.J.; NOVAKOVIC, B.; LI, Y.; WANG, S.-Y.; OOSTING, M.; KUMAR, V.; XAVIER, R.J.; WIJMENGA, C.; JOOSTEN, L.A.; *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
8. BARAKAT A. Preliminary studies on the use of BCG as an immunopotentiating agent against rift valley fever among sheep in Egypt. *Bull Off Int Epiz*. (1981) 93:1387–93.
9. BASTOS RG, ALZAN HF, RATHINASAMY VA, COOKE BM, DELLAGOSTIN OA, BARLETTA RG, SUAREZ CE. Harnessing Mycobacterium bovis BCG Trained Immunity to Control Human and Bovine Babesiosis. *Vaccines (Basel)*. 2022 Jan 14;10(1):123. doi: 10.3390/vaccines10010123.
10. BEHR MA, WILSON MA, GILL WP, SALAMON H, SCHOOLNIK GK, RANE S, SMALL PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*. 1999 May 28;284(5419):1520-3. doi: 10.1126/science.284.5419.1520.
11. BEKKERING S, DOMINGUEZ-ANDRES J, JOOSTEN LAB, RIKSEN NP, NETEA MG. Trained Immunity: Reprogramming Innate Immunity in Health and Disease. *Annu Rev Immunol* (2021) 39:667–93. doi: 10.1146/annurevimmunol-102119-073855
12. BERENDSEN ML, VAN GIJZEL SW, SMITS J, *et al* BCG vaccination is associated with reduced malaria prevalence in children under the age of 5 years in sub-Saharan Africa *BMJ Global Health* 2019;4:e001862.
13. BLOK BA, ARTS RJ, VAN CREVEL R, BENN CS, NETEA MG. Trained innate immunity as underlying mechanism for the long-term, nonspecific effects of vaccines. *J Leukoc Biol*. 2015 Sep;98(3):347-56. doi: 10.1189/jlb.5RI0315-096R. Epub 2015 Jul 6. PMID: 26150551.

14. BROSCH R, GORDON SV, PYM A, EIGLMEIER K, GARNIER T, COLE ST. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol.* 2000 May;290(2):143-52. doi: 10.1016/S1438-4221(00)80083-1.
15. BRUEGGEMAN JM, ZHAO J, SCHANK M, YAO ZQ, MOORMAN JP. Trained Immunity: An Overview and the Impact on COVID-19. *Front Immunol.* 2022 Feb 17;13:837524. doi: 10.3389/fimmu.2022.837524.
16. BUDDLE BM, VORDERMEIER HM, CHAMBERS MA, DE KLERK-LORIST LM. Efficacy and Safety of BCG Vaccine for Control of Tuberculosis in Domestic Livestock and Wildlife. *Front Vet Sci.* 2018 Oct 26;5:259. doi: 10.3389/fvets.2018.00259.
17. BYRNE KA, LOVING CL, MCGILL JL. Innate Immunomodulation in Food Animals: Evidence for Trained Immunity? *Front Immunol.* 2020 Jun 5;11:1099. doi: 10.3389/fimmu.2020.01099.
18. BYRNE KA, TUGGLE CK, LOVING CL. Differential induction of innate memory in porcine monocytes by  $\beta$ -glucan or bacillus Calmette-Guerin. *Innate Immun.* 2021 Aug;27(6):448-460. doi: 10.1177/1753425920951607.
19. CAO Y, DONG Q, WANG D, LIU Y, ZHANG P, YU X, NIU C. TIDB: a comprehensive database of trained immunity. *Database (Oxford).* 2021 Jul 9;2021:baab041. doi: 10.1093/database/baab041.
20. CIARLO E, HEINONEN T, THÉROUDE C, ASGARI F, LE ROY D, NETEA MG, ROGER T. Trained Immunity Confers Broad-Spectrum Protection Against Bacterial Infections. *J Infect Dis.* 2020 Nov 9;222(11):1869-1881. doi: 10.1093/infdis/jiz692.
21. CIVIL RH, WARREN KS, MAHMOUD AA. Conditions for bacille Calmette-Guérin-induced resistance to infection with *Schistosoma mansoni* in mice. *J Infect Dis.* 1978 May;137(5):550-5. doi: 10.1093/infdis/137.5.550. PMID: 659914.
22. CLARK IA, ALLISON AC, COX FE. Protection of mice against *Babesia* and *Plasmodium* with BCG. *Nature.* 1976 Jan 29;259(5541):309-11. doi: 10.1038/259309a0.
23. CLAUS J, TEN DOESSCHATE T, GUMBS C, VAN WERKHOVEN CH, VAN DER VAART TW, JANSSEN AB, SMITS G, VAN BINNENDIJK R, VAN DER KLIS F, VAN BAARLE D, PAGANELLI FL, LEAVIS H, VERHAGEN LM, JOOSTEN SA, BONTEN MJM, NETEA MG, VAN DE WIJGERT JHHM; BCG-Corona Study Group. BCG Vaccination of Health Care Workers Does Not Reduce SARS-CoV-2 Infections nor Infection Severity or Duration: a Randomized Placebo-Controlled Trial. *mBio.* 2023 Apr 25;14(2):e0035623. doi: 10.1128/mbio.00356-23.
24. COE NE, FRANK DE, WOOD RL, ROTH JA. Alteration of neutrophil function in BCG-treated and non-treated swine after exposure to *Salmonella typhimurium*. *Vet*

- Immunol Immunopathol. 1992 Jun;33(1-2):37-50. doi: 10.1016/0165-2427(92)90033-m.
25. CONTRERAS C, ALEGRÍA-MORAN R, DUCHENS M, ÁBALOS P, LÓPEZ R AND RETAMAL P (2023) Specific and non-specific effects of Mycobacterium bovis BCG vaccination in dairy calves. *Front. Vet. Sci.* 10:1278329. doi: 10.3389/fvets.2023.1278329
  26. COVIÁN C, FERNÁNDEZ-FIERRO A, RETAMAL-DÍAZ A, DÍAZ FE, VASQUEZ AE, LAY MK, RIEDEL CA, GONZÁLEZ PA, BUENO SM, KALERGIS AM. BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. *Front Immunol.* 2019 Nov 29;10:2806. doi: 10.3389/fimmu.2019.02806.
  27. DE BREE LCJ, MARIJNISSEN RJ, KEL JM, ROSENDAHL HUBER SK, AABY P, BENN CS, WIJNANDS MVW, DIAVATOPOULOS DA, VAN CREVEL R, JOOSTEN LAB, NETEA MG, DULOS J. Bacillus Calmette-Guérin-Induced Trained Immunity Is Not Protective for Experimental Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) Infection in Mice. *Front Immunol.* 2018 Apr 30;9:869. doi: 10.3389/fimmu.2018.00869. Erratum in: *Front Immunol.* 2018 Oct 25;9:2471.
  28. DE BREE LCJ, MOURITS VP, KOEKEN VA, MOORLAG SJ, JANSSEN R, FOLKMAN L, BARRECA D, KRAUSGRUBER T, FIFE-GERNEDL V, NOVAKOVIC B, ARTS RJ, DIJKSTRA H, LEMMERS H, BOCK C, JOOSTEN LA, VAN CREVEL R, BENN CS, NETEA MG. Circadian rhythm influences induction of trained immunity by BCG vaccination. *J Clin Invest.* 2020 Oct 1;130(10):5603-5617. doi: 10.1172/JCI133934.
  29. DE LA FUENTE J, ARMAS O, SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ L, GORTÁZAR C, LUKASHEV AN; COVID-BCG Collaborative Working Group. Citizen science initiative points at childhood BCG vaccination as a risk factor for COVID-19. *Transbound Emerg Dis.* 2021 Nov;68(6):3114-3119. doi: 10.1111/tbed.14097.
  30. DRITZ SS, SHI J, KIELIAN TL, GOODBAND RD, NELSEN JL, TOKACH MD, CHENGAPPA MM, SMITH JE, BLECHA F. Influence of dietary beta-glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to *Streptococcus suis* infection in weanling pigs. *J Anim Sci.* 1995 Nov;73(11):3341-50. doi: 10.2527/1995.73113341x.
  31. DU J, SU Y, WANG R, DONG E, CAO Y, ZHAO W, GONG W. Research progress on specific and non-specific immune effects of BCG and the possibility of BCG protection against COVID-19. *Front Immunol.* 2023 Jan 31;14:1118378. doi: 10.3389/fimmu.2023.1118378.
  32. FINE PE, SMITH PG, EVANS SJ. Non-specific effects of BCG? *J Infect Dis.* 2012 Feb 1;205(3):515; author reply 517-8. doi: 10.1093/infdis/jir760.

33. FINOTTI P. Sequence similarity of HSP65 of Mycobacterium bovis BCG with SARS-CoV-2 spike and nuclear proteins: may it predict an antigen-dependent immune protection of BCG against COVID-19? *Cell Stress Chaperones*. 2022 Jan;27(1):37-43. doi: 10.1007/s12192-021-01244-y.
34. GIAMARELLOS-BOURBOULIS EJ, TSILIKA M, MOORLAG S, ANTONAKOS N, KOTSAKI A, DOMÍNGUEZ-ANDRÉS J, KYRIAZOPOULOU E, GKAVOGIANNI T, ADAMI ME, DAMORAKI G, KOUFARGYRIS P, KARAGEORGOS A, BOLANOU A, KOENEN H, VAN CREVEL R, DROGGITI DI, RENIERIS G, PAPADOPOULOS A, NETEA MG. Activate: Randomized Clinical Trial of BCG Vaccination against Infection in the Elderly. *Cell*. 2020 Oct 15;183(2):315-323.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.051.
35. GONG W, ASPATWAR A, WANG S, PARKKILA S, WU X. COVID-19 pandemic: SARS-CoV-2 specific vaccines and challenges, protection via BCG trained immunity, and clinical trials. *Expert Rev Vaccines*. 2021 Jul;20(7):857-880. doi: 10.1080/14760584.2021.1938550.
36. GU H, ZENG X, PENG L, XIANG C, ZHOU Y, ZHANG X, ZHANG J, WANG N, GUO G, LI Y, LIU K, GU J, ZENG H, ZHUANG Y, LI H, ZHANG J, ZHANG W, ZOU Q, SHI Y. Vaccination induces rapid protection against bacterial pneumonia via training alveolar macrophage in mice. *Elife*. 2021 Sep 20;10:e69951. doi: 10.7554/eLife.69951.
37. GUERRA-MAUPOME M, VANG DX, MCGILL JL. Aerosol vaccination with Bacille Calmette-Guerin induces a trained innate immune phenotype in calves. *PLoS One*. 2019 Feb 22;14(2):e0212751. doi: 10.1371/journal.pone.0212751.
38. HILLIGAN KL, NAMASIVAYAM S, CLANCY CS, O'MARD D, OLAND SD, ROBERTSON SJ, BAKER PJ, CASTRO E, GARZA NL, LAFONT BAP, JOHNSON R, RONCHESE F, MAYER-BARBER KD, BEST SM, SHER A. Intravenous administration of BCG protects mice against lethal SARS-CoV-2 challenge. *J Exp Med*. 2022 Feb 7;219(2):e20211862. doi: 10.1084/jem.20211862.
39. HOLE CR, WAGER CML, CASTRO-LOPEZ N, CAMPUZANO A, CAI H, WOZNIAK KL, et al. Induction of memory-like dendritic cell responses in vivo. *Nat Commun*. (2019) 10:2955. doi: 10.1038/s41467-019-10486-5
40. HOWARD JG, BIOZZI G, HALPERN BN, STIFFEL C, MOUTON D. The effect of Mycobacterium tuberculosis (BCG) infection on the resistance of mice to bacterial endotoxin and Salmonella enteritidis infection. *Br J Exp Pathol*. 1959 Jun;40(3):281-90.
41. JELJELI M, RICCIO LGC, DORIDOT L, CHÊNE C, NICCO C, CHOUZENOUX S, DELETANG Q, ALLANORE Y, KAVIAN N, BATTEUX F. Trained immunity modulates inflammation-



- induced fibrosis. *Nat Commun.* 2019 Dec 11;10(1):5670. doi: 10.1038/s41467-019-13636-x.
42. JENSEN KJ, HANSEN MS, HEEGAARD PMH, BENN CS, JUNGERSEN G. The Effect of Inactivated Mycobacterium Paratuberculosis Vaccine on the Response to a Heterologous Bacterial Challenge in Pigs. *Front Immunol.* 2019 Jul 5;10:1557. doi: 10.3389/fimmu.2019.01557.
  43. JUSTE RA, ALONSO-HEARN M, GARRIDO JM, ABENDAÑO N, SEVILLA IA, GORTAZAR C, DE LA FUENTE J, DOMINGUEZ L. Increased Lytic Efficiency of Bovine Macrophages Trained with Killed Mycobacteria. *PLoS One.* 2016 Nov 7;11(11):e0165607. doi: 10.1371/journal.pone.0165607.
  44. JUSTE RA, FERRERAS-COLINO E, DE LA FUENTE J, DOMÍNGUEZ M, RISALDE MA, DOMÍNGUEZ L, CABEZAS-CRUZ A, GORTÁZAR C. Heat inactivated mycobacteria, alpha-Gal and zebrafish: Insights gained from experiences with two promising trained immunity inductors and a validated animal model. *Immunology.* 2022 Oct;167(2):139-153. doi: 10.1111/imm.13529.
  45. KANG A, YE G, SINGH R, AFKHAMI S, BAVANANTHASIVAM J, LUO X, VASEGHI-SHANJANI M, ALEITHAN F, ZGANIACZ A, JEYANATHAN M, XING Z. Subcutaneous BCG vaccination protects against streptococcal pneumonia via regulating innate immune responses in the lung. *EMBO Mol Med.* 2023 Jul 10;15(7):e17084. doi: 10.15252/emmm.202217084.
  46. KAUFMANN E, SANZ J, DUNN JL, KHAN N, MENDONÇA LE, PACIS A, TZELEPIS F, PERNET E, DUMAINE A, GRENIER JC, MAILHOT-LÉONARD F, AHMED E, BELLE J, BESLA R, MAZER B, KING IL, NIJNIK A, ROBBINS CS, BARREIRO LB, DIVANGAHI M. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell.* 2018 Jan 11;172(1-2):176-190.e19. doi: 10.1016/j.cell.2017.12.031.
  47. KAUFMANN E, KHAN N, TRAN KA, ULNDREAJ A, PERNET E, FONTES G, LUPIEN A, DESMEULES P, MCINTOSH F, ABOW A, MOORLAG SJCFM, DEBISARUN P, MOSSMAN K, BANERJEE A, KARO-ATAR D, SADEGHI M, MUBAREKA S, VINH DC, KING IL, ROBBINS CS, BEHR MA, NETEA MG, JOUBERT P, DIVANGAHI M. BCG vaccination provides protection against IAV but not SARS-CoV-2. *Cell Rep.* 2022 Mar 8;38(10):110502. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110502.
  48. KAUR G, SINGH S, NANDA S, ZAFAR MA, MALIK JA, ARSHI MU, LAMBA T, AGREWALA JN. Fiction and Facts about BCG Imparting Trained Immunity against COVID-19. *Vaccines (Basel).* 2022 Jun 23;10(7):1006. doi: 10.3390/vaccines10071006.

49. KATO G, KATO K, SAITO K, PE Y, KONDO H, AOKI T, HIRONO I. Vaccine efficacy of Mycobacterium bovis BCG against Mycobacterium sp. infection in amberjack *Seriola dumerili*. *Fish Shellfish Immunol.* 2011 Feb;30(2):467-72. doi: 10.1016/j.fsi.2010.11.002.
50. KATO G, KONDO H, AOKI T, HIRONO I. Mycobacterium bovis BCG vaccine induces non-specific immune responses in Japanese flounder against *Nocardia seriolae*. *Fish Shellfish Immunol.* 2012 Aug;33(2):243-50. doi: 10.1016/j.fsi.2012.05.002.
51. KLEINNIJENHUIS J, QUINTIN J, PREIJERS F, JOOSTEN LA, IFRIM DC, SAEED S, JACOBS C, VAN LOENHOUT J, DE JONG D, STUNNENBERG HG, XAVIER RJ, VAN DER MEER JW, VAN CREVEL R, NETEA MG. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Oct 23;109(43):17537-42. doi: 10.1073/pnas.1202870109.
52. KLEINNIJENHUIS J, QUINTIN J, PREIJERS F, BENN CS, JOOSTEN LA, JACOBS C, VAN LOENHOUT J, XAVIER RJ, AABY P, VAN DER MEER JW, VAN CREVEL R, NETEA MG. Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous Th1/Th17 responses and innate trained immunity. *J Innate Immun.* 2014;6(2):152-8. doi: 10.1159/000355628.
53. LARSEN ES, JOENSEN UN, POULSEN AM, GOLETTI D, Johansen Is. Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for bladder cancer: a review of immunological aspects, clinical effects and BCG infections. *APMIS.* 2020 Feb;128(2):92-103. doi: 10.1111/apm.13011.
54. LEENTJENS J, KOX M, STOKMAN R, GERRETSEN J, DIAVATOPOULOS DA, VAN CREVEL R, RIMMELZWAAN GF, PICKKERS P, NETEA MG. BCG Vaccination Enhances the Immunogenicity of Subsequent Influenza Vaccination in Healthy Volunteers: A Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study. *J Infect Dis.* 2015 Dec 15;212(12):1930-8. doi: 10.1093/infdis/jiv332.
55. LIBRÁN-PÉREZ M, COSTA MM, FIGUERAS A, NOVOA B.  $\beta$ -glucan administration induces metabolic changes and differential survival rates after bacterial or viral infection in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2018 Nov;82:173-182. doi: 10.1016/j.fsi.2018.08.005.
56. MACKANESS GB. The Immunological Basis Of Acquired Cellular Resistance. *J Exp Med.* 1964 Jul 1;120(1):105-20. doi: 10.1084/jem.120.1.105.
57. MATHURIN KS, MARTENS GW, KORNFELD H, WELSH RM. CD4 T-cell-mediated heterologous immunity between mycobacteria and poxviruses. *J Virol.* 2009 Apr;83(8):3528-39. doi: 10.1128/JVI.02393-08.
58. MESSINA, N.L.; PITTET, L.F.; GARDINER, K.; FREYNE, B.; FRANCIS, K.L.; ZUFFEREY, C.; ABRUZZO, V.; MORRISON, C.; ALLEN, K.J.; FLANAGAN, K.L.; *et al.* Neonatal Bacille

- Calmette-Guérin Vaccination and Infections in the First Year of Life: The MIS BAIR Randomized Controlled Trial. *J. Infect. Dis.* 2021, 224, 1115–1127.
59. MOORLAG SJCFM, RODRIGUEZ-ROSALES YA, GILLARD J, FANUCCHI S, THEUNISSEN K, NOVAKOVIC B, DE BONT CM, NEGISHI Y, FOK ET, KALAFATI L, VERGINIS P, MOURITS VP, KOEKEN VACM, DE BREE LCJ, PRUIJN GJM, FENWICK C, VAN CREVEL R, JOOSTEN LAB, JOOSTEN I, KOENEN H, MHLANGA MM, DIAVATOPOULOS DA, CHAVAKIS T, NETEA MG. BCG Vaccination Induces Long-Term Functional Reprogramming of Human Neutrophils. *Cell Rep.* 2020 Nov 17;33(7):108387. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108387.
60. MOREO E, JARIT-CABANILLAS A, ROBLES-VERA I, URANGA S, GUERRERO C, GÓMEZ AB, MATA-MARTÍNEZ P, MINUTE L, ARAUJO-VOCES M, FELGUERES MJ, ESTESO G, URANGA-MURILLO I, ARIAS M, PARDO J, MARTÍN C, VALÉS-GÓMEZ M, DEL FRESNO C, SANCHO D, AGUILÓ N. Intravenous administration of BCG in mice promotes natural killer and T cell-mediated antitumor immunity in the lung. *Nat Commun.* 2023 Oct 4;14(1):6090. doi: 10.1038/s41467-023-41768-8.
61. MORRA ME, KIEN ND, ELMARAEZY A, ABDELAZIZ OAM, ELSAYED AL, HALHOULI O, MONTASR AM, VU TL, HO C, FOLY AS, PHI AP, ABDULLAH WM, MIKHAIL M, MILNE E, HIRAYAMA K, HUY NT. Early vaccination protects against childhood leukemia: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2017 Nov 22;7(1):15986. doi: 10.1038/s41598-017-16067-0.
62. MUKHERJEE S, SUBRAMANIAM R, CHEN H, SMITH A, KESHAVA S, SHAMS H. Boosting efferocytosis in alveolar space using BCG vaccine to protect host against influenza pneumonia. *PLoS One.* 2017 Jul 7;12(7):e0180143. doi: 10.1371/journal.pone.0180143.
63. NETEA MG, JOOSTEN LA, LATZ E, MILLS KH, NATOLI G, STUNNENBERG HG, O'NEILL LA, XAVIER RJ. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science.* 2016 Apr 22;352(6284):aaf1098. doi: 10.1126/science.aaf1098.
64. NETEA MG, DOMÍNGUEZ-ANDRÉS J, BARREIRO LB, CHAVAKIS T, DIVANGAHI M, FUCHS E, JOOSTEN LAB, VAN DER MEER JWM, MHLANGA MM, MULDER WJM, RIKSEN NP, SCHLITZER A, SCHULTZE JL, STABELL BENN C, SUN JC, XAVIER RJ, LATZ E. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2020 Jun;20(6):375-388. doi: 10.1038/s41577-020-0285-6.
65. OLD LJ, CLARKE DA, BENACERRAF B (1959) Effect of Bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature* 184(Suppl:291-2.
66. PARIS, S., CHAPAT, L., MARTIN-CAGNON, N., DURAND, P.Y., PINEY, L., CARIOU, C., DE LUCA, K., 2020a.  $\beta$ -glucan as trained immunity-based adjuvants for rabies vaccines in dogs. *Front. Immunol.* 11 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.564497>.

67. PARIS, S., CHAPAT, L., PASIN, M., LAMBIEL, M., SHARROCK, T.E., SHUKLA, R., DE LUCA, K., 2020b.  $\beta$ -glucan-induced trained immunity in dogs. *Front. Immunol.* 11 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.566893>.
68. PETIT J, EMBREGTS CWE, FORLENZA M, WIEGERTJES GF. Evidence of Trained Immunity in a Fish: Conserved Features in Carp Macrophages. *J Immunol.* 2019 Jul 1;203(1):216-224. doi: 10.4049/jimmunol.1900137.
69. PITTET LF, MESSINA NL, ORSINI F, MOORE CL, ABRUZZO V, BARRY S, BONNICI R, BONTEN M, CAMPBELL J, CRODA J, DALCOLMO M, GARDINER K, GELL G, GERMANO S, GOMES-SILVA A, GOODALL C, GWEE A, JAMIESON T, JARDIM B, KOLLMANN TR, LACERDA MVG, LEE KJ, LUCAS M, LYNN DJ, MANNING L, MARSHALL HS, MCDONALD E, MUNNS CF, NICHOLSON S, O'CONNELL A, DE OLIVEIRA RD, PERLEN S, PERRETT KP, PRAT-AYMERICH C, RICHMOND PC, RODRIGUEZ-BAÑO J, DOS SANTOS G, DA SILVA PV, TEO JW, VILLANUEVA P, WARRIS A, WOOD NJ, DAVIDSON A, CURTIS N; BRACE TRIAL CONSORTIUM GROUP. Randomized Trial of BCG Vaccine to Protect against Covid-19 in Health Care Workers. *N Engl J Med.* 2023 Apr 27;388(17):1582-1596. doi: 10.1056/NEJMoa2212616.
70. PÖNNIGHAUS JM, FINE PE, STERNE JA, WILSON RJ, MSOSA E, GRUER PJ, JENKINS PA, LUCAS SB, LIOMBA NG, BLISS L. Efficacy of BCG vaccine against leprosy and tuberculosis in northern Malawi. *Lancet.* 1992 Mar 14;339(8794):636-9. doi: 10.1016/0140-6736(92)90794-4.
71. REN X, LIU X, ZHU X, XIONG L, BAI X. Trained immunity can improve the disease resistance of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Fish Shellfish Immunol.* 2023 Jan;132:108468. doi: 10.1016/j.fsi.2022.108468.
72. RITZ N, HANEKOM WA, ROBINS-BROWNE R, BRITTON WJ, CURTIS N. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. *FEMS Microbiol Rev.* 2008 Aug;32(5):821-41. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00118.x.
73. SALMON C, CONUS F, PARENT MÉ, BENEDETTI A, ROUSSEAU MC. Association between Bacillus Calmette-Guérin vaccination and lymphoma: a population-based birth cohort study. *J Intern Med.* 2019 Nov;286(5):583-595. doi: 10.1111/joim.12965.
74. SALMON C, CONUS F, PARENT MÉ, BENEDETTI A, ROUSSEAU MC. Association between Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination and lymphoma risk: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol.* 2020 Apr;65:101696. doi: 10.1016/j.canep.2020.101696.
75. SÁNCHEZ-RAMÓN S, CONEJERO L, NETEA MG, SANCHO D, PALOMARES Ó, SUBIZA JL. Trained Immunity-Based Vaccines: A New Paradigm for the Development of Broad-

- Spectrum Anti-infectious Formulations. *Front Immunol.* 2018 Dec 17;9:2936. doi: 10.3389/fimmu.2018.02936.
76. SOUDI, S.; HOSSEINI, A.Z.; HASHEMI, S.M. Co-administration of rectal BCG and autoclaved *Leishmania major* induce protection in susceptible BALB/c mice. *Parasite Immunol.* 2011, 33, 561–571.
77. STARR SE, VISINTINE AM, TOMEH MO, NAHMIA AJ. Effects of immunostimulants on resistance of newborn mice to herpes simplex type 2 infection. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1976 May;152(1):57-60. doi: 10.3181/00379727-152-39327.
78. STENSBALLE LG, NANTE E, JENSEN IP, KOFOED PE, POULSEN A, JENSEN H, NEWPORT M, MARCHANT A, AABY P. Acute lower respiratory tract infections and respiratory syncytial virus in infants in Guinea-Bissau: a beneficial effect of BCG vaccination for girls community based case-control study. *Vaccine.* 2005 Jan 26;23(10):1251-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.09.006.
79. STEWART JH 4TH, LEVINE EA. Role of bacillus Calmette-Guérin in the treatment of advanced melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011 Nov;11(11):1671-6. doi: 10.1586/era.11.163.
80. TOMITA Y, SATO R, IKEDA T, SAKAGAMI T. BCG vaccine may generate cross-reactive T cells against SARS-CoV-2: In silico analyses and a hypothesis. *Vaccine.* 2020 Sep 22;38(41):6352-6356. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.08.045.
81. TRUNK, G.; DAVIDOVIC, M.; BOHLIUS, J. Non-Specific Effects of Bacillus Calmette-Guérin: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Vaccines* 2023, 11, 121. <https://doi.org/10.3390/vaccines11010121>
82. VAN 'T WOUT JW, POELL R, VAN FURTH R. The role of BCG/PPD-activated macrophages in resistance against systemic candidiasis in mice. *Scand J Immunol.* 1992 Nov;36(5):713-9. doi: 10.1111/j.1365-3083.1992.tb03132.x.
83. VAZ-RODRIGUES R, FERRERAS-COLINO E, UGARTE-RUÍZ M, PESCIAROLI M, THOMAS J, GARCÍA-SECO T, SEVILLA IA, PÉREZ-SANCHO M, MATEO R, DOMÍNGUEZ L, GORTAZAR C, RISALDE MA. Nonspecific protection of heat-inactivated *Mycobacterium bovis* against *Salmonella Choleraesuis* infection in pigs. *Vet Res.* 2022 Apr 18;53(1):31. doi: 10.1186/s13567-022-01047-8.
84. VERWOOLDE, M.B., VAN DEN BIGGELAAR, R.H., VAN BAAL, J., JANSEN, C.A., LAMMERS, A., 2020. Training of primary chicken monocytes results in enhanced pro-inflammatory responses. *Vet. Sci.* 7 (3), 115. <https://doi.org/10.3390/vetsci7030115>.
85. VERWOOLDE, M.B., VAN BAAL, J., JANSEN, C.A., GRAAT, E.A., LAMOT, D.M., LAMMERS, A., VAN ECK, L., 2021b. Transgenerational effects of innate immune activation in broiler breeders on growth performance and immune responsiveness. *Poult. Sci.* 100 (11), 101413 <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101413>.

86. VILLUMSEN M, SØRUP S, JESS T, RAVN H, RELANDER T, BAKER JL, BENN CS, SØRENSEN TI, AABY P, ROTH A. Risk of lymphoma and leukaemia after bacille Calmette-Guérin and smallpox vaccination: a Danish case-cohort study. *Vaccine*. 2009 Nov 16;27(49):6950-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.08.103.
87. WALK J, DE BREE LCJ, GRAUMANS W, STOTER R, VAN GEMERT GJ, VAN DE VEGTEBOLMER M, TEELLEN K, HERMSEN CC, ARTS RJW, BEHET MC, KERAMATI F, MOORLAG SJCFM, YANG ASP, VAN CREVEL R, AABY P, DE MAST Q, VAN DER VEN AJAM, STABELL BENN C, NETEA MG, SAUERWEIN RW. Outcomes of controlled human malaria infection after BCG vaccination. *Nat Commun*. 2019 Feb 20;10(1):874. doi: 10.1038/s41467-019-08659-3.
88. WANG Y, GE F, WANG J, LI H, ZHENG B, LI W, CHEN S, ZHENG X, DENG Y, WANG Y, ZENG R. Mycobacterium bovis BCG Given at Birth Followed by Inactivated Respiratory Syncytial Virus Vaccine Prevents Vaccine-Enhanced Disease by Promoting Trained Macrophages and Resident Memory T Cells. *J Virol*. 2023 Mar 30;97(3):e0176422. doi: 10.1128/jvi.01764-22.
89. ZHANG Z, CHI H, DALMO RA. Trained Innate Immunity of Fish Is a Viable Approach in Larval Aquaculture. *Front Immunol*. 2019 Jan 25;10:42. doi: 10.3389/fimmu.2019.00042.
90. ZHANG BZ, SHUAI H, GONG HR, HU JC, YAN B, YUEN TT, HU YF, YOON C, WANG XL, HOU Y, LIN X, HUANG X, LI R, AU-YEUNG YM, LI W, HU B, CHAI Y, YUE M, CAI JP, LING GS, HUNG IF, YUEN KY, CHAN JF, HUANG JD, CHU H. Bacillus Calmette-Guérin-induced trained immunity protects against SARS-CoV-2 challenge in K18-hACE2 mice. *JCI Insight*. 2022 Jun 8;7(11):e157393. doi: 10.1172/jci.insight.157393.
91. ZHOU Z, ZHU Y, CHU M. Role of COVID-19 Vaccines in SARS-CoV-2 Variants. *Front Immunol*. 2022 May 20;13:898192. doi: 10.3389/fimmu.2022.898192.