***Bordetella pertussis*: Participação da arginase, TGF- β e
TLR4 no controle da síntese de óxido nítrico em
macrófagos derivados de medula óssea murina.**

ANDREZA DA SILVA ROSETTI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção
do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia
Orientador: Monamaris Marques Borges
Co-orientador: José Abrahão Neto

**São Paulo
2009**

ROSETTI, A.S. *Bordetella pertussis*: participação da arginase, TGF- β e TLR4 no controle da síntese de óxido nítrico em macrófagos derivados de medula óssea murina. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Bordetella pertussis e *Bordetella parapertussis* são os principais agentes causadores da coqueluche no homem. Estas duas bactérias não induzem proteção cruzada, e os mecanismos imunes desenvolvidos em resposta a estas infecções não foram definidos. Estes dados sugerem a importância de esclarecermos mecanismos comuns entre estas bactérias que favoreça o entendimento desta patologia e contribua para o esclarecimento do papel dos componentes bacterianos envolvidos na ativação imune. Macrófagos possuem papel importante na regulação do sistema imune, principalmente na fase inicial da resposta imune. A geração de óxido nítrico é um dos principais processos de ativação destas células sendo fundamental para o controle de diversos processos fisiopatológicos incluindo a destruição de microrganismos infecciosos. IFN- γ e LPS são alguns dos principais indutores de NO. IL-10 e TGF- β controlam negativamente a ativação das células fagocíticas reduzindo a produção de óxido nítrico (NO), isto se dá em parte devido ao TGF- β estimular a atividade de arginase, que compete com iNOS pelo mesmo substrato L-arginina levando a formação de uréia e redução de óxido nítrico. Além disto, bactérias gram-negativas como *B. pertussis* e *B. parapertussis* possuem em sua membrana LPS (lipopolissacarídeo) que é reconhecido por receptores presentes na superfície dos fagócitos denominados Toll Like-4 (TLR-4) que é um dos principais reguladores de mecanismos de imunidade inata. Pouco conhecemos sobre o papel deste receptor durante a infecção com *Bordetella* sp. *Bordetella pertussis* é capaz de invadir macrófagos, porém desconhecemos os mecanismos utilizados por esta bactéria para manipular estas células e garantir sua sobrevivência durante as primeiras horas de infecção. Neste trabalho analisamos *in vitro*, em culturas de macrófagos derivados de medula óssea murina (BMDMO), a influência da estimulação provocada por *B. pertussis* e *B. parapertussis* e o envolvimento de alguns mediadores imunes dentre eles TGF- β , arginase, TLR-4 e a contribuição da toxina pertussis na regulação da produção de NO. Nossos resultados mostraram que: BMDMO de camundongos C57BL/6 estimulados com antígeno solúvel ou infectados ativamente com *B. pertussis* não foram capazes de sintetizar níveis significativos de nitrito, ao contrário do obtido na infecção com *B. parapertussis*. A baixa síntese de nitrito foi revertida pela adição exógena de L-arginina às culturas de macrófagos ativados, elevando a geração de NO sendo este superior ao

encontrado no grupo controle não tratado. Macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados por 6 horas com *B. pertussis* e por 24 horas com *B. parapertussis* produziram altas quantidades de arginase determinada em função do nível de uréia. O bloqueio de TGF- β , através da adição de anti-TGF- β às culturas de macrófagos ativados com *B. pertussis*, reduziu a síntese de arginase e favoreceu a produção de nitrito, sugerindo o envolvimento destes mediadores no controle da produção de NO no modelo estudado. BMDMO de C57BL/6 ativados com ambas as bactérias secretaram grande quantidade de TGF- β no sobrenadante das culturas, confirmando a participação desta citocina neste mecanismo. Ao analisarmos a contribuição da toxina pertussis (PT) no modelo estudado através da adição exógena desta às culturas de macrófagos infectados com *B. parapertussis*, notamos que houve redução na produção de NO se comparado ao grupo controle apenas infectado. Macrófagos de camundongos C3H/HeJ (deficientes na resposta ao LPS) não produziram arginase e TGF- β em resposta a infecção com *B. pertussis* ou *B. parapertussis* sugerindo que a síntese destes mediadores foi dependente de TLR-4. No entanto estes macrófagos sintetizaram grande quantidade de NO em resposta a infecção com *B. parapertussis* sugerindo que esta resposta não foi exclusivamente em resposta ao LPS sendo independente de TLR-4. Concluímos que TGF- β e arginase contribuem para o controle da produção de NO durante a infecção “*in vitro*” de BMDMO com *B. pertussis*. Este mecanismo foi dependente de LPS envolvendo TLR-4 e toxina pertussis. Comprovamos também que *B. parapertussis* ativa diferentemente BMDMO, uma vez que a produção de NO foi independente de TLR-4.

Palavras-chave: *Bordetella pertussis*. Óxido nítrico. Macrófagos. TGF- β . Arginase. TLR4.

ROSETTI, A.S. *Bordetella pertussis*: role of arginase, TGF- β and TLR4 during nitric oxide synthesis by murine bone marrow-derived macrophages. 98 f. Dissertation (Master degree in Biotechnology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

Bordetella pertussis and *Bordetella parapertussis* are the main etiologic causes of human whooping cough. These bacteria do not induce cross-protection and the immune mechanisms involved in protection against them have not been defined. Altogether this prompted us to study the pathways triggered by these two bacteria, aiming to contribute to our understanding of the pathogenesis of human whooping cough and uncovering the bacterial components involved in activation of the immune system. Macrophages play an important role in the regulation of the immune system, mainly during the early phases of the immune response. The production of nitric oxide (NO) occurs after activation of these cells and plays a crucial role during several physiopathologic events, including microorganism destruction. IFN- γ and LPS are among the most important triggers of NO. IL-10 and TGF- β down-regulate the activation of phagocytic cells, decreasing NO production. This occurs partially through the ability of TGF- β to stimulate arginase activity, which competes with iNOS for the substrate L-arginine, reducing the production of nitric oxide and increasing urea formation. Moreover, gram-negative bacteria such as *B. pertussis* and *B. parapertussis* have lipopolysaccharide (LPS), which is recognized by surface receptors named Toll-like receptor 4 (TLR-4). TLR-4 is one of the most important regulators of innate immunity. Little is known about the role of this receptor during infection with *Bordetella* sp. *Bordetella pertussis* invades macrophages but the mechanisms by which the former manipulate the latter to warrant their survival during the first hours after infection remain unknown. Herein we analyzed the molecular signals required for NO production by murine bone marrow-derived macrophages (BMDM) infected with *B. pertussis* or *B. parapertussis*. We studied the role played by some mediators such as TGF- β and arginase and the contribution of Pertussis toxin and TLR-4 for the regulation of NO production. Our data shows that BMDM from C57Bl/6 mice when stimulated with soluble antigen or infected with *B. pertussis* were not capable of producing measurable levels of nitrite. On contrary, infection with *B. parapertussis* induced high levels of nitrite. Low production of nitrite was reversed by exogenous addition of L-arginine to the cultures. High levels of arginase were detected in C57Bl/6 BMDM after 6 hours of infection with *B. pertussis* and after 24 hours with *B. parapertussis*. Blockage of TGF- β with neutralizing antibodies reduced arginase synthesis and favored nitrite production, suggesting the involvement

of these molecules in the regulation of NO synthesis in our model. C57Bl/6 BMDM secreted large quantities of TGF- β , as measured in the cultures supernatant, after infection with *Bordetella* species, suggesting the participation of this cytokine in the immune response. The addition of Pertussis toxin (PT) to the cultures of macrophages infected with *B. paraptussis* led to decrease of NO production when compared to untreated cultures. Macrophages derived from C3H/HeJ (unresponsive to LPS) did not produce arginase and TGF- β in response to infection with *B. pertussis* or *B. paraptussis* suggesting that the synthesis of these mediators depends on TLR-4 signaling. Nevertheless, these cells produced large quantities of NO during infection with *B. paraptussis*, suggesting there is a TLR-4-independent pathway being activated by these bacteria. In conclusion, TGF- β and arginase contribute to NO production during in vitro infection of BMDM by *B. pertussis*. This occurs through a TLR-4- and Pertussis toxin-dependent pathways. We also showed that in the case of *B. paraptussis* infection, there is a TLR-4-independent pathway regulating NO production.

Key words: *Bordetella pertussis*. Nitric oxide. Macrophage. TGF- β . Arginase. TLR4.

1 Introdução

1.1 O desenvolvimento da infecção com *Bordetella pertussis*

A bactéria *Bordetella pertussis* é um cocobacilo Gram-negativo agente causador da coqueluche ou tosse comprida. Foi originalmente isolado em 1906 por Bordet e Gengou (1906).

A coqueluche é transmitida mediante o contato das secreções respiratórias ou de aerossóis de um indivíduo infectado para o trato respiratório de um indivíduo sadio. É considerada uma doença respiratória altamente contagiosa, sendo caracterizada por broncopneumonia, tosse paroxística que pode levar a complicações para o paciente, principalmente recém nascidos, dentre as quais convulsões, encefalopatia, encefalite, danificações permanentes no cérebro e morte (WORTIS et al., 1996; CHERRY et al., 1998; SMITH et al., 2001).

A coqueluche é uma doença que desafia diversos pesquisadores, médicos, microbiologistas e epidemiologistas em todo mundo. Apesar de parcialmente controlada pela vacinação, é considerada uma das dez doenças que mais causam morte em bebês no mundo e em populações com crianças não vacinadas (MURRAY et al., 1996; CROWCROFT et al., 2003).

Embora a *Bordetella pertussis* seja suscetível à maioria dos antibióticos, estes não são eficientes no tratamento, principalmente, porque, quando o quadro é diagnosticado, a bactéria já se instalou e causou danos ao trato respiratório.

A infecção inicia-se com a penetração das bactérias, presentes em gotículas expelidas pela tosse de indivíduos infectados, nas vias aéreas do hospedeiro sadio. Em seguida, as bactérias aderem às células epiteliais ciliadas da traquéia e nasofaringe. Posteriormente, começam a replicar-se e a colonizar áreas adjacentes produzindo toxinas que danificam o epitélio, resultando em perda das células ciliadas, o que acarreta a tosse característica. Além de se multiplicarem extracelularmente, estas bactérias podem invadir e sobreviver dentro de macrófagos e neutrófilos ou outros tipos celulares (BROMBERG et al., 1991; SAUKONEN et al., 1991, STEED et al., 1992). Em seguida, a *B. pertussis* invade e danifica o epitélio alveolar mediante a ação combinada de vários fatores de virulência, que interferem no movimento ciliar normal e auxiliam a sobrevivência da bactéria no trato respiratório. Dentre

esses fatores, podem ser citados: filamentos de hemaglutinina (FHA), pertactina (PRN), fímbrias (FIM) e o fator de colonização traqueal.

Dentre as toxinas produzidas por esta bactéria, destacam-se: a toxina pertussis (PT), a citotoxina traqueal (TCT), a adenilato ciclase (ACT), a toxina termo lábil e endotoxina ou LPS. Todas estão relacionadas tanto com a patogênese da infecção quanto com a proteção imune. Com o comprometimento das funções ciliares, há alterações na célula hospedeira, que ocorrem via cascata de sinalização mediada por receptores de proteína G. Como consequência, há inibição das funções celulares provocadas, principalmente, pela ação da toxina pertussis e adenilato ciclase produzidas, que promovem a elevação dos níveis de cAMP intracelular (SMITH et al., 2001).

O período de incubação desta infecção varia entre 6 e 21 dias, mas tipicamente ocorre entre 6 a 10 dias. Os sintomas podem persistir por muito tempo após a infecção do organismo.

Clinicamente, há três fases após o período de incubação. A primeira fase é denominada de *fase catarral*, que dura de 1 a 2 semanas, sendo esta a fase mais contagiosa. Em seguida, ocorre a *fase paroxística*, caracterizada por acessos de tosse, seguida de expectoração de um muco claro, viscoso, espesso e vômitos. Esta fase geralmente perdura por 3 a 6 semanas. Em uma terceira fase, denominada de *fase de convalescência*, os sintomas diminuem gradualmente, a expectoração desaparece, mas a tosse persiste por até 3 semanas, podendo durar diversos meses. O curso clínico da infecção é influenciado por fatores diversos tais como: idade, sexo e estado de imunização dos pacientes. Muitos recém-nascidos não desenvolvem a tosse paroxística característica. Adolescentes e adultos raramente apresentam os 3 estágios típicos da coqueluche, podendo apresentar somente tosse (DE SERRES et al., 2000; SENZILET et al., 2001)

Os riscos de complicações são mais elevados entre recém nascidos, se comparados aos riscos entre adolescentes e adultos. As complicações mais graves e freqüentes em recém nascidos são pneumonia e vômito, que podem levar à desnutrição dos recém-nascidos, que não conseguem se alimentar, além de complicações neurológicas, decorrentes da hipoxia que ocorre nos momentos de apnéia (HEININGER et al., 1997; WIRSING VON KONING et al., 2002), sinusite, superinfecções bacterianas e virais.

Em 1990, foi estimado no mundo que 500.000 crianças sofreram complicações neurológicas decorrentes da coqueluche (IVANOFF, 1997). Além disto, foi notificado que houve encefalopatia em 0,9 de 100.000 casos de coqueluche (PERTUSSIS, 2002). Os recém-

nascidos, especialmente aqueles que não foram vacinados ou com vacinação incompleta, são os que requerem maiores cuidados, sendo os mais severamente atingidos.

1.2 Epidemiologia

A incidência de coqueluche no mundo foi muito reduzida desde a introdução da vacina, em 1940, conhecida como “whole-cell” ou vacina de células inteiras. Apesar de terem se passado décadas com alta cobertura de vacinação, a infecção com *B. pertussis* não foi erradicada em nenhum país.

Em 1990 houve ocorrência global de 50 milhões de casos de *B. pertussis* e mais de 300 mil mortes de crianças, provocada pela doença (PERTUSSIS VACCINES, 1999). No Brasil, foram notificados em 2002, cerca de 2 mil casos de coqueluche (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Embora a vacinação tenha reduzido drasticamente a incidência de coqueluche nas últimas décadas, muitos países, tanto desenvolvidos quanto em desenvolvimento, tem relatado a reemergência desta infecção entre crianças e jovens vacinados ou mesmo entre adolescentes e adultos (SENZILET et al., 2001; SKOWRONSKI et al., 2002; TANAKA et al., 2003, NTEZAYABO et al., 2003).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o número de mortes provocadas por *B. pertussis* em crianças menores de 5 anos de idade, em 2002, foi de 294.000, tendo havido uma redução para 236.844 casos em 2004. Nesse ano, foi notificado que 78% das crianças não receberam a terceira dose de vacina para difteria, tétano e pertussis, deixando desprotegidos 27 milhões de crianças, dos quais 75% estavam na África Sub-Saariana e Sul da Ásia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Esta infecção permanece como desafio clínico, todas as idades podem ser afetadas, é difícil comparar dados de diferentes países devido às diferenças existentes nos sistemas de vacinação, práticas clínicas para definições de casos, métodos diagnósticos e políticas de saúde públicas vigentes (TAN et al., 2005). Outra barreira são as notificações clínicas, pois pacientes sem sintomas típicos (como tosse prolongada, paroxismo ou vômito) passam como assintomáticos se confundindo com outras infecções e permanecendo como fonte da infecção.

As evidências mostram que adultos, freqüentemente assintomáticos, possuem papel importante na transmissão da infecção para crianças (BASS et al., 1994; BARON et al., 1998), às vezes, com conseqüências fatais para estas (HEININGER et al., 1996). As principais fontes da infecção para recém-nascidos são mães, adolescentes, crianças pré-

vacinadas (BARON et al., 1998; GURIS et al., 1999; CROWCROFT et al., 2003;) e agentes da saúde (GEHANNO et al., 1999). Os adolescentes tendem a serem infectados pelos amigos da escola (DE SERRES et al., 2000).

O ressurgimento da infecção entre adolescentes e crianças pré-vacinadas foi relatado mesmo em países desenvolvidos e com alta cobertura vacinal como a Bélgica, Espanha, França, Austrália, Canadá e Estados Unidos (NTEZAYABO et al., 2003; TANAKA et al., 2003; VITEK et al., 2003). Ainda assim, persiste a dúvida se estaria havendo aumento de incidência da infecção ou melhoria nos métodos laboratoriais para sua identificação?. Nesses países, algumas hipóteses são apontadas para justificar o ressurgimento da doença: falha no processo de vacinação, mudanças genéticas da bactéria, perda gradual da imunidade adquirida, o aumento do número de portadores assintomáticos e a seleção natural de variantes resistentes à vacina. No Canadá e na Holanda, o aumento da incidência foi correlacionado à ineficácia da vacina (NTEZAYABO et al., 2003), atribuindo-se a polimorfismos nos genes que codificam a pertactina e toxina pertussis, com possível evolução de cepas circulantes (MOOI et al., 2001).

Em 1983, o Brasil introduziu o uso sistemático da vacina tríplice (DTP), após trinta anos do início da vacinação em países desenvolvidos. Desde então, em resposta ao aumento da cobertura vacinal, houve redução no número de casos notificados (WALDMAN, 1999). As crianças menores de um ano são as mais acometidas pela doença, seguidas daqueles com idade entre 1 e 4 anos e, por último, as crianças de 5 a 9 anos. Os adultos correspondem a apenas 2 a 3% dos casos (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

A dinâmica da coqueluche envolvendo os países desenvolvidos e o Brasil suscita a seguinte questão: será que no Brasil a coqueluche está sob controle, como parecem indicar os dados de notificação, ou existe uma mudança gradual na dinâmica da transmissão, que não foi detectada pelos sistemas de vigilância epidemiológica?

Apenas os dados do Ministério da Saúde são fontes de informações que nos possibilitam acompanhar reemergência ou não da coqueluche no Brasil. Há dados mostrando que, em 1997, houve aumento de casos e internações, interrompendo a redução da doença, estabelecida na década de 1990. A região Norte e Sudeste foram responsáveis respectivamente por 45% e 19% das notificações e de 4 e 48% de internações no país.

Não há no Brasil um estudo cuidadoso sobre se os fatos ocorridos em outros países, poderiam estar ocorrendo no nosso país, uma vez que somente os casos sintomáticos e característicos em recém-nascidos são notificados, enquanto a população adulta ou

adolescente pode estar passando despercebida pelo Sistema de Saúde. Nos países onde houve reemergência da infecção, observou-se uma correlação entre o aumento do número de casos em adultos e maior incidência da infecção em crianças. Como nosso processo de vacinação em massa se iniciou posteriormente, pode haver aqui uma dinâmica de transmissão diferente se comparada a outros países, e não podemos descartar a hipótese de ocorrência de uma reemergência da doença em nosso país, o que merece atenção e acompanhamento pelos serviços de saúde no país.

É fundamental que os serviços de vigilância sanitária e controle desta doença em nosso país monitorem a situação epidemiológica da coqueluche para que, se necessário, estejam preparados para reformular suas estratégias de imunização.

1.3 Patogenia da infecção por *Bordetella pertussis*

As principais espécies que compõem o gênero *Bordetella* sp são cocobacilos Gram negativos estritamente aeróbicos, que apresentam similaridades entre si. Foram descritas as seguintes espécies associadas ao gênero *Bordetella*: 1. *Bordetella pertussis*, 2. *Bordetella parapertussis* 3. *Bordetella bronchiseptica*, 4. *Bordetella avium*, 5. *Bordetella hinzii*, 6. *Bordetella holmesii*, 7. *Bordetella trematum*.

Tabela 1: Comparação entre as quatro espécies mais estudados do gênero *Bordetella*.

Fatores de Virulência	<i>Bordetella</i> sp			
	<i>B.pertussis</i>	<i>B.parapertussis</i>	<i>B.bronchiseptica</i>	<i>B.avium</i>
FHA	X	X	X	-----
Fímbrias (Aglutinógenos)	X	X	X	X
Pertactina (PRN)	X	X	X	X
Toxina pertussis	X	-----	-----	-----
Adenilato ciclase (hemolisina)	X	X	X	-----
Toxina dermonecrótica	X	X	X	X
Citotoxina traqueal	X	X	X	X
Lipopolissacarídeo	X	X	X	X
Fator de colonização traqueal	X	-----	-----	-----
Proteínas do locus da soro resistência (brk)	X	X	X	-----

Presente = (X) Ausente = (-----)

Enquanto a *Bordetella pertussis* é restrita aos seres humanos, a *Bordetella parapertussis* infecta mais raramente os seres humanos, causando coqueluche mais branda, sendo muitas vezes encontrada associada a infecções respiratórias em carneiros. A *Bordetella bronchiseptica* é raramente encontrada no homem, sendo mais frequente em animais, como cães, macacos, coelhos, suínos e cavalos (COOKSON et al., 1994; WEYANT et al., 1995; VAN DAMME et al., 1996). Estas três espécies causam doença respiratória que envolve a destruição do epitélio ciliado com morte destas células (VAN DAMME et al., 1995), mas são distintas, possuindo diferenças fenotípicas no crescimento em ágar sangue livre de peptona, na motilidade, na atividade da urease e na redução do nitrato (SMITH et al., 2001). Em comparação a outras bactérias patogênicas, a diversidade genética entre estas três espécies de *Bordetella* é limitada. Estudos filogenéticos, realizados através de hibridização de DNA ou por eletroforese de enzimas codificadas por multi-locus (MLEE), mostraram que estas três espécies são relacionadas (MÜLLER e HILDEBRANDT, 1993; GERLACH et al., 2001).

Embora *B. pertussis* e a *B. parapertussis* sejam espécies muito próximas e causadoras da coqueluche, a vacina atual não confere imunidade protetora contra *B. parapertussis*. Assim, pode ser que a reemergência da coqueluche de *B. pertussis* esteja associada à infecção por *B. parapertussis*. Diferente da infecção com *B. pertussis*, a infecção por *B. parapertussis* provoca doença pouco severa em humanos (HEININGER et al., 1994; BERGFORS et al., 1999).

Contudo estudos recentes mostram que a infecção de ratos com *B. parapertussis* protegeu contra ambas as espécies microbianas. Além disto, a distinção destes dois patógenos é bastante difícil, e os dados disponíveis sobre a ocorrência da infecção por *B. parapertussis* são limitados e pouco esclarecedores (RESTIF et al., 2008). Estas espécies possuem fatores de virulência similares, porém com duas diferenças fundamentais: 1) a ausência da toxina pertussis em *B. parapertussis*, em razão de uma mutação gênica no locus *vir*; 2) variação estrutural no LPS de *B. pertussis* na qual o antígeno O está ausente, em virtude de uma deleção de 20kb no locus *wbm* responsável pela síntese deste antígeno.

O LPS tem um padrão molecular que favorece um maior protagonismo no relacionamento hospedeiro-bactéria, conduzindo a numerosos processos de ativação de células apresentadoras de antígenos profissionais, tal como macrófagos e células dendríticas. As diferenças estruturais nos LPS entre as duas espécies de *Bordetella* podem influenciar as diferenças na patogênese. Alguns estudos sugerem que o antígeno O facilita a propagação

sistêmica de *B. parapertussis*, mediante da evasão do sistema complemento (WOLFE et al., 2007; GOEBEL et al., 2008).

A *Bordetella avium* é um patógeno isolado de pássaros, causa coriza em peru e outras doenças respiratórias em aves (KERSTERS et al., 1984). Mais recentemente, novos membros foram propostos para serem incorporados a este gênero, como a *B. hinzii*, *B. holmesii* e *B. trematum*. A *Bordetella hinzii*, foi isolada de um indivíduo infectado com HIV (COOKSON et al., 1994) e é responsável por doenças respiratórias oportunistas em aves domésticas (VAN DAMME et al., 1995). A *Bordetella holmesii*, foi descrita associada a um caso de septicemia humana (WEYANT et al., 1995) e a *Bordetella trematum* foi recentemente proposta como nova espécie, isolada de ferimentos e infecções do ouvido em humanos (VAN DAMME et al., 1996).

Embora nenhuma destas novas espécies esteja associada a infecções do trato respiratório, elas apresentaram similaridades aos outros membros do gênero com base em análises filogenéticas (COOKSON et al., 1994; WEYANT et al., 1995; VAN DAMME et al., 1996).

Os principais componentes de *B. pertussis* são: adesinas (hemaglutinina filamentosa, fímbrias e pertactina) e toxinas (toxina pertussis, adenilato ciclase, citotoxina traqueal, toxina dermonecrotica), além de LPS e Brk (BrkA e BrkB).

A invasão e persistência da *B. pertussis* é resultante da expressão de genes de adesinas, envolvidas no contato com as células do hospedeiro, e de toxinas que modulam o seu sistema imune. Os estudos de mutagênese mostraram que muitas destas adesinas e toxinas são requeridas para persistência da bactéria em modelos animais *in vivo* (WEISS et al., 1989; GROSS et al., 1992).

Muitos dos fatores de virulência de *B. pertussis* foram explorados quanto à sua capacidade imunogênica para serem utilizados como componentes de uma vacina denominada acelular.

A vacina pertussis acelular licenciada em alguns países é composta de cinco componentes antigênicos: FHA, fímbrias 2 e 3, pertactina, e toxina pertussis inativada. Outra formulação é feita com três componentes: pertactina, FHA e toxina pertussis inativada, sendo esta a única apresentação licenciada até o momento no Brasil.

1.3.1 Hemaglutinina Filamentosa (FHA)

A FHA é uma das principais moléculas envolvidas com a adesão deste patógeno à célula hospedeira. É uma proteína de aproximadamente 220 kDa, está associada à superfície e pode ser secretada para o ambiente extracelular.

Esta adesina medeia a adesão da bactéria às células epiteliais ciliadas, sendo esta etapa crítica para o estabelecimento da infecção com *B. pertussis*, para iniciar o processo patogênico.

1.3.2 Fímbrias

As fímbrias, denominadas pili ou aglutinógenos, são filamentos extracelulares de proteínas que se estendem da superfície bacteriana, podendo facilitar a ligação da bactéria a receptores específicos. A *B. pertussis*, produz dois tipos distintos de fímbrias, identificados como aglutinógenos dos sorotipos 2 e 3 (também conhecido como 6). Elas são compostas por várias subunidades (fim A, B, C ou D) que se associam ao FHA para desempenho de sua função principal que é a colonização. Alguns trabalhos de hibridização do DNA mostraram que há homologia entre algumas subunidades de fímbrias B de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*, sugerindo que as três espécies expõem subunidades similares de fímbria B na superfície da célula (WILLEMS et al., 1992). As fímbrias D de *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* mostram homologia entre si, bem como as de *B. pertussis* e *B. parapertussis* (WILLEMS et al., 1993). Mutantes da fímbria D mostram menor capacidade de colonizar o pulmão de camundongos do que a amostra selvagem, comprovando o papel desta fímbria na colonização do pulmão e traquéia (GEUIJEN et al., 1997). Foi demonstrado que o receptor para fibronectina VLA-5 (very late antigen 5) presente em monócitos pode ser um receptor para fímbria D (HAZENBOS et al., 1995).

Assim como os outros fatores de virulência empregados por *B. pertussis*, a expressão das fímbrias é controlada pelo gene *bvg*.

1.3.3 Pertactina (PRN)

A pertactina (PRN) é uma proteína de membrana externa, de 60 kDa e está envolvida na adesão bacteriana, sendo também denominada por p69 e OMP69 devido a sua mobilidade eletroforética em SDS-PAGE (MAKOFF et al., 1990; LEININGER et al., 1991). Moléculas similares foram descritas em outros membros do gênero, que foram denominadas p70 em *B. parapertussis* e p68 em *B. bronchiseptica* (MONTARAZ et al., 1985; LI et al., 1991).

1.3.4 Toxina Pertussis

A toxina pertussis (PT) é uma exotoxina do tipo AB₅, possui 106 kDa, sendo composta por cinco subunidades, S1-S5 (TAMURA et al., 1982). O componente A é enzimaticamente ativo e composto pela unidade S1 que catalisa a ADP-ribosilação da proteína G, participando na transdução de sinais para o interior da célula hospedeira. Acredita-se que a atividade ADP-ribosiltransferase desta toxina transmita sinais para o complexo adenilato ciclase, resultando na elevação intracelular do AMP cíclico responsável por diversos efeitos biológicos na célula hospedeira, o que contribui para disfunções imunes *in vivo* e *in vitro* (BURNETTE, 1992). O oligômero B é constituído por outras subunidades (S2, S3, S4 e S5), sendo responsável pela união da toxina à superfície da célula eucariótica possibilitando assim a ação da subunidade S1.

Dentre as espécies de *Bordetella*, apenas *B. pertussis* produz a toxina pertussis; nas outras espécies que podem infectar o homem, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*, o operon para PT está presente, mas várias mutações na região promotora fazem com que este operon seja silenciado (ARICO et al., 1987).

1.3.5 Adenilato Ciclase/Hemolisina

A adenilato ciclase (ACT) é uma proteína bifuncional, de aproximadamente 130kDa, que se insere na membrana plasmática de células fagocíticas do hospedeiro, com a formação de canais ou poros que provocam a lise da célula. Pertence à família RTX (“Repeat toxin”) de exotoxinas que tem propriedades estimulatórias sobre o sistema imune e hemolítico (COOTE, 1992). Ambas as atividades, de adenilato ciclase e hemolítica, têm sido demonstradas como essenciais ao início do processo infeccioso da *B. pertussis* (KHELEF et al., 1992).

Esta toxina é codificada pelo gene CyaA e regulada por BvgAS. O polipeptídeo de CyaA é sintetizado como protoxina inativa e, então, convertida a uma toxina ativa por palmitoilação de duas lisinas internas (lisinas 856 e 963). Esta reação é necessária para a proteína se ligar à membrana permitindo a sua penetração na célula, e formação do poro.

1.3.6 Toxina Dermonecrótica

Embora descrita há muitos anos (BORDET e GENGOU, 1909), esta toxina não foi explorada tanto quanto os outros fatores de virulência de *Bordetella* sp. Isto se deve em parte à dificuldade no processo de sua purificação. É denominada toxina termo-lábil, por ser inativada a 56 °C, e conhecida como toxina letal devido a sua grande habilidade em causar lesões necróticas na pele de rato, quando injetado, subcutaneamente (LIVEY e WARDLAW, 1984) e ser letal quando injetada intravenosamente.

Esta toxina não é secretada no ambiente extracelular localizando-se no citoplasma (COWELL et al., 1979). Sua baixa expressão e a não secreção são os principais problemas para sua purificação. O papel exato da toxina dermonecrótica na patogênese da infecção por *B. pertussis* é desconhecido, porém os avanços tecnológicos recentes que permitiram a purificação e a clonagem de seu gene podem auxiliar no esclarecimento do seu papel na virulência causada pela infecção por *B. pertussis*.

1.3.7 Citotoxina Traqueal

A citotoxina traqueal (TCT) é uma exotoxina pequena com 921 Da derivada de um fragmento da camada peptidoglicano presente na parede celular de bactérias gram-negativas. É liberado, pela *B. pertussis* em níveis relativamente elevados sendo responsável pela citopatologia epitelial respiratória. A TCT é um membro da família do peptídeo muramil, fragmentos pequenos de peptidoglicano bacteriano envolvidos em várias atividades biológicas dentre elas a habilidade de danificar as células epiteliais ciliadas respiratórias (COOKSON et al., 1989).

1.3.8 Lipopolissacarídeo (LPS)

A molécula de LPS, também denominada endotoxina de *B. pertussis* é menor em relação a muitas outras estruturas bacterianas de LPS e difere das demais pela falta de antígeno O. Como na maioria das bactérias Gram-negativas, este LPS é composto por três porções distintas: o lipídeo A, que lhe confere atividade biológica, cuja região central é transmembranar e composta por 10 a 12 resíduos de sacarídeos ligados ao lipídeo A por uma ligação éster, um polissacarídeo longo e o antígeno “O”, hidrofílico e extracelular, composto por 30 a 100 oligossacarídeos, que confere especificidade sorológica às bactérias gram-negativas, e ativa a via alternativa do complemento (RESTIF et al., 2008).

O antígeno O do LPS é um importante componente antigênico, agrupando as bactérias Gram-negativas em diferentes sorogrupos "O", cuja composição antigênica é usada para identificação de linhagens patogênicas de *E. coli*.

O LPS de *B. pertussis* é um lipooligossacarídeo e mediante ensaios de eletroforese revelou a presença de duas classes de moléculas, LPS I e II. A classe I tem migração mais lenta sendo composta por lipídeo A com o oligossacarídeo no centro e o trissacarídeo terminal. A classe II migra mais rapidamente, sendo composta pelo lipídeo e oligossacarídeo, mas falta o trissacarídeo terminal (PEPPLER, 1984).

1.3.9 Fator de Colonização Traqueal

O fator de colonização traqueal é uma proteína de 34kDa codificada pelo gene TcfA. O TcfA é um membro da família de autotransportadores, que pode direcionar seu próprio transporte através da membrana externa da bactéria (HENDERSON et al., 2001). O processo de maturação da pertactina e do TcfA compartilham características comuns. A secreção de TcfA envolve a molécula precursora de 68kDa, que é transportada ao periplasma, após a clivagem do peptídeo. O precursor de 64kDa restante é translocado através da membrana exterior, a exemplo da pertactina, auxiliado por sua própria região C-terminal, sendo então liberado como uma proteína madura de 34kDa. Assim como outros fatores de virulência, a Tcf de *B. pertussis* possui papel importante na infecção e transmissão da doença, mas o papel exato desta proteína na patogênese não está totalmente elucidado (SMITH et al., 2001).

1.3.10 Proteínas do Locus da Soro Resistência (locus brk)

O locus brk consiste de dois genes responsáveis pela produção de duas proteínas: brkA de 103 KDa de localização na membrana e o brkB uma proteína citoplasmática de 32 kDa, que são importantes para o que se denominou de soro resistência (FERNANDEZ e WEISS, 1994). São proteínas similares à pertactina, por isso, possivelmente, desempenham também um papel na aderência e na invasão da bactéria. O locus brk existe em todas espécies de *Bordetella*, exceto na *B. avium* e possui homólogos nas espécies *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*.

1.4 Macrófagos e Mecanismos Microbicidas

A resposta imune é mediada por uma variedade de células e moléculas solúveis. Esta resposta envolve inicialmente o reconhecimento do patógeno ou outro agente estranho, com posterior elaboração de uma ação efetora para conter e eliminar tais agentes. Dois tipos de resposta imune foram definidos: um denominado resposta inata e outro adaptativa.

Os mecanismos de defesa inatos pré-existem nos indivíduos, sendo a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos. Neste mecanismo, os macrófagos exercem papel importante graças à sua dupla função de defesa: na fase inicial, onde diversos receptores são utilizados para reconhecer e promover o processo de fagocitose e, posteriormente, na fase adaptativa, atuando como células acessórias da imunidade adaptativa (GORDON, 2003). Os macrófagos derivam de monócitos que migraram do sangue para os tecidos, possuindo três funções imunes: fagocitose, destruição de microrganismos e apresentação de antígeno aos linfócitos T, o que resultará na resposta adaptativa. Portanto representam elementos chaves no reconhecimento de microrganismos, sendo capazes de englobar partículas mediante múltiplos receptores que transmitem sinais intracelulares diferentes, que ao interagirem resultam na resposta imune final do organismo.

Todas as células da imunidade inata participam da defesa contra bactérias, embora seja enfatizado principalmente o papel dos macrófagos, em virtude da grande capacidade fagocítica dessas células. As células dendríticas também participam da defesa imune protetora processando eficientemente os patógenos. Estas células são consideradas imunoestimuladoras, pois, além de apresentarem os antígenos aos linfócitos T, elas são capazes de estimular células T naïve que ainda não entraram em contato com qualquer antígeno. Neste processo de

apresentação, as células dendríticas secretam citocinas com efeitos pleiotrópicos (MARODI, 2006).

Diversos receptores são utilizados pelos macrófagos para o reconhecimento e internalização de um microrganismo, dentre outros os receptores para a porção Fc de imunoglobulinas (FcRs), receptores para lectinas como manose (MR), LPS (CD14), integrina (CD11b/CD18), também conhecida como CR3 ou Mac-1, que são capazes de reconhecer componentes microbianos, dentre eles a hemaglutinina filamentosa da *Bordetella* (UNDERHILL e OZINSKY, 2002).

Várias moléculas sinalizadoras participam do processo de fagocitose dentre as quais podem ser destacadas a fosfoinositídeo-3-quinase (PI3-quinase), a fosfolipase C (PLC), a proteína quinase C (PKC) e RhoGTPases (reguladores chave do citoesqueleto). Estas últimas influenciam sinais de transdução importantes para produção de citocinas e a ativação dos mecanismos de morte celular e de microrganismos induzidos durante a fagocitose. Estas moléculas estão integradas para regular a fagocitose, orquestrando a resposta inflamatória e a morte microbiana. (UNDERHILL e OZINSKY, 2002; MA et al., 2003).

Durante a fagocitose, a ativação de mecanismos antimicrobianos e a produção de sinais pró-inflamatórios podem ser reguladas por componentes denominados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) presentes em microrganismos cujos receptores estão presentes em vários tipos celulares incluindo células fagocíticas. Estes receptores são denominados receptores *Toll-like* (TLRs) em analogia aos receptores Toll. Os receptores Toll (TRs) foram primeiramente descritos em drosófilas e, posteriormente, verificaram-se algumas similaridades com receptores presentes em células de vertebrados, que estão envolvidos no controle da resposta imune (MESCHER e NEFF, 2005). A ativação de receptores TL presentes em células imunes induz a expressão de vários genes diretamente envolvidos na produção de citocinas inflamatórias em resposta à infecção. A família de TLRs são proteínas transmembranas ligadas às vias de transdução de sinal celular (MUZIO et al., 2000; TIPPING, 2006). Até o momento, doze TLRs foram descritos em células de mamíferos, mas apenas alguns estão bem caracterizados. O receptor TLR2 juntamente com o receptor TLR6 ligam-se à moléculas de peptídeoglicano, encontradas em alguns patógenos. TLR4 liga-se ao LPS de bactérias gram-negativas, TLR5 reconhece a flagelina presente em flagelo bacteriano, TLR3 reconhece a dupla cadeia de RNA viral e TLR9 reconhece sequências CpG não metiladas presentes em DNA bacteriano durante infecções humanas por bactérias (RIVAS-SANTIAGO e JUAREZ, 2007).

O receptor TLR4 desempenha um papel importante durante a infecção por bactérias Gram negativas. Durante o reconhecimento, o LPS associa-se a uma proteína plasmática, denominada LBP (proteína de ligação ao LPS), que se liga à molécula CD14 (receptor específico para LPS, mas ineficiente na transdução de sinal). Esta ligação ativa o TLR4, formando um complexo composto por TLR4/CD14/LBP e uma proteína denominada MD2. As interações entre o LPS e o complexo TLR4 exercem influência fundamental na amplificação da resposta imune celular (ABBAS et al., 2003). Este receptor possui uma porção intracitoplasmática que ativa sinais de transdução, recrutando várias proteínas intracelulares (MyD88, IRAK e TRAF-6), que vão desencadear a ativação das vias JNK e ERK da cascata das MAPKs (Proteínas quinases ativadas por mitógeno). Estas proteínas estão envolvidas na ativação dos fatores de transcrição AP-1 (ativador protéico-1) e NF- κ B (fator nuclear kappa B), favorecendo a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória e microbida (ABBAS et al., 2003; BOCHUD e CALANDRA, 2003).

O NF- κ B, quando ativado em resposta a sinais mediados via TLR4, pode controlar a síntese de citocinas inflamatórias tais como TNF- α , IL-1 e IL-12, moléculas de adesão endoteliais e proteínas envolvidas nos mecanismos de morte microbiana, dentre elas a regulação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), além de promover a produção de IL-10 em macrófagos ativados por LPS de *B. pertussis* (ABBAS et al., 2005, HIGGINS et al., 2003).

Camundongos C3H/HeJ possuem uma mutação no gene do TLR4, sendo hiporesponsivos ao LPS. Por não responderem ao tratamento com esta endotoxina, tornam-se altamente suscetíveis a infecções bacterianas (HIGGINS et al., 2003). Este dado sugere que TLR4 seja importante para ativação de vias de sinalizações envolvidas na destruição de bactéria Gram-negativa e para o estabelecimento de uma imunidade protetora.

A fagocitose é um mecanismo importante de defesa inata que induz a geração de metabólitos derivados do nitrogênio (NOS) e oxigênio (ROS), sendo produzida uma série de substâncias como óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radicais de hidrogênio (H) e íon hidroxila (OH⁻), ânion superóxido (O₂⁻) e oxigênio (O₂), que associadas serão tóxicas, podendo resultar na morte do microorganismo fagocitado. Defeitos no recrutamento dos macrófagos para o local atingido, em qualquer das etapas de fagocitose ou da capacidade bactericida desta célula, podem resultar em maior suscetibilidade do hospedeiro a infecções. A maioria dos microrganismos fagocitados serão internalizados nos fagossomos, e a fusão desta organela com os lisossomos irá favorecer a destruição dos microrganismos (HASS,

1998). Além dos mediadores químicos discutidos acima, a natureza do microrganismo fagocitado irá colaborar para estimular a liberação de uma grande variedade de citocinas pró ou antiinflamatórias, o que irá definir uma resposta imune eficaz.

A *B. pertussis* é um patógeno intracelular facultativo, pode invadir diversos tipos celulares incluindo macrófagos, sobrevivendo por curto período no ambiente intracelular. Isto sugere um possível requerimento da imunidade celular para sua eliminação. Esta bactéria foi encontrada no interior de macrófagos pulmonares de pacientes adultos e de crianças que haviam sido imunizados e que se infectaram com o HIV (ADAMSON et al., 1989). Supõe-se, que a capacidade de sobreviver em macrófagos deve-se em parte, à inibição da fusão fagossomo-lisossomo (FRIEDMAN et al., 1992) e à inibição de mecanismos de morte, gerados pela presença de fatores de virulência desta bactéria dentre estes a adenilato ciclase (KHELEF et al., 1993; CARBONETTI, 2007).

1.4.1 Ativação e desativação de macrófagos

Os macrófagos podem ser ativados mediante receptores para componentes de microrganismos e por citocinas. Há duas vias de ativação definidas que são denominadas via clássica e alternativa.

A via clássica de ativação ou do tipo 1 (M1), se dá na presença de citocinas produzidas por células T CD4+, do subgrupo Th1. Nesta via, os macrófagos são ativados e transformados em células efectoras, com potencialidade de matar patógenos intracelulares, graças à presença de citocinas como IL-2, IL-1 e IFN- γ que pode sinergizar com TNF- α , levando à ativação da enzima óxido nítrico sintase induzida, iNOS (POLLOCK et al., 2003).

A outra via de ativação denominada alternativa ou do tipo 2 (M2), é mediada por citocinas produzidas por linfócitos T CD4+ do subgrupo Th2 que inclui IL-4, IL-10 e IL-13, que esta mais associada à resposta humoral e atividade anti-inflamatória sendo envolvida no combate a patógenos de natureza extracelular (GORDON, 2003).

Outras subpopulações de células T que podem influenciar a ativação de macrófagos, são as células T regulatórias (Tr1) e Th3 que produzem IL-10 e TGF- β e, assim, regulam negativamente as funções de IFN- γ , podendo inibir parcialmente a produção de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias.

A presença de TGF- β pode aumentar a atividade da enzima arginase, produzida pelos macrófagos e, como consequência, reduz a atividade da iNOS, uma vez que ambas enzimas

compartilham o mesmo substrato, L-arginina, contribuindo desta forma para a regulação do processo inflamatório (BARKSDALE et al., 2004).

O interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$) é um dos principais ativadores dos mecanismos microbicidas de macrófago infectados, pois promove o aumento da produção de óxido nítrico. Esta citocina é produzida, inicialmente, por células do sistema imune inato, as células natural killer (NK), e, posteriormente por células T CD4^+ , do tipo Th1, podendo também regular positivamente a produção de outras citocinas, como a IL-1, IL-6, IL-12 e $\text{TNF-}\alpha$ e, desta forma, mediar mecanismos de imunidade celular, importantes para a proteção em resposta a infecções (MAHON, 1999; CANTHABOO et al., 2002).

A resposta inflamatória é seguida por uma resposta antiinflamatória que se dá devido ao aumento da produção de IL-4, IL-10, IL-13, $\text{TGF-}\beta$, receptor solúvel de $\text{TNF-}\alpha$ e do antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) (SIKORA, 2000).

O fator de crescimento e transformação beta ($\text{TGF-}\beta$) exerce papel importante no processo antiinflamatório e é produzido por plaquetas, macrófagos e linfócitos Th3. Esta citocina possui atividade multifuncional, está associada à supressão da inflamação, regulação de numerosos processos fisiológicos, incluindo o crescimento e diferenciação de células, apoptose e adesão, além de inibir a adesão de neutrófilos, a proliferação de células T e B e promover o reparo tecidual pelo aumento na síntese de colágeno. É um quimioatraente de monócitos e estimula a produção de IL-1, $\text{TNF-}\alpha$ e o próprio $\text{TGF-}\beta$ (KUROSAKA et al., 2002). $\text{TGF-}\beta$ inibe funções dos macrófagos, dentre elas a liberação de intermediários reativos do oxigênio, a produção de citocinas pró-inflamatórias (sintetizadas por células T, B e NK), reduzindo a função e a produção de IL-12 e consequentemente a produção de $\text{IFN-}\gamma$ por células T CD4^+ e NK, agravando o curso da infecção (CHEN et al., 2003). Esta citocina é considerada benéfica em algumas situações por suas propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras (FADOK et al., 1998; RICH et al., 2001; KUROSAKA et al., 2002).

A fagocitose microbiana provoca a produção de citocinas pró-inflamatórias, ativa sistemas de morte e processamento e apresentação do antígeno, mas suprime os genes que codificam as moléculas envolvidas com o reconhecimento e a internalização bacteriana (CHEN et al., 2003).

As citocinas produzidas têm ações bem equilibradas, auxiliando na defesa contra agentes infecciosos; distúrbios no equilíbrio destas moléculas podem contribuir para diferentes doenças, sendo o seu conhecimento de fundamental importância.

1.4.2 A importância da geração de óxido nítrico

As células fagocíticas, dentre elas monócitos e macrófagos, após interiorizar um microrganismo sintetizam vários produtos capazes de inibir seu crescimento ou levá-lo a morte. Entre os produtos gerados estão os intermediários de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila) e nitrogênio (óxido nítrico, nitrito e nitrato). A produção de NO por macrófagos é considerada como o principal mecanismo microbicida contra vários patógenos (DENIS et al., 2006).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre que participa do metabolismo oxidativo dos macrófagos sendo importante na resposta inflamatória. Este mediador está envolvido na patogênese e no controle de doenças infecciosas e de tumores, nos processos autoimunes e de doenças degenerativas. É sintetizado por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir do aminoácido L-arginina, gerando citrulina e NO, necessitando da presença de dois cofatores, o oxigênio e o fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH) (BOGDAN et al., 2000).

As ações biológicas do NO são mediadas pela sua ação sobre a guanilato ciclase, ativando-a e elevando a concentração de GMPc (guanosina monofosfato cíclico) que é o principal mecanismo de transdução de sinal pelo qual o NO determina seus efeitos fisiológicos (BOGDAN, 2001). O NO pode induzir reações tóxicas contra outros tecidos do hospedeiro, no caso de doenças autoimunes e situações de sobrecarga exageradas do organismo (ROTHER e KOLB, 1999), por exemplo, na asma (BARNES e LIEW, 1995), atuando como toxina conforme a concentração e o tecido em questão, desempenhando um papel pró-inflamatório. Esta molécula também pode atuar como anti-inflamatório ou agente imunossupressor através de seus efeitos inibitórios ou apoptóticos em células (MACIEJEWSKI et al., 1995; LI e BILLIAR, 2000).

Várias isoformas de NOS foram identificadas em diversos tecidos de mamíferos. Estudos bioquímicos e a análise sequencial de aminoácidos revelaram que estas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos. Assim, as isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias: a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzida (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (STENGER et al., 1995; STENGER et al., 1996). A c-NOS e iNOS diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO (STENGER et al., 1995). A

isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (n-NOS, tipo I), presente normalmente nos neurônios (WEISS et al., 1995; MATTNER et al., 1997), e a NOS endotelial (e-NOS, tipo III), presente normalmente nas células endoteliais vasculares e plaquetas (STENGER et al., 1996).

A iNOS (tipo II) não é expressa sob condições normais sendo regulada positivamente ou negativamente pelo contato célula-célula (mediante a adesão e moléculas coestimulatórias), por citocinas, produtos microbianos e virais dentre outros. Embora IFN- γ e LPS sejam seus ativadores clássicos, novos reguladores continuam a serem descobertos. A IL-12 ativa a iNOS em macrófagos, embora seja por um mecanismo mediado por produção autócrina de IFN- γ . Esta isoforma requer algumas horas para ser expressa, mas, uma vez sintetizada, sua ação continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra à morte celular (KAWAMURA et al., 1998). A expressão de iNOS ocorre durante a inflamação ou infecção sendo um componente importante para a resposta do hospedeiro. O NO controla uma variedade de organismos intracelulares como *Leishmania* (INIESTA et al., 2001), *Plasmodium* (CHIWAKATA et al., 2000), *Tripanosoma* (SAEFTEL et al., 2001), infecções virais (REISS e KOMATSU, 1998) e fúngicas (LIRK et al., 2002), porém o papel do NO em infecções bacterianas não está totalmente definido. Os mecanismos potenciais incluem efeito microbicida direto através da reação do óxido nítrico com grupos do ferro ou do tiolato formando um complexo que inativa as enzimas fundamentais na respiração mitocondrial ou na replicação do DNA. Outros mecanismos desenvolvidos pelo óxido nítrico é a sua capacidade de reagir com superóxidos formando reativos oxidantes capazes de danificar as células alvo (TRIPATHI et al., 2007; NATHAN e SHILOH, 2000).

Dentre as várias funções descritas para o NO podemos citar efeitos antiviral, antimicrobiano, imunoestimulador (pró-inflamatório) e imunossupressivo (anti-inflamatório) além de ações citotóxicas e citostáticas que promovem a destruição de microrganismos. A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. O óxido nítrico exerce efeitos variados nas funções desenvolvidas por células leucocitárias, incluindo a indução de apoptose do macrófago, a modulação da adesão do neutrófilo, além da regulação diferenciada na síntese de citocinas pelos leucócitos (BOGDAN, 1997).

A expressão da iNOS depende do estímulo microbiano, de citocinas e do tipo celular que levam a diferentes sinalizações envolvidas na sua expressão, como por exemplo, Janus quinase Jak1, Jak2 e tyk2; proteína quinase Raf-1; Mapk p38, Erk1/2 e JNK; proteína quinase C; proteína fosfatase 1 e 2A, que promovem, ou inibem sinalizações como por exemplo, via fosfoinositídeo-3-quinase e proteína tirosina fosfatase (IA-2). O óxido nítrico exerce efeito bifásico na transcrição da iNOS. Baixas concentrações de NO, assim como ocorre nos macrófagos estimulados por citocinas, ativam NF- κ B e regulam positivamente a iNOS, porém, concentrações elevadas têm o efeito oposto, prevenindo desta forma a superprodução de óxido nítrico (TRIPATHI et al., 2007).

Diversos agentes infecciosos são dependentes de arginina exógena para a síntese de poliaminas e proliferação celular. Consequentemente, a depleção da arginina pela ativação da iNOS pode inibir o crescimento do microrganismo, levando-os à morte, enquanto a depleção do substrato devido a produção de arginase pelos macrófagos pode levar à sobrevivência do patógeno, como exemplo a *Leishmania*, que subverte resposta ao NO. Recentemente sugeriu-se que a N-hidroxi-L-arginina, um intermediário da reação L-arginina-iNOS-NO, contribui para a morte intracelular da *Leishmania* de forma independente de óxido nítrico, bloqueando a atividade da arginase dentro do parasita e/ou do macrófago (BOGDAN, 2001).

O LPS e citocinas pró-inflamatórias tais como IFN- γ e IL-12 regulam positivamente a produção de NO, através da ativação da síntese de iNOS, e suprimem a expressão da arginase. Ao contrário, citocinas anti-inflamatórias podem induzir a produção de arginase que converte L-arginina em L-ornitina e uréia, suprimindo a iNOS, consequentemente reduzindo NO. Neste processo, estas duas enzimas competem pelo mesmo substrato L-arginina (MUNDER et al., 1999).

O NO modula várias funções em células fagocitárias, por exemplo, induz a transcrição do gene da IL-12p40, mas não do gene IL-12p35 em humano. Como o homodímero IL-12 (p40) é um antagonista para IL-12, este fato pode levar a baixa resposta do tipo Th1 na presença de NO [uma vez que ele inibe a síntese de IL-12 pelos macrófagos ativados suprimindo indiretamente a expansão de células Th1] (TAYLOR-ROBINSON et al., 1994; BAUER et al., 1997; HUANG et al., 1998; VAN DER VEEN, 2001).

Durante os processos infecciosos, macrófagos ativados podem secretar simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio (ROE) exercendo ação citotóxica indireta devido a sua reação com esses intermediários do oxigênio o qual resulta na formação

de peroxinitrito (ONOO^-) um poderoso oxidante de proteínas (BECKMAN e KOPPENOL, 1996).

Além de iNOS, os macrófagos expressam a arginase, enzima descrita como anti-inflamatória, que regula negativamente a síntese de óxido nítrico. A produção de TGF- β e citocinas do tipo Th2 agem sinergicamente para induzir a atividade da arginase nos macrófagos. A presença de TGF- β pode suprimir a atividade da iNOS em macrófagos em virtude da redução da estabilidade do gene para iNOS. Além disto, pode aumentar a degradação da proteína de iNOS, favorecendo deste modo o aumento da atividade de arginase que passa a consumir o substrato L-arginina, com a consequente redução da atividade da iNOS e o controle da produção de NO. Deste modo a presença de TGF- β é em parte responsável pela supressão da atividade citotóxica dos macrófagos (VODOVOTZ et al., 1993).

Nem todos os modelos estudados mostraram relação linear entre a presença de arginase e a inibição total de iNOS. Há uma hipótese destas duas enzimas serem reguladas por vias independentes, e que o TGF- β aumenta a atividade da arginase indiretamente promovendo a síntese de outras proteínas (BOUTARD et al., 1995).

A arginase catalisa a hidrólise de L-arginina para formar L-ornitina e uréia. A ornitina é o precursor para a síntese de poliaminas que promovem a proliferação e o reparo em vários tipos celulares (SCALABRINO et al., 1991).

A arginase possui valor de K_m enzimático mais elevado para arginina se comparado a NOS o que determina afinidade preferencial da NOS pelo substrato. Porém, a expressão de arginase, antes da indução da iNOS durante a estimulação com IFN- γ e TNF- α , impede a produção de NO por depletar o substrato, isto se deve em parte a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como TGF- β . Esta citocina facilita a alta atividade da arginase diminuindo o K_m desta enzima (GOTOH e MORI, 1999; RUSCHMAN et al., 2001).

O aminoácido L-arginina é um componente vital das respostas inflamatórias e imunes, sendo o único substrato para a iNOS; se a presença da arginase provoca a escolha da via metabólica não está bem definida. A disponibilidade de L-arginina é fator crucial para a atividade de iNOS, uma vez que o NO é produzido continuamente a uma taxa elevada na presença adequada deste substrato. A L-arginina é também substrato para a síntese de outras proteínas, poliaminas, glutamato entre outras moléculas, que são importantes para a sinalização celular e funcionamento dos canais iônicos, além de funcionar como intermediário do ciclo da uréia (POPOVIC et al., 2007). Macrófagos murinos e células dendríticas

expressam arginase I quando estimulados por citocina do tipo Th2 (MUNDER et al., 1999), LPS (LOUIS et al., 1998) ou cAMP (MORRIS et al., 1998). É possível que a seletiva expressão de arginase possa depender de vários fatores associados. Que seja de nosso conhecimento, os mecanismos de regulação de iNOS e arginase em macrófagos ativados por *B. pertussis* não foram explorados, o que significa contribuir para o conhecimento da interrelação desta bactéria com células fagocíticas durante seu primeiro contato e assim colaborar para o entendimento dos mecanismos imunopatológicos provocados por esta infecção.

1.4.3 *B. pertussis* e os fatores de virulência na imunidade

As interações bactéria-célula hospedeira durante a infecção com *B. pertussis* não foram totalmente elucidadas, os mecanismos de resposta imune necessários para o controle desta infecção não estão definidos e pouco se conhece sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro desenvolvidos durante a infecção ou sobre a patogênese de *B. pertussis*. O desafio para o desenvolvimento de vacinas de qualidade superior à existente está associado à falta de compreensão destes mecanismos. A interação entre *B. pertussis* e macrófagos é importante para o desenvolvimento da imunidade inata e controle da infecção, mas estes aspectos ainda não foram totalmente esclarecidos.

Estudos anteriores indicam que a infecção por *B. pertussis* promove uma resposta imune Th1, baseada em parte na produção de IFN- γ (MILLS et al., 1993). Estudos recentes em modelos animais demonstraram que a resposta imune do hospedeiro após esta infecção leva a expansão de subclones de linfócitos T CD4⁺, denominados células Th17, que são geradas devido a presença de IL-23 (FEDELE et al., 2005; CARBONETTI, 2007). A incubação de células dendríticas humanas com *B. pertussis* induz a expressão de IL-23, mas não de IL-12 que leva a geração de células Th1. A indução de IL-23 e a inibição de IL-12 são causadas pela ação enzimática da adenilato ciclase que aumenta os níveis de cAMP (SPENSIERI et al., 2006; LANGRISH et al., 2005). Estudos utilizando vacina celular mostraram que a proteção foi altamente dependente de células Th17 produtoras de IL-17, enquanto a vacina acelular mediou a proteção através de mecanismos dependentes de anticorpos, com geração mais polarizada de clones de células T CD4⁺ do tipo Th2 ou uma resposta mista do tipo Th1/Th2. Embora os mecanismos envolvidos na produção de IL-17 não estejam totalmente compreendidos esta citocina pode estar envolvida na ativação de citocinas

inflamatórias, quimiocinas e na atividade antibacteriana dos macrófagos (ELAHI et al., 2007; MILLS, 2001).

A resposta a infecção por *B. pertussis* pode ser iniciada e controlada através do receptor TLR4 que reconhece o LPS desta bactéria. A sinalização via TLR4 induz preferencialmente a produção de IL-10 inibindo a resposta inflamatória. A infecção com *B. pertussis* em camundongos deficientes em TLR4 é mais grave, sendo caracterizada pelo aumento da carga bacteriana no trato respiratório, em parte devido à falta de produção de TNF- α . No entanto esta citocina não tem mostrado papel protetor significativo durante esta infecção provavelmente devido a natureza menos endotóxica do LPS de *B. pertussis* e pela produção de toxina pertussis. A sinalização do TLR4 parece necessária para estabelecer uma imunidade protetora induzida pela vacina, potencialmente através da produção de IL-17 pelas células T CD4⁺ (HIGGINS et al., 2003; BANUS et al., 2006).

Há especulações que a tosse, principal patologia associada com a infecção por *B. pertussis*, seja causada por uma reação autoimune crônica como resultado do desvio da resposta imune para o perfil Th17 (CARBONETTI, 2007).

O papel dos fatores de virulência de *B. pertussis* na modulação da resposta imune de macrófagos ativados, a determinação da especificidade e características da doença, não estão totalmente compreendidos.

A pertactina, hemaglutinina filamentosa e LPS induziram a produção de anticorpos que contribuem para a proteção, entretanto estes anticorpos específicos não foram suficientes e eficazes para uma proteção total. Isto pode explicar as dificuldades em estabelecer correlações sorológicas quantitativas definitivas para vacinas de *B. pertussis*.

Os numerosos estudos realizados em camundongos demonstraram que a imunização com PT, FHA, PRN, FIM ou ACT podem gerar níveis variados de proteção. Entretanto, nenhuma das principais experimentações clínicas definiu o papel exato destes antígenos na proteção contra a infecção com *B. pertussis*. A vacina monocompetente com PT gerou anticorpos contra esta toxina, e foi sugerido que as crianças com níveis mais elevados de IgG no soro após as imunizações foram as menos suscetíveis à infecção por *B. pertussis* (BAGLEY et al., 2002).

As cepas mutantes de *B. pertussis* deficientes em ACT, FIM e PT possuem capacidade reduzida para colonizar o trato respiratório de camundongos ou então são menos patogênicas (GOODWIN e WEISS, 1990; GEUIJEN et al., 1997), sugerindo que estes componentes são importantes para colonização do trato respiratório.

O FHA, além de exercer seu papel na aderência, possui atividades imunossupressoras e imunomoduladora, sendo um antígeno protetor importante, pois induz anticorpos específicos após a imunização com a vacina celular de *B. pertussis*. Embora o FHA seja importante para a aderência e a colonização inicial no trato respiratório, mostrou-se que o FHA e a PRN não foram essenciais para a colonização da bactéria nos pulmões (LOCHT et al., 1993). Esta adesina pode facilitar a adesão de outros microrganismos (TUOMANEN, 1986), explicando as superinfecções que complicam o curso clínico da coqueluche.

O FHA possui vários domínios que funcionam como sítios de ligação e podem regular a função da célula hospedeira através da geração de sinais mediados por estas ligações. Algumas destas ligações são mediadas por integrinas presentes em células fagocíticas ou ligações “lectina-like” a açúcares sulfatados presentes na matriz extracelular (HANNAH et al., 1994). Esta adesina possui uma região na cauda composta por um tripeptídeo RGD (Arg-Gly-Asp) que facilita a ligação da bactéria ao receptor CR3 presente em macrófagos facilitando a entrada da bactéria nestas células (RELMAN et al., 1990). Outros autores mostraram que um receptor para fibronectina denominado VLA (“very late antigen-5”) pode ativar CR3 facilitando a ligação do FHA à célula hospedeira (HAZENBOS et al., 1993), favorecendo o reconhecimento e a sobrevivência intracelular da bactéria. O FHA pode também se ligar a uma proteína do soro reguladora do sistema complemento denominado C4BP (“C4 binding protein”) inibindo a ativação da via clássica do complemento, impedindo assim a formação do complexo de ataque à membrana bacteriana (BERGGARD et al., 1997). Desta forma o FHA pode contribuir como mecanismo de evasão criado pela bactéria, reduzindo a atividade do sistema imune e possibilitando a sua sobrevivência.

A infecção de ratos por *B. pertussis* gera linfócitos T regulatórios específicos para FHA que secretam IL-10 e suprimem a resposta mediada por células T CD4⁺ (Th1) reduzindo assim a produção de IL-12 contra este patógeno (MCGUIRK et al., 2002). Anticorpos anti-FHA encontrado no soro humano podem reduzir a fagocitose de *B. pertussis* pelos neutrófilos humanos (MOBBERLEY-SCHUMAN et al., 2003).

A pertactina (PRN) está presente em todas as cepas virulentas de *B. pertussis* sendo sugerida como um antígeno protetor (GUSTAFSSON et al., 1996), porém seu mecanismo de ação é desconhecido. Esta adesina não parece envolvida na persistência da infecção, uma vez que mutantes desta adesina infectaram e colonizaram o trato respiratório de camundongos (ROBERTS et al., 1991). Assim como o FHA, a PRN contém uma sequência de tripeptídeos

formados por Arg-Gly-Asp (RGD), porém esta não parece importante para a ligação ao receptor para CR3 (Cd11b/CD18) presente em leucócitos (EVEREST et al., 1996).

A toxina pertussis (PT) é um dos principais componentes imunogênicos de *B. pertussis* e um dos principais causadores de reações adversas. Entre tais reações estão a inibição do aumento de cálcio intracelular em células T CD4+ e CD8+ induzido por quimiocinas, a ativação de neutrófilos e de células NK e a inibição da quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos (XING et al., 2000; CASSAN et al., 2006). A ligação desta toxina a receptores presentes na superfície de células do sistema imune inato e adquirido ativa sinais moleculares envolvidos na secreção de citocinas e expressão de moléculas acessórias. Em algumas circunstâncias estes efeitos podem se dar independentemente da atividade enzimática mediada pela subunidade S1, uma vez que o oligômero B pode induzir imunidade a antígenos não relacionados (OKA et al., 1994).

Inúmeras pesquisas têm investido na definição de um bom sistema de expressão desta toxina para obter grandes quantidades ou mesmo uma proteína com baixa toxicidade com o objetivo de melhorar a vacina acelular utilizada em vários países, pois quase sempre a toxina não é liberada em quantidade que permita sua utilização em grande escala (SMITH et al., 2001).

O papel exato da toxina pertussis (PT) na imunidade inata não está totalmente claro, havendo controversias quanto à sua função imunomoduladora e seus efeitos nos estágios iniciais da infecção. Esta toxina é responsável pelos sintomas sistêmicos associados à infecção por *B. pertussis*, dentre estes linfocitose, hipoglicemia e sensibilidade à histamina (CARBONETTI, 2007).

Estudos recentes mostraram que as características clínicas de *B. pertussis* e *B. parapertussis* são muito similares. Entretanto em infecções com *B. pertussis* houve leucocitose o que não ocorreu nas infecções com *B. parapertussis*.

A PT possui efeitos supressores múltiplos no sistema imune por reduzir moléculas MHC II na superfície de monócitos humanos, por promover a maturação de APC, modulando os marcadores de superfície em células dendríticas e diminuindo a produção de IL-6, IL-10 e IL-12 (MARTINO et al., 2006).

A toxina pertussis pode atuar sobre a imunidade inata nos estágios iniciais da infecção, reduzindo a resposta imune adaptativa gerada pela infecção e promovendo a re-infecção em um indivíduo parcialmente imune.

A PT induz a maturação de células dendríticas, o que resulta na expansão de células T efetoras e na diferenciação de ambas as células Th1 e Th2. A ativação intracelular de TLR4 é também implicada na atividade adjuvante mediada pela PT. Recentemente foi mostrado que o tratamento *in vivo* com PT promoveu a diferenciação de células Th17, reduzindo o número de células T regulatórias FoxP3+CD4+CD25+ (Treg) em camundongos (CHEN et al., 2007).

Em modelo murino durante o desafio intracerebral, a presença de PT é fundamental para induzir proteção quando associado a outros antígenos de *B. pertussis*, sendo também detectado anticorpos contra este fator em seres humanos após a infecção com *B. pertussis* ou após imunização com a vacina celular (ZHANG e MORRISON, 1993; CANTHABOO et al., 2002).

A toxina adenilato ciclase (ACT) colabora com o estabelecimento da infecção por *B. pertussis* auxiliando na colonização do trato respiratório. Esta toxina interage com as moléculas $\beta 2$ integrina CD11b/CD18 em macrófagos, insere o domínio catalítico, (dependente de cálcio e temperatura), através da membrana citoplasmática e invade a célula hospedeira, utilizando a calmodulina, que cataliza a conversão de ATP para AMPc (FRIEDMAN et al., 1987; PEARSON, et al., 1987; NJAMKEPO et al., 2000).

Foi demonstrado que cepas mutantes na síntese de ACT possuem virulência e proliferação reduzida, sendo removidas mais rapidamente dos pulmões. Esta toxina pode aumentar o nível endógeno de AMP cíclico (AMPc), interferindo nas funções das células fagocíticas efetoras, alterando sua capacidade fagocítica, bactericidas e respostas oxidativas, o que pode auxiliar a sobrevivência das bactérias nos estágios iniciais da colonização (PEARSON et al., 1987; GROSS et al., 1992; NJAMKEPO et al., 2000). Esta enzima de *B. pertussis* pode também provocar a apoptose em macrófagos *in vivo* e *in vitro* (GUEIRARD et al., 1998).

A ACT pode modular TLR em células dendríticas promovendo a indução de células Treg secretoras de IL-10 e inibindo IL-12. A indução de citocinas anti-inflamatórias e células Treg não é somente um importante mecanismo protetor do hospedeiro devido limitar a imunopatogenese durante a infecção mas pode também ser usado pelos patógenos como estratégia para subverter a resposta imune inibindo células Th1 e prolongando a sua sobrevivência no hospedeiro (HICKEY et al., 2008).

A maioria dos efeitos biológicos do LPS foi atribuída às propriedades imunoestimulatórias do lipídeo A (MUNFORD et al., 2006, RAETZ et al., 2007). Entretanto, o antígeno O das bactérias gram-negativas exerce importante função imune protegendo a

bactéria da lise mediada pelo complemento e dos efeitos bactericidas mediados por peptídeos antimicrobianos (RAYNAUD et al., 2007, SEBASTIAN et al., 2007).

O papel do LPS na patogênese da infecção por *B. pertussis* não está claro, entretanto, as atividades biológicas exibidas por este LPS incluem propriedades antigênicas e imunomoduladoras, conduzindo a processos de ativação de células apresentadoras de antígeno profissionais como macrófago e células dendríticas (AMANO et al., 1990; WATANABE et al., 1990). Este LPS é um fraco imunógeno tanto para animais de laboratório, quanto para o homem após o uso da vacina celular (MANCLARK e COWELL, 1984) porém, pequenas quantidades de LPS contribuem como adjuvante, colaborando assim na eficácia da vacina celular e acelular (CHABY e CAROFF, 1988).

As espécies de *Bordetella* expressam diferentes moléculas de LPS que podem afetar a patogênese. Cepas de *B. parapertussis* isoladas de seres humanos e de carneiros possuem perfis distintos de LPS que geram no hospedeiro características específicas (VAN DEN AKKER, 1998). O LPS produzido pela *B. bronchiseptica* é similar ao de *B. parapertussis*, pois ambos expressam antígeno O dependente da temperatura (VAN DEN AKKER, 1998). O antígeno O de *B. bronchiseptica* confere proteção aos peptídeos antimicrobianos, diferente de *B. pertussis*, nas quais falta o antígeno O, não sendo protetor (BANEMANN et al., 1998).

O antígeno O é um polissacarídeo de superfície extremamente variável nas bactérias Gram-negativas. As interações entre este antígeno e o sistema imune são fundamentais para determinar a vantagem seletiva de cada espécie (REEVES, 1995). Embora *B. pertussis* e *B. parapertussis* sejam espécies relacionadas, a variação na estrutura do LPS pode levar a patogenicidade distintas.

O antígeno O de *B. parapertussis* a protege da morte pelo sistema complemento, enquanto que a *B. pertussis* é sensível aos efeitos causados por este sistema (GOEBEL et al., 2008). Ambos patógenos são endêmicos na população humana o que indica que o antígeno O não é necessário para a ocorrência da infecção. Entretanto o papel para o antígeno O não está claramente definido (GOEBEL et al., 2008; FEDELE et al., 2008).

O LPS tem uma função importante como adjuvante para respostas imunes a outros antígenos. O lipooligossacarídeo de *B. pertussis* pode sinergizar com citotoxina traqueal (TCT), estimulando a produção de IL-1 e NO, danificando células epiteliais ciliadas, podendo também ter efeitos deletérios em neutrófilos (CUNDELL et al., 1994) e induzir junto com ACT a produção de IL-10 em células dendríticas. Entretanto, TCT e endotoxina sozinhos não induzem a produção de NO nas células epiteliais.

O LPS, PT e TCT são os principais responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias no pulmão infectado, e estas citocinas em conjunto com NO são responsáveis pela patologia local. Os mecanismos de defesa contra a infecção com *B. pertussis* são complexos. A infecção pode ser impedida pela atividade de várias células imunocompetentes incluindo, linfócitos, macrófagos e moléculas como citocinas e NO.

6 Conclusão

- 1- A ativação de MφDM com antígeno solúvel ou a infecção ativa com *B. pertussis* não foi suficiente para gerar nitrito. Ao contrário, a infecção dos MφDM com *B. parapertussis*, estimulou a síntese de grande quantidade de NO.
- 2- A adição exógena de L-arginina às culturas de macrófagos estimuladas com o Ag solúvel de *B. pertussis* aumentou a síntese de NO.
- 3- A inibição de arginase pela adição de L-NOHA às culturas favoreceu a produção de NO, e a presença de arginase foi confirmada através da produção de uréia nos macrófagos infectados com *B. pertussis* e *B. parapertussis*, sugerindo haver competição entre ambas as enzimas pelo consumo do substrato.
- 4- O TGF-β está envolvido na baixa síntese de NO nos macrófagos ativados com *B. pertussis*, uma vez que a adição de anti-TGF-β às culturas celulares aumentou a síntese de nitrito e reduziu a produção de arginase, e houve produção desta citocina nos macrófagos estimulados com *B. pertussis*.
- 5- A presença de arginase pode estar relacionada à presença de TGF-β, uma vez que a adição de anti-TGF-β nas culturas estimuladas com *B. pertussis* reduziu a atividade desta enzima.
- 6- A PT parece estar envolvida na inibição da expressão de iNOS na infecção por *B. pertussis*. Sua adição as culturas de macrófagos infectados com *B. parapertussis* reduziu a quantidade de NO sintetizados por estas células.
- 7- Pelo uso de macrófagos de camundongos deficientes para TLR4, concluímos que o LPS parece estar envolvido na produção de arginase e TGF-β em resposta a infecção com *B. pertussis* e *B. parapertussis*, porém a produção de NO pelos macrófagos infectados com *B. parapertussis* foi independente de TLR4, não havendo uma correlação direta entre a presença de PT e NO neste modelo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 544p.

ADAMSON, P. C; WU, T. C; MEADE, B. D; RUBIN, M; MANCLARK, C. R; PIZZO, P. A. Pertussis a previously immunized child with human immunodeficiency virus infection, v.115, **J. Pediatr.**, v.115, p.589-592, 1989.

ALBINA, J. E.; MILLS, C. D.; HENRY, W. L.; CALDWELL, M. D. Temporal expression of different pathways of L-arginine metabolism in healing wounds. **J. Immunol.**, v.144, p.3877-3880, 1990.

AMANO, K.; FUKUSHI, K.; WATANABE, M. Biochemical and immunological comparison of lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis*. **J. Gen. Microbiol.** v.136, p.481-487, 1990.

ARICO, B.; RAPPUOLI, R. *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. **J. Bacteriol.** v.169, p.2847-2853, 1987.

BAGLEY, K. C.; ABDELWAHAB, S. F.; TUSKAN, R. G.; FOUTS, T. R.; LEWIS, G. K.; Pertussis toxin and the adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* activate human monocyte-derived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a cAMP-dependent pathway. **J. Leukoc. Biol.**, v.72, p.962-969, 2002.

BANEMANN, A.; DEPPISCH, H.; CROSS, R. The lipopolysaccharide of *Bordetella bronchiseptica* acts as a protective shield against antimicrobial peptides. **Infect. Immun.** v.66, p.5607-5612, 1998.

BARNES, P. J., LIEW, F. Y. Nitric Oxide and asthmatic inflammation. **Immunol. Today.** v.16, p.128-130, 1995.

BARON, S., NJAMKEPO, E., GRIMPREL, E., BEGUE, P.; DESENCLOS, J. C.; DRUCKER, J.; GUIZO, N. Epidemiology of pertussis in French hospitals in 1993 and 1994: thirty years after a routine use of vaccination. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.17, p.412-18, 1998.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARKSDALE, A.R.; BERNARD, A.C.; MALEY, M.E.; GELLIN, G.L.; KEARNEY, P. A.; BOULANGER, B.R.; TSUEI, B.J.; OCHOA, J.B. Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. **Surgery**, v. 135, p.527-535, 2004.

BANUS, H. A.; VANDEBRIEL, R. J.; DE RUITER, H.; DORMANS, J. Á.; NAGELKERKE, N. J.; MOOI, F. R.; HOEBEE, B.; VAN KRANEN, H. J.; KIMMAN, T. G. Host genetics of *Bordetella pertussis* infection in mice: significance of Toll-Like receptor 4 in genetic susceptibility and pathobiology. **Infect. Immun.**, v.74, p.2596-2605, 2006.

BASS, J. W.; WITTLER, R. R. Return of epidemic pertussis in the United States. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 13, p.343-45, 1994.

BAUER, H.; JUNG, T.; TSIKAS, D.; STICHTENOTH, D. O.; FRALICH, J. C.; NEUMANN, C. Nitric oxide inhibits the secretion of T-helper 1- and T-helper 2-associated cytokines in activated human T cells. **Immunol.**, v.90, p.205-211, 1997.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.** v.271, p.1424-1437, 1996.

BERGFORS, E.; TROLLFORS, B.; TARANGER, J.; LAGERGARD, T.; SUNDH, V.; ZACKRISSON, G. Parapertussis and pertussis: differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. **Int. J. Infect. Dis.**, v.3, p.140-146, 1999.

BERGGARD, K.; JOHNSON, E.; MOOI, F. R.; LINDAHL, G. *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin. **Infect. Immun.** v.65, p.3638-3643, 1997.

BOCHUD, P. Y.; CALANDRA, T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. **BMJ**, v.326, p.262-6, 2003.

BOGDAN, C. Of microbes, macrophages and nitric oxide. **Behring Inst. Mitt.**, v.99, p.58-72, 1997.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol.**, v.173, p.17-26, 2000.

BOGDAN, C. Nitric Oxide and the immune response. **Nature Immunol.**, Review, v.2, p. 907-916, 2001.

BORDET, J.; GENGOU, O. Le microbe de la coqueluche. **Ann. Inst. Pasteur (Paris)**., v. 20, p.731-741, 1906.

BORDET, J.; GENGOU, O., L'endotoxine coquelucheuse. **Ann. Inst. Pasteur (Paris)**., v. 23, p. 415-419, 1909.

BOUCHER, J. L.; CUSTOT, J.; VADON, S.; DELAFORGE, M.; LEPOIVRE, M.; TENU, J. P.; YAPO, A.; MANSUY, D. N^o-Hydroxy-L-Arginine, an Intermediate in the L-Arginine to Nitric Oxide Pathway, Is a Strong Inhibitor of Liver and Macrophage Arginase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.30, p.1614-21, 1994.

BOUTARD, V.; HAVOUI, R.; FOUQUERAY, B.; PHILIPPE, C.; MOULINOX, J. P.; BAUD, L. Transforming Growth Factor- β Stimulates Arginase Activity in macrophage – Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. **J. Immunol.**, v.155, p.2077-2084, 1995.

BROMBERG, K.; TANNIS, G.; STEINE, P. Detection of *Bordetella pertussis* associated with the alveolar macrophages of children with human immunodeficiency virus infection. **Infect. Immun.**, v.59, p.4715-4719, 1991.

BURNETTE, W.N. Perspectives in recombinant pertussis toxoid development. In: KOFF W., SIX HR (Ed.), **Vaccine Research and Development**. New York: Marcel Dekker, p.143-193, 1992.

CANTHABOO, C.; XING, D.; WEI, X. Q.; CORBEL, M. J. Investigation of Role of Nitric oxide in protection from *Bordetella pertussis* respiratory challenge. **Infect. Immun.**, v.70, p. 679-684, 2002.

CARBONETTI, N. H. Immunomodulation in the pathogenesis of *Bordetella pertussis* infection and disease. **Cur. Pharmacol.**, v.7, p. 272-278, 2007.

CASSAN, C.; PIAGGIO, E.; ZAPPULLA, J. P.; MARS, L. T.; COUTURIER, N.; BUCCIARELLI, F.; DESBOIS, S.; BAUER, J.; GONZALES-DUNIA, D.; LIBLAU, R. S. Pertussis Toxin Reduces the number of splenic Foxp3 regulatory T cells. **J. Immunol.**, v.177, p.1552-1560, 2006.

CHABY, R.; CAROFF, M. Lipopolysaccharides of *Bordetella pertussis*. In: WARDLAW; R.PARTON (Ed.) **Pathogen. Immun. in Pertussis**. v.8, p.247-266, 1998.

CHANG, C. I.; LIAO, J. C.; KUO, L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. **Am. J. Physiology.**, v.43, p. 342-348, 1998.

CHEN, C. H.; SEGUIN-DEVAUX, C.; BURKE, N. A.; ORISS, T. B.; WATKINS, S. C.; CLIPSTONE, N.; RAY, A. Transforming Growth Factor Blocks Tec Kinase Phosphorylation, Ca Influx, and NFATc Translocation Causing Inhibition of T cell differentiation. **J. Exp. Med.**, v.197, p.1689-1699, 2003.

CHEN, X.; HOWARD, O. M.; OPPENHEIM, J. J. Pertussis toxin by inducing IL-6 promotes the generation of IL-17-producing CD4 cells. **J. Immunol.**, v. 178, p.6123-6129, 2007.

CHERRY, J. D.; BRUNEL, P. A.; GOLDEN, G. S.; KARZON, D. T. Report of the task force on pertussis immunization – 1988, **Pediatrics**, v.81, p.939-984, 1998.

CHIWAKATA, C. B.; HEMMER, C. J.; DIETRICH, M. High levels of inducible nitric oxide synthase mRNA are associated with increased monocyte counts in blood and have a beneficial role in *Plasmodium falciparum* malaria. **Infect. Immun.**, v.68, p.394-399, 2000.

COOKSON, B. T.; VANDAMME, P.; CARLSON, L. C.; LARSON, A. M.; SHEFFIELD, J. V. L.; KERSTERS, K.; SPACH, D. H. Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, *B.hinzii*. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.2569-2571, 1994.

COOTE, J. G. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.8, p.137-161, 1992.

COWELL, J. L.; HEWLETT, E. L.; MANCLARK, C. R. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. **Infect. Immun.**, v.25, p.896-901, 1979.

CROWCROFT, N. S.; BOOY, R.; HARRISON, T.; et al. Severe and unrecognised: pertussis in UK infants. **Arch. Dis. Child.**, v.88, p.802-06, 2003.

CROWCROFT, N. S.; STEIN, C.; DUCLOS, P.; BIRMINGHAM, M. How best to estimate the global burden of pertussis? **Lancet Infect. Dis.**, v.3, p.413-18, 2003.

CUNDELL, D. R.; KANTHAKUMAR, K.; TAYLOR, G. W.; GOLDMAN, W. E.; FLAK, T.; COLE, P. J.; WILSON, R. Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function *in vitro*. **Infect. Immun.**, v.62, p. 639-643, 1994.

DE SERRES, G.; SHADMANI, R.; DUVAL, B.; BOULIANNE, N.; DÉRY, P.; DOUVILLE FRADET, M.; ROCHETTE, L.; HALPERIN, S. A. Morbidity of pertussis in adolescents and adults. **J. Infect. Dis.**, v.182, p.174-79, 2000.

DENIS, M.; PARLANE, N. A.; LACY-HULBERT, S. J.; SUMMERS, E. L.; BUDDLE, B. M.; WEDLOCK, D. N. Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is different in mammary gland secretions of lactating and drying off cows. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.15, p. 111-20, 2006.

ELAHI, S.; HOLMSTROM, J.; GERDTS, V. The benefits of using diverse animal models for studying pertussis. **Trends Microbiol.**, v.10, p.462-468, 2007.

EVEREST, P.; LI, J.; DOUCE, G.; CHARLES, I.; DE AZEVEDO, J.; CHATFIELD, S.; DOUGAN, G.; ROBERTS, M. Role of the Bordetella pertussis P 69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells, **Microbiology**, v.142, p.3261-3268, 1996.

FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; KONOWAL, A.; FREED, P. W.; WESTCOTT, J. Y.; HENSON, P. M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2, and PAF; **J. Clin. Invest.**, v.101, p.890-898, 1998.

FEDELE, G.; STEFANELLI, P.; SPENSIERI, F.; FAZIO, C.; MASTRANTONIO, P.; AUSIELLO, C. M. *Bordetella pertussis*- infected human monocyte-derived dendritic cells undergo maturation and induce Th1 polarization and interleukin-23 expression. **Infect. Immun.**, v.73, p.1590-1597, 2005.

FEDELE, G.; NASSO, M.; SPENSIERI, F.; PALAZZO, R.; FRASCA, L.; WATANABE, M.; AUSIELLO, C. M. Lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* differently modulate human dendritic cell functions resulting in divergent prevalence of Th17-polarized responses. **J. Immunol.**, v.181, p.208-216, 2008.

FERNANDEZ, R. C.; WEISS, A. A. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. **Infect. Immun.**, v. 62, p.4727-38, 1994.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de doenças**. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br>. Acesso em: 12 fev. 2008

FRIEDMAN, R. L.; NORDENSSON, K.; WILSON, L.; AKPORIAYE, E. T.; YOCUM, D. E. Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. **Infect. Immun.**, v.60, p.4578-4585, 1992.

FRIEDMAN, R. L.; FIEDERLEIN, L.; GLASSER, L.; GALGIANI, J. N. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: effects of affinity-purified adenylate cyclase on human polymorphonuclear leukocyte functions. **Infect. Immun.**, v.55, p.135-140, 1987.

GEHANNO, J. F.; PESTEL-CARON, M.; NOUVELLON, M.; CAILLARD, J. F. Nosocomial pertussis in healthcare workers from a pediatric emergency unit in France. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 20, p. 549-52, 1999.

GERLACH, G.; VON WINTZINGERODE, F.; MIDDENDORF, B.; GROSS, R. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. **Microbes Infect.**, v.3, p.61-72, 2001.

GEUIJEN, C. A.; WILLEMS, R. J.; BONGAERTSM, J.; GIELEN, H.; MOOI, F. R. Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. **Infect. Immun.**, v 65, p.4222-4228, 1997.

GOEBEL, E. M.; WOLFE, D. N.; ELDER, K.; STIBITZ, S.; HARVILL, E. T. O antigen protects *Bordetella parapertussis* from complement. **Infect. Immun.**, v.76, p.1774-1780, 2008.

GOODWIN, M. S.; WEISS, A. A. Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by *Bordetella pertussis* in infant mice. **Infect. Immun.**, v.58, p.3445-3447, 1990.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Ver. Immunol.**, v.3, p.23-35, 2003.

GOTOH, T.; MORI, M. Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents Nomediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW264.7 cells. **J. Cell. Biol.**, v.144, p. 427–434, 1999.

GROSS, M. K.; AU, D. C.; SMITH, A. L.; STORM, D. R. Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional *cyaA* toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 89, p. 4898-4902, 1992.

GUEIRARD, P.; DRUILHE, A.; PRETOLANI, M.; GUIZO, N. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection in vivo. **Infect. Immun.**, v.66, p.17187-1725, 1998.

GURIS, D.; STREBEL, P. M.; BARDENHEIER, B.; Changing epidemiology of pertussis in the United States increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990-1996. **Clin. Infect. Dis.**, v.28, p.1230-37, 1999.

GUSTAFSSON, L.; HALLANDER, H. O.; OLIN, P.; REIZENSTEIN, E.; STORSAETER, J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. **New Engl. J. Med.**, v.334, p.349-355, 1996.

HANNAH, J. H.; MENOZZI, F. D.; RENAULD, G.; LOCHT, C.; BRENNAN, M. J. Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. **Infect. Immun.**, v. 62, p.5010-5019. 1994.

HASS, A. Reprogramming the phagocytosis pathway-intracellular pathogens and their vacuoles. **Mol. Membr. Biol.**, v.15, p.103-121, 1998.

HAZENBOS, W. L.; VAN DEN BERG, B. M.; VAN FURTH, R. Very late antigen-5 and complement receptor type 3 cooperatively mediate the interaction between *Bordetella pertussis* and human monocytes. **J. Immunol.**, v.151, p.6274;6282, 1993.

HAZENBOS, W. L.; GEUIJEN, C. A.; VAN DEN BERG, B. M.; MOOI, F. R.; VAN FURTH, R. *Bordetella pertussis* fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD. **J.Infect. Dis.**, v.171, p.924-929, 1995.

HEININGER, U.; STEHR, K.; SCHMITT-GROHE, S.; LORENZ, C.; ROST, R.; CHRISTENSON, P. D.; UBERALL, M.; CHERRY, J. D. Clinical characteristics of illness caused by *Bordetella parapertussis* compared with illness caused by *Bordetella pertussis*. **Infect. Dis. J.**, v.13, p.306-309, 1994.

HEININGER, U.; STEHR, K.; SCHMIDT-SCHLAPFER, G.; *Bordetella pertussis* infections and sudden unexpected deaths in children . **Eur. J. Pediatr.** v.155, p.551-53, 1996.

HEININGER, U.; KLICH, K.; STEHR, K.; CHERRY, J. D.; Clinical findings in *Bordetella pertussis* infections: results of a prospective multicenter surveillance study. **Pediatrics**, v. 100, p. 100-106, 1997.

HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P. Virulence functions of autotransporter proteins. **Infect. Immun.**, v.69, p.1231-1243, 2001.

HICKEY, F. B.; BRERETON, C. F.; MILLS, K. H. G. Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* inhibits TLR-induced IRF-1 and IRF-8 activation and IL-12 production and enhances IL-10 through MAPK activation in dendritic cells. **J. Leukoc. Biol.**, v.84, p.234-243, 2008.

HIGGINS, S. C.; LAVELLE, E. C.; MCCANN, C.; KEOGH, B.; MCNEELA, E.; BYRNE, P.; O'GORMAN, B.; JARNICKI, A.; MCGUIRCK, P.; MILLS, K. H. G. Toll-Like Receptor 4-Mediated Innate IL-10 Activates Antigen-Specific Regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. **J. Immunol.**, v.171, p.3119-3127, 2003.

HUANG, F. P.; XU, D.; ESFANDIARI, E. O.; SANDS, W.; WEI, X. Q.; LIEW, F. Y. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v.28, p.4062-4070, 1998.

INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. **J. Exp. Med.**, v.193, p.777-783, 2001.

IVANOFF, B.; ROBERTSON, S. E. Pertussis: a worldwide problem. **Dev. Biol. Stand.**, v.89, p3-13, 1997.

KAWAMURA, T.; BLUMENSCHN, W. M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWICK, J. D.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. Critical role of NK1 T cells in IL-12 induced immune responses in vivo. **J. Immunol.** v. 160, p.16-19, 1998.

KERSTERS, K.; HINZ, K. H.; HERTLE, A.; SEGERS, P.; LIEVENS, A.; SIEGMANN, O.; DE LEY, J. *Bordetella avium* so. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.34, p.56-70, 1984.

KHELEF, N.; SAKAMOTO, H.; GUIZO, N. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. **Microb. Pathogen.**, v.12, p.227-235, 1992.

KHELEF, N.; ZYCHLINSKY, A.; GUIZO, N. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophage: role of adenylate cyclase-hemolysin. **Infect. Immun.**, v.61, p. 4064-4071, 1993.

KUROSACA, K.; WATANABE, N.; KOBAYASHI, Y. Potentiation by human serum of anti-inflammatory cytokine production by human macrophages in response to apoptotic cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 71, p.950-956, 2002.

LANGRISH, C. L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHN, W. M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWICK, J. D.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J. Exp. Med.**, v.201, p.233-240, 2005.

LEININGER, E.; ROBERTS, M.; BALLANTINE, S. P.; CHARLES, I. G.; FAIRWEATHER, N.; NOVOTNY, P.; BRENNAN, M. J. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.88, p.345-349, 1991.

LI, J.; BILLIAR, T. R. The role of nitric oxide in apoptosis. **Semin. Perinatol.**, v.24, p.46-50, 2000.

LI, L. J.; DOUGAN, G.; NOVOTNY, P.; CHARLES, I. G. p70 pertactin, an outer-membrane protein form *Bordetella parapertussis*: cloning, nucleotide sequence and surface expression in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v.5, p.409-417, 1991.

LIESE, J. C.; RENNER, C.; STOJANOV, S.; BELOHRADSKY, B. H. and The Munich Vaccine Study Group. Clinical and epidemiological picture of B. pertussis and B. parapertussis infections after introduction of acellular pertussis vaccines. **Arch. Dis. Child.**, v.88, p.684-687, 1998.

LIRK, P.; HOFFMANN, G.; RIEDER, J. Inducible nitric oxide synthase – time for reappraisal. **Curr. Drug Targets.**, v.1, p.89-108, 2002.

LIVEY, I.; WARDLAW, A. C. Production and properties of *Bordetella pertussis* heat-labile toxin. **J. Med. Microbiol.**, v.17, p.91-103, 1984.

LOCHT, C.; BERTIN, P.; MENOZZI, F. D.; RENAULD, G. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp. **Mol. Microbiol.**, v.9, p.653-660, 1993.

LOUIS, C. A.; REICHNER, J. S.; HENRY JR, W. L.; MASTROFRANCESCO, B.; GOTOH, T.; MORI, M.; ALBINA, J. E. Distinct arginase isoforms expressed in primary and transformed macrophages: regulation by oxygen tension. **Am. J. Physiol.**, v 274, p.775, 1998.

MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J.; CEPONIS, A.; MILLER, N. E.; HUKKANEN, M.; MA, G. F. Regulation of macrophage activation. Review. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v.60, p.2334-2346, 2003.

MACIEJEWSKI, J. P.; SELLERI, C.; SATO, T.; CHO, H. J.; KEEFER, L. K.; NATHAN, C. F.; YOUNG, N. S. Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **J. Clin. Inves.**, v.96, p. 1085–1092, 1995.

MAHON, B. P.; MILLS, K. H. G. Interferon- γ mediated immune effector mechanisms against *Bordetella pertussis*. **Immunol. Lett.**, v.68, p.231-217, 1999.

MAKOFF, A. J.; OXER, M. D.; BALLANTINE, S. P.; FAIRWEATHER, N. F.; CHARLES, I. G. Protective surface antigen p69 of *Bordetella pertussis*: its characterization and very high level expression in *Escherichia coli*. **BioTechnology.**, v.8, p.1030-1033, 1990.

MANCLARK, C. R.; COWELL, J. L. Pertussis in: Bacterial Vaccine. **René Germanier, Suíça.** v. 18, p.69-105, 1984.

MARODI, L. Innate cellular immune responses in newborns. **Clin. Immunol.**, v.118, p.137 – 144, 2006.

MARTINO, A.; VOLPE, E.; AURICCHIO, G.; COLIZZI, V.; BALDINI, P. M. Influence of pertussis toxin on CD1a isoform expression in human dendritic cells. **J. Clin. Immunol.**, v.26, p.153-159, 2006.

MATTNER, F.; DI PADOVA, K.; ALBER, G. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major* **Infect. Immun.**, v. 65, p.4378-4383, 1997.

MCGUIRK, P.; MCCANN, C.; MILLS, K. H. G. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis* **J. Exp. Med.**, v 195, p. 221-231, 2002.

MESCHER, A. L.; NEFF, A. W. Regenerative capacity and the developing immune system. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v.93, p.39-66, 2005.

MILLS, K. H. G. Immunity to *Bordetella pertussis*. **Microbes Infect.**, v.3, p.655-677, 2001.

MILLS, K. H. G.; BARNARD, A.; WATKINS, J.; REDHEAD, K.. Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. **Infect. Immun.**, v. 61, p.399–410, 1993.

MOBBERLEY-SCHUMAN, P. S.; CONNELLY, B.; WEISS, A.A .; Phagocytosis of *Bordetella pertussis* incubated with convalescent serum. **J. Infect. Dis.**, v.187, p.1646-1653, 2003.

MONTARAZ, J. A.; NOVOTNY, P.; IVANYI, J. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. **Infect. Immun.**, v.47, p.744-751, 1985.

MORRIS, S. M.; KEPK-LENHHART, D.; CHEN, L. C. Differential regulation of arginase and inducible nitric oxide synthase in macrophage cells. **Am. J. Physiol.**, v.275, p.740, 1998.

MÜLLER, M.; HILDEBRANDT, A. Nucleotide sequence of the 23S rRNA genes from *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* and *B. avium*, and their implications for phylogenetic analysis. **Nucleic Acids Res.**, v.21, p.3320, 1993.

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MORÁN, J. M.; CENTENO, F.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophage and dendritic cells. **J. Immunol.**, v.163, p.3771-3777, 1999.

MUNFORD, R. S.; VARLEY, A. W. Shield as signal: lipopolysaccharides and the evolution of immunity to gram-negative bacteria. **PLoS Pathog.**, v.2, p.67, 2006.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. The Global burden of disease: a comprehensive assesment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. **Lancet**, v. 349, p. 1498-1504, 1996.

MUZIO, M.; MANTOVANI, A. Toll Like receptors. **Microbes Infect.**, v. 3, p.251-255, 2000.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.97, p.8841-8848, 2000.

NJAMKEPO, E.; PINOT, F.; FRANCOIS, D.; GUISO, N.; POLLA, B. S.; BACHELET, M. Adaptive responses of human monocytes infected by *Bordetella pertussis*: the role of adenylate cyclase hemolysin. **J. Cell. Physiol.**, v. 183, p.91-99, 2000.

NTEZAYABO, B.; DE SERRES, G.; DUVAL, B. Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.22, p.22-7, 2003.

OKA, T.; HONDA, T.; MOROKUMA, K.; GINNAGA, A.; OHKUMA, K.; SAKOH, M.; Enhancing effects of pertussis toxin B oligomer on the immunogenicity of influenza vaccine administrated intranasally. **Vaccine**, v.12, p. 1255-1258, 1994.

PEARSON, R. D.; SYMES, P.; CONBOY, M.; WEISS, A.; HEWLETT, E. I. Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. **J. Immunol.**, v.139, p. 2749-2754, 1987.

PEPPLER, M. S. Two physically and serologically distinct lipopolysaccharide profiles in strains of *Bordetella pertussis* and their phenotype variants. **Infect. Immun.**, v.43, p.224-232, 1984.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Pertussis: United States, 1997-2000. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.** v. 51, p. 73-6, 2002.

PERTUSSIS VACCINES. **Whly Epidemiol. Rec.** v.74, p. 137-44, 1999.

POLLOCK, K. G.; CONACHER, M.; WEI, X. G.; ALEXANDER, J.; BREWER, J. M. Interleukin-18 plays a role in both the alum-induced T helper 2 response and the T helper 1 response induced by alum-adsorbed interleukin-12. **Immunology**, v.108, p. 137-143, 2003.

POPOVIC, P. J.; ZEH, H. J.; OCHOA, J. B. Arginine and Immunity. **J. Nutrition**, v.137, p.1681S-1686S, 2007.

RAETZ, C. R. H.; REYNOLDS, C. M.; TRENT, M. S.; BISHOP, R. E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Ann. Rev. Biochem.**, v.76, p.295-329, 2007.

RAYNAUD, C.; MEIBOM, K. L.; LETY, M. A.; DUBAIL, I.; CANDELA, T.; FRAPY, E.; CHARBIT, A. Role of the wbt Locus of *Francisella tularensis* in Lipopolysaccharide O-Antigen Biogenesis and Pathogenