



Facultad de Farmacia
Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética.

TRABAJO DE FIN DE GRADO:
Uso terapéutico de la vacuna BCG.

Alumno: José Antonio Cruz González.

Tutora: Dra. Teresa Ruiz Martín.

San Cristóbal de La Laguna

Julio 2019

Índice.

1. Abstract.....	2
2. Introducción.....	3
2.1. La vacuna BCG.	3
2.2. Uso de la BCG en otras terapias.	3
3. Objetivo del trabajo.	4
4. Material y Métodos.	4
5. Resultados y discusión.	5
5. 1. Uso de la BCG en el tratamiento del cáncer de vejiga.	5
5.2. Empleo de la BCG en el tratamiento de otros tumores.	8
5.3. Perspectivas de futuro.....	9
6. Conclusiones.	10
7. Bibliografía.	11

1. Abstract.

The tuberculosis vaccine contains an attenuated strain of *Mycobacterium bovis* known as Bacillus of Calmette and Guerin (BCG). It is the most widely employed vaccine worldwide, although its efficacy is variable. BCG is also a powerful immunomodulating agent, which has opened up the possibilities of its use in the treatment of other diseases, particularly in the treatment of some types of cancer. After its approval in 1990, the BCG has been used as an effective treatment for bladder cancer. The mechanism by which it exerts its anticancer effect is still unknown, although it is probably based in the fact that the cells infected by the vaccine's bacteria secrete a number of cytokines that lead to the destruction of the tumor cells. However, although BCG has been shown to delay the recurrence of bladder cancer, this treatment does not allow to achieve a complete cure of the disease.

Besides its effectiveness in the treatment of bladder cancer, there are preclinical and clinical evidences of the potential usefulness of the BCG vaccine for other types of cancer, particularly in melanoma, gastric cancer and colon cancer. In this work, a review of the literature on the use of BCG as anticancer agent, as well as on its potential application in other therapies has been carried out.

Resumen.

La vacuna de la tuberculosis contiene una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* conocida como Bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Es la vacuna más administrada a nivel mundial, aunque su eficacia es variable. Pero la BCG es, además, un potente agente inmunomodulador, lo que ha abierto las posibilidades de su uso en el tratamiento de otras enfermedades, en particular en el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Así, desde 1990 está aprobado el uso de la BCG como tratamiento para el cáncer de vejiga. El mecanismo por el que ejerce su efecto anticanceroso es aún desconocido, aunque se intuye que las células infectadas por las bacterias de la vacuna secretan una serie de citoquinas que conducen a la destrucción de las células tumorales. Sin embargo, aunque la BCG ha demostrado retrasar notablemente la recurrencia del cáncer de vejiga, este tratamiento no consigue una curación total.

Además de su eficacia en el tratamiento del cáncer de vejiga, existen evidencias preclínicas y clínicas de la posible utilidad de la vacuna BCG en otros tipos de cáncer, en particular en el melanoma, el cáncer gástrico y el cáncer de colon. En este trabajo se revisa la bibliografía relativa al uso de la BCG como agente anticanceroso, así como su posible aplicación en otras terapias.

2. Introducción.

2.1. La vacuna BCG.

La tuberculosis es una enfermedad sistémica que afecta al aparato respiratorio, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, transmitida principalmente por vía aérea [1]. En la actualidad es una enfermedad que puede ser mortal si el paciente no recibe el tratamiento adecuado, pero a finales del siglo XIX suponía un reto sobrevivir a ella, razón por la que, ante la falta de un tratamiento eficaz, se empezó a buscar una vacuna contra esta pandemia [2,3].

En 1904, Nocard aisló de una vaca con mastitis tuberculosa una cepa virulenta de *Mycobacterium bovis*. Esta cepa fue enviada al instituto Pasteur, donde Albert Calmette y Camille Guérin estaban trabajando con bacilos tuberculosos bovinos [4]. Después de realizar 230 subcultivos [5], realizados entre 1908 y 1921, mediante los cuales se consiguió la pérdida gradual de su virulencia, se obtuvo la cepa completamente avirulenta que fue denominada Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) [6,7].

Desde 1921, el bacilo de Calmette-Guérin se emplea como vacuna frente a la tuberculosis (conocida como “vacuna BCG”). En 1974, la vacunación con BCG es incluida por la *Organización Mundial de la Salud* (OMS) en el Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI) como medida de refuerzo en la lucha contra las enfermedades infecciosas infantiles en países en vías de desarrollo. En 1993, la OMS declaró a la tuberculosis una “enfermedad global” y en 1995 convocó y comprometió a los gobiernos a poner en práctica medidas para tratar de conseguir eliminar la tuberculosis como problema de salud pública en el año 2050. Como consecuencia de ello, la vacuna BCG es la vacuna más administrada a nivel mundial. Sin embargo, su eficacia es variable, evidenciando una menor protección en adultos y habitantes de zonas tropicales, donde es endémica la tuberculosis. La causa de esta variabilidad podría estar relacionada con diferencias entre las cepas usadas en la vacuna, factores genéticos y ambientales, alta carga infecciosa recibida del contacto y desnutrición, entre otros factores [8,9].

