UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

KEINI BUOSI

IMPACTO DA VACINA BACILO CALMETTE-GUERIN (BCG) EM PACIENTES CONVALESCENTES DA COVID-19

IMPACT OF BACILLUS CALMETTE-GUERIN VACCINE (BCG) IN CONVALESCENT PATIENTS FROM COVID-19

CAMPINAS

2024

KEINI BUOSI

IMPACTO DA VACINA BACILO CALMETTE-GUERIN (BCG) EM PACIENTES CONVALESCENTES DA COVID-19

IMPACT OF BACILLUS CALMETTE-GUERIN VACCINE (BCG) IN CONVALESCENT PATIENTS FROM COVID-19

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

ORIENTADOR: PROF. DR. LEONARDO OLIVEIRA REIS

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA KEINI BUOSI, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. LEONARDO OLIVEIRA REIS.

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8402

B889i

Buosi, Keini, 1989-
Impacto da vacina Bacilo Calmette-Guerin (bcg) em pacientes convalescentes da Covid-19 / Keini Buosi. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador(es): Leonardo Oliveira Reis.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ageusia. 2. BCG. 3. COVID-19. 4. Enzima de conversão de angiotensina 2. 5. Anticorpos neutralizantes. 6. Imunoglobulina G. 7. SARS-CoV-2. I. Reis, Leonardo Oliveira, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Impact of Bacillus Calmette-Guerin vaccine (bcg) in convalescent patients from Covid-19
Palavras-chave em inglês:
Ageusia
BCG
COVID-19
Angiotensin-converting enzyme 2
Antibodies, Neutralizing
Immunoglobulin G
SARS-CoV-2
Área de concentração: Ciências Médicas
Titulação: Doutora em Ciências
Banca examinadora:
Leonardo Oliveira Reis [Orientador]
Mario José Abdalla Saad
Jose Antonio Rocha Gontijo
Rodolfo Borges dos Reis
João Luiz Amaro
Data de defesa: 02-10-2024
Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-8470-5571
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/1737457259003766

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

KEINI BUOSI

ORIENTADOR: PROF. DR. LEONARDO OLIVEIRA REIS

MEMBROS TITULARES:

1. **PROF. DR. LEONARDO OLIVEIRA REIS**
2. **PROF. DR. MÁRIO JOSÉ ABDALLA SAAD**
3. **PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO ROCHA GONTIJO**
4. **DR. RODOLFO BORGES DOS REIS**
5. **DR. JOÃO LUIZ AMARO**

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 02/10/2024

AGRADECIMENTOS

A minha família, especialmente ao meu marido Ricardo e filho Kaleo que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado, obrigada pela paciência com minha ausência e por me acompanharem em tudo sempre, sem vocês tudo seria mais difícil.

Ao meu orientador Leonardo Oliveira Reis que sempre acreditou no meu potencial, me deu autonomia e mostrou várias possibilidades para eu me desenvolver profissionalmente.

Aos Profs. Drs. Alessandro, Lício, Mario, e tantos outros que me deram a possibilidade de trabalhar em seus laboratórios e dividiram um pouco do seu vasto conhecimento comigo. A cada professor que aceitou participar dessa banca nesse dia.

Gostaria de agradecer também, cada aluno e cada funcionário que me auxiliou nos laboratórios, foram muitas pessoas a passarem e me deixar um pouco do seu conhecimento nesse longo trajeto. Em especial à colega de grupo Franciele, e às profissionais Joseane, Aline e Natália que me acolheram em seus laboratórios e me auxiliaram em parte dos experimentos, isso não teria sido possível sem a experiência de vocês e empatia em me ajudar.

Aos técnicos do Núcleo de cirurgia experimental que sempre estiveram de prontidão para me auxiliar no que fosse preciso.

À secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelo apoio e auxílio durante esse período.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A doença do Coronavírus (COVID-19) causou impactos mundiais iniciados no ano de 2019. É sabido que a vacina do Bacilo Calmette-Guérin (BCG) pode gerar proteção cruzada contra doenças virais em adultos e crianças, este estudo objetivou avaliar a resposta do BCG em adultos convalescentes da COVID-19. Duplo cego, randomizado, multicêntrico, prospectivo e de fase III, esse estudo foi realizado no Cecom (Centro de Saúde da Comunidade) e no Hospital Municipal de Paulínia. Foram incluídos 378 pacientes adultos convalescentes da COVID-19. A vacina BCG ou placebo foi realizada após a coleta de sangue na admissão pela via intradérmica em dose única, a evolução clínica foi caracterizada através dos questionários de admissão e acompanhamento. Uma proporção maior de pacientes vacinados com BCG se recuperaram mais rápido de anosmia e ageusia em relação aos vacinados com placebo (anosmia: 83,1% vs. 68,7%, p = 0,043; ageusia: 81,2% vs. 63,4% , p = 0,032), BCG também evitou o aparecimento de ageusia em pacientes que não relataram esse sintoma na admissão: 7 de 113 (6,2%) receptores de BCG e 19 de 126 (15,1%) placebos, p = 0,036. Em 39 pacientes, a resposta humoral anti-SARS-CoV-2 foi medida pelo título de imunoglobulina G da proteína N e pela soro neutralização através da interação com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) sugerindo que o plasma de pacientes injetados com BCG podem neutralizar o vírus com menor especificidade; no entanto, os resultados não foram estatisticamente significativos. Com o intuito de entender melhor o papel do BCG, o plasma de um grupo de 80 pacientes foi utilizado em diferentes concentrações para tratamento de macrófagos (linhagem de monócitos humanos THP-1), com avaliação da citotoxicidade e da expressão do gene ECA2 medida por RT-PCR. A vacina BCG oferece proteção cruzada contra COVID-19 com modulação da resposta imune e aumento da expressão de ECA2.

Palavras-chave: Ageusia. BCG. COVID-19. ECA2. Neutralização. IgG. SARSCoV-2.

ABSTRACT

The Coronavirus disease (COVID-19) caused worldwide impacts that began in 2019. It is known that the Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine can generate cross-protection against viral diseases in adults and children. This study aimed to evaluate the response of BCG in adults convalescent from COVID-19. Double blind, randomized, multicenter, prospective and phase III, this study was carried out at Cecom (Community Health Center) and at the Paulínia Municipal Hospital. 378 adult patients convalescent from COVID-19 were included. The BCG or placebo vaccine was administered after blood collection on admission via the intradermal route in a single dose, clinical evolution was characterized through admission and follow-up questionnaires. A greater proportion of patients vaccinated with BCG recovered faster from anosmia and ageusia compared to those vaccinated with placebo (anosmia: 83.1% vs. 68.7%, p = 0.043; ageusia: 81.2% vs. 63, 4%, p = 0.032), BCG also prevented the appearance of ageusia in patients who did not report this symptom on admission: 7 of 113 (6.2%) BCG recipients and 19 of 126 (15.1%) placebos, p = 0.036. In 39 patients, the anti-SARS-CoV-2 humoral response was measured by N protein immunoglobulin G titer and by serum neutralization through interaction with the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor, suggesting that plasma from injected patients with BCG they can neutralize the virus with less specificity; however, the results were not statistically significant. In order to better understand the role of BCG, plasma from a group of 80 patients was used in different concentrations to treat macrophages (THP-1 human monocyte lineage), with evaluation of cytotoxicity and expression of the ACE2 gene measured by RT-PCR. The BCG vaccine offers cross-protection against COVID-19 by modulating the immune response and increasing ACE2 expression.

Keywords: Ageusia. BCG. COVID-19. ECA2. Neutralization. IgG. SARS-CoV-2.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Esquema dos braços do Sistema Renina Angiotensina Clássico (SRA) e anti-SRA.……..……..19

Figura 2 Interface da plataforma Red Cap TM REDCap v5.18.1 (*Vanderbilt University*, EUA)..…….……..27

Figura 3 Fluxograma do monitoramento dos pacientes participantes do projeto. Admissão até 14 dias do início dos sintomas (com diagnóstico positivo para COVID-19 confirmado por teste RT-PCR) o paciente foi admitido no estudo e administrado com a vacina BCG (T0) e submetido a um questionário. A evolução clínica foi acompanhada nos tempos de 7, 14, 21 e 45 dias (T7, T14, T21 e T45) após a vacinação por questionários de acompanhamento.....28

Figura 4 expressão basal de ECA2 diminuiu naqueles que apresentavam anosmia…….……..69

Figura 5 Observamos no grupo BCG a alteração do nível da expressão da ECA2 em pacientes com anosmia…….....70

Figura 6 Gráfico representativo do desequilíbrio causado no SRA no tecido pulmonar através da infecção pelo SARS-CoV-2…….....75

Figura 7 Síntese gráfica da restauração do equilíbrio do SRA, ação da terapia com bloqueador do receptor tipo 1 da angiotensina II (BRA).....76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COVID-19	Corona Virus Disease-19
SARS-Cov-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
SRA	Sistema renina angiotensina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
AT1R	Receptor de angiotensina II tipo 1
AT2R	Receptor de angiotensina II tipo 2
Ang 1-9	Angiotensina 1-9
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
ECA1	Enzima conversora de angiotensina 1
MaSR	Receptor MaS
BRA	Bloqueador do receptor de angiotensina
BCG	*Bacilo Calmette-Guérin*
NK	Natural Killer
IL-1β	Interleucina 1 beta

TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
EUA	Estados Unidos da América
PCR	Reação em cadeia da polimerase
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
FAP	Fundação Ataulpho de Paiva
REDCap	Research Electronic Data Capture
PBS	Tampão salina-fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
RPMI	Roswell Park memorial Institute
SFB	Soro fetal bovino
HRP	Horseradish peroxidase
TMB	Tetrametilbenzidina
PMA	Phorbol 12-myristato 13-acetato
MT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
DNA	Ácido nucléico
RNA	Ácido ribonucléico
GEE	Generalized Estimating Equations
CV	Comorbidades cardiovasculares

IC	Insuficiência cardíaca
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
>	Maior
™	*Trademark*
®	*Registered Trademark*
mg	Miligrama
kg	Quilograma
mL	Mililitro
UFC	Unidades formadoras de colônia
µg	Micrograma
h	Horas
µm	Micrômetro
x	Vezes
L	Litro
mM	Milimolar
ºC	Graus Celsius
rpm	Rotações por minuto
ng	Nanograma
<	Menor
µL	Microlitros
λ	Lambda
cm	Centímetros
=	Igual
+	Sinal de mais

-	Sinal de menos
nm	Nanômetro

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA DE ORIGINALIDADE.....16

1 INTRODUÇÃO.....17

1.1 COVID-19.....17

1.2 MECANISMO DE AÇÃO DO SARS-CoV-2 e SRAA.....18

1.3 BCG.....20

2 OBJETIVOS.....24

2.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS GERAIS.....24

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....25

3 MATERIAIS E MÉTODOS.....26

3.1 PACIENTES E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....26

3.2 VACINAS DE BCG E ADMINISTRAÇÃO.....26

3.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA.....27

3.4 EXTRAÇÃO DE PLASMA E CONSERVAÇÃO DE CÉLULAS.....28

3.5 DETECÇÃO DE PROTEÍNA IgG ANTI-SARS-COV-2 N.....30

3.6 DETECÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES.....30

3.7 CULTURA CELULAR E PCR.....31

3.7.1 Diferenciação celular e tratamento com plasma.....31

3.7.2 Ensaio de viabilidade celular MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide).....31

3.7.3 Quantificação da expressão gênica por qPCR.....32

3.7.4 ECA2.....33

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....34

4 RESULTADOS.....35

4.1 ARTIGO.....35

4.2 RESULTADOS ADICIONAIS.....69

5 DISCUSSÃO.....71

6 CONCLUSÃO.....80

7 REFERÊNCIAS.....81

8 ANEXOS.....89

8.1 ANEXO. 1 CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA.....89

8.2 ANEXO. 2 FORMULÁRIOS DE ADMISSÃO E ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES.....90

8.3 ANEXO. 3 AUTORIZAÇÃO DA EDITORA PARA USO DO ARTIGO.....93

JUSTIFICATIVA DE ORIGINALIDADE

No ano de 2020 foi declarado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a pandemia da COVID-19, iniciou-se a busca por soluções para contenção da doença, vários tratamentos foram testados, medicações novas ou aplicações inovadoras de medicações utilizadas em outras patologias, como é o caso da vacina BCG. Um adendo, países que possuíam a vacina BCG no calendário vacinal como compulsória mostraram menor mortalidade pela COVID-19.

O grupo Uroscience, onde o trabalho em questão foi desenvolvido tinha vasto conhecimento do BCG na área oncológica, principalmente no tratamento do câncer de bexiga não músculo invasivo, associado ao conhecimento prévio apontando o BCG como um possível alvo protetivo, emergiu uma oportunidade, sugeriu-se a aplicação do BCG em pacientes convalescentes da COVID-19 englobando a população em geral, diferentemente de outros estudos que utilizaram o BCG em pacientes saudáveis e direcionado a profissionais da área da saúde, dando-se aí a inovação do trabalho em questão.

1 INTRODUÇÃO

1.1 COVID-19

Em dezembro de 2019, na província de Wuhan, China, (1) teve início a pandemia da COVID-19 (do inglês Corona Virus Disease-19), causada pelo vírus da síndrome respiratória aguda 2 (SARS-CoV-2, do inglês Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). Esta doença já tem acumulado mais de 675 milhões de casos no mundo todo e destes, mais de 37 milhões de casos e 699 mil óbitos foram confirmados apenas no território brasileiro (2), ocasionando grave problema de saúde pública e financeira para o país (3).

O SARS-CoV-2 pertence ao grupo dos B-coronavírus, os quais possuem características estruturais específicas, com um envelope e nucleocapsídeo revestido por fosfolipídios e proteínas, sua transmissão ocorre através de gotículas expelidas por pacientes infectados (4).

Devido ao alto grau de transmissão do vírus, da gravidade dos sintomas e ao grande impacto no campo socioeconômico mundial causado pela pandemia, iniciou uma corrida em busca de informações sobre a nova doença, resultando no desenvolvimento de métodos de diagnósticos (através do teste RT-PCR para detecção do vírus nas vias aéreas e detecção de anticorpos IgG e IgM no soro) além de medidas de prevenção (uso de máscaras, distanciamento/isolamento social, lavagem frequente das mãos e uso de álcool em gel 70%) contra a COVID-19. Quanto ao tratamento da doença, foram investigados a eficácia de fármacos, incluindo pesquisas com a Hidroxicloroquina (5) associada ou não a Azitromicina (6), tratamento com imunoglobulinas (7,8), e por fim o desenvolvimento de diversas vacinas (9).

Diante deste cenário, o desenvolvimento das vacinas contra a COVID-19 ganhou destaque, sendo tal processo considerado o mais rápido da história (10). Entretanto, tal recurso não chegou igualmente a todos os países do mundo, especialmente nos economicamente menos favorecidos como a Etiópia, por

exemplo, que possui vacinas para apenas 20% da sua população e teve como estimativa a conclusão do processo de vacinação somente em 2024, ratificando desta forma uma grande desigualdade social (11).

1.2 MECANISMO DE AÇÃO DO SARS-CoV-2 ASSOCIADO AO SRA

O SARS-CoV-2 utiliza-se do sistema renina angiotensina (SRA) para adentrar ao organismo, após sua entrada, ele utiliza-se da ECA2 (Enzima Conversora de Angiotensina 2) para entrar nas células. Desta forma, após se ligar com a ECA2, o vírus incorpora seu material às células do hospedeiro estimulando uma resposta imune com exacerbada produção de citocinas pró-inflamatórias. As consequências fisiológicas deste processo demonstram desde quadros leves e assintomáticos até quadros muito graves, evoluindo a partir de sintomas leves como febre, fadiga, tosse, dispnéia e mialgia para pneumonia, síndrome respiratória aguda grave, insuficiência cardíaca, sepse, entre outras complicações, até mesmo óbito (4,18,19).

O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) ou somente SRA (sistema renina angiotensina) desempenha um papel central tanto no controle homeostático do sistema cardiovascular e renal quanto na regulação do volume de fluidos e pressão arterial, porém, também exerce efeitos tróficos e patomorfológicos em vários tecidos, incluindo os pulmões, atuando principalmente na microvasculatura e nas células mesenquimais. A manipulação do SRA, tanto seu bloqueio como seu reequilíbrio é o foco de vários protocolos terapêuticos, sendo utilizado em patologias como a hipertensão arterial e suas sequelas cardiovasculares, cardiopatia isquêmica e insuficiência cardíaca (12).

O SRA é dividido em SRA clássico e anti-SRA, ambos consistem em várias reações enzimáticas que ocorrem em cascata. Um dos seus principais produtos é a geração de Angiotensina II (Ang II) no SRA clássico (figura 1, topo). A renina é uma protease liberada pelos rins em sua forma ativa, atua clivando o angiotensinogênio, esse por sua vez é produzido pelo fígado em grandes quantidades, mas também pelo tecido adiposo, levando a formação da Angiotensina I (Ang I), local e sistêmica, que é então hidrolisada pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), produzindo o octapeptídeo Ang II (13).

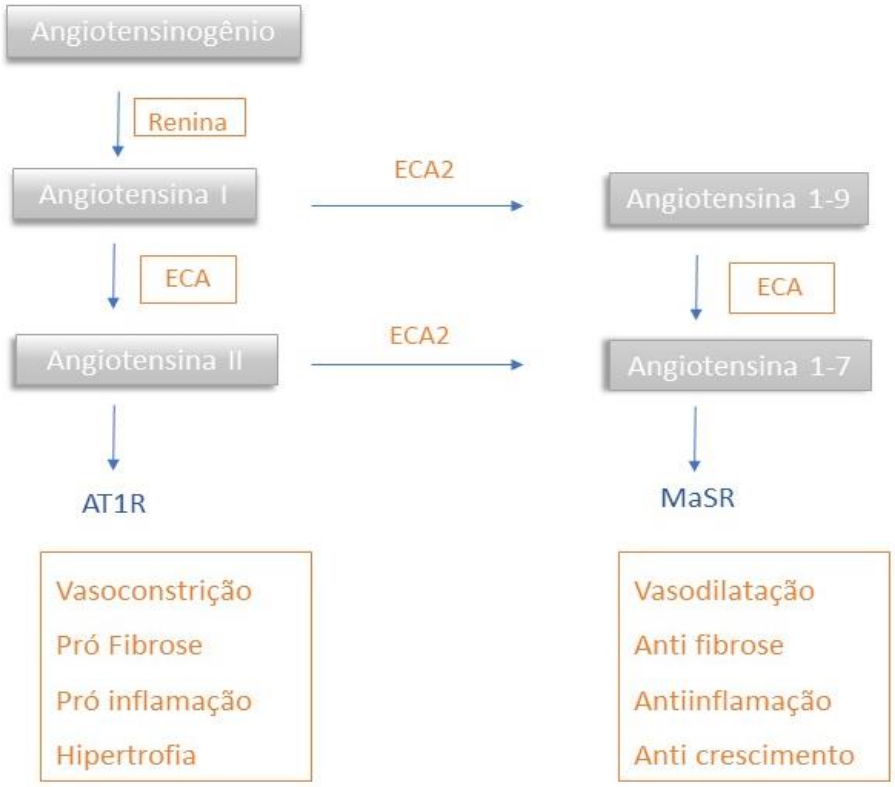

Figura 1. Esquema dos braços do Sistema Renina Angiotensina Clássico (SRA) e anti-SRA.

No endotélio, devido ser um tecido rico em microvasculatura, assim como em todo tecido pulmonar, a ECA é abundantemente expressa. A conversão de Ang I em Ang II acontece rapidamente em toda extensão do leito vascular. Se ocorrer aumento dos níveis de Ang I circulante, como previamente descrito no sobrepeso e obesidade, acarretará superprodução de Ang II (13).