Teniendo en cuenta estos factores, se llegó a la conclusión de que la BCG proporciona un 50% de la protección global frente a la tuberculosis y previene la meningitis tuberculosa infantil. Su eficacia parece aumentar a medida que nos alejamos del ecuador y persiste tras 10 años después de la vacunación [8].

2.2. Uso de la BCG en otras terapias.

La BCG es un potente agente inmunomodulador, lo que ha abierto las posibilidades de su uso en el tratamiento de otras enfermedades, distintas de la tuberculosis, en particular en el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

Ya Pearl, en 1929, observó que la prevalencia de cáncer en individuos que padecían tuberculosis era muy baja y fue el primero en sugerir el uso de BCG como terapia anticancerosa [6,10].

Holmgren, en 1935, reportó variaciones en la regresión tumoral al tratar con tuberculina y BCG a individuos con cáncer [6,11] y en 1966, Coe y Feldman consideraron que la vejiga era el órgano ideal para la aplicación de inmunoterapia local en tumores, ya que demostraron que en este órgano se producía una reacción de hipersensibilidad retardada frente a un estímulo antigénico, estableciendo las bases teóricas de la inmunoterapia intravesical tópica [6,12].

En la década de los 70 se realizan los primeros ensayos de tratamiento de diversos tipos de tumores (melanoma, carcinoma gástrico y cáncer de vejiga) utilizando la BCG [13,14,15], ensayos que condujeron a la aprobación por la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos, en 1990, del uso de la BCG como tratamiento para el cáncer de vejiga [6].

3. Objetivo del trabajo.

El objetivo de este trabajo es revisar la bibliografía relativa al empleo de la vacuna BCG como agente terapéutico para el tratamiento del cáncer de vejiga, así como los estudios encaminados a determinar si este microorganismo puede ser utilizado o no en la terapia de otros tipos de tumores.

4. Material y Métodos.

La información bibliográfica para la elaboración de este trabajo se obtuvo a través del Punto Q de la Biblioteca de la *Universidad de La Laguna*. Asimismo, se han utilizado fuentes oficiales de datos sanitarios como la *American Cancer Society* o la *Organización Mundial de la Salud*.

La búsqueda de información se realizó utilizando las siguientes palabras clave: BCG, immunotherapy, cancer, genitourinary, bladder tumor, recombinant, melanoma, nanotechnology.

Se seleccionaron revisiones y artículos publicados a partir de las principales bases de datos: MEDLINE/PubMed, Scopus, Science Citation Index Expanded, ScienceDirect Journals, Wiley, Elsevier, Nature Publishing Group.

De los resultados obtenidos se descartaron aquellos cuyo título no estaba relacionado con el tema a tratar, aquellos cuyo abstract tampoco mostraba relación y, por último, los artículos cuyo contenido se desviaba del objetivo del trabajo.

5. Resultados y discusión.

5. 1. Uso de la BCG en el tratamiento del cáncer de vejiga.

Como ya se ha indicado en la Introducción, es en la década de los años 70 cuando se realizan los primeros ensayos de empleo de la BCG para el tratamiento de diversos tumores. Fruto de esos trabajos es el establecimiento de las condiciones para que un tumor pueda ser tratado con BCG, así como las dosis efectivas de bacilos necesarias para obtener una respuesta positiva [6,16,17]. En el año 1976, Morales y colaboradores reconocieron que estas condiciones, se daban en el cáncer superficial de vejiga [6,15].

El cáncer de vejiga es la segunda neoplasia más común, constituyendo un 5% de las muertes totales por cáncer y suponiendo un alto coste para la sanidad [18]. La forma más común es el carcinoma de las células uroteliales, que representa el 90% de los cánceres de vejiga [19].

Este cáncer se puede desarrollar por dos vías: la vía invasiva y la vía papilar no invasiva [20,21]. La mayoría de los cánceres desarrollados son del tipo no muscular invasivo (NMIBC) y una minoría constituye el cáncer muscular invasivo (MIBC) [22,23].

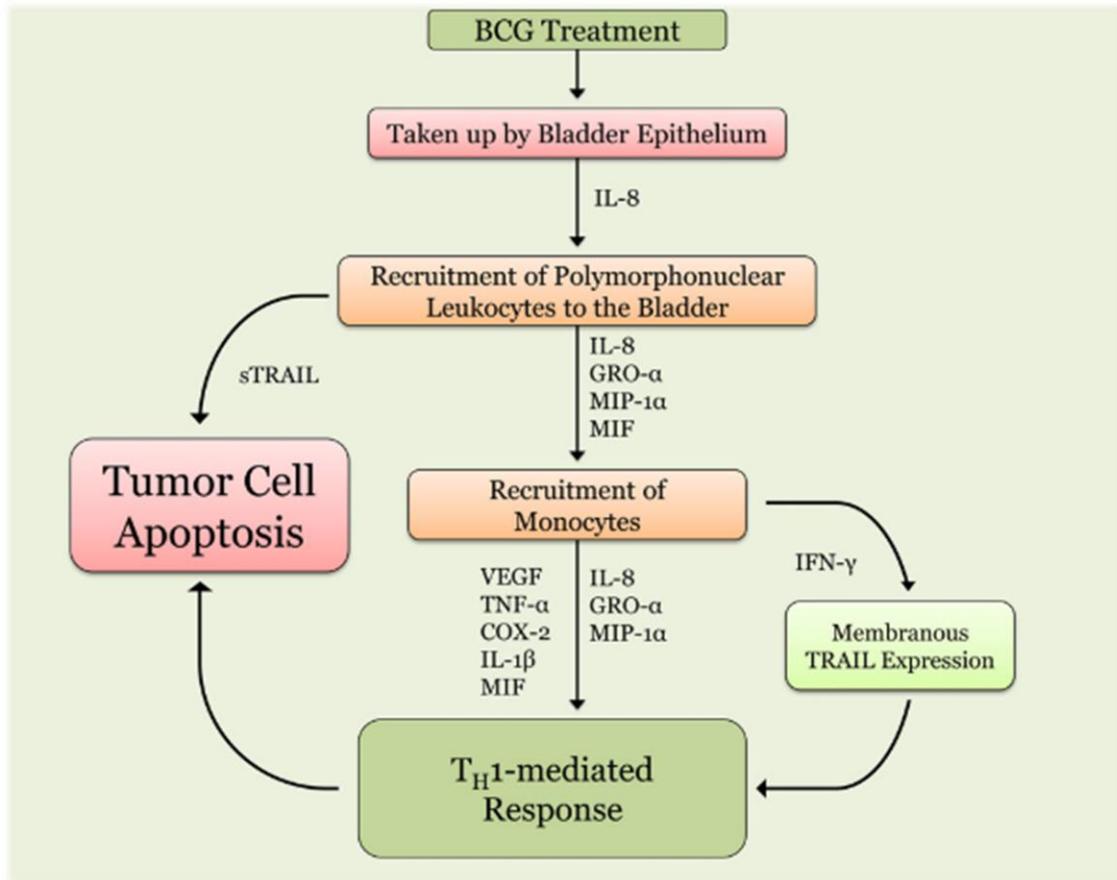
A su vez, cada uno de estos tipos de cáncer se puede clasificar como de alto o bajo riesgo, según sus formas celulares y citología, presentando diferentes tipos: Ta (papilar no invasivo) y Tis (CIS), como formas no invasivas, y T1 y T2 como las invasivas. [22,24].

Debido a sus características y mejor respuesta, el NMIBC de alto riesgo es el candidato perfecto para el tratamiento con BCG, ya que se ha demostrado que este tratamiento reduce su recurrencia y progresión [22,25].

El mecanismo de acción por el cual la BCG ejerce su efecto es aún desconocido, aunque se intuye como puede actuar. Las bacterias que contiene la solución administrada van a adherirse a las células de la pared mediante la fibronectina y la integrina $\alpha 5\beta 1$, previo a la internalización de estas mediante micropinocitosis. Estas células cancerosas infectadas por las bacterias que contiene la BCG secretan una serie de citoquinas, incluyendo la IL-6, IL-8, GM-CSF y TNF- α . También se produce una regulación positiva del MHC-II e ICAM-1 mejorando la presentación de antígenos [26,27].

El estallido inicial de citoquinas lleva a un reclutamiento de granulocitos, monocitos y macrófagos y a la posterior liberación de citoquinas adicionales que incluyen IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF- α , INF- γ , GM-CSF+, células T *helper* (TH) y células T citotóxicas CD8⁺ (CTL). La destrucción de las células tumorales se logra por la acción de las células natural killer (NK), células citotóxicas CD8⁺, macrófagos y granulocitos a través de la liberación de la proteína TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) [26,27] (Figura 1).

Figura 1. Posible mecanismo de acción de la BCG [22].