Quanto ativa a Ang II irá se ligar a alguns receptores, o ATR1R e AT2R (receptores de Angiotensina II tipo 1 ou tipo 2), essa ligação costuma levar a vasoconstrição e possível dano vascular se for ativada de forma excessiva (14). Com a descoberta da ECA2 a vinte anos atrás o papel dominante da via clássica do SRA precisou ser melhor elucidado (15), um fator interessante é que a localização da Ang II predita sua atuação/função, como nas adrenais que ela irá

estimular a secreção de aldosterona com consequente reabsorção de sódio e aumento da PA (pressão arterial) (15).

Assim como a ECA a ECA2 é muito semelhante em sua homologia, ela é uma metalocarboxipeptidase, que também se faz presente em tecidos pulmonares, cardíacos, renais e do trato gastrointestinal. As principais ações da ECA2 é a clivagem de Ang I em Ang 1-9, essa por seguinte irá se ligar ao AT2R, e a clivagem de Ang II em Ang 1-7 que irá se ligar ao receptor Mas (MasR) (16) (Fig.1, inferior), porém a ECA2 possui outros peptídeos como substrato, esses são os mais relevantes no contexto atual.

A ECA2 possui uma eficiência 400 vezes maior em clivar Ang II do que Ang I (17). A ECA pode atuar também fazendo a clivagem de Ang 1-9 em Ang 1-7 rapidamente. O composto mais comum originado da Ang II é a Ang 1-7 através da atuação da ECA2, no entanto caso a ECA seja inibida, acarretando a diminuição de Ang II com consequente aumento de Ang I, a ECA2 poderá mudar seu papel de ação passando a produzir mais Ang 1-9, podemos concluir que a ECA2 pode neutralizar efeitos da ECA (16).

Diferenças na modulação da ECA2 e do SRA por ECA1 e pelo receptor tipo 1 da angiotensina II (BRA) são então esperadas. A ECA-1 reduz a atividade da via Ang II-AT1R reduzindo a síntese de Ang II com aumento do substrato Ang I para ECA-2 e uma conversão reduzida de Ang 1–9 para Ang 1–7. A ação da ECA1 pode levar ao aumento específico da atividade de Ang 1-9 no receptor AT2R (18).

Desequilíbrios entre o sistema renina-angiotensina clássico e seu braço oposto foram investigados como motivadores de lesão pulmonar relacionada ao SARS-CoV-2 (19, 20, 21). Em suma, a diminuição da biodisponibilidade da ECA2 e o aumento do nível da atividade da ECA podem aumentar a atividade da Ang II no SRAA levando a exacerbação da inflamação (22).

1.3 BCG

Diante de um possível desequilíbrio no sistema imune causado pelo SARS-CoV-2 e o conhecimento prévio de que a vacina BCG (Bacilo Calmette-

Guérin) atua na imunomodulação esse poderia ser um forte aliado frente a desafios como a COVID-19. A vacina BCG foi inicialmente formulada para combater a Tuberculose, porém, seus exatos mecanismos de ação ainda permanecem parcialmente desconhecidos, sabe-se que estes são caracterizados por uma resposta imune inata mais proeminente em relação à resposta imune adaptativa (23) e confere um fenótipo duradouro após a vacinação (24).

A vacinação com BCG induz inicialmente uma potente resposta imune de padrão celular e a presença intradérmica da micobactéria resulta na interação desta com macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células natural killer (NK) residentes que reconhecem a micobactéria, resultando na produção de citocinas pró inflamatórias como a interleucina 1 beta (IL-1β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) envolvidas na ativação da resposta imune celular inata (24).

A ativação da resposta imune adaptativa se dá pela apresentação de antígenos de BCG pelas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B) havendo a ativação de ambos linfócitos TCD4+ e TCD8+ via produção de IL-6, TNF-α e IL-12. As células TCD4+, uma vez ativadas, secretam IFN-γ, TNF-α e IL-2, o que leva a indução da resposta imune celular padrão Th1. Já as células TCD8+ secretam IFN-γ, granzimas e perforinas, exercendo sua atividade citotóxica. A resposta imune humoral, por sua vez, se desenvolve a partir de 4 a 8 semanas após a vacinação, quando ocorre a produção de anticorpos pelos linfócitos B e posterior indução das células B de memória (24).

É conhecido a complexidade dos mecanismos ativados pela vacinação com o BCG, previamente sabe-se do envolvimento de dois tipos de respostas imunes celulares a primeira através de células T de memória a partir de antígenos específicos (conhecida como imunidade adaptativa clássica) e a segunda que ocorre pelas células imunes inatas (conhecida como “imunidade treinada”) através da reprogramação epigenética (25).

A imunidade treinada é um mecanismo de potencialização da resposta imune inata inespecífica a uma infecção secundária, de forma

independente de linfócitos T e B, sendo mediada por monócitos/macrófagos e células NK (26), podendo levar a melhores desfechos clínicos durante uma infecção viral secundária (27). O BCG possui ainda capacidade de proteção inespecífica contra diversos microrganismos como o agente C. albicans (11) e a Leishmaniose (27), além de ser utilizado por décadas como tratamento padrão ouro contra células neoplásicas de câncer de bexiga não-músculo invasivo (28).

Este efeito de reação cruzada do BCG é devido a denominada “Imunidade Treinada”, na qual ocorre um processo de reprogramação epigenética, transcricional e funcional das células imunes, levando a um aumento da capacidade de produção de citocinas e ativação de suas funções antimicrobianas. Desta forma, o “priming effect” (pré-exposição) de BCG também induz a produção de anticorpos a outros agentes, contra o vírus da gripe H1N1 (25) e da febre amarela (29), podendo assim diminuir a morbidade e mortalidade associada a infecções virais (30).

A COVID-19 é causada por um vírus de RNA de sentido positivo único, semelhante ao de outros agentes pelos quais a BCG já foi comprovadamente capaz de reduzir a gravidade frente as infecções (31). Além disso, em países onde a política de vacinação para BCG é inexistente (como a Itália e EUA), houve estudos populacionais demonstrando maior mortalidade associada à COVID-19 do que em locais com políticas de vacinação com BCG de longa data como a Coreia do Sul e o Japão (32). Somado a estes estudos existem outros em andamento como a investigação da vacinação com BCG em profissionais de saúde como uma possível forma de proteção para COVID-19, estudos que têm associado o histórico de vacinação de BCG com a diminuição da soroprevalência do IgG anti-SARS-CoV-2 e dos sintomas clínicos relacionados a COVID-19 (33, 34) além da prevenção de infecção grave do SARS-CoV-2 em idosos com o uso da BCG (35).

A vacina BCG comumente cursa com eventos adversos esperados e outros atípicos. Dentro dos eventos adversos esperados, o local da aplicação normalmente evolui com mácula e hiperemia, passando por pústula, úlcera e chegando à cicatriz final e permanente com aproximadamente 12 semanas. Tais reações ocorrem em 95% dos vacinados, sendo então um importante indício de vacinação na população (28). Já os eventos adversos atípicos locais são

constituídos de presença de úlcera maior que 1 cm de diâmetro, abcessos subcutâneos, linfadenopatia, cicatriz queloide, reação lupóide e reações disseminadas, como lesões na pele e lesões osteoarticulares, mas os efeitos severos sistêmicos são muito raros e ocorrem apenas em indivíduos extremamente imunossuprimidos (33).

A presença de cicatriz vacinal causada pela BCG pode representar superioridade da resposta imune do indivíduo frente aqueles que não a desenvolveram, sendo relacionado com redução acentuada da mortalidade infantil (28). Assim, já foi visto que bebês menores de 6 meses com cicatriz vacinal de BCG apresentam um perfil de citocinas menos inflamatórias e têm menores taxas de bacteremia do que os que não apresentam cicatriz (34). O desenvolvimento ou não de cicatriz está associado a técnica de vacinação e a cepa BCG utilizada, sendo as cepas do Japão e da Dinamarca associadas a uma resposta imune mais expressiva. Entretanto, ainda não se sabe se a precocidade do aparecimento das lesões e seu tamanho tem associação com desfechos clínicos (28).

Uma vez que a vacina BCG tem segurança reconhecida e baixo custo (30), garantindo desta forma ampla acessibilidade, ela pode ser considerada como uma promissora opção para minimizar o impacto da pandemia da COVID-19 e de futuras pandemias, principalmente em países com menos recurso e disponibilidade para compra de vacinas específicas para tais doenças. Além disso, devido aos estudos que têm demonstrado que o BCG influência na taxa de mortalidade e em determinados sintomas relacionados à COVID-19, é de grande importância que se desenvolvam trabalhos que elucidem o papel do BCG em doenças como a COVID-19.

2 OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS GERAIS

É indiscutível que vivemos uma pandemia com grandes repercussões na saúde pública e na situação econômica do mundo todo. Frente a isso, foi iniciada uma corrida em busca de tratamentos e prevenções para a nova patologia com grandes descobertas em tempo recorde. Entretanto, os tratamentos disponíveis (especialmente as vacinas já desenvolvidas) nem sempre estão ao alcance de países mais carentes (devido a necessidade de investimento econômico para a obtenção das vacinas) e sua eficácia e efeitos colaterais ainda estão sob investigação devido à extrema atualidade do vírus.

Desta forma, uma opção amplamente utilizada de baixo custo e segura como a vacina BCG, seria uma alternativa promissora, uma vez que possui atividade imunomoduladora inespecífica (potencializando a defesa imune contra diversos tipos de microrganismos, incluindo vírus) e por aumentar a eficiência de vacinas antivirais (como a da vacina contra H1N1 e febre amarela).

Ademais, diversos estudos populacionais têm demonstrado sua capacidade de reduzir a taxa de mortalidade frente a agentes virais com características semelhantes as do SARS-CoV-2 , além dos indícios de que países no mundo que possuem política universal de vacinação com BCG apresentaram menor mortalidade frente aos países que não adotavam tal política.

Com base nesta perspectiva e na ausência de conhecimento sobre como esta vacina poderia influenciar no desfecho clínico de pacientes positivos para COVID-19 (os quais podem desenvolver quadros prolongados e sequelas referentes à infecção), este estudo buscou correlacionar a resposta imune humoral e celular resultante da vacinação com BCG com a evolução dos sintomas destes indivíduos a curto e médio prazo.

Como objetivo, avaliar a influência da vacina BCG no quadro clínico de pacientes convalescentes da COVID-19 e utilizar o padrão da resposta imune humoral e celular como ferramenta indicativa da evolução clínica destes indivíduos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Acompanhar a evolução dos sintomas dos pacientes nos períodos de admissão (antes da administração da vacina BCG - tempo 0) e nos tempos 7 (T7), 14 (T14), 21 (T21) e 45 dias (T45) após a vacinação;

b) Analisar e quantificar a resposta imune celular e humoral através da quantificação de IgG, IgM, anticorpos neutralizantes, e gene específico ECA2 através da cultura celular e PCR nos tempos 0 e 45 dias.

c) Avaliar a evolução do quadro clínico dos pacientes associado ao padrão de resposta imune nos pacientes vacinados com BCG.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PACIENTES E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os pacientes investigados neste estudo foram os que receberam a administração de BCG no projeto BATTLE Trial, projeto este multicêntrico, prospectivo, randomizado, duplo-cego, placebo controlado e com desfechos clínicos. Registrado no https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04369794, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), CAAE: 31049320.7.1001.5404 - (ver anexo 1). Foram incluídos pacientes de outubro de 2020 a fevereiro de 2022.

Desta forma, os pacientes participantes deste estudo foram indivíduos com mais de 18 anos de idade, com até 14 dias da confirmação laboratorial específica (através de exame positivo em teste RT-PCR) para COVID-19.

Foram excluídos indivíduos imunossuprimidos de qualquer natureza; gestantes; pacientes com sintomas em período superior a 14 dias do diagnóstico; que não aceitaram participar da pesquisa ou não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), pacientes declarados apenas como suspeitos ou prováveis, e não diagnosticados com exame pré determinado (RT-PCR).

3.2 VACINAS DE BCG E ADMINISTRAÇÃO

Foram utilizadas para a vacinação dos pacientes, duas cepas de BCG, a cepa BCG Brasileira (Fundação Ataulpho de Paiva, FAP) e a cepa BCG Indiana (Laboratório Serum Institute of India Pvt. Ltd), totalizando 378 pacientes participantes.

Os pacientes diagnosticados com COVID-19 receberam a vacina de cepa liofilizada, viva e atenuada de BCG brasileira ou indiana por via intradérmica (ao nível da inserção do músculo deltóide) em volume de 0.1 mL, contendo 2 e 8 x 105 U.F.C em dose única.

3.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA

O acompanhamento da evolução clínica dos pacientes foi realizada através do questionário específico (ver anexo 2) de caracterização e duração de sinais e sintomas respiratórios, cardiovasculares, gastrointestinais, geniturinários, neurológicos e gerais, obtidos de forma remota (T7, T14, T21) e presencial (T45) com utilização do software RedCap (Research Electronic Data Capture- REDCap v5.18.1 -Vanderbilt University, EUA) para monitorar os pacientes (figura 2).

O questionário foi aplicado no momento da admissão (período anterior à administração da vacina de BCG (T0) e posteriormente nos períodos de 7, 14, 21 e 45 dias, pós-vacinação (figura 3). Pacientes que vieram a óbito durante o processo ou não responderam a mais de dois questionários seguidos foram descontinuados do projeto.

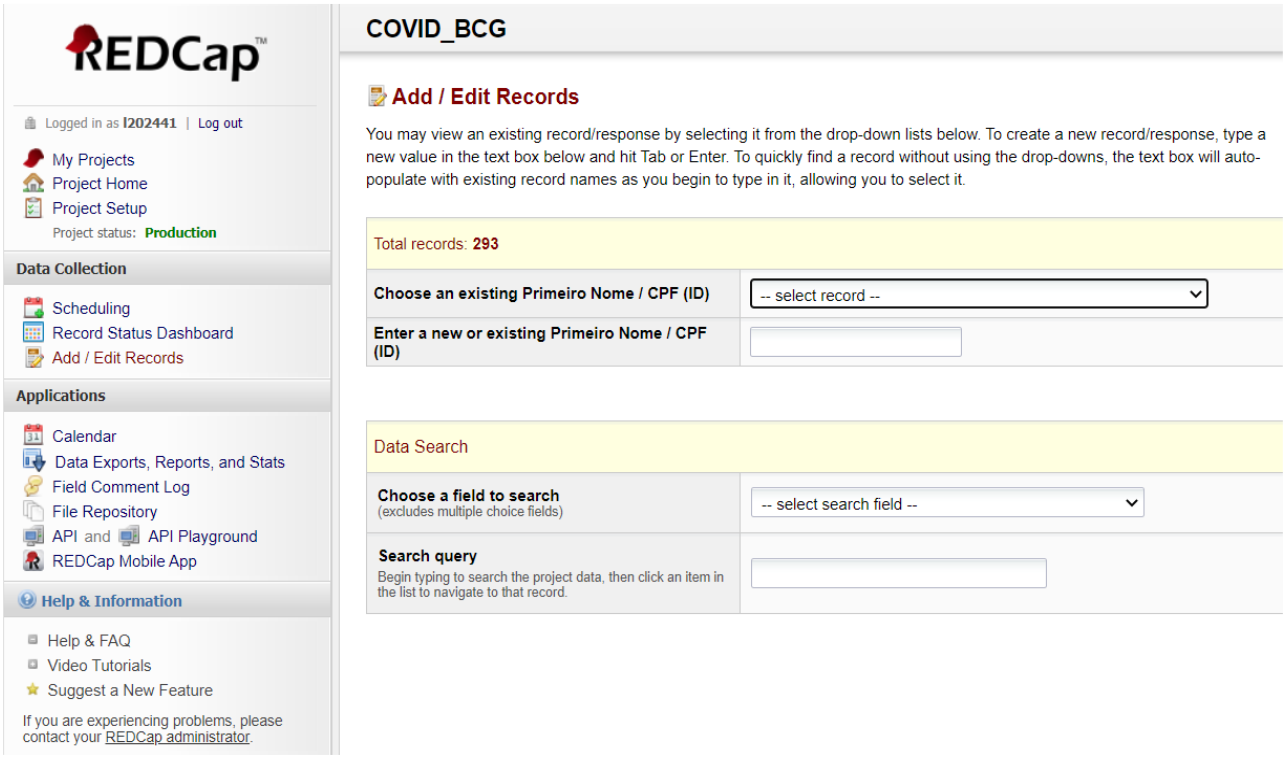

Figura 2: Interface da plataforma Red Cap TM REDCap v5.18.1 (*Vanderbilt University*, EUA)

Figura 3: Fluxograma do monitoramento dos pacientes participantes do projeto. Admissão até 14 dias do início dos sintomas (com diagnóstico positivo para COVID-19 confirmado por teste RT-PCR) o paciente foi admitido no estudo e administrado com a vacina BCG (T0) e submetido a um questionário. A evolução clínica foi acompanhada nos tempos de 7, 14, 21 e 45 dias (T7, T14, T21 e T45) após a vacinação por questionários de acompanhamento.

3.4 EXTRAÇÃO DE PLASMA E CONSERVAÇÃO DE CÉLULAS

A separação de PBMCs (células mononucleares de sangue periférico) foi realizada por gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque®, que consistia em:

1° Verter o conteúdo dos 6 tubos (sangue + EDTA) de 2 ml em apenas 2 tubos;

2° Centrifugar a 1200 rpm por 10 min à 4°C;

3° Coletar o plasma cuidadosamente e aliquotar em criotubos para congelamento;

4° Com a Pipeta Pasteur/Pipeta de 1000 µl, coletar a interface plasma-sangue (2 mL/tubo- aproximadamente);

5° A solução coletada de 4 mL, aproximadamente, transferir para um tubo falcon de 15 mL contendo a mesma quantidade de solução salina de Hanks estéril ou meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) estéril ou PBS (tampão salina-fosfato) 1x (diluição 1:1);

6° Homogeneizar;

7° Colocar esse conteúdo diluído, cuidadosamente, em um tubo falcon de 15 mL previamente contendo 3 mL (ou 2,5mL) de Ficoll-Hypaque®;

8° Centrifugar a 1500 rpm por 30min (tubo) à 22°C (sem freio e aceleração);

9° Coletar a "nuvem" de PBMCs (anel de linfócitos) e colocar em um novo falcon de 15 mL com aproximadamente 5 mL de PBS 1x ou solução salina de Hanks estéril;

10° Centrifugar a 1200 rpm por 10min à 22°C (freio e aceleração = 9);

11° Descartar o sobrenadante por inversão e ressuspender em um volume conhecido de solução salina de Hanks estéril, 1 mL.

12° Contar na câmara de Neubauer;

13° Centrifugar e descartar o sobrenadante;

14° Ressuspender em aproximadamente 600 mL de meio de congelamento (90% SFB + 10% Dimetilsulfóxido);

Obs: Até 20 milhões de células utilizar até 1,5mL de solução SFB e Dimetilsulfóxido (DMSO);

15° Colocar em criotubos para congelamento (anotar o número de células na parte de fora do tubo);

16° Congelamos a 24h no -20°C e depois passamos ao -80°C para armazenamento (armazenamos em conjunto com os plasmas do mesmo dia para facilitar a localização posteriormente);

3.5 DETECÇÃO DE PROTEÍNA IgG ANTI-SARS-COV-2 N

Para detecção de proteína IgG anti-SARS-CoV-2 N e anticorpos neutralizantes, o sangue venoso dos pacientes foi coletado em quatro tubos K2EDTA revestidos com spray BD Vacutainer (12 mL) antes da intervenção (T0) e durante as visitas de acompanhamento (T1, T2, T3 e T4). Após a centrifugação dos tubos o plasma foi separado.

Para a detecção da proteína IgG anti-SARS-CoV-2 N foi realizada a técnica de ELISA de um total de 38 amostras de plasma (grupo placebo n=15, grupo BCG n=23).

A microplaca (96 poços) que continha proteína SARS-CoV-2 N (1 µg/ml) e foi lavada com PBS 0,1% + Tween 20 passou por incubação noturna a 4ºC, após esse procedimento foi realizado o bloqueio inespecífico utilizando PBS + 2%BSA durante 1 hora a 37°C. Realizado então uma nova lavagem, e a diluição das amostras de plasma a 1:100 e acrescentadas a placa na quantidade de 100µl/poço.

Após incubação por 2h a 37ºC, o anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com HRP (horseradish peroxidase) (1:30.000) foi adicionado por 1h a 37ºC. O substrato TMB (tetrametilbenzidina-Thermo Scientific) foi utilizado para detecção de IgG antiviral, e adicionado as amostras, a reação foi interrompida com uso de solução de ácido clorídrico (HCl) após 3 minutos.

O leitor de microplacas foi utilizado a 450 nm para detecção da reação de absorbância. Foram utilizadas amostras de controle positivo (pacientes positivos através do PCR) e controle negativo (amostras de indivíduos saudáveis obtidas antes da pandemia) para validação do ensaio previamente.

3.6 DETECÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES

Para verificar se a vacinação com BCG induzia a produção de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 a longo prazo, amostras de plasma do grupo placebo (n=12) e do grupo BCG (n=11) foram utilizadas para a detecção de IgG nos períodos de T0 e T4. Foi utilizado o kit SARS-CoV-2 Neutralization Antibody ELISA (Elabscience Biotechnology Inc, Estados Unidos)

previamente revestido com ECA2 recombinante humano, para a detecção de anticorpos neutralizantes, seguiu-se todas as orientações do fabricante.

3.7 CULTURA CELULAR E PCR

3.7.1 Diferenciação celular e tratamento com plasma

Células de linhagem de monócitos humanos (TIB-202 – THP-1– ATCC) foram cultivadas conforme as especificações do banco de células do fornecedor. Monócitos THP-1 foram diferenciados em macrófagos com Phorbol 12-myristato 13-acetato (PMA) (P8139 - Sigma Aldrich) 1ug/ml durante 24h seguidas de 4h de descanso em meio sem PMA.

Para investigar os efeitos do plasma de pacientes diagnosticados com COVID-19 que receberam dose de vacina BCG sobre os macrófagos, células de linhagem de monócitos humanos THP-1 (TIB-202 – THP-1– ATCC) foram cultivadas em meio RPMI 1640 4,5 g/L de glicose (A10491-01 Gibco Thermo Fisher Scientific, Dublin, Ireland), com 10% de soro fetal bovino a 37ºC e CO_2 5%.

Quando bem estabelecidos, os monócitos THP-1 foram adicionados a placas de 24 poços (400 mil/poço) e em seguida diferenciados em macrófagos com Phorbol 12-myristato 13-acetato (PMA) (P8139 - Sigma Aldrich) 1ug/ml durante 24h. Em seguida, após passarem por 4h de descanso em meio de cultura sem PMA, os macrófagos THP-1 foram incubados por 4h com plasma dos pacientes diluído na concentração de 2,5% em meio de tratamento, que consiste no meio de cultura indicado pelo banco fornecedor com concentração reduzida de soro fetal bovino (0,5%) (36, 37, 38).

3.7.2 Ensaio de viabilidade celular MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)

Para avaliar a citotoxicidade da incubação com plasma de pacientes com COVID-19 antes e após a vacina de BCG em diferentes concentrações

sobre os macrófagos, as células da linhagem THP-1 foram incubadas nas concentrações 1%, 2,5% e 5% em meio de tratamento. Em seguida, as células foram incubadas em tampão com Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT, M5655, Sigma Aldrich) e glicose por 2h. Em seguida, foram adicionados 300 µL de DMSO (Sigma Aldrich) e o formazan formado à partir da reação mitocondrial das células vivas com o MTT foi quantificado utilizando-se um espectrofotômetro para leitura da absorbância medida em 560 λ. Quanto maior a concentração de células vivas da amostra, maior quantidade de formazan e, consequentemente, maior a absorbância medida na amostra (37).

Esse ensaio foi utilizado como piloto para definição de melhor concentração e tempo de tratamento com o plasma sobre os macrófagos, foi preconizada a concentração de 2,5% com avaliação após 4 horas.

3.7.3 Quantificação da expressão gênica por qPCR

Após o período de tratamento, as células de cada poço das placas consistiram em uma amostra. As amostras foram ressuspensas em Trizol (Invitrogen Corporation, CA, EUA) e tiveram o seu RNA total extraído e quantificado por espectrofotometria. Um total de 1.000 ng de RNA de cada amostra foi transcrito reversamente em DNA complementar em um termociclador utilizando-se o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (no. 4368813; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e de acordo com suas instruções de uso.

Em seguida, a expressão do gene alvo foi medida por PCR real-time. Para tal, 20 ng do DNAc de cada amostra somados a 3 µL de master mix (Taqman Universal nº 4369016), 0,25 µL de água desmineralizada e 0,25 µL de primer, em 7 µL de volume final, foram adicionados em duplicata a uma placa de 96 poços e analisados em um sistema de PCR Real-Time StepOnePlus (Applied Biosystems). A expressão do gene PPIA (Peptidilprolil Isomerase A) um gene de codificação de proteína que possui doenças associadas a ele como a Influenza e o vírus da Hepatite C, de cada amostra foi usada como seu controle endógeno. A expressão gênica é expressa em “Fold Change”, que é obtido

através de cálculos utilizando os valores de C_T, “cycle threshold”, de cada amostra (39, 40).

3.7.4 ECA2

Após o período de tratamento, as células de cada poço das placas consistiram em uma amostra. As amostras foram ressuspensas em Trizol (Invitrogen Corporation, CA, EUA) e tiveram o seu RNA total extraído e quantificado por espectrofotometria. Um total de 1.000ng de RNA de cada amostra foi transcrito reversamente em DNA complementar em um termociclador utilizando-se o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (no. 4368813; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com suas instruções de uso.

Em seguida, a expressão do gene alvo ECA2 (no. 021804.1; Applied Biosystems) foi medida por RT-PCR. Para tal, 20ng do DNAc de cada amostra somados a 3 µL de master mix (Taqman Universal nº 4369016), 0,25 µL de água desmineralizada e 0,25 µL de primer, em 7µL de volume final, foram adicionados em duplicata a uma placa de 96 poços e analisados em um sistema de PCR Real-Time StepOnePlus (Applied Biosystems). A expressão do gene PPIA (no. 021130.3, Applied Biosystems) de cada amostra foi usada como seu controle endógeno. A expressão gênica foi expressa em “Fold Change”, que é obtido através de cálculos utilizando os valores de C_T, “cycle threshold”, de cada amostra (39, 40).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para comparação entre médias, foi usado o teste t de Student e entre proporções o qui-quadrado. O teste exato de Fisher foi utilizado nas comparações entre as variáveis categóricas. Para amostras não paramétricas, a comparação foi feita pelo teste de Mann-Whitney em variáveis contínuas ou o teste de Kruskall-Wallis, para análise de correlação (sintomas versus eventos adversos) foi utilizado o teste de Spearman. P com valores <0,05, foi considerado significativo, significância adotada de 5%.

O perfil das amostras foi descrito da seguinte forma: as variáveis categóricas foram distribuídas em tabelas de frequência, contendo valores de frequência absoluta (n) e seu percentual (%) e para variáveis quantitativas foram utilizadas medidas descritivas (mínimo, mediana, máximo, média e desvio padrão).

O método de Equação de Estimação Generalizada-EEG (Generalized Estimating Equations-GEE) foi utilizado para análise dos parâmetros ao longo do tempo e devido ausência de distribuição normal os dados foram transformados em ranks (postos) para possibilitar a análise.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO

Randomized Clinical Trial of BCG vaccine in convalescent COVID-19 patients

(BATTLE) clinical evolution, adverse events, and humoral immune response

Mehrsa Jalalizadeh[1&], Keini Buosi[1&], Franciele A. V. Dionato[1], Luciana S.B. Dal Col[1], Cristiane F. Giacomelli[1], Karen L. Ferrari[1], Ana Carolina Pagliarone[1], Patrícia A.F. Leme[1], Cristiane L. Maia[1], Reza Yadollahvandmiandoab[1], Quoc-Dien Trinh[2], Kleber G. Franchini[3], Marcio C. Bajgelman[3], Leonardo O. Reis[1,4]*

& co-first authors

[1]School of Medical Sciences, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil. [2] Harvard Medical School**,** Brigham and Women's Center for Surgery and Public Health, Boston, MA, USA. [3] Brazilian Biosciences National Laboratory, LNBio, Brazilian Center for Research in Energy and Materials, CNPEM, Campinas, Brazil. [4]Center for Life Sciences, Pontifical Catholic University of Campinas, PUC- Campinas, SP, Brazil

***Lead contact:**

Leonardo Oliveira Reis, MD, MSc, PhD (orcid: **0000-0003-2092-414X)**

Professor Livre Docente, UroScience

School of Medical Sciences – University of Campinas, UNICAMP

Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126

Cidade Universitária "Zeferino Vaz"

Campinas – São Paulo - Brasil - CEP: 13083-887

Phone/Fax: +55 019 35217481

Email: reisleo.l@gmail.com

Abstract

Background: The bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine may confer cross-protection against viral disease in adults. The study evaluates BCG vaccine cross-protection in convalescent COVID-19 adults.

Method: Design: Multicenter, prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind phase III study (ClinicalTrials.gov: NCT04369794). Setting: University Community Health Center and Municipal Outpatient Center in South America. Patients: 378 COVID-19 convalescent adult patients. Intervention: Single intradermal BCG vaccine (n=183) and placebo (n=195). Measurements: The primary outcome was clinical evolution. Other outcomes included adverse events and humoral immune response up to 6 months.

Results: A significantly higher proportion of BCG patients with anosmia and ageusia recovered at 6-week follow-up visit compared to placebo (anosmia: 83.1% vs. 68.7% healed, p = 0.043, number needed to treat [NNT] = 6.9; ageusia: 81.2% vs. to 63.4% healed, p = 0.032, NNT = 5.6). BCG also prevented the appearance of ageusia in the following weeks, 7 in 113 (6.2%) BCG recipients versus 19 in 126 (15.1%) placebos, p = 0.036, NNT = 11.2. BCG induced no severe or systemic adverse effect. The most common and expected adverse effects were local vaccine lesions, erythema (n=152, 86.4%), and papule (n=111, 63.1%). Anti-SARS-CoV-2 humoral response measured by N protein IgG titer

and seroneutralization by interacting with ACE2 receptor suggest that serum of BCG injected patients may neutralize the virus at lower specificity, however the results were not statistically significant.

Conclusion: BCG vaccine is safe and offers cross-protection against COVID-19, with potential humoral response modulation. Limitation: No severely ill patient included. Outpatient setting

Primary funding source: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, CAPES, Federal Government, Brazil, grant number: 8887.506617/2020-00

Key words: COVID-19; SARS-CoV-2; BCG; Convalescence; Immunomodulation; IgG; Neutralization; Safety;

What is already known

- BCG provides cross-protection against viral diseases including non-COVID-19 pneumonia and urothelial cancer.

What the study adds

- In COVID-19 convalescent adults, BCG rechallenge is safe and offers cross-protection regarding anosmia and ageusia, with potential humoral response modulation.

Introduction

The vaccine made with the bacillus Calmette-Guérin (BCG) was developed over 100 years ago for the prevention of severe forms of tuberculosis in children (1). Half a century later, the BCG's effect in modulating immunity was successfully used to treat non-muscle invasive bladder cancer (2). As part of the Brazilian vaccination schedule, this vaccine is offered at birth (3), after which a small local lesion evolves into a vaccine scar in most cases; however, more severe local and systemic adverse events may occur (4).

Revaccination with BCG regardless of the skin test result is not recommended due to the lack of evidence on its safety but has recently attracted interest due to its off-target effects in adults (5). This vaccine was considered an option at the beginning of the pandemic caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) until the emergence of the specific vaccine (6).

In this trial we first hypothesize that BCG revaccination in COVID-19 convalescent adults is safe: the healing of COVID-19 symptoms are not prolonged and new symptoms do not emerge. Further, we hypothesize that BCG could serve as an adjuvant aiming to minimize damage from an already installed process, improve immune response, and enhance the efficacy of SARS-CoV-2

vaccination. Herein, we describe a phase III placebo-controlled clinical trial of 378 coronavirus-2019 disease (COVID-19) convalescent adults randomized 1:1 to BCG and placebo.

Materials and methods

BATTLE clinical trial design

Multicenter, prospective, randomized (1:1, www.randomization.com), double-blind, parallel-group, placebo-controlled phase III clinical trial, approved by National Commission for Research Ethics (CONEP) under number 31049320.7.1001.5404. All participants signed an informed consent authorizing the use of their data before joining the study. This trial is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT04369794 (COVID-19 BATTLE trial), and is funded by CAPES. The funders had no role in the design, conduct, analysis, and interpretation of the data.

Residents of the metropolitan region of Campinas (State of São Paulo, Brazil) were approached by phone and invited to participate in the study between October 2020 to December 2021. Eligibility criteria were individuals older than 18 years of both genders diagnosed with COVID-19 in the last 14 days by nasopharyngeal RT-qPCR performed at outpatient settings of Community Health Center (CeCom) of the State University of Campinas, UNICAMP (Campinas-SP, Brazil), and Paulínia Municipal Hospital, HMP, (Paulínia-SP, Brazil).

Exclusion criteria included contraindications to BCG administration (pregnant; immunosuppressed - including use of corticosteroids for a period

longer than 3 months; transplanted; cancer; use of immunobiological or chemotherapy), or who did not understand or agree with the informed consent.

The established COVID-19 BATTLE trial protocol determined T0 as the day of randomization and injection application, and T1, T2, T3, and T4 as 7, 14, 21, and more than 40 days after application, respectively. In T0, the patients were screened and those eligible signed the informed consent and completed the established clinical questionnaire (based on Brazilian Ministry of Health 2014 guidelines, BRASIL, 2014) stored in the database software REDCap (v5.18.1-Vanderbilt University, USA) followed by the application of BCG or placebo.

The patient's questionnaire included the history of current disease, symptoms, and history of comorbidities as follows: hypertension (systolic blood pressure > 139 mmHg or diastolic blood pressure > 89 mmHg), obesity (BMI > 30 kg/m²), chronic pulmonary diseases (chronic obstructive pulmonary disease, chronic asthma, interstitial lung diseases, etc.), chronic sinusitis (chronic sinus inflammation > 6 months), respiratory allergies, hemoglobinopathies, autoimmune diseases. Other chronic diseases were classified under "other" and included the following: hypothyroidism, gastritis, depression, arthrosis, dyslipidemia, glaucoma, etc.

Administration of BCG vaccine or placebo

Either 0.1ml of BCG vaccine, Brazilian strain (Ataulpho de Paiva Foundation - FAP, Rio de Janeiro, Brazil) or Russian BCG-I strain (Serum Institute of India PVT LTD, Hadapsar, Pune, India), or 0.1ml of 0.9% saline

solution was intradermic injected in the deltoid area on the arm without BCG scar for better monitoring of the emerging skin reactions.

Allocation and concealment: One investigator prepared the injections and numbered them based on a pre-determined list of randomized numbers. The syringes for placebo and BCG were identical and the investigator who injected them as well as the patient were both blinded to the content.

Symptoms monitoring

Patients were monitored and symptoms were characterized at days zero (randomization), 7, 14, 21, and beyond 40 days. Symptom recovery, as well as new emergency symptoms, were analyzed.

Evaluation of the vaccine dermic reaction and characterization of adverse events

The standardized measurement of the dermal vaccine reaction was performed at T1, T2, T3, and T4, in millimeters (mm) using a ruler or measuring tape and recorded in a photo at a distance of 15-20 cm from the wound.

Vaccination adverse reactions were taken and classified according to the World Health Organization and Epidemiological Surveillance Manual of Post-Vaccination Adverse Events (7).

Detection of IgG anti-SARS-COV-2 N protein

For IgG anti-SARS-CoV-2 N protein and neutralizing antibodies detection, the patients' venous blood was collected in four BD Vacutainer spray-coated K2EDTA tubes (12 mL) before the intervention (T0) and during follow up visits (T1, T2, T3, and T4). The tubes were centrifuged and plasma was separated.

Detection of IgG in plasma samples was verified in 38 consecutive patients (*n=15* for the placebo group and *n=23* for the BCG group) by the ELISA technique for detection of IgG anti-SARS-CoV-2 N protein.

After overnight incubation at 4ºC of the 96-well microplate containing SARS-CoV-2 N protein (1 ug/ml) and washing with PBS 0.1% + Tween 20, the plate was blocked against nonspecific binding with PBS + 2%BSA solution for 1h at 37°C. After washing again, the plasma samples were diluted at 1:100 and added to the plate (100 ul/well). After incubation for 2h at 37ºC, secondary antibody anti-human IgG conjugated with HRP (1:30,000) was added for 1h at 37ºC. For the detection of antiviral IgG, the substrate TMB (tetramethylbenzidine -Thermo Scientific) was added, and after 3 minutes the reaction was stopped with a solution of HCl (1N). The absorbance of the reaction was detected in a microplate reader at 450 nm. The assay was validated using positive (diagnosed patients) and negative (samples obtained from uninfected individuals before the pandemic) control samples.

Detection of neutralizing antibodies

To verify whether vaccination with BCG induces the production of neutralizing anti-SARS-CoV-2 antibodies in the long term, plasma samples from the placebo group (n=12) and the BCG group (n=11) were used for the detection of IgG in the periods of T0 and T4. The detection of neutralizing antibodies was performed using the SARS-CoV-2 Neutralization Antibody ELISA kit (Elabscience Biotechnology Inc, United States), pre-coated with recombinant human ACE2, according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Study sample size: the primary outcome of our study was the evaluation of symptoms resolution on SARS-CoV-2 infected patients. To provide 80% power to detect a symptom difference of 13% between groups using a type-I error of 0.05, 180 patients were required per group.

Wilcoxon rank-sum test (unpaired) was used for continuous variables. Fisher exact test was used for categorical analysis. A p-value of less than 0.05 was considered significant, and each test's significance was discussed based on context. Error bars throughout all figures represent one standard deviation unless otherwise specified. All statistical analyses were performed using R version 4.1.2 (2021-11-01) on RStudio platform version "Ghost Orchid" Release (fc9e2179, 2022-01-04) and using the following packages: tidyverse, ggstatsplot, and janitor.

Results

A total of 2808 patients were approached by phone, of which 381 fulfilled the inclusion criteria and agreed to participate; 3 patients were excluded due to comorbidities (immunocompromised state), leaving 378 for randomization (**Figure 1**). Patients were on average randomized 13 days following the start of their symptoms. BCG vaccine was injected to 183 patients and 195 patients received placebo.

Table 1 shows the characteristics and comorbidities of both groups. There were no significant differences in terms of symptoms at admission (T0). The majority of patients in both groups had BCG scar from childhood vaccination (94.5% of BCG and 93.3% of placebo, p=0.67). In terms of comorbidities, there was a higher proportion of chronic pulmonary diseases in the BCG group (asthma, chronic obstructive pulmonary disease, etc.) compared to the placebo recipients (6.6% vs 2.1%, p = 0.039). There were no other significant differences in comorbidities.

Follow up and major events

Two patients from the BCG group and one from the placebo group were hospitalized in the first week following randomization and one patient (BCG) died from COVID-19 complications. Two patients (both placebo) were hospitalized in week three. No other major event was observed. No tuberculosis or disseminated BCGitis was reported.

Adverse reactions

BCG group demonstrated no systemic adverse effect.

Supplementary Table 1 shows details of local skin reactions following injection.

At the first visit (T1, one week following injection) the vast majority of patients in the BCG group presented with local erythema (n=152, 86.4%), and some presented with papule (n=111, 63.1%) or pustule (n=16, 9.1%). Other reactions such as mild pain at the site of injection (n=12, 6.8%) and local itching (n=24, 13.6%) were also reported. Late skin reactions (ulcer, crust, and scar) became more common in late visits.

There were very few skin reactions in the placebo group: two local erythema, one papule, and one pustule.

Symptom analysis

In the symptom analysis, we endeavored to answer two questions.

First, does BCG cause the development of new symptoms in SARS-CoV-2 infected patients? Second, does BCG impact recovery time of already developed symptoms? For both questions we excluded patients who did not fulfill all their follow-up visits; 8 (4.3%) of the BCG patients and 9 (4.6%) of the placebo patients were excluded.

Acquiring new symptoms after injection

To answer the first question, we assessed the development of new COVID-related symptoms in patients who did not have those symptoms at the time of injection. We counted new cases of each symptom weekly until the last follow-up (>4 weeks, average 6 weeks).

Table 2 shows the development of new symptoms in patients who did not have that symptom on admission. BCG injected patients who did not have ageusia at the time of injection were significantly less likely to develop ageusia in the following weeks (7 new cases in 113 BCG recipients compared to 19 in 126 placebos, p = 0.036, number needed to treat [NNT] = 11.2). A similar pattern was seen in the development of new anosmia cases but the difference was not statistically significant (10 new cases in 100 BCGs compared to 19 in 108 placebos, p = 0.16). There were no statistically significant differences between BCG and placebo in the development of other new symptoms.

Recovery from COVID-19 symptoms after injection

To answer the second question, we analyzed patients based on symptoms at the time of injection and compared the symptom recovery process. This calculation showed a relapsing nature, especially in the third week. In patients who complained of fatigue on admission, we saw a relapse in fatigue during the second week in the BCG group but in the placebo group, we saw relapse in the last visit (>4weeks). In both groups, there were few cases of diarrhea relapse during the second week and sore throat relapse during the third week. There was an increase in the number of headaches, arthralgias, myalgias, nausea, and nasal congestions in the 3rd week in both groups (**Supplementary Table 2**).

We statistically analyzed the percentage of recovered symptoms in each group in the third week. There was no statistically significant difference in the percentage of healed cases between the two groups in any of the symptoms during the third week. For anosmia and ageusia, we also compared the percentage of healed patients at the final visit because these two symptoms tend to heal slowly. A significantly higher number of BCG patients with anosmia and ageusia were healed on the six week follow up visit compared to placebo (anosmia: 83.1% vs. 68.7% healed, p = 0.043, NNT = 6.9; ageusia: 81.2% vs. to 63.4% healed, p = 0.032, NNT = 5.6).

We also calculated the change in the number of symptoms per week, **Figure 2.** The counting of symptoms shows that placebo and BCG overlap almost perfectly in terms of recovering from symptoms except on 2nd follow-up visits (T2, 14 days of randomization) where there is a slightly lower symptom count in the BCG group.

Potentially non-COVID-related symptoms

There were few non-COVID-19 symptoms.

In the first week visit (T1), four patients complained of mild dizziness (placebo), three intense sweating (placebo), one stomach pain (placebo), two back pains (one BCG and one placebo), and one complaint of palpitation (BCG).

At the second week visit (T2): two patients complained of abdominal pains (one BCG one placebo), one general urticaria (placebo), three back pains (one

placebo and two BCG), one photosensitivity (placebo), three dizziness (two placeboes and one BCG).

Third-week visit (T3): two patients complained of dizziness (both placebo), one loss of appetite (placebo), four back pains (two placeboes, two BCG).

Beyond 40 days visit (T4): two patients complained of dizziness (both placebo), two back pains (both BCG), heartburn (BCG), two pleuritic chest pains (both placebo), one dysuria (placebo), and one constipation (placebo).

IgG quantification and neutralization assay

We initially performed an ELISA assay to evaluate antiviral IgG antibodies to SARS CoV-2 N protein, in plasma samples from 24 BCG (vaccinated about 12 days following symptoms onset) and 15 placebo recipients that were collected in follow-up visits at days 0, 7, 14, 21, and beyond 40 days. **Supplementary Table 3** shows the characteristics and comorbidities and **Supplementary Table 4** the symptoms evolution of each group.

There was a borderline difference between the two groups in terms of IgG titer on day 21 (Wilcoxon rank-sum test, $p = 0.078$, **Figure 3-A,3-B**). IgG fold induction was calculated as IgG titer on follow-up visit divided by IgG titer on admission. There was a borderline difference in the IgG fold induction between BCG and placebo groups (all follow-ups compared together: Wilcoxon rank-sum exact test, $p = 0.057$). Daily comparison of the two groups, however, showed no significant difference.

There was no significant difference between the two groups in antiviral IgG levels, nor in neutralization, which was also evaluated in these plasma samples, on admission and beyond 40 days (visit T4) (**Figure 3-C,3-D**). When neutralization was normalized by IgG titer (neutralization divided by IgG titer) it revealed a slight difference between the two groups on T4 (Wilcoxon rank-sum exact test, p = 0.189 and p = 0.053 after removing an outlier sample, **Figure 3-E,3-F**).

Discussion

The emergence of COVID-19 has forced the scientific community into the development of new treatments and the repurposing of old treatments. Previous studies have shown that BCG protects infants and children against mortality due to respiratory viral infections. BCG has also been shown to modulate body immune response against viruses in multiple studies (8-12). Furthermore, since the beginning of our trial, there have been a few retrospective studies showing potential protection against SARS-CoV-2 of old or new BCG vaccination in adults (13).

A retrospective observational study of a diverse cohort of 6679 health care workers in Los Angeles, California, demonstrated that a history of BCG vaccination was associated with reduced COVID-19 related clinical symptoms (p = 0.017), as well as decreased seroprevalence of anti–SARS-CoV-2 IgG with an odds ratio (OR) of 0.76 (95% CI 0.57–0.99; p = 0.048). BCG vaccination history was also associated with decreased SARS-CoV-2 seroprevalence across a diverse cohort of healthcare workers (14).

Using the results of this study in decision-making

In the case of making decisions for an *individual* adult regarding BCG revaccination, our data with an adequate sample size shows that BCG is possibly safe: BCG is unlikely to cause severe adverse effects in a COVID-19 convalescent adult with mild symptoms. However, our data is not representative of severely ill COVID-19 patients or children. Our data is also not sufficient to make large-scale decisions for an entire population; a sample size of 378 is adequate for individual decision-making, however, rare adverse effects only emerge in large sample sizes, though BCG has been successfully used for the last 100 years. Furthermore, mortality in mild to moderate COVID-19 is very low, roughly 1 in 1,300 (15), therefore our study should not be used for mortality analysis.

Understanding the statistical analysis of the article

One of the weaknesses of the article is performing too many statistical tests. The issue of multiple testing is very simple: the more tests are performed the more likely it is to acquire a wrongly-significant p-value by chance. However, our observation on anosmia and ageusia was repeated more than once in different tests, which reduces the probability of it being generated by chance. We also strongly urge the reader to have the issue of multiple testing in mind while poring through the result of the data; one easy way to adjust for this issue is to reduce the significant level of p-value so that the overall alpha error $=1-(1- \alpha)^m$ (with m being the number of tests in the symptomatology analysis -26 tests- and α being the new significant level for p-value) reaches an acceptable number for the reader (usually 0.05). We generally avoid having a clear cut-off for significance of p-value because statistical tests with small sample sizes are

“suggestive of a trend” rather than clearly proving a causality or association. Therefore, the result of each test has to be carefully concluded in its own context.

SARS-CoV-2 mutated from the old Coronavirus family in 2019. One of the specific changes as the result of mutations was the high affinity and direct attack of the virus to protein/receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) that is located in human olfactory neurons. According to previous studies, SARS-CoV-2 enters the body through interacting with ACE2 receptors causing anosmia and ageusia. In our study, we saw connection between BCG vaccination and ACE2 receptors; we observed faster recovery from anosmia and ageusia and lower odds of developing ageusia following BCG immunization. These findings may suggest that BCG reduces the chance of acquiring COVID-19 as corroborated by previous studies (13,16-19). Our study includes a large number of patients presenting with anosmia and/or ageusia at the time of intervention (total of 160 and 130 respectively at T0). This robust sample size showed a statistically significant difference in recovery. Furthermore, these two symptoms tend to be less subjective than other COVID-19 symptoms.

We also explored the in vitro interaction of a recombinant SARS-CoV-2 protein and the synthetic ACE2 receptor, in the presence of BCG’s stimulated plasma. In this assay, we could evaluate the neutralization potential of plasma antibodies to inhibit the interaction between SARS-CoV-2 SPIKE protein and the ACE2 receptor, which mimics a virus infection. We used this neutralization assay as an indicator of homologous anti-SARS-CoV-2 humoral response since the assay was monoclonal.

BCG did not significantly change in absolute antiviral IgG levels nor the absolute neutralization activity in our small sample, however, we saw a trend towards reduction in the neutralization normalized by IgG level (neutralization divided by IgG titer), which may indicate that the serum of BCG injected patients had the same capacity to neutralize the virus but a higher concentration of antibody was needed to achieve the same neutralization percentage. In fact, BCG has been shown by multiple studies to induce “heterologous” and “trained” immunity. Meaning it enhances immune response to pathogens other than BCG (heterologous immunity), moreover, it changes the behavior and trains part of immune response that previously was considered innate (non-specific cellular immunity that lack the ability to learn). Therefore, the antiviral response following BCG injection might not be super-specialized against the target protein because BCG-induced immune changes are non-specific and generally shift towards the cellular response. This reduced specificity can cause a desirable outcome because secondary infections as well as constant mutation of the virus are the main threats to the host in SARS-CoV-2 infection; a small mutation in the virus can turn monoclonal antibodies blind to the virus and if the majority of immune system is occupied with one specific antigen, they might miss a mutated virus and opportunistic bacteria. The heterologous immune training of BCG is considered responsible for reduced mortality from different types of respiratory infections in BCG vaccinated populations (11, 12, 20, 21).

In a 2021 study by Garcia-Beltran et al. (22) neutralization capacity was decreased in severely ill COVID-19 patients, showing that it might be important not to lower such ability. However, it is not clear whether lower neutralization capacity was the *cause* or an *association* of poorer outcome. The sample size for

their assay was relatively small (similar to our sample) and mostly involved hospitalized or critically ill patients compared to our sample of relatively healthy individuals.

Long-term effects and future vaccination adjuvant

Our recruited patients are under surveillance regarding the impact of BCG on eventual post-COVID chronic symptoms and sequels in the long-term follow-up. If in the future, BCG is to be used as an adjunct to vaccination to enhance the effect of the vaccine as previously shown [23-25] and protect against mutated strains, more studies with large sample sizes are needed to first analyze the effect of BCG on different types of vaccine (mRNA versus inactivated virus, etc.), and then proceed with analyzing the improvement of vaccine efficacy and its protection against mutated variations.

Variability in response to BCG

Several studies have shown variable host response to BCG based on strain of the vaccine or previous exposure to previous BCG vaccination and Mycobacterium species. Brazil is a tuberculosis endemic region with 100% expected to be BCG vaccinated at birth. Our study reported previous BCG vaccination in infancy subjectively by visualization of the old scar (94% had the scar). BCG vaccine has proven safe irrespective of PPD skin reactivity or IGRA test, which expands the safety profile of BCG, once previous exposure to Mycobacterium have been used as formal impediment parameters for BCG rechallenge (5, 26).”

Last but not least, BCG is a live vaccine made of different strains around the globe and our study showed no significant difference when comparing Brazilian and Russian BCG-I strains regarding clinical evolution, severe adverse events, humoral immune response, and correlation with BCG vaccine lesion in the BATTLE trial (data not shown).

Conclusions

In COVID-19 convalescent adults, BCG rechallenge is safe and offers cross-protection regarding anosmia and ageusia, with potential humoral response modulation. This strategy may be further explored to evaluate vaccine potentiation for other COVID-19 variants.

Author contributions

MJ, KB, FAVD, LSBDC, CFG, KLF, ACP, PAFL, CLM, and RY collected clinical data and prepared the manuscript; ACP performed experiments; MJ performed statistical analysis of the data; QDT, MCB, KF, LOR manuscript critical revision and intellectual contribution; LOR supervision and funding acquisition. All authors approved the final submitted version.

Acknowledgments

To our volunteer patients.

The BATTLE trial was supported by Community Health Center (CeCom-UNICAMP, Campinas-SP-Brazil) and Paulínia Municipal Hospital (HMP-Paulínia-SP-Brazil), with the special support of the healthcare workers Robson Pereira da Silva and Humberto Alves Ferrari from the aforementioned centers, respectively.

Funding

- Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, CAPES, Federal Government, Brazil, grant number: 88887.506617/2020-00 (Reis LO)

- General Coordination of the National Immunization Program - CGPNI/DEIDT/SVS/MS, Ministry of Health, Brazil, official letter number 465/2020 (Reis LO)

- “National Council for Scientific and Technological Development” – CNPq, Research Productivity, grant number: 304747/2018-1 (Reis LO)

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

Data and material availability

The availability of collected non-personal patient data and material transfer of this study are available after communication and agreement of the lead contact.

References

1. World Health Organization. WHO World Health Organization global tuberculosis program. 20 November 2021. Accessed at www.acpjournals.org/doi/pdf/10.7326/M21-3507 on 20 November 2021.

2. Pettenati C, Ingersoll, MA. Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer. *Nat rev Urol*. 2018;**15**:615–625.

3. Ministério da Saúde. Calendário Nacional de Vacinação. Accessed at https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de-vacinacao on 20 November 2021.

4. Prefeitura de São Paulo. Nota técnica Cidade de São Paulo: Vacinação com a vacina BCG: indicações, contraindicações, eventos adversos e condutas. 19 November 2020. Accessed at https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/nota_tecnica_10_2020_bcg.pdf on 20 november 2021.

5. Bannister S, Sudbury E, Villanueva P, et al. The safety of BCG revaccination: A systematic review. *Vaccine*. 2021;39:2736–2745.

6. Pavan K, Padmapriyadarsini N, Rajamanickam C, et al. Effect of BCG vaccination on proinflammatory responses in elderly individuals. *Sci Adv*. 2021;7:eabg7181.

7. Ministério da Saúde. Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação. 2020. Accessed at https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_epidemiologica_eventos_vacinacao_4ed.pdf on 20 november 2021.

8. Singh DD, Parveen A, Yadav DK. SARS-CoV-2: Emergence of New Variants and Effectiveness of Vaccines. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;**11**.

9. O'Neill LAJ, Netea MG. BCG-induced trained immunity: can it offer protection against COVID-19? *Nat Rev Immunol*. 2020;20:335–337.

10. Leentjens J, Rox M, Stokman R, et al. BCG vaccination enhances the immunogenicity of subsequent influenza vaccination in healthy volunteers: a randomized, placebo-controlled pilot study. *J Infect Dis*. 2015;**212**:1930–1938.

11. Gursel M, Gursel I. Is global BCG vaccination-induced trained immunity relevant to the progression of SARS-CoV-2 pandemic? *Allergy*. 2020;**75**:1815–1819.

12. Fu W, Ho PC, Liu CL. et al. Reconcile the debate over protective effects of BCG vaccine against COVID-19. *Sci Rep*. 2021;**11**:8356.

13. Amirlak L, Haddad R, Hardy JD, et al. Effectiveness of booster BCG vaccination in preventing Covid-19 infection. *Hum Vaccines Immunother*. 2021;**17**:3913–3915.

14. Rivas MN, Ebinger JE, Wu M, et al. BCG vaccination history associates with decreased SARS-CoV-2 seroprevalence across a diverse cohort of health care workers. *J Clin In*

15. Clift AK, Coupland CAC, Keogh RH, et al. Living risk prediction algorithm (QCOVID) for risk of hospital admission and mortality from coronavirus 19 in adults: national derivation and validation cohort study. *BMJ*. 2020;**371**. *vestig*. 2021;**131**.

16. Wrapp D, Wang N, Corbertt KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020;**367**:1260–1263.

17. Pang, NY, Pang AS, Chow VT, et al. Understanding neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and their implications in clinical practice. *Mil Med Res*. 2021; **8**:1–17.

18. Chen M, Shen W, Rowan NR, et al. Elevated ACE-2 expression in the olfactory neuroepithelium: implications for anosmia and upper respiratory SARS-CoV-2 entry and replication. *Eur Respir J*. 2020;**56**.

19. Meng X, Deng Y, Dai Z, et al. COVID-19, and anosmia: A review based on up-to-date knowledge. *Am J of Otolaryngol*. 2020;**41**:102581.

20. Jodaylami MH, Djaïleb A, Ricard P, et al. Cross-reactivity of antibodies from non-hospitalized COVID-19 positive individuals against the native, B. 1.351, B. 1.617. 2, and P. 1 SARS-CoV-2 spike proteins. *Sci Rep*. 2021;**11**:1–11.

21 Gonzalez-Perez M, Sanchez-Tarjuelo R, Shor B, et al. The BCG Vaccine for COVID-19: First Verdict and Future Directions. *Front Immunol*. 2021;**8**:632478.

22 Garcia-Beltran WF, Lam EC, Denis KS, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*. 2021;184:2372–2383.

23 Covián C, Fernández-Fierro A, Retamal-Díaz A, et al. BCG-induced cross-protection and development of trained immunity: implication for vaccine design. *Front Immunol*. 2019;**10**:2806.

24 Arts, RJW, Moorlag SJCFM, Novakovic B, et al. BCG vaccination protects against experimental viral infection in humans through the induction of cytokines associated with trained immunity. *Cell Host Microbe*. 2018;**23**:89–100.

25 Leentjens J, Rox M, Stokman R, et al. BCG vaccination enhances the immunogenicity of subsequent influenza vaccination in healthy volunteers: a randomized, placebo-controlled pilot study. *J Infect Dis*. 2015;**212**:1930–1938.

26 Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 745, and Amendment to Annex 12 of WHO Technical Report Series, No. 771. In WHO Expert Committee on Biological Standardization, Geneva. 2013.

Legends

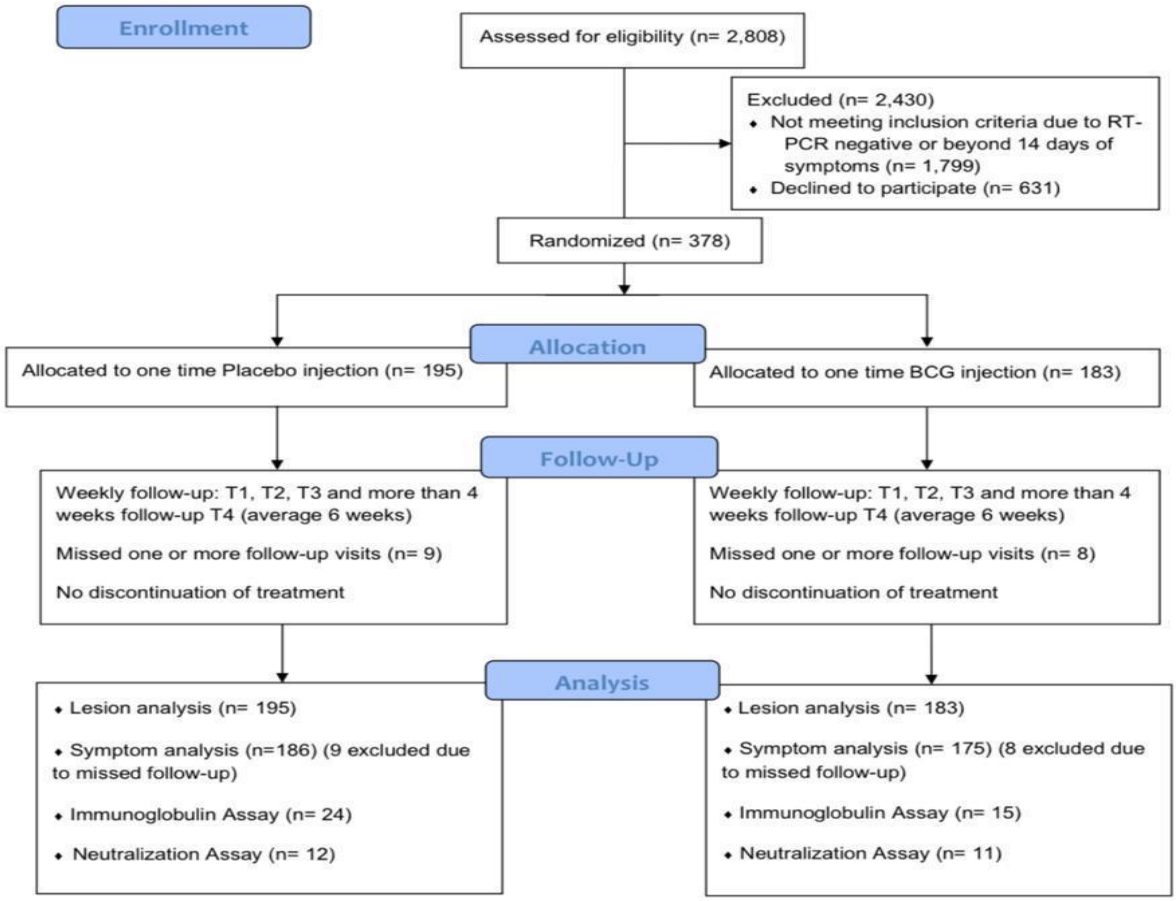

Figure 1: Flowchart of study inclusion, exclusion, and analysis.

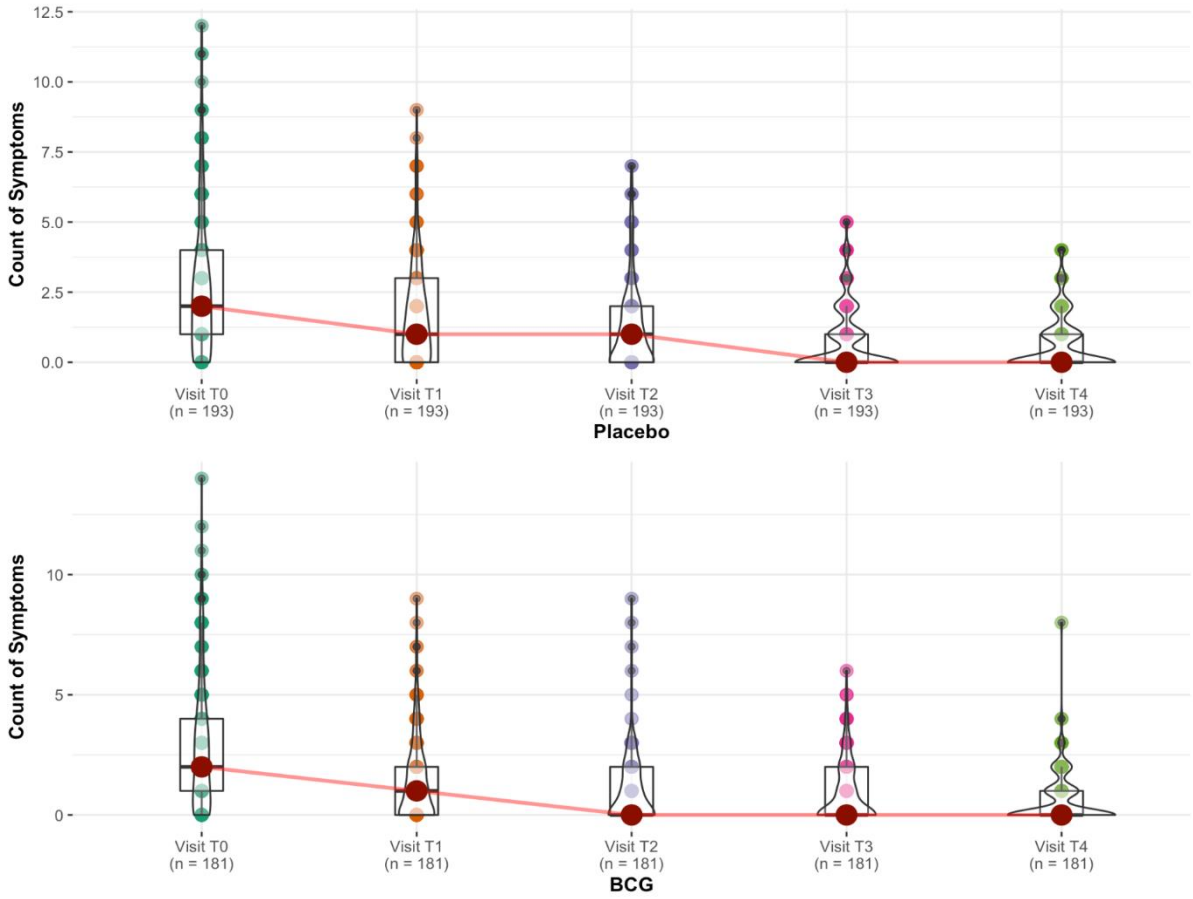

Figure 2: Symptomatic analysis of patients. Each symptom is given a number and the count of symptoms for each patient for each visit is calculated to understand difference in speed of recovery. For example, if patient had headache and fatigue on visit T1 the symptom count on T1 would be 2. The graphs show no significant difference between BCG and placebo on speed of recovery except of visit T2 when BCG recipients are slightly less symptomatic.

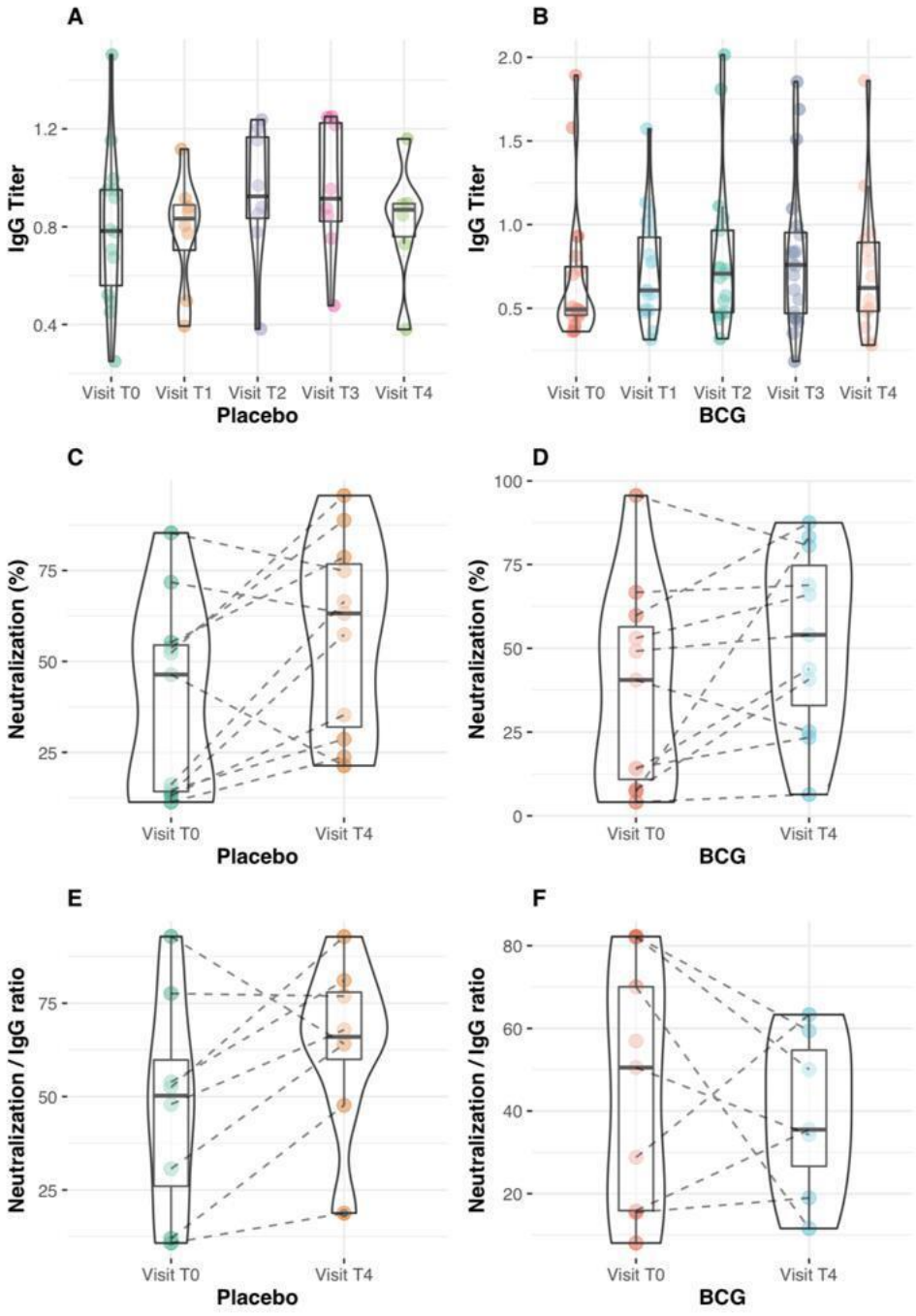

Figure 3: Serology analysis of patients. A and B show anti-SARS-CoV-2 N protein IgG titer on each visit. There was no significant difference on this titer between BCG and placebo. C and D show percent neutralization of recombinant ACE2 receptor assay of patient sera. E and F are neutralization divided by IgG titer showing a slightly lower result at T4 in BCG recipients.

Table 1: the characteristics and comorbidities of BCG and placebo groups.

Demographics and comorbidities	BCG (n=183)	Placebo (n=195)	p-Value
Age **(mean ± SD)**	39.8 ±14.0	41.6 ±12.3	0.12
BMI **(mean ± SD)**	28.3 ± 15.3	28.2 ± 13.8	0.91
Female gender, **no. (%)**	105 (57.4)	123 (63.1)	0.29
Presence of old BCG scar, **no. (%)**	173 (94.5)	182 (93.3)	0.67
Physically active, **no. (%)**	100 (54.6)	98 (50.3)	0.41
Tobacco smoking, **no. (%)**	15 (8.2)	15 (7.7)	1
Regular alcohol drinking, **no. (%)**	80 (43.7)	93 (47.7)	0.47
Diabetes, **no. (%)**	10 (5.5)	12 (6.2)	0.82
Hypertension, **no. (%)**	32 (17.5)	34 (17.4)	1
Obesity, **no. (%)**	15 (8.2)	15 (7.7)	1
Chronic heart disease, **no. (%)**	4 (2.2)	1 (0.5)	0.202
Chronic kidney disease, **no. (%)**	0	0	-
Chronic pulmonary disease, **no. (%)**	12 (6.6)	4 (2.1)	0.039
Chronic sinusitis, **no. (%)**	27 (14.8)	26 (13.3)	0.76
Respiratory allergies, **no. (%)**	24 (13.1)	23 (11.8)	0.75
Hemoglobinopathies, **no. (%)**	1	0	-
Autoimmune disease, **no. (%)**	0	0	-
Others, **no. (%)**	55 (30.1)	64 (32.8)	0.58
Symptomatology			
Days symptomatic on admission **(mean ± SD)**	12.8 ±15.3	13.2 ±12.3	0.27
Cough, **no. (%)**	65 (35.5)	54 (27.7)	0.12
Fever, **no. (%)**	3 (1.6)	1 (0.5)	0.35
Fatigue, **no. (%)**	56 (30.6)	66 (33.8)	0.51
Coryza, **no. (%)**	18 (9.8)	13 (6.7)	0.35
Nasal Congestion, **no. (%)**	29 (15.8)	29 (14.9)	0.88
Myalgia, **no. (%)**	27 (14.8)	34 (17.4)	0.49
Arthralgia, **no. (%)**	16 (8.7)	22 (6.2)	0.43
Headache, **no. (%)**	41 (22.4)	41 (21.0)	0.80
Sore throat, **no. (%)**	21 (11.5)	26 (13.3)	0.64
Anosmia, **no. (%)**	83 (45.5)	87 (44.6)	0.92
Ageusia, **no. (%)**	70 (38.3)	69 (35.4)	0.59
Nausea, **no. (%)**	15 (8.2)	16 (8.2)	1
Vomiting, **no. (%)**	1 (0.5)	1 (0.5)	-
Diarrhea, **no. (%)**	14 (7.7)	10 (5.1)	0.40
Dyspnea, **no. (%)**	24 (13.1)	17 (8.7)	0.19
Asymptomatic, **no.** (%)	38 (20.8)	38 (19.5)	0.80

Note: Wilcoxon rank-sum test with continuity correction. Abbreviations: BCG, Bacillus Calmette-Guérin; BMI, body mass index; no., number; SD, standard deviation.

Table 2: development of new symptoms in patients who did not have that symptom on admission.

Admission (n = patients without the symptom)	1st week new cases	2nd week new cases	3rd week new cases	> 4 weeks new cases	Total new cases	P
Cough						
BCG (n = 118) Placebo (n = 141)	BCG = 12 Placebo = 10	BCG = 7 Placebo = 4	BCG = 3 Placebo = 2	BCG = 3 Placebo = 2	BCG = 25 (21.2%) Placebo = 18 (12.8%)	0.92
Fatigue						
BCG (n = 127) Placebo = 129)	BCG = 14 Placebo = 9	BCG = 3 Placebo = 3	BCG = 3 Placebo = 2	BCG = 6 Placebo = 7	BCG = 26 (20.5%) Placebo = 21 (16.3%)	0.42
Fever						
BCG (n = 173) Placebo = 188)	BCG = 0 Placebo = 2	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 0 Placebo = 2 (1.1%)	-
Coryza						
BCG (n = 165) Placebo = 182)	BCG = 3 Placebo = 6	BCG = 2 Placebo = 2	BCG = 4 Placebo = 1	BCG = 1 Placebo = 2	BCG = 10 (6.1%) Placebo = 11 (6.0%)	1
Nasal Congestion						
BCG (n = 154) Placebo = 166)	BCG = 4 Placebo = 4	BCG = 4 Placebo = 2	BCG = 1 Placebo = 0	BCG = 1 Placebo = 1	BCG = 10 (6.5%) Placebo = 7 (4.2%)	0.46
Myalgia						
BCG (n = 156) Placebo = 161)	BCG = 8 Placebo = 9	BCG = 2 Placebo = 4	BCG = 3 Placebo = 3	BCG = 3 Placebo = 1	BCG = 16 (10.3%) Placebo = 17 (10.6%)	1
Arthralgia						
BCG (n = 167) Placebo = 173)	BCG = 0 Placebo = 6	BCG = 2 Placebo = 2	BCG = 1 Placebo = 0	BCG = 1 Placebo = 3	BCG = 4 (2.4%) Placebo = 11 (6.4%)	0.11
Headache						
BCG (n = 142) Placebo = 154)	BCG = 12 Placebo = 14	BCG = 5 Placebo = 5	BCG = 3 Placebo = 4	BCG = 7 Placebo = 4	BCG = 27 Placebo = 27	0.76
Sore throat						
BCG (n = 162) Placebo = 169)	BCG = 5 Placebo = 5	BCG = 1 Placebo = 0	BCG = 0 Placebo = 2	BCG = 0 Placebo = 1	BCG = 6 (3.7%) Placebo = 8 (4.7%)	0.78
Anosmia						
BCG (n = 100) Placebo = 108)	BCG = 4 Placebo = 14	BCG = 3 Placebo = 2	BCG = 1 Placebo = 0	BCG = 2 Placebo = 3	BCG = 10 (10.0%) Placebo = 19 (17.6%)	0.16
Ageusia						
BCG (n = 113) Placebo = 126)	BCG = 4 Placebo = 12	BCG = 0 Placebo = 4	BCG = 2 Placebo = 2	BCG = 1 Placebo = 1	BCG = 7 (6.2%) Placebo = 19 (15.1%)	0.036
Diarrhea						
BCG (n = 169) Placebo = 185)	BCG = 1 Placebo = 5	BCG = 1 Placebo = 0	BCG = 2 Placebo = 0	BCG = 2 Placebo = 0	BCG = 6 (3.6%) Placebo = 5 (2.7%)	0.76
Nausea						
BCG (n = 168) Placebo = 179)	BCG = 2 Placebo = 1	BCG = 1 Placebo = 0	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 1 Placebo = 0	BCG = 4 (2.4%) Placebo = 1 (0.6%)	0.20
Vomiting						
BCG (n = 182) Placebo = 194)	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 1 Placebo = 0	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 1 (0.5%) Placebo = 0	-
Dyspnea						
BCG (n = 159) Placebo = 178)	BCG = 3 Placebo = 6	BCG = 2 Placebo = 3	BCG = 1 Placebo = 0	BCG = 3 Placebo = 0	BCG = 9 (5.7%) Placebo = 9 (5.1%)	0.81

Supplementary Table 1: details of local skin reactions following injection, their frequency and their average size in millimeter (mm) plus standard deviation (SD).

Variables	Visit 1 (first week)	Visit 2 (second week)	Visit 3 (third week)	Visit 4 (>4 weeks, average 6 weeks)
Local pain (mild), no. (%)	BCG = 12 (6.8%) Placebo = 0	BCG = 8 (4.6%) Placebo = 0	BCG = 8 (4.6%) Placebo = 0	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)
Local pain (moderate or severe), no. (%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)
Local itching (mild), no. (%)	BCG = 24 (13.6%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 11 (6.3%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 13 (7.5%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 7 (4.0%) Placebo = 0 (0%)
Local itching (moderate or severe), no. (%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)
Local erythema, no. (%)	BCG = 152 (86.4%) Placebo = 2 (1.0%)	BCG = 147 (84.0%) Placebo = 3 (1.6%)	BCG = 129 (74.1%) Placebo = 3 (1.6%)	BCG = 107 (61.5%) Placebo = 0
Average erythema size (mm±SD)	BCG = 10.8 ± 6.2 Placebo = 5 ± 0	BCG = 10.4 ± 4.1 Placebo = 1.7 ± 1.5	BCG = 9.6 ± 4.9 Placebo = 3 ± 1	BCG = 7.1 ± 3.1 Placebo = 0 ± 0
Papule, no. (%)	BCG = 111 (63.1%) Placebo = 1 (0.5%)	BCG = 76 (43.4%) Placebo = 4 (2.1%)	BCG = 67 (38.5%) Placebo = 1 (0.5%)	BCG = 32 (18.4%) Placebo = 1 (0.5%)
Average papule size (mm±SD)	BCG = 10.3 ± 6.0 Placebo = 5 ± NA	BCG = 9.0 ± 2.6 Placebo = 2.7 ± 2.5	BCG = 8.9 ± 5.1 Placebo = 4 ± NA	BCG = 6.2 ± 3.4 Placebo = 3 ± NA
Pustule, no. (%)	BCG = 16 (9.1%) Placebo = 1 (0.5%)	BCG = 34 (17.4%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 13 (7.5%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 8 (4.6%) Placebo = 0 (0%)
Average pustule size (mm±SD)	BCG = 12.5 ± 6.2 Placebo = 10 ± NA	BCG = 11.6 ± 4.9 Placebo = 0 ± 0	BCG = 9.7 ± 2.8 Placebo = 0 ± 0	BCG = 6.0 ± 2.9 Placebo = 0 ± 0
Local vesicle, no. (%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)
Local ulcer, no. (%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 4 (2.3%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 7 (4.0%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 7 (4.0%) Placebo = 0 (0%)
Average ulcer size (mm±SD)	BCG = 0 ± 0 Placebo = 0 ± 0	BCG = 11.7 ± 2.9 Placebo = 0 ± 0	BCG = 8.7 ± 2.3 Placebo = 0 ± 0	BCG = 7.4 ± 1.4 Placebo = 0 ± 0
Crust formation, no. (%)	BCG = 4 (2.3%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 21 (12.0%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 23 (13.2%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 38 (21.8%) Placebo = 0 (0%)
Average crust size (mm±SD)	BCG = 20.5 ± 7.8 Placebo = 0 ± 0	BCG = 9.6 ± 2.2 Placebo = 0 ± 0	BCG = 9.7 ± 1.4 Placebo = 0 ± 0	BCG = 6.6 ± 2.3 Placebo = 0 ± 0
Scar formation, no. (%)	BCG = 0 (0%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 2 (1.1%) Placebo = 1 (0.5%)	BCG = 6 (3.4%) Placebo = 3 (1.6%)	BCG = 35 (20.1%) Placebo = 1 (0.5%)
Average scar size (mm±SD)	BCG = 0 ± 0 Placebo = 0 ± 0	BCG = 11.0 ± 1.4 Placebo = 0 ± 0	BCG = 10.4 ± 8.6 Placebo = 0 ± 0	BCG = 6.1 ± 2.5 Placebo = 0 ± 0
Local skin exfoliation, no. (%)	BCG = 3 (1.7%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 16 (9.1%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 20 (11.5%) Placebo = 0 (0%)	BCG = 37 (21.3%) Placebo = 0 (0%)

Supplementary Table 2: Temporal analysis of recovery from symptoms reported on admission.

Admission no. of patients with symptom	1st week no. of patients with symptom	2nd week no. of patients with symptom	3rd week no. of patients with symptom	> 4 weeks no. of patients with symptom	Average drop in patients with symptom per visit, no. (%)	Cases healed by week 3, no. (%)	p
Cough BCG = 63 Placebo = 48	BCG = 25 Placebo = 24	BCG = 17 Placebo = 17	**BCG = 12** **Placebo = 10**	BCG = 8 Placebo = 8	BCG = 13.8 (21.9) Placebo = 10.0 (20.8)	BCG = 51 (81.0) Placebo = 38 (79.2)	0.81
Fatigue BCG = 55 Placebo = 60	BCG = 13 Placebo = 21	BCG = 15 Placebo = 12	**BCG = 13** **Placebo = 7**	BCG = 8 Placebo = 11	BCG = 11.8 (21.4) Placebo = 12.3 (20.5)	BCG = 42 (76.4.5) Placebo = 53 (88.3)	0.14
Fever BCG = 3 Placebo = 1	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 0 Placebo = 0	**BCG = 0** **Placebo = 0**	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 3 (100) Placebo = 1 (100)	-
Coryza BCG = 17 Placebo = 10	BCG = 2 Placebo = 4	BCG = 5 Placebo = 2	**BCG = 3** **Placebo = 1**	BCG = 3 Placebo = 0	BCG = 3.5 (20.6) Placebo = 2.5 (0.25)	BCG = 14 (82.4) Placebo = 9 (90.0)	1
Nasal Congestion BCG = 29 Placebo = 29	BCG = 5 Placebo = 10	BCG = 2 Placebo = 6	**BCG = 3** **Placebo = 5**	BCG = 2 Placebo = 3	BCG = 6.8 (23.4) Placebo = 6.5 (22.4)	BCG = 26 (89.7) Placebo = 24 (82.8)	0.71
Myalgia BCG = 26 Placebo = 32	BCG = 7 Placebo = 13	BCG = 4 Placebo = 5	**BCG = 8** **Placebo = 4**	BCG = 3 Placebo = 2	BCG = 5.8 (22.3) Placebo = 7.5 (23.4)	BCG = 18 (69.2) Placebo = 28 (87.5)	0.11
Arthralgia BCG = 15 Placebo = 21	BCG = 4 Placebo = 6	BCG = 0 Placebo = 1	**BCG = 2** **Placebo = 0**	BCG = 0 Placebo = 1	BCG = 3.8 (25.0) Placebo = 5.0 (23.8)	BCG = 13 (86.7) Placebo = 21 (100)	0.16
Headache BCG = 41 Placebo = 41	BCG = 18 Placebo = 14	BCG = 11 Placebo = 12	**BCG = 14** **Placebo = 7**	BCG = 11 Placebo = 4	BCG = 7.5 (18.3) Placebo = 9.3 (22.6)	BCG = 27 (65.9) Placebo = 34 (82.9)	0.13
Sore throat BCG = 21 Placebo = 24	BCG = 4 Placebo = 3	BCG = 3 Placebo = 2	**BCG = 4** **Placebo = 4**	BCG = 4 Placebo = 3	BCG = 5.3 (25.0) Placebo = 5.8 (24.0)	BCG = 17 (81.0) Placebo = 20 (83.3)	1
Anosmia BCG = 77 Placebo = 83	BCG = 42 Placebo = 59	BCG = 35 Placebo = 46	**BCG = 28** **Placebo = 39**	BCG = 13 Placebo = 26	BCG = 16 (20.8) Placebo = 12.8 (15.4)	BCG = 49 (63.6) Placebo = 44 (53.0)	0.20
Ageusia BCG = 64 Placebo = 66	BCG = 38 Placebo = 44	BCG = 29 Placebo = 35	**BCG = 26** **Placebo = 33**	BCG = 12 Placebo = 24	BCG = 13 (20.3) Placebo = 10.5 (15.9)	BCG = 38 (59.4) Placebo = 33 (50)	0.30
Diarrhea BCG = 14 Placebo = 10	BCG = 2 Placebo = 1	BCG = 3 Placebo = 2	**BCG = 0** **Placebo = 1**	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 3.5 (25.0) Placebo = 2.5 (25.0)	BCG = 14 (100) Placebo = 9 (90.0)	0.42
Nausea BCG = 15 Placebo = 16	BCG = 2 Placebo = 4	BCG = 0 Placebo = 2	**BCG = 1** **Placebo = 1**	BCG = 1 Placebo = 0	BCG = 3.8 (25.0) Placebo = 4.0 (25.0)	BCG = 14 (93.3) Placebo = 15 (93.8)	1
Vomiting BCG = 1 Placebo = 1	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 0 Placebo = 0	**BCG = 0** **Placebo = 0**	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 0 Placebo = 0	BCG = 1 (100) Placebo = 1 (100)	-
Dyspnea BCG = 23 Placebo = 14	BCG = 9 Placebo = 3	BCG = 4 Placebo = 3	**BCG = 2** **Placebo = 1**	BCG = 3 Placebo = 1	BCG = 5 (21.7) Placebo = 3.3 (23.2)	BCG = 21 (91.3) Placebo = 13 (92.9)	1

Supplementary Table 3: the characteristics and comorbidities of BCG and placebo groups in the serology analysis

	BCG (n = 24)	Placebo (n = 15)	p-value
Age (mean ± SD)	36.8 ± 10.4	38.7 ± 13.7	0.65
Days symptomatic (mean ± SD)	12.2 ± 4.0	11.8 ± 2.3	0.73
Female gender, no. (%)	16 (66.7)	11 (73.3)	0.66
Physically active, no. (%)	24 (100.0)	15 (100.0)	-
Consumes alcohol, no. (%)	12 (50.0)	6 (40.0)	0.54
Obesity, no. (%)	1 (4.2)	1 (6.7)	0.73
Diabetes, no. (%)	0 (0)	0 (0)	-
Hypertension, no. (%)	2 (8.3)	0 (0)	0.25
Cardiac disease, no. (%)	0 (0)	0 (0)	0.42
Pulmonary disease, no. (%)	1 (4.2)	0 (0)	0.73
Sinusitis, no. (%)	3 (12.5)	1 (6.7)	0.56
Respiratory allergies, no. (%)	2 (8.3)	3 (20.0)	0.29
Hemoglobinopathies, no. (%)	0 (0)	0 (0)	-
Autoimmune disease, no. (%)	0 (0)	0 (0)	-

Supplementary Table 4: symptomatic analysis of BCG and placebo groups in the serology analysis

	Admission	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4
Cough, no. (%)	BCG 7 (29.2) Placebo 3 (20.0) P = 0.52	BCG 3 (12.5) Placebo 2 (13.3) P = 0.94	BCG 2 (8.3) Placebo 1 (6.7) P = 0.85	BCG 2 (8.3) Placebo 0 (0) P = 0.45	BCG 4 (16.7) Placebo 0 (0) P = 0.095
Fever, no. (%)	BCG 1 (4.2) Placebo 0 (0) P = NA	BCG 0 (0) Placebo 0 (0) P = NA	BCG 0 (0) Placebo 0 (0) P = NA	BCG 0 (0) Placebo 0 (0) P = NA	BCG 0 (0) Placebo 0 (0) P = NA
Fatigue, no. (%)	BCG 10 (41.7) Placebo 6 (40.0) P = 0.92	BCG 3 (12.5) Placebo 2 (13.3) P = 0.94	BCG 6 (25.0) Placebo 2 (13.3) P = 0.38	BCG 2 (8.3) Placebo 1 (6.7) P = 0.85	BCG 2 (8.3) Placebo 1 (6.7) P = 0.85
Coryza, no. (%)	BCG 3 (12.5) Placebo 1 (6.7) P = 0.56	BCG 2 (8.3) Placebo 0 (0) P = 0.25	BCG 2 (8.3) Placebo 0 (0) P = 0.25	BCG 3 (12.5) Placebo 0 (0) P = 0.154	BCG 1 (4.2) Placebo 0 (0) P = 0.42
Myalgia, no. (%)	BCG 3 (12.5) Placebo 1 (6.7) P = 0.56	BCG 2 (8.3) Placebo 1 (6.7) P = 0.85	BCG 1 (4.2) Placebo 1 (6.7) P = 0.73	BCG 1 (4.2) Placebo 0 (0) P = 0.42	BCG 2 (8.3) Placebo 0 (0) P = 0.25
Arthralgia, no. (%)	BCG 2 (8.3) Placebo 1 (6.7) P = 0.84	BCG 0 (0) Placebo 1 (6.7) P = 0.2	BCG 0 (0) Placebo 1 (6.7) P = 0.2	BCG 0 (0) Placebo 0 (0) P = NA	BCG 1 (4.2) Placebo 0 (0) P = 0.42
Headache, no. (%)	BCG 6 (25) Placebo 3 (20.0) P = 0.72	BCG 5 (20.8) Placebo 2 (13.3) P = 0.55	BCG 3 (12.5) Placebo 0 (0) P = 0.154	BCG 4 (16.7) Placebo 2 (13.3) P = 0.78	BCG 5 (20.8) Placebo 1 (6.7) P = 0.23
Diarrhea, no. (%)	BCG 2 (8.3) Placebo 1 (6.7) P = 0.84	BCG 1 (4.2) Placebo 0 (0) P = 0.42	BCG 1 (4.2) Placebo 0 (0) P = 0.42	BCG 0 (0) Placebo 0 (0) P = NA	BCG 0 (0%) Placebo 0 (0%) P = NA
Anosmia, no. (%)	BCG 10 (41.7) Placebo 8 (53.3) P = 0.48	BCG 7 (29.2) Placebo 9 (60.0) P = 0.057	BCG 5 (20.8) Placebo 6 (40.0) P = 0.20	BCG 2 (8.3) Placebo 7 (46.7) P = 0.006	BCG 4 (16.7) Placebo 6 (40.0) P = 0.105
Ageusia, no. (%)	BCG 9 (37.5) Placebo 7 (46.7) P = 0.57	BCG 7 (29.2) Placebo 6 (40.0) P = 0.485	BCG 4 (16.7) Placebo 6 (40.0) P = 0.104	BCG 2 (8.3) Placebo 7 (46.7) P = 0.006	BCG 3 (12.5) Placebo 4 (26.7) P = 0.26
Dyspnea, no. (%)	BCG 3 (12.5) Placebo 0 (0) P = 0.154	BCG 4 (16.7) Placebo 1 (6.7) P = 0.74	BCG 1 (4.2) Placebo 0 (0) P = 0.42	BCG 1 (4.2) Placebo 0 (0) P = 0.42	BCG 4 (16.7) Placebo 1 (6.7) P = 0.36

4.2 RESULTADOS ADICIONAIS

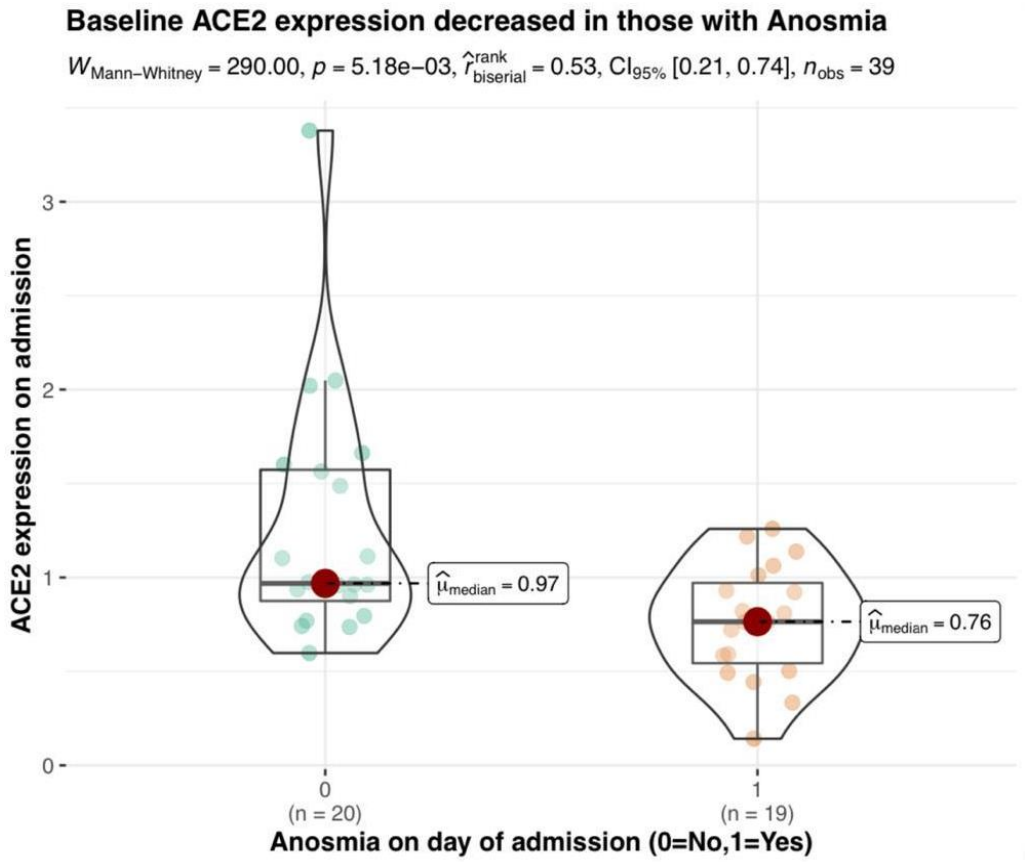

Figura 4: expressão basal de ECA2 diminuiu naqueles que apresentavam anosmia.

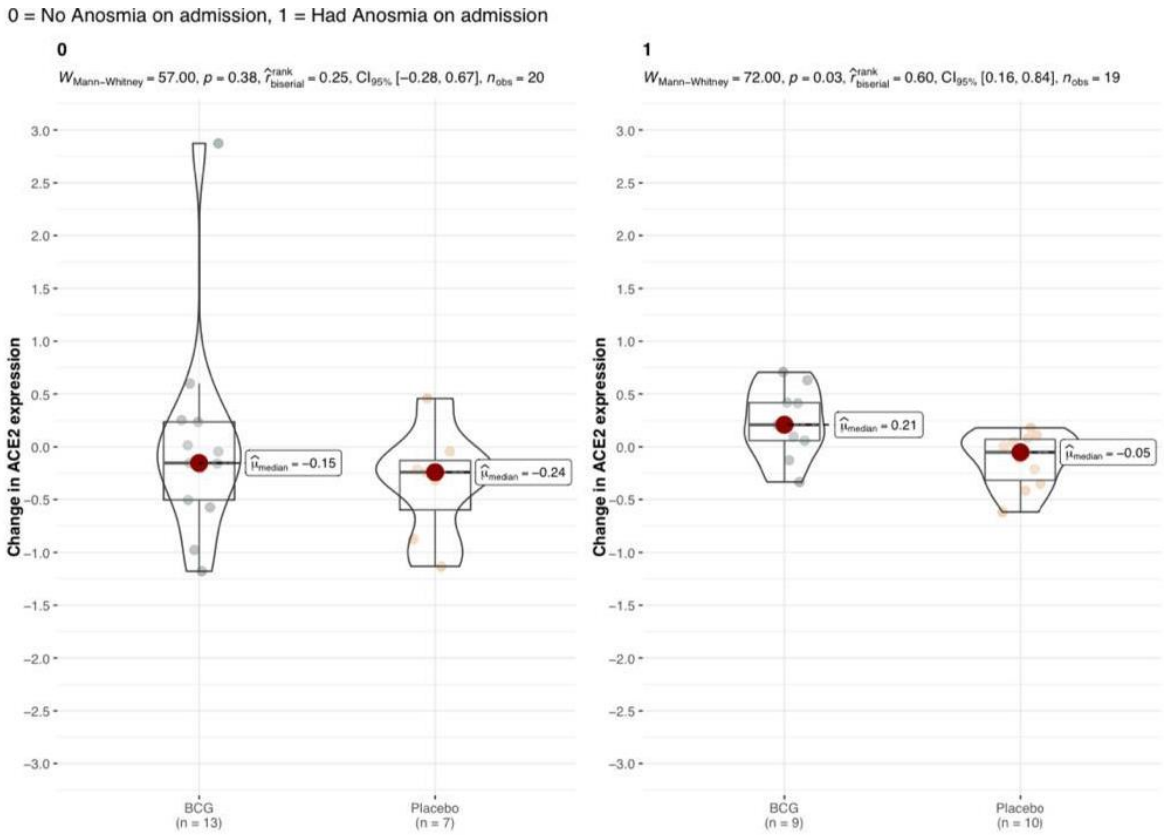

Figura 5: Observamos no grupo BCG a alteração do nível da expressão da ECA2 em pacientes com anosmia.

5 DISCUSSÃO

Em 11 de março de 2020, decretou-se a pandemia da COVID-19 pela Organização Mundial de Saúde, doença essa causada pelo vírus da síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV2). O surgimento da COVID-19 direcionou a ciência a desenvolver novos tratamentos e encontrar outras aplicações para tratamentos antigos. Vários estudos com BCG ao longo dos anos vieram nos mostrando sua proteção em bebês, crianças e até mesmo idosos contra infecções virais respiratórias. Outro papel muito elucidado foi seu efeito modulatório na resposta imune contra outros tipos virais (30, 33, 41-45).

Desde o início do estudo aqui abordado, alguns outros estudos retrospectivos mostraram a possível proteção contra SARS-CoV-2 da vacinação com BCG (antiga ou nova) em profissionais da área da saúde ou em diferentes populações (33, 46), como este que englobou uma maior variedade populacional.

Vários estudos mostraram que o BCG induz imunidade “heteróloga” e “treinada”, aumentando a resposta imune a outros patógenos, através do treinamento e alteração do comportamento da resposta imune, antes considerada inata. Baseada no conhecimento prévio de que as respostas induzidas por BCG são inespecíficas e originadas pela resposta imune celular, a hipótese de que a resposta antiviral após a vacina BCG não seja tão especializada e direcionada contra a proteína alvo. Talvez essa especificidade mais baixa seja algo desejável, atuando em várias frentes inclusive em mutações virais que são relevantes ameaças ao hospedeiro.

Uma pequena mutação do vírus pode tornar os anticorpos monoclonais insensíveis ao vírus não o reconhecendo mais, se a maior parte do sistema imunológico estiver ocupada com um antígeno específico, eles podem deixar passar algum outro patógeno, como algum vírus ou bactéria oportunista. As populações vacinadas com BCG são beneficiadas com a proteção contra diferentes infecções respiratórias através da imunidade heteróloga treinada (45-48).

Um histórico prévio de vacinação com BCG foi capaz de reduzir sintomas clínicos associados a COVID-19 em um estudo observacional, retrospectivo e diversificado de 6.679 pacientes (profissionais de saúde) da cidade de Los Angeles, nesses mesmos pacientes foi verificado a diminuição da soroprevalência de IgG anti-SARS-CoV-2, também possivelmente devido a vacina BCG (46).

Profissionais de saúde de nove hospitais holandeses foram randomizados para vacinação com BCG ou placebo em estudo com certa similaridade a este, encontraram que a concentração média de anticorpos anti-SARS-CoV-2 foi maior no grupo BCG do que no grupo placebo nos 3 primeiros meses, em 6 e 12 meses não houve diferença significativa. A predisposição, duração ou gravidade da COVID-19 não foi alterada pela vacinação com BCG (49). Nos 3 primeiros meses após a vacinação com BCG ocorreu o aumento da produção de anticorpos, essa produção aumentada nos 3 primeiros meses reforça a hipótese que o BCG influencia mais na resposta imune celular do que na resposta imune humoral, já que ela não se sustenta ao longo do tempo e não forneceu proteção.

Verificamos a redução de sintomas como anosmia e ageusia que acabam sendo menos subjetivos que outros sintomas previamente relatados por outros autores. Em relação às análises sorológicas aqui realizadas não houve diferença significativa entre os grupos (BCG/placebo). O BCG não alterou significativamente os níveis absolutos de IgG antiviral ou a atividade de neutralização absoluta possivelmente relacionado a nossa pequena amostragem, entretanto, observamos uma tendência de redução da neutralização quando normalizada pelo nível de IgG (neutralização dividida pelo título de IgG), o que pode indicar que o soro de pacientes do grupo BCG tiveram a mesma capacidade em neutralizar o vírus, no entanto, foi necessária uma concentração mais elevada de anticorpos para atingir a mesma percentagem de neutralização.

Crianças e adultos jovens e saudáveis geralmente apresentavam sintomas leves ou podiam ser assintomáticos, idosos tinham maior risco de complicações graves e morte (50, 51). Como agravante da doença, aumentando o risco de óbito inclusive em pacientes mais jovens, temos dados prévios na

literatura citando a obesidade (52). Relacionado a obesidade o estudo aqui apresentado ficou defasado, poucos pacientes sabiam relatar peso e altura de forma precisa durante a entrevista, alguns julgavam-se obesos e respondiam sim ao questionamento, porém, não foi aplicado em nenhum momento pela equipe um método padronizado para tal análise.

Outros fatores cruciais no prognóstico, além da obesidade e o envelhecimento, tínhamos as comorbidades cardiovasculares (CV). Dentre os óbitos pela COVID-19, hipertensos e doentes cardiovasculares ocuparam a maior casuística (53). A insuficiência cardíaca (IC) provavelmente também foi altamente prevalente entre os óbitos, embora os dados publicados sobre essa associação ainda sejam escassos (54). Hipertensão e cardiopatia crônica foram poucas vezes relatadas pelos pacientes aqui acompanhados, apresentando uma baixa casuística dentro dessa amostragem (hipertensão BCG 32/17,5%, placebo 34/17,4%, cardiopatia crônica BCG 4/2,2%, placebo 1/0,5%), isso poderia explicar o baixo número de óbitos ocorridos no presente estudo, somente um paciente do grupo BCG veio a óbito por possíveis complicações cardiovasculares relacionadas a COVID-19.

As doenças pulmonares crônicas como a doença pulmonar obstrutiva e asma foram mais prevalentes no estudo em questão no grupo BCG e menos prevalentes no grupo placebo (BCG 6,6%, placebo 2,1%, p=0,039), outras comorbidades não apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos.

A enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) é o receptor para o SARS-CoV-2, assim como para SARS-CoV, sua distribuição generalizada explicaria a capacidade infecciosa do vírus, acometendo vários órgãos além do sistema respiratório (55, 56).

Explorar a interação in vitro da proteína recombinante SARS-CoV-2 e o receptor da ECA2 sintética se fez justificável devido a interação in vivo da proteína Spike-Fc periférica do vírus SARS-CoV-2 que liga-se de forma específica aos receptores da ECA2, essa ligação em células epiteliais

brônquicas e pneumócitos alveolares leva a diminuição da expressão de ECA2 com consequente insuficiência respiratória aguda grave (57).

A interação do SARS-CoV-2 e o receptor da ECA2 foi avaliada através do ensaio de neutralização na presença do plasma de pacientes tratados com BCG, foi avaliada ainda a presença da resposta imune humoral contra o SARS-CoV-2, o objetivo do ensaio em questão foi detectar os anticorpos presentes no plasma e qual o seu poder de neutralizar a interação da proteína Spike do SARS-CoV-2 com o receptor ECA2.

A ECA2 seria a chave para o equilíbrio entre os dois principais eixos do SRA, o eixo SRA clássico e o anti-SRA. Lesões pulmonares e a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) na COVID-19 e em outras patologias já foi conectada a desequilíbrios dos SRA, levando a uma diminuição da expressão da ECA2, como resultado dessa regulação negativa teríamos o aprimoramento do SRA clássico (figura 6), levando a dano pulmonar e inflamação local além de fibrose, devido a diminuição da atenuação mediada pelo braço anti-SRA (58, 59).

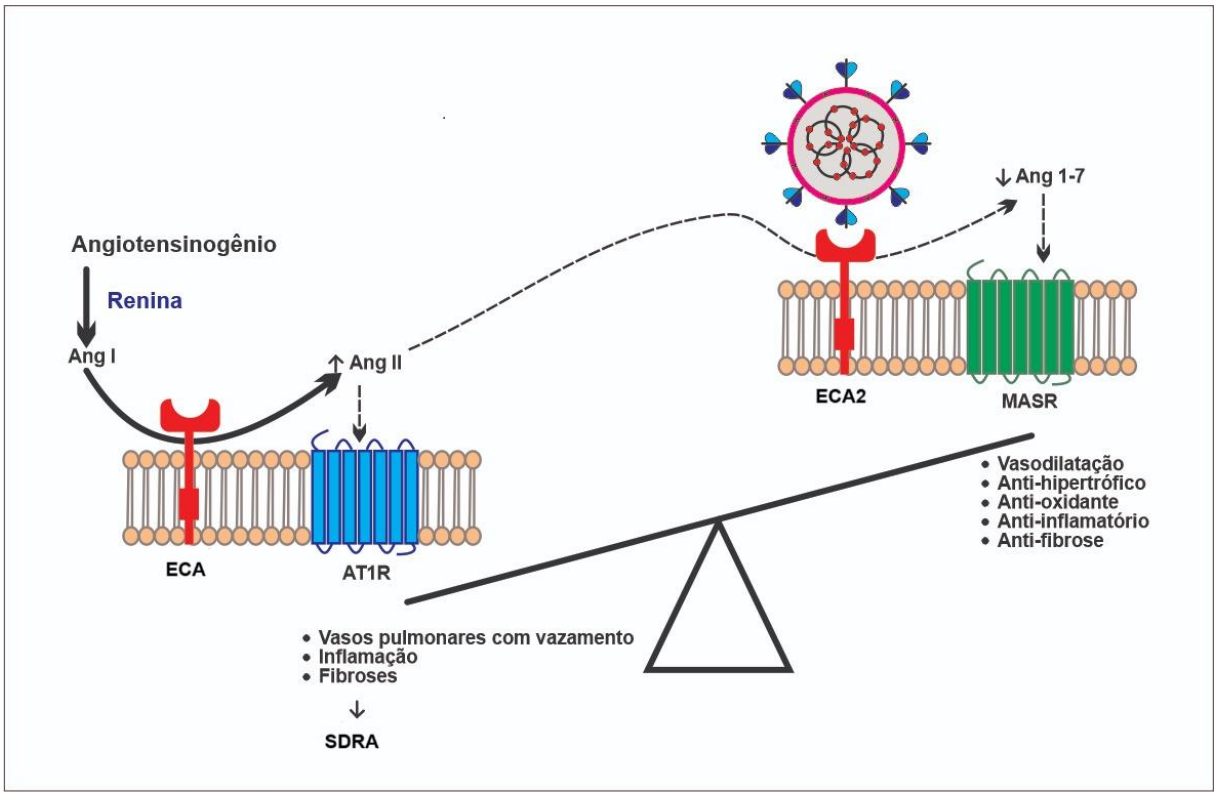

Figura 6: Gráfico representativo do desequilíbrio causado no SRA no tecido pulmonar através da infecção pelo SARS-CoV-2. Adaptado de Sarzani et al., 2020 (60).

Ainda nesse contexto de regulação do SRA, alguns medicamentos como os inibidores da ECA (ECA-I) ou os bloqueadores dos receptores de angiotensina II (BRA) foram associados em alguns estudos ao aumento dos níveis de ECA2 em tecidos ou fluidos de pacientes que faziam uso destes para doenças como hipertensão ou DCV (doenças cardiovasculares). Alguns autores levantaram a hipótese de uma maior suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2 e um maior risco de doença grave associada a esses medicamentos. Já em outros modelos experimentais, os inibidores da ECA e os BRA demonstraram prevenir e neutralizar a lesão pulmonar aguda, restaurando o equilíbrio entre os braços do SRA (figura 7). A evidência do desequilíbrio do SRA na COVID-19 e a hipótese de um papel benéfico da modulação deste foi o foco de estudos pré-clínicos e clínicos sobre medicamentos que poderiam equilibrar esse sistema, auxiliando contra a COVID-19 (14, 59).

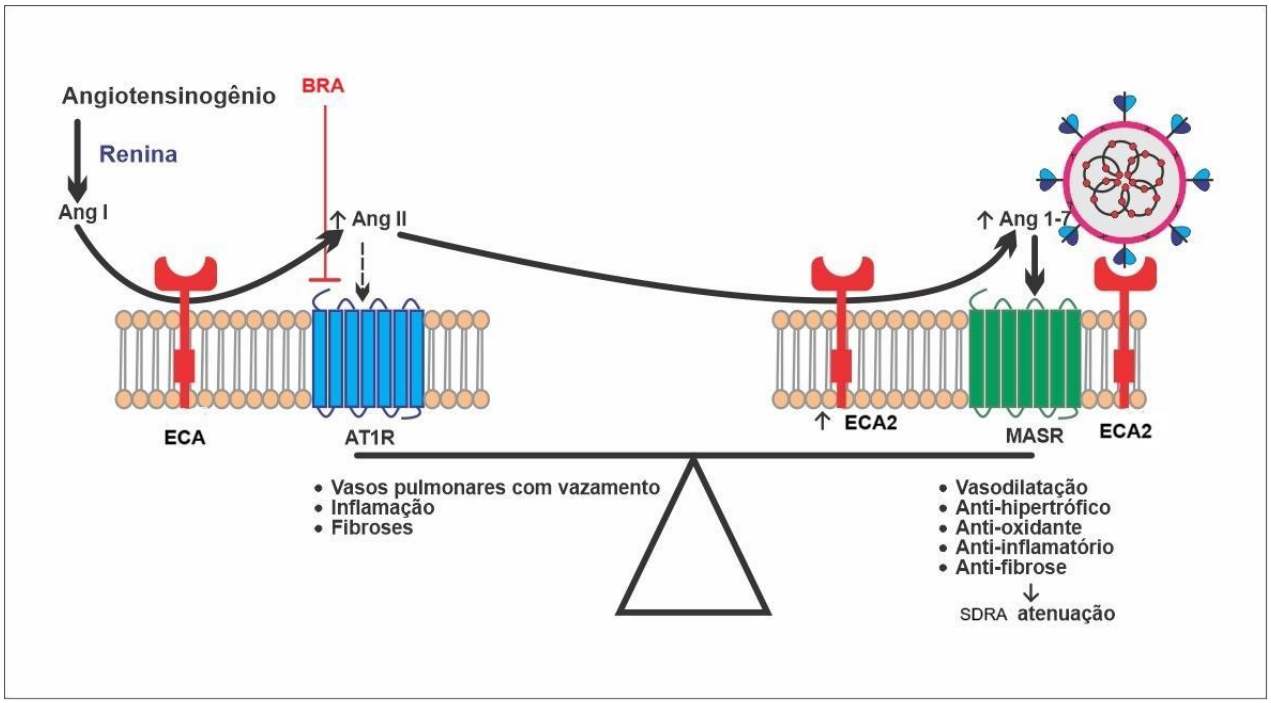

Figura 7: Síntese gráfica da restauração do equilíbrio do SRA, ação da terapia com bloqueador do receptor tipo 1 da angiotensina II (BRA). Adaptado de Sarzani et al., 2020 (60).

Estudos que visaram comparar os efeitos protetivos dos inibidores da ECA com os BRA mostraram que ambos diminuíram a mortalidade por pneumonia, porém sem diferenças estatísticas entre eles (61).

Nessa mesma linha vários estudos observacionais clínicos publicados recentemente refutaram amplamente a hipótese dessas medicações serem responsáveis por algum dano, além de reforçar sobre o risco de abstinência ou parada abrupta de tais medicações já que ambas são utilizadas de forma eficaz em doenças graves e muitas vezes crônicas (62, 63, 64).

De fato, a desregulação do SRA desempenha papel fundamental na origem do dano pulmonar após a infecção por SARS-CoV-2, e os inibidores de SRA podem restaurar o equilíbrio entre o braço “SRA clássico” e seu braço “anti-SRA”, no qual a ECA2 tem um papel central. Em camundongos knockout a infusão de Ang II induziu hipertensão, hipertrofia miocárdica, fibrose e disfunção diastólica, enquanto a ECA2 recombinante (rhECA2) atenuou a remodelação

miocárdica, sendo essa característica consequência da IC (65, 66). Em outro estudo a infecção experimental por SARS-CoV de camundongos do tipo selvagem in vivo levou à redução da expressão de ECA2 nos pulmões, sugerindo que a redução da expressão de ECA2 pode ter um papel na doença pulmonar aguda grave mediada por SARS-CoV (66).

Várias causas podem atuar modulando a ECA2 e o SRA através da ECA-I e dos BRA com consequente alteração de toda cascata. A ECA-1 leva a redução da via Ang II no receptor AT1 (via clássica), com posterior redução da síntese de Ang II e elevação da Ang I direcionada a ECA2, culminando com conversão diminuída de Ang 1–9 para Ang 1–7.Portanto, a ECA-I pode aumentar especificamente a atividade de Ang 1–9 no receptor AT2. A ECA também pode clivar a Ang 1–7 em Ang 1–5 inativa, a ECA-I pode inclusive aumentar o tempo de vida da Ang 1–7 (65).

Diferentemente dos BRA que irão atuar aumentando o substrato Ang II para ECA2, através da competição com a Ang II a nível do receptor AT1, eles levam a um aumento secundário da Ang II através do feedback negativo diminuído na liberação da renina. Quando excessivamente ativada a ligação no receptor AT1 pode levar a dano vascular direto após vasoconstrição primária (14). Além disso, nas adrenais, a Ang II estimula a secreção de aldosterona, promovendo a reabsorção de sódio e aumento da pressão arterial.

Semelhante ao que é observado após a infecção por SARS-CoV, a diminuição de ECA2, induzida pelo SRA clássico Ang II/AT1R, resultará em uma regulação negativa local através da atividade enzimática (68, 69).

A ECA2 também interage com outros peptídeos de angiotensina (chamados alatensinas) nos quais o aspartato NH 2 -terminal é substituído por alanina, levando a Ala-Ang 1–7 (chamada alamandina) se ligar à proteína G ligada ao receptor Mas (70), mostrando efeitos semelhantes ao da Ang 1-7, estimulando o MasR. A maior parte da ECA2 está ligada à membrana, enquanto sua forma solúvel circula no sangue em níveis muito baixos (71).

O uso de anticorpos neutralizantes da proteína S ou os inibidores de TMPRSS2 (mesilato de camostato) poderiam ser uma opção para bloquear a

entrada do SARS-CoV-2 nas células, já que ele se utiliza desses receptores para adentrar e infectar as células saudáveis (72, 73).

Uma distinção entre a ECA2 que está ligada a membrana e a solúvel deve ser feita, porque um aumento na ECA2 solúvel poderia implicar uma diminuição na ECA2 ligada à membrana, com consequências opostas. Em vários modelos animais, tanto a ECA-I como o BRA poderiam regular positivamente a ECA2, especialmente no tecido cardíaco (74, 75, 76), porém, não se conhece completamente a consequência disso em outros tecidos. Embora tenha sido demonstrada uma expressão reduzida de ECA2 após a infecção por SARS-CoV (77), esse mecanismo ainda não foi totalmente elucidado com o SARS-CoV-2 em humanos, podemos extrapolar que o SARS-CoV-2 também induza a regulação negativa de ECA2.

Em um estudo mais aprofundado das análises realizadas no BATTLE (artigo abordado nessa tese), foi reforçada a hipótese de que pacientes que receberam BCG tiveram uma recuperação mais rápida de anosmia e ageusia possivelmente ligadas ao aumento da quantificação basal de ECA2. A expressão basal de ECA2 foi menor em pacientes que apresentavam esses sintomas. O BCG teve a capacidade de aumentar a ECA2 somente em pacientes que apresentavam anosmia e ageusia (78).

A hipótese é que o aumento da indução da expressão da ECA2 após a injeção de BCG pode ser o resultado da redução da inflamação nas cavidades paranasais, permitindo que as células olfativas de suporte se curem.

Nessa linha, o plasma de pacientes com COVID leve com anosmia vacinados com placebo na admissão induziu menor expressão de ECA2 em macrófagos, enquanto a vacinação com BCG aumentou para o nível de expressão normal (78). Embora a alta expressão de ECA2 e o anticorpo anti-ECA2 IgM foram ambos previamente ligados à COVID-19 grave (79, 80), nenhum ensaio com BCG mostrou ligação com piora nos quadros respiratórios apresentados na COVID-19 (81, 82).

O nível da expressão da ECA2 em diferentes tecidos pode desempenhar um papel importante na gravidade da COVID-19. A alta expressão de ECA2 no

sistema respiratório e outros tecidos poderia explicar a suscetibilidade a infecções. No entanto, a relação entre a expressão da ECA2 e a gravidade da COVID-19 é complexa e não totalmente compreendida. O papel da BCG e seus mecanismos de ação, apesar de seu uso por décadas com sua comprovada segurança, não foi totalmente elucidado, dá-se aí a importância deste estudo.

Obtivemos além de uma melhoria sintomatológica na COVID-19, uma melhor compreensão de parte dos mecanismos do BCG que possivelmente atuou no reequilíbrio do SRA através do aumento de ECA2 nos pacientes vacinados. Efeitos adversos raros ocorrem somente em amostras grandes, e a mortalidade na COVID-19 leve a moderado é muito baixa aproximadamente 1 em 1.300 (83) portanto, um tamanho de amostra de 378 não seria adequado para tomada de decisão populacional, somente para a tomada de decisão individual, esse estudo também não deve ser utilizado para análise de mortalidade.

É importante notar que, embora a ECA2 seja um interveniente fundamental no processo de infecção pela COVID-19, tem funções fisiológicas importantes no corpo, para além do seu papel no SRA, e a alteração da sua atividade pode ter efeitos abrangentes. Pesquisas que visem esclarecer o papel do BCG na COVID-19 e entender melhor seus mecanismos de modulação da resposta imune celular fazem-se ainda necessárias.

6 CONCLUSÃO

O BCG aumentou a expressão da ECA2 até a normalidade, diminuindo a anosmia e ageusia nos pacientes com esses sintomas ou evitando seu aparecimento ao longo do tempo de acompanhamento, devido possível reequilíbrio do SRA.

7 REFERÊNCIAS

1. Li, Ruiyun, et al. "Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2)." Science 368.6490 (2020): 489-493.

2. Ministério da saúde - Painel Coronavírus: relatório de situação. Acesso em 16 de março de 2023. Disponível em https://covid.saude.gov.br/.

3. Candido, Darlan S., et al. "Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil." Science 369.6508 (2020): 1255-1260.

4. Hickmann, Maria Fernanda Grossi, et al. "Fisiopatologia da COVID-19 e alvo farmacológico tromboimunológico." VITTALLE-Revista De Ciências Da Saúde 32.3 (2020): 30-34.

5. Chen, Yao, et al. "Hydroxychloroquine/chloroquine as therapeutics for COVID-19: truth under the mystery." International Journal of Biological Sciences 17.6 (2021): 1538.

6. Fiolet, Thibault, et al. "Effect of hydroxychloroquine with or without azithromycin on the mortality of coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients: a systematic review and meta-analysis." Clinical microbiology and infection 27.1 (2021): 19-27.

7. Huang, Chenlu, et al. "Efficacy evaluation of intravenous immunoglobulin in non-severe patients with COVID-19: A retrospective cohort study based on propensity score matching." International Journal of Infectious Diseases 105 (2021): 525-531.

8. Tabarsi, Payam, et al. "Evaluating the effects of Intravenous Immunoglobulin (IVIg) on the management of severe COVID-19 cases: A randomized controlled trial." International immunopharmacology 90 (2021): 107205.

9. Dong, Yetian, et al. "A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates." Signal transduction and targeted therapy 5.1 (2020): 237.

10. Lima, Eduardo Jorge da Fonseca, Amalia Mapurunga Almeida, and Renato de Ávila Kfouri. "Vacinas para COVID-19-o estado da arte." Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil 21 (2021): 13-19.

11. Duke global health institute. Will Low-Income Countries Be Left Behind When COVID-19 Vaccines Arrive? (2020). Disponível em duke.edu.

12. Ponikowski, P., et al. "Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC." Eur J Heart Fail 18.8 (2016): 891-975.

13. Sarzani, Riccardo, et al. "Renin–angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans." Journal of hypertension 26.5 (2008): 831-843.

14. Paz Ocaranza, Maria, et al. "Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease." Nature Reviews Cardiology 17.2 (2020): 116-129.

15. Donoghue, Mary, et al. "A novel angiotensin-converting enzyme–related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9." Circulation research 87.5 (2000): e1-e9.

16. Santos, Robson AS, et al. "Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas." Proceedings of the National Academy of Sciences 100.14 (2003): 8258-8263.

17. Vickers, Chad, et al. "Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase." Journal of Biological Chemistry 277.17 (2002): 14838-14843.

18. Shereen, Muhammad Adnan, et al. "COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses." Journal of advanced research 24 (2020): 91-98.

19. Gurwitz, David. "Angiotensin receptor blockers as tentative SARS-CoV-2 therapeutics." Drug development research 81.5 (2020): 537-540.

20. Zhang, Peng, et al. "Association of inpatient use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers with mortality among patients with hypertension hospitalized with COVID-19." Circulation research 126.12 (2020): 1671-1681.

21. Gao, Chao, et al. "Association of hypertension and antihypertensive treatment with COVID-19 mortality: a retrospective observational study." European heart journal 41.22 (2020): 2058-2066.

22. Chappell, Mark C., et al. "Update on the angiotensin converting enzyme 2-angiotensin (1–7)-Mas receptor axis: fetal programing, sex differences, and intracellular pathways." Frontiers in endocrinology 4 (2014): 201.

23. Moorlag, S. J. C. F. M., et al. "Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections." Clinical microbiology and infection 25.12 (2019): 1473-1478.

24. Chen, Tingting, et al. "Association of human antibodies to arabinomannan with enhanced mycobacterial opsonophagocytosis and intracellular growth reduction." The Journal of infectious diseases 214.2 (2016): 300-310.

25. Kleinnijenhuis, Johanneke, et al. "BCG-induced trained immunity in NK cells: role for non-specific protection to infection." Clinical immunology 155.2 (2014): 213-219.

26. Netea, Mihai G., et al. "Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease." Science 352.6284 (2016): aaf1098.

27. Momeni, Ali Z., et al. "A randomised, double-blind, controlled trial of a killed L. major vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran." Vaccine 17.5 (1999): 466-472.

28. Pettenati, Caroline, and Molly A. Ingersoll. "Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer." Nature reviews urology 15.10 (2018): 615-625.

29. Leentjens, Jenneke, et al. "BCG vaccination enhances the immunogenicity of subsequent influenza vaccination in healthy volunteers: a randomized, placebo-controlled pilot study." The Journal of infectious diseases 212.12 (2015): 1930-1938.

30. Schaltz-Buchholzer, Frederik, et al. "BCG skin reactions by 2 months of age are associated with better survival in infancy: a prospective observational study from Guinea-Bissau." BMJ Global Health 5.9 (2020): e002993.

31. Curtis, Nigel, et al. "Considering BCG vaccination to reduce the impact of COVID-19." The Lancet 395.10236 (2020): 1545-1546.

32. Redelman-Sidi, Gil. "Could BCG be used to protect against COVID-1 Nature Reviews Urology 17.6 (2020): 316-317.

33. Rivas, Magali Noval, et al. "BCG vaccination history associates with decreased SARS-CoV-2 seroprevalence across a diverse cohort of health care workers." The Journal of clinical investigation 131.2 (2021).

34. Jason, Janine, et al. "Clinical and immune impact of Mycobacterium bovis BCG vaccination scarring." Infection and immunity 70.11 (2002): 6188-6195.

35. Pavan Kumar, Nathella, et al. "Effect of BCG vaccination on proinflammatory responses in elderly individuals." Science advances 7.32 (2021): eabg7181.

36. Karampini, Ellie, et al. "Endothelial cell activation, Weibel-Palade body secretion, and enhanced angiogenesis in severe COVID-19." Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis 7.2 (2023): 100085.

37. Barhoumi, Tlili, et al. "SARS-CoV-2 coronavirus spike protein-induced apoptosis, inflammatory, and oxidative stress responses in THP-1-like-macrophages: potential role of angiotensin-converting enzyme inhibitor (perindopril)." Frontiers in Immunology 12 (2021): 3771.

38. Lee, Aeri, et al. "Hesperetin suppresses LPS/high glucose-induced inflammatory responses via TLR/MyD88/NF-κB signaling pathways in THP-1 cells." Nutr. Res. Pract 15 (2021): 591-603.

39. Bertelli, Daniela F., et al. "Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits inositide trisphosphate accumulation in hypothalamus and regulates food intake and body weight." Endocrinology 147.11 (2006): 5385-5399.

40. Nascimento, Lucas FR, et al. "n-3 fatty acids induce neurogenesis of predominantly POMC-expressing cells in the hypothalamus." Diabetes 65.3 (2016): 673-686.

41. Singh, Desh Deepak, Amna Parveen, and Dharmendra Kumar Yadav. "SARS-CoV-2: emergence of new variants and effectiveness of vaccines." Frontiers in cellular and infection microbiology 11 (2021): 777212.

42. O'Neill, Luke AJ, and Mihai G. Netea. "BCG-induced trained immunity: can it offer protection against COVID-19?." Nature Reviews Immunology 20.6 (2020): 335-337.

43. Gursel, Mayda, and Ihsan Gursel. "Is global BCG vaccination-induced trained immunity relevant to the progression of SARS-CoV-2 pandemic?." Allergy 75.7 (2020): 1815.

44. Fu, Wei, et al. "Reconcile the debate over protective effects of BCG vaccine against COVID-19." Scientific Reports 11.1 (2021): 8356.

45. Tsilika, Maria, et al. "ACTIVATE-2: a double-blind randomized trial of BCG vaccination against COVID-19 in individuals at risk." Frontiers in immunology 13 (2022): 873067.

46. Junqueira-Kipnis, Ana Paula, et al. "BCG revaccination of health workers in Brazil to improve innate immune responses against COVID-19: A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial." Trials 21 (2020): 1-3.

47. Hojjat Jodaylami, Maryam, et al. "Cross-reactivity of antibodies from non-hospitalized COVID-19 positive individuals against the native, B. 1.351, B. 1.617. 2, and P. 1 SARS-CoV-2 spike proteins." Scientific Reports 11.1 (2021): 21601.

48. Gonzalez-Perez, Maria, et al. "The BCG vaccine for COVID-19: first verdict and future directions." Frontiers in immunology 12 (2021): 632478.

49. Borges, Kellen, et al. "Tuberculosis, BCG Vaccination, and COVID-19: Are They Connected?". Mini Reviews in Medicinal Chemistry 22.12 (2022): 1631-1647.

50. Grasselli, Giacomo, et al. "Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy." Jama 323.16 (2020): 1574-1581.

51. Onder, Graziano, Giovanni Rezza, and Silvio Brusaferro. "Case-fatality rate and characteristics of patients dying in relation to COVID-19 in Italy." Jama 323.18 (2020): 1775-1776.

52. Sattar, Naveed, Iain B. McInnes, and John JV McMurray. "Obesity is a risk factor for severe COVID-19 infection: multiple potential mechanisms." Circulation 142.1 (2020): 4-6.

53. Zhou, Fei, et al. "Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study." The lancet 395.10229 (2020): 1054-1062.

54. Ruan, Qiurong, et al. "Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China." Intensive care medicine 46.5 (2020): 846-848.

55. Hoffmann, Markus, et al. "SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor." cell 181.2 (2020): 271-280.

56. Yan, Renhong, et al. "Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2." Science 367.6485 (2020): 1444-1448.

57. Khade, Shankar M., Shivraj M. Yabaji, and Jyoti Srivastava. "An update on COVID-19: SARS-CoV-2 life cycle, immunopathology, and BCG vaccination." Preparative biochemistry & biotechnology 51.7 (2021): 650-658.

58. Radzikowska, Urszula, et al. "Distribution of ACE2, CD147, CD26, and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors." Allergy 75.11 (2020): 2829-2845.

59. Zheng, Ying-Ying, et al. "COVID-19 and the cardiovascular system." Nature reviews cardiology 17.5 (2020): 259-260.

60. Sarzani, Riccardo, et al. "Disequilibrium between the classic renin-angiotensin system and its opposing arm in SARS-CoV-2-related lung injury." American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology (2020).

61. Caldeira, Daniel, et al. "Risk of pneumonia associated with use of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: systematic review and meta-analysis." Bmj 345 (2012).

62. Claus, Juana, et al. "BCG Vaccination of health care workers does not reduce SARS-CoV-2 infections nor infection severity or duration: a randomized placebo-controlled trial." Mbio 14.2 (2023): e00356-23.

63. Fang, Lei, George Karakiulakis, and Michael Roth. "Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection?." The lancet respiratory medicine 8.4 (2020): e21.

64. Mackey, Katherine, et al. "Risks and impact of angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin-receptor blockers on SARS-CoV-2 infection in adults: a living systematic review." Annals of internal medicine 173.3 (2020): 195-203.

65. Wrapp, Daniel, et al. "Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation." Science 367.6483 (2020): 1260-1263.

66. Kuba, Keiji, et al. "A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus–induced lung injury." Nature medicine 11.8 (2005): 875-879.

67. Chappell, Mark C., et al. "Metabolism of angiotensin-(1–7) by angiotensin-converting enzyme." Hypertension 31.1 (1998): 362-367.

68. Glowacka, Ilona, et al. "Differential downregulation of ACE2 by the spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus NL63." Journal of virology 84.2 (2010): 1198-1205.

69. Jia, Hong Peng, et al. "Ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme 2 in human airway epithelia." American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 297.1 (2009): L84-L96.

70. Santos, Robson Augusto Souza, et al. "The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology (2019).

71. Xu, Jiaxi, et al. "Clinical relevance and role of neuronal AT1 receptors in ADAM17-mediated ACE2 shedding in neurogenic hypertension." Circulation research 121.1 (2017): 43-55.

72. Vaduganathan, Muthiah, et al. "Renin–angiotensin–aldosterone system inhibitors in patients with Covid-19." New England Journal of Medicine 382.17 (2020): 1653-1659.

73. Danser, AH Jan, Murray Epstein, and Daniel Batlle. "Renin-angiotensin system blockers and the COVID-19 pandemic: at present there is no evidence to

abandon renin-angiotensin system blockers." Hypertension 75.6 (2020): 1382-1385.

74. Ferrario, Carlos M., et al. "Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2." Circulation 111.20 (2005): 2605-2610.

75. Ishiyama, Yuichiro, et al. "Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors." Hypertension 43.5 (2004): 970-976.

76. Ocaranza, María Paz, et al. "Enalapril attenuates downregulation of angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat." Hypertension 48.4 (2006): 572-578.

77. Oudit, G. Y., et al. "SARS-coronavirus modulation of myocardial ACE2 expression and inflammation in patients with SARS." European journal of clinical investigation 39.7 (2009): 618-625.

78. Buosi, Keini, et al. "Modulation of Human Macrophages by Plasma from COVID-19 Patients Following BCG Vaccination: BATTLE Trial." International Journal of General Medicine (2024): 3107-3117.

79. Park, Annsea, and Akiko Iwasaki. "Type I and type III interferons–induction, signaling, evasion, and application to combat COVID-19." Cell host & microbe 27.6 (2020): 870-878.

80. Casciola-Rosen, Livia, et al. "IgM anti-ACE2 autoantibodies in severe COVID-19 activate complement and perturb vascular endothelial function." JCI insight 7.9 (2022).

81. Dionato, Franciele AV, et al. "BCG vaccine safety in COVID-19 convalescent adults: BATTLE a randomized controlled trial." Vaccine 40.32 (2022): 4603-4608.

82. da Costa, Cristiane Giacomelli, et al. "Effect of BCG on Respiratory Complications Caused by COVID-19: A Scoping Review." International Journal of General Medicine 15 (2022): 8727.

83. Clift, Ash K., et al. "Living risk prediction algorithm (QCOVID) for risk of hospital admission and mortality from coronavirus 19 in adults: national derivation and validation cohort study." bmj 371 (2020)

8 ANEXOS

ANEXO 1. Certificado do comitê de ética.

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PlataForma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: IDENTIFIÇÃO DO VÍRUS SARS-CoV-2 EM FLUIDOS CORPORAIS E AR ESPIRADO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PROTEÇÃO CRUZADA DO BCG

Pesquisador: Leonardo Oliveira Reis

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 4

CAAE: 31049320.7.1001.5404

Instituição Proponente: SAO PAULO SECRETARIA DA SAUDE

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.173.069

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1564546_E1.pdf, de 17/07/2020).

INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019 surgiu uma pneumonia inexplicável em um grupo de pessoas em Wuhan na China, o qual posteriormente resultou na identificação de um novo coronavírus nomeado de SARS-CoV-2, o qual atualmente originou a pandemia de COVID-19 (Zhu et al., 2020). SARS-CoV-2 é o nome oficial dado ao novo coronavírus, que significa "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2" (no português, Síndrome Respiratória Aguda Grave de Coronavírus 2) que recebeu essa nomenclatura por possuir grande semelhança com o vírus SARS-CoV, agente causador da epidemia de SARS, em 2002. A doença causada por SARS-CoV-2 foi nomeada de COVID-19, que quer dizer "Coronavirus Disease 2019" (Doença do Coronavírus 2019, em português), uma forma encontrada para se referir à condição sintomática de forma simplificada. O panorama epidemiológico mundial descreve 1.282.931 casos confirmados na data de 07/04/2020, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). No que tange o perfil no Brasil, no momento existem 11.130 casos diagnosticados com 486 mortes (World Health Organization, 2020). Por ser um vírus de rápida propagação e a maioria dos casos primários serem oriundos de áreas endêmicas, uma

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

ANEXO 2. Formulários de admissão e acompanhamento dos pacientes

1. Formulário de Admissão:

- Primeiro Nome/ CPF
- Data de Admissão
- Prontuário
- Possui cicatriz da vacina BCG prévia: sim ou não
- Sexo: feminino ou masculino
- Data de Nascimento
- Telefone Celular
- Endereço
- Email
- Contato de Emergência
    - Nome do Contato de Emergência
    - Grau de parentesco
    - Telefone Celular
    - Telefone Fixo
- Responsável Clínico
    - Hospital do Primeiro Atendimento
    - Número da Vacina Brasileira
    - Número da Vacina Indiana
    - Médico Responsável
- Mora sozinho: sim ou não
- Quantas pessoas moram com você:1, 2, 3 ou mais
- Alguém que mora com você é profissional da saúde: sim ou não
- Você é profissional da saúde: sim ou não
- Qual a sua profissão: Médico, enfermeiro, técnico enfermagem, dentista, biomédico, veterinário, outro
- Pratica atividade física: sim ou não
    - Atividade leve:1, 2, 3 vezes ou mais na semana
    - Atividade intensa: 1, 2, 3 ou mais vezes na semana
- Tabagismo: sim ou não
- Etilismo: sim ou não

- Comorbidades: diabetes, hipertensão arterial sistêmica, cardiopatia, obesidade, DRC, pneumopatia crônica, sinusite, alergias respiratórias, hemoglobinopatias, doença autoimune, imunossupressão, outros
- Contato com caso suspeito ou confirmado: sim ou não
- Qual dos testes deu positivo: RT-PCR, teste rápido ou sorologia por quimioluminescência
- Apresenta sintomas: sim ou não
- Hoje completa quantos dias de início dos sintomas?
- Hoje completa quantos dias do teste diagnóstico?
- Sintomatologia hoje: tosse, febre, calafrios, fadiga, coriza, congestão nasal, mialgia, artralgia, cefaleia, dor de garganta, anosmia, ageusia, náusea, diarreia, dor no peito, dificuldade para respirar, sonolência, confusão mental, lábios ou rostos azulados, palidez.
    - Se febre: aferida ou não, por quantos dias e qual a medida
    - Intensidade de todos sintomas divididos em: fraco, moderado e intenso
- Sintomatologia nos dias anteriores: tosse, febre, calafrios, fadiga, coriza, congestão nasal, mialgia, artralgia, cefaleia, dor de garganta, anosmia, ageusia, náusea, diarreia, dor no peito, dificuldade para respirar, sonolência, confusão mental, lábios ou rostos azulados, palidez.
    - Se febre: aferida ou não, por quantos dias e qual a medida
    - Duração (dias) e intensidade de todos sintomas se presentes

2. <u>Formulário de Acompanhamento:</u>

- Primeiro nome/CPF
- Data do acompanhamento
- Passou por consulta médica desde a última vinda: sim ou não
- Como está se sentindo: melhora, estável ou piora
- Esteve internado: sim ou não
- Sintomatologia hoje: tosse, febre, calafrios, fadiga, coriza, congestão nasal, mialgia, artralgia, cefaleia, dor de garganta, anosmia, ageusia, náusea, diarreia, dor no peito, dificuldade para respirar, sonolência, confusão mental, lábios ou rostos azulados, palidez, vômitos, dor na aplicação da injeção, hiperemia no local da injeção, pápula, pústula, dor

no local da injeção, crosta, úlcera, descamação, cicatriz, prurido no local da injeção, vesícula, aumento de linfonodos.

  - Se febre: aferida ou não, por quantos dias e qual a medida
  - Duração (dias) e intensidade de todos sintomas se presentes

- Algum outro sintoma no dia de hoje: caixa aberta
- Algum outro evento adverso em decorrência da vacinação BCG: caixa aberta

Medida da lesão vacinal em mm.

ANEXO 3. Autorização da editora para uso do artigo

Thank you for your order!

Dear Mrs. Keini Buosi,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee:	Mrs. Keini Buosi
Order Date:	Oct 31, 2024
Order Number:	5899611367683
Publication:	Journal of Internal Medicine
Title:	Randomized clinical trial of BCG vaccine in patients with convalescent COVID-19: Clinical evolution, adverse events, and humoral immune response
Type of Use:	Dissertation/Thesis
Order Total:	0.00 USD

View or print complete details of your order and the publisher's terms and conditions.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE

TERMS AND CONDITIONS

Oct 31, 2024

This Agreement between Keini Buosi ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5899611367683
License date	Oct 31, 2024
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Internal Medicine

Licensed Content Title	Randomized clinical trial of BCG vaccine in patients with convalescent COVID-19: Clinical evolution, adverse events, and humoral immune response
Licensed Content Author	Leonardo O. Reis, Marcio C. Bajgelman, Kleber G. Franchini, et al
Licensed Content Date	Jun 3, 2022
Licensed Content Volume	292
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	13
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of new work	IMPACTO DA VACINA BACILO CALMETTE-GUERIN (BCG) EM PACIENTES CONVALESCENTES DA COVID-19
Institution name	Universidade estadual de campinas - UNICAMP
Expected presentation date	Oct 2024

The Requesting Person /

Organization to Appear on the License	Keini Buosi
	Mrs. Keini Buosi Rua Daniel cesário de andrade 507
Requestor Location	Campinas, SP 13044035 Brazil Attn: Mrs. Keini Buosi
Publisher Tax ID	EU826007151
Customer Tax ID	BR37143225827