Una vez diagnosticado el tipo de carcinoma el tratamiento comienza con la resección transuretral del tumor (RTUTV) y tejidos afectados, realizándose un raspado de los tejidos dañados, incidiendo en la base del tumor [6]. Si el cáncer es un NMIBC de bajo riesgo puede ser suficiente el tratamiento con quimioterapéuticos intravesicales como la mitomicina C [28], pero si resulta ser uno de alto riesgo se pone en práctica la terapia con BCG [22]. En este último caso, la RTUTV previa es fundamental, ya que las bacterias de la vacuna se unen por medio de la fibronectina a las zonas del epitelio donde se ha producido daño. Esto se ha demostrado al administrar anticuerpos anti-fibronectina, lo que tiene como consecuencia una peor respuesta a la BCG y una mayor progresión y recurrencia de la enfermedad [29,30]. Dentro las 24 horas siguientes a la RTUTV, se administra una solución que contiene la BCG mediante un catéter a través de la uretra. Una vez instilado, el paciente debe de cambiar de posición para garantizar que la solución entre en contacto con todas las paredes de la vejiga [31]. Entre 2 y 6 semanas tras la RTUTV se le administra, además, una vacuna BCG percutánea [22].

Aunque existe alguna controversia sobre el esquema terapéutico más adecuado, aún se mantiene el régimen propuesto por Morales y colaboradores [15], que consiste en una instilación semanal de BCG, similar a la inicial, durante 6 semanas [32], lo que produce una respuesta positiva en la mayoría de los pacientes [6,33,34]. En caso de recurrencia, los urólogos han optado por repetir un segundo ciclo de instilaciones de 6 semanas, a pesar de que este enfoque carece de evidencia científica suficiente [2]. La terapia de

mantenimiento, vital para evitar la progresión y recurrencia del tumor, es la propuesta por Lamm y el *Southwest Oncology Group* (SWOG) [10], que consiste en una instilación semanal durante tres semanas, cada 6 meses y hasta los tres años [6,35].

La cantidad de BCG a emplear es también un tema controvertido desde que Morales y colaboradores propusieron administrar dosis de 120 mg (la más tóxica) para tratar los cánceres de riesgo alto e intermedio y dosis de 60 mg para las recurrencias [6,36]. Aunque se sigue usando esta pauta de dosificación, estudios posteriores han demostrado que una dosis baja, y por lo tanto más segura, es eficaz a la hora de tratar el NMIBC de riesgo alto e intermedio [37].

En cuanto a los efectos adversos y posibles complicaciones de la terapia con BCG, hay que reseñar que, aunque en general la tolerancia a la BCG es muy buena, también cabe la posibilidad de que su toxicidad pueda llegar a ser grave e incluso mortal [2,38].

El efecto adverso más frecuente es la irritación de la vejiga, que suele comenzar tras la segunda o tercera instilación y durar unos días, y es consecuencia de la presencia de citoquinas y de la estimulación del sistema inmunológico. Las reacciones más graves son consecuencia del paso a la sangre de los microorganismos que componen la BCG. Esto puede ser debido a los traumas causados por una mala cateterización, lo que constituye un riesgo de sepsis bacteriana que puede llegar a ser mortal. A aquellos pacientes en los que los síntomas irritativos perduran más de lo común se les suele administrar antibióticos y disminuir la dosis de BCG en las siguientes instilaciones [2,39].

Para evitar los efectos adversos de la BCG, Nakamura y colaboradores [40] desarrollaron un nanoencapsulado que contiene el esqueleto de la pared celular del bacilo (BCG-CWS), el cual posee un potente efecto inmunomodulador y produce un fuerte efecto antitumoral contra las células del cáncer de vejiga, debido a la internalización del BCG-CWS por parte de éstas. De modo análogo, se han preparado liposomas modificados con octarginina que incorporan el BCG-CWS (R8-liposoma-BCG-CWS), aumentando el potencial inmunoterapéutico de éste [22,41]. Estas preparaciones representan alternativas eficientes y, aparentemente, seguras a la BCG.

Figura 2. Nano-BCG: Un prometedor sistema de administración para el tratamiento del cáncer de vejiga humano [24].



En cualquier caso, aunque la BCG ha demostrado retrasar notablemente la recurrencia del cáncer de vejiga, este tratamiento no consigue, generalmente, una curación total. Por esta razón, a la larga, la mayoría de los pacientes deben someterse a una cistectomía radical [6,42].

5.2. Empleo de la BCG en el tratamiento de otros tumores.

Además de su eficacia en el tratamiento del cáncer de vejiga, existen evidencias preclínicas y clínicas de la posible utilidad de la vacuna BCG en otros tipos de cáncer [30].

Ya en el año 1936, ratones con cáncer de estómago que fueron inyectados con BCG mostraron una mayor supervivencia y un desarrollo tumoral lento [30,43] y en 1959, Old y colaboradores comprobaron que los ratones previamente infectados con BCG eran resistentes al desarrollo de tumores que les fueron inoculados subcutáneamente o intraperitonealmente [30,44].

En 1970, Morton y colaboradores describieron que la inyección de BCG en las lesiones producidas por melanomas subcutáneos malignos en 36 pacientes humanos no solo provocaba la desaparición o regresión de más del 90% de las lesiones inyectadas, sino que también se producía la regresión de aproximadamente el 20% de las lesiones no inyectadas localizadas en la misma área de drenaje donde se localizaban las tratadas [30,45,46]. De modo análogo, un año más tarde se describió que la inyección intratumoral de BCG en tumores previamente establecidos mediante inoculación intradérmica en cobayas causaba la regresión completa de dichos tumores en la mayoría de los animales e inhibía la metástasis a los nódulos linfáticos [30,47]. Estos efectos se producían tanto en animales preinmunizados con BCG como en los no inmunizados. Por tanto, el contacto entre las células tumorales y las bacterias inyectadas parecía ser imprescindible. Con posterioridad a estos primeros resultados, otros investigadores han descrito los beneficios obtenidos mediante la inyección intratumoral de BCG en pacientes con melanoma [30,46] y, más recientemente, la prolongación de la supervivencia producida por la inmunoterapia con BCG en pacientes con melanoma en estadios III y IV en comparación con la terapia con interferón [30,48].

Sin embargo, los resultados obtenidos en el tratamiento con BCG de otros tipos de tumores han dado resultados menos prometedores. Un ensayo aleatorizado en pacientes con cáncer de estómago, colon y páncreas dio como resultado que cuando la BCG se administraba intraperitonealmente seguido de varios ciclos de administración oral de BCG se prolongaba la supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico o cáncer de colon, comparado con quienes habían recibido sólo quimioterapia convencional. Sin embargo, sorprendentemente, en los pacientes con cáncer de páncreas se obtenía un resultado opuesto, acortándose en ellos el tiempo de supervivencia [30,14].

Por otra parte, la inyección intratumoral de BCG en pacientes con cáncer de próstata ha resultado ser también aparentemente beneficiosa en algunos ensayos clínicos preliminares [30,49,50], habiéndose obtenido asimismo un aumento de la supervivencia en pacientes con este tipo de cáncer tratados con inmunoterapia con BCG junto a la quimioterapia convencional, en comparación con quienes fueron tratados solamente con

esta última [30,51]. Sin embargo, estos ensayos fueron interrumpidos debido a la aparición de efectos adversos graves en algunos pacientes, aunque ello no ha significado el abandono de la investigación de otros tratamientos del cáncer de próstata basados en la inmunoterapia [30,52].

Tabla 1: Respuesta de la BCG frente a diferentes tipos de cáncer.

ANFITRIÓN	APLICACIÓN	RESULTADOS CLAVE	REFERENCIA
Ratones con cáncer de estómago	Inyectados con BCG	Mayor supervivencia, Desarrollo tumoral lento	[43]
Ratones infectados con BCG	Tumores inoculados subcutáneamente o intraperitonealmente	Resistencia al desarrollo tumoral	[44]
36 pacientes humanos	Inyección de BCG en melanomas subcutáneos malignos	90% lesiones inyectadas regresión o desaparición y el 20% de las no inyectadas	[45,46]
Cobayas con tumores por inoculación intradérmica	Inyección intratumoral de BCG	Regresión de tumores e inhibición de la metástasis	[47]
Pacientes humanos con melanoma III y IV	Inmunoterapia con BCG	Prolongación de la supervivencia en comparación con el interferón	[48]
Pacientes con cáncer gástrico o colon	BCG intraperitoneal y oral	Prolongación de la supervivencia en comparación con la quimioterapia	[14]
Pacientes con cáncer pancreático	BCG intraperitoneal y oral	Disminución de la supervivencia en comparación con la quimioterapia	[14]
Pacientes con cáncer prostático	BCG intratumoral	Aumenta la supervivencia, pero produce efectos adversos graves	[49,50,51,52]

5.3. Perspectivas de futuro.

La tecnología del ADN recombinante ha abierto un campo donde la BCG podría ser usada en la prevención o el tratamiento de una gran variedad de enfermedades. El bacilo

de Calmette-Guérin ha sido modificado genéticamente para conseguir que exprese genes que codifican antígenos específicos de diversos organismos patógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos. Con ello, teóricamente sería posible desencadenar la respuesta inmunitaria no sólo contra la tuberculosis sino también, de manera colateral, frente a esos antígenos, lográndose así una protección extra contra varias enfermedades. Pero, además, algunas cepas de BCG recombinantes (rBCG) han sido manipuladas para hacerlas productoras de diversas citoquinas humanas, generalmente asociadas a respuestas inmunogénicas positivas [30,53].

Aunque algunas de estas cepas recombinantes podrían encontrar aplicación en el aumento de la eficacia de la vacuna frente a la tuberculosis, otras han dado resultados prometedores en el terreno de la terapia anticancerosa. Así, por ejemplo, en la búsqueda de cepas que pudieran inducir una respuesta inmune antitumoral más fuerte y específica, se ha descrito que una rBCG que expresa la subunidad S1 de la toxina de *Bordetella pertussis* prolongó la supervivencia de ratones inoculados con células de cáncer de vejiga murino e incrementó en los mismos la producción de las citoquinas TNF- α y IL-10, en comparación con ratones tratados con BCG convencional [30,54]. Un resultado similar, en lo que a supervivencia se refiere, fue obtenido utilizando una rBCG que secreta INF- γ murino [30,55].

En un intento de ampliar el número de tipos de cáncer susceptibles de ser tratados con BCG, en el año 2003 Chung y colaboradores construyeron la cepa rBCG-hIL2-MUC1, que expresa la IL-2 humana, así como una forma truncada de la glicoproteína de membrana mucina-1, con objeto de evaluar su efecto en un modelo murino de cáncer de mama [30,56]. El resultado obtenido fue que la vacunación de los animales con esta cepa, previamente a la inoculación de las células cancerosas, inhibió el desarrollo de los tumores, indicando la capacidad inmunoprotectora de esta cepa recombinante, así como de otras de características similares construidas posteriormente. Desafortunadamente, en ningún caso el valor de estos resultados ha sido evaluado en ensayos clínicos.

6. Conclusiones.

1. Además de su utilidad para la prevención de la tuberculosis, la vacuna BCG es un potente agente inmunomodulador lo que puede permitir su aplicación como agente inmunoterapéutico en el tratamiento de otras enfermedades, y en particular en el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

2. Desde 1990 la BCG constituye una herramienta fundamental en el tratamiento del cáncer de vejiga, ya que en este órgano se produce una reacción de hipersensibilidad retardada frente al estímulo antigénico que provoca la destrucción de las células cancerosas y la regresión del tumor. Sin embargo, el mecanismo por el cual la BCG ejerce su efecto anticanceroso no se conoce con exactitud, por lo que resulta necesario llegar a conocer en profundidad dicho mecanismo, lo que permitirá el establecimiento

de esquemas terapéuticos que mejoren la efectividad de este y reduzcan sus efectos secundarios.

3. Un fuerte efecto inmunomodulador y antitumoral contra las células del cáncer de vejiga, similar al producido por la BCG, se consigue mediante la administración de nanoencapsulados que contienen la pared celular del bacilo. Estas preparaciones reducen los efectos secundarios causados por la vacuna y constituyen alternativas eficientes y, aparentemente, seguras a la BCG.

4. Estudios preclínicos y clínicos evidencian la posibilidad de uso de BCG en otros tipos de tumores diferentes al de vejiga, pero el resultado obtenido es variable. La administración intratumoral, en lesiones de melanoma, o intraperitoneal seguida de varios ciclos de administración oral, en el cáncer gástrico y el cáncer de colon, prolongan la supervivencia de los pacientes.

5. La construcción de cepas de BCG recombinantes, portadoras de genes que codifican antígenos de diversos patógenos o citoquinas humanas, podrían mejorar la eficacia de la vacuna antituberculosa y ampliar su rango de aplicación a la prevención de otras enfermedades. Además, algunas de estas cepas han dado ya resultados prometedores en el terreno de la terapia anticancerosa, aunque el valor de estos resultados no ha sido aún evaluado en ensayos clínicos.

7. Bibliografía.

1. Tuberculosis. [internet]. [consultado 8 mayo 2019].
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tuberculosis.html>
2. Gandhi NM, Morales A, Lamm DI. Bacillus Calmette- Guérin immunotherapy for genitourinary cancer. *BJU International*. 2013;112:288-297.
3. Crispen R. History of BCG and its substrains. En A Liss (ed.), *EORTC Genitourinary Group Monograph 6: BCG in Superficial Bladder Cancer*, New York: John Wiley and Sons. 1989:35–50.

4. Teo SSS, Shingadia D. BCG Vaccine. En: Pollard A.J., Finn A. (eds) Hot Topics in Infection and Immunity in Children II. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer, Boston, MA. 2005;568:117-134.
5. Corbel MJ, Fruth U, Griffiths E, Knezevic I. Report on a WHO Consultation on the characterisation of BCG strains, Imperial College, London 15–16 December 2003. *Vaccine*. 2004;22(21-22):2675-2680.
6. Manzanilla-García HA, Maldonado-Ávila M, Aguilar-Barradas J, Lira-Dale A. Inmunoterapia con el bacilo de Calmette-Guérin en el tratamiento del carcinoma superficial de vejiga. *Rev Mex Urol*. 2009;69(6):307-313.
7. Meyer JP, Persad R, Gillatt DA. Use of bacille Calmette-Guérin in superficial bladder cancer. *Postgrad Med J*. 2002;78:449-454.
8. Quezada-Andrade S, Sánchez-Giler S, Vacuna contra la tuberculosis BCG: Eficacia y efectos adversos. *Rev UNEMI*. 2015;8(16):120-125.
9. World Health Organization. (2010). WHO global tuberculosis control: WHO report 2010. [internet]. [consultado 10 mayo 2019].
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44241/1/9789241598866_eng.pdf?ua=1
10. Lamm DL. Long term results of intravesical therapy for superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am*. 1992;19:573-580.
11. Holmgren I. La tuberculine et le BCG chez les cancéreux. *Schweiz. Med. Wochenschr*. 1935;65:1203-1206.
12. Coe JE, Feldman JD. Extracutaneous delayed type hypersensitivity, particularly in the guinea pig bladder. *Immunol*. 1966;10:127-136.
13. Morton DL, Holmes EC, Eilber FR. Immunological aspects of neoplasia: a rational basis for immunotherapy. *Ann Intern Med*. 1971;74(4):587-604.

14. Falk RE, MacGregor AB, Ambus U, Landi S, Miller AB, Samuel ES, et al. Combined treatment with BCG and chemotherapy for metastatic gastrointestinal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1977;20(3):215–222.
15. Morales A, Eiding D, Bruce AW. Intracavitary bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*. 1976;116:180-183.
16. Zbar B, Bernstein ID, Rapp HJ. Suppression of tumor growth at the site of infection with living *Bacillus Calmette-Guérin*. *J Natl Cancer Inst*. 1971;46(4):831-839.
17. Zbar B, Rapp HJ. Immunotherapy of guinea pig cancer with BCG. *Cancer*. 1974;34:1532-1540.
18. Simons MP, Nauseef WM, Griffith TS. Neutrophils and TRAIL: Insights into BCG immunotherapy for bladder cancer. *Immunol. Res*. 2007;39:79–93.
19. Rossi R, Lichtner M, Iori F, et al. Dendritic cells in blood and urine samples from bladder cancer patients undergoing BCG immunotherapy. *Arch. Ital. di Urol. Androl*. 2013;85(4):157–163.
20. Thompson DB, Siref LE, Feloney MP, Hauke RJ, Agrawal DK. Immunological basis in the pathogenesis and treatment of bladder cancer. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;11(2):265-79.
21. Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, et al. FGFR3 and TP53 Gene Mutations Define Two Distinct Pathways in Urothelial Cell Carcinoma of the Bladder. *Cancer Res*. 2003;63:8108–8112.
22. Buss JH, Begnini KR, Bender CB, Pohlmann AR, Guterres SS, Collares T, Seixas FK. Nano-BCG: A Promising Delivery System for Treatment of Human Bladder Cancer. *Front Pharmacol*. 2018;8:977.
23. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part A: renal, penile, and testicular tumours. *Eur Urol*. 2016; 70:93–105.

24. Sobin L, Gospodarowicz MWC. TNM: Classification of Malignant Tumours. Oxford, UK: Wiley-Blackwell;2009.
25. Ahn J. J., Ghandour R. A., McKiernan J. M. New agents for bacillus Calmette-Guérin-refractory nonmuscle invasive bladder cancer. *Curr. Opin. Urol.* 2014; 24:540–545.
26. Smith SG, Zaharoff DA. Future directions in bladder cancer immunotherapy: towards adaptive immunity. *Immunotherapy.* 2016;8(3):351-65.
27. Redelman-Sidi G, Glickman M, Bochner B. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer – a current perspective. *Nat. Rev. Urol.* 2014;11(3):153–162.
28. Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmström PU, Choi W. Bladder cancer. *Lancet.* 2016;338:2796–2810.
29. Kavoussi LR, Brown EJ, Ritchey JK, Ratliff TL. Fibronectin-mediated Calmette-Guerin bacillus attachment to murine bladder mucosa. Requirement for the expression of an antitumor response. *J Clin Invest.* 1990; 85(1):62–67.
30. Yuan-qiang Zheng, Youssef W. Naguib, Yixuan Dong, Yan-chun Shi, Shorgan Bou, Zhengrong Cui. Applications of bacillus Calmette-Guerin and recombinant bacillus Calmette-Guerin in vaccine development and tumor immunotherapy. *Expert Rev Vaccines.* 2015;14(9):1255–1275.
31. Terapia intravesical para el cáncer de vejiga. [internet]. [consultado 9 mayo 2019]. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-vejiga/tratamiento/terapia-intravesical.html#referencias>
32. Fernández-Cañabate E, Longoni-Merino M. Infección sistémica secundaria a instalación vesical con BCG. *Farm Hosp.* 2006;30:313- 323.
33. Ratliff TL, Hudson MA, Catalona WJ. Strategy for improving therapy of superficial bladder cancer. *World J Urol.* 1991;9:95-98.

34. Manoharan M, Soloway MS. Optimal management of the T1G3 bladder cancer. *Urol Clin N Am.* 2005;32:133-145.
35. Nogueira-March JL, Ojea-Calvo A, Rodríguez-Iglesias F, et. al. Indicaciones de la BCG en los tumores superficiales de vejiga. *Actas Urol Esp.* 1999;23(8):643-656.
36. Meyer JP, Persad R, Gillatt DA. Use of bacille Calmette-Guérin in superficial bladder cancer. *Postgrad Med J.* 2002;78:449-454.
37. Wang Z, Xiao H, Wei G, Zhang N, Wei M, Chen Z, Peng Z, Peng S, Qiu S, Li H, Long J. Low-dose Bacillus Calmette-Guerin versus full-dose for intermediate and high-risk of non-muscle invasive bladder cancer: a Markov model. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1108.
38. Lamm DL. Efficacy and safety of bacille Calmette-Guerin immunotherapy in superficial bladder cancer. *Clin Infect Dis.* 2000;31(3):86–90.
39. Luftenegger W, Ackermann DK, Futterlieb A. Intravesical versus intravesical plus intradermal bacillus Calmette-Guerin: a prospective randomized study in patients with recurrent superficial bladder tumors. *J Urol.* 1996;155:483–487.
40. Nakamura T, Fukiage M, Suzuki Y, Yano I, Miyazaki J, Nishiyama H. Mechanism responsible for the antitumor effect of BCG-CWS using the LEEL method in a mouse bladder cancer model. *J. Control Release.* 2014;196:161–167.
41. Joraku A, Homhuan A, Kawai K, Yamamoto T, Miyazaki J, Kogure K. Immunoprotection against murine bladder carcinoma by octaarginine-modified liposomes incorporating cell wall of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *BJU Int.* 2008;103:686–693.
42. Shahin O, Thalmann GN, Rentsch C, et al. A retrospective analysis of 153 patients treated with or without intravesical bacillus CalmetteGuérin for primary stage T1 grade 3 bladder cancer: recurrence, progression and survival. *J Urol.* 2003;169(1):96-100.

43. Holmgren I. Employment of B. C. G. especially in Intravenous Injection. *Acta Medica Scandinavica*. 1936;90(78):350–361.
44. Old LJ, Clarke DA, Benacerraf B. Effect of Bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature*. 1959;184(5):291–292.
45. Morton D, Eilber FR, Malmgren RA, Wood WC. Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. *Surgery*. 1970; 68(1):158–163.
46. Rosenberg SA, Rapp HJ. Intralesional immunotherapy of melanoma with BCG. *Med Clin North Am*. 1976;60(3):419–430.
47. Zbar B, Tanaka T. Immunotherapy of cancer: regression of tumors after intralesional injection of living Mycobacterium bovis. *Science*. 1971; 172(3980):271–273.
48. Stewart JH, Levine EA. Role of bacillus Calmette-Guerin in the treatment of advanced melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011;11(11):1671–1676.
49. Robinson MR, Rigby CC, Pugh RC, Dumonde DC. Prostate carcinoma: intratumor BCG immunotherapy. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1978;(49):351–353.
50. Robinson MR, Rigby CC, Pugh RC, Dumonde DC. Adjuvant immunotherapy with B.C.G. in carcinoma of the prostate. *Br J Urol*. 1977; 49(3):221–226.
51. Guinan PD, John T, Baumgartner G, Sundar B, Ablin RJ. Adjuvant immunotherapy (BCG) in stage D prostate cancer. *Am J Clin Oncol*. 1982; 5(1):65–68.
52. Risk M, Corman JM. The role of immunotherapy in prostate cancer: an overview of current approaches in development. *Rev Urol*. 2009;11(1):16–27.
53. Luo Y, Henning J, O'Donnell MA. Th1 cytokine-secreting recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin and prospective use in immunotherapy of bladder cancer. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:728-930.

54. Chade DC, Borra RC, Nascimento IP, Villanova FE, Leite LC, Andrade E, et al. Immunomodulatory effects of recombinant BCG expressing pertussis toxin on TNF-alpha and IL-10 in a bladder cancer model. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008; 27:78.

55. Arnold J, de Boer EC, O'Donnell MA, Bohle A, Brandau S. Immunotherapy of experimental bladder cancer with recombinant BCG expressing interferon-gamma. *J Immunother.* 2004;27(2):116–123.

56. Chung MA, Luo Y, O'Donnell M, Rodriguez C, Heber W, Sharma S, et al. Development and preclinical evaluation of a Bacillus Calmette-Guerin-MUC1-based novel breast cancer vaccine. *Cancer Res.* 2003;63(6):1280–1287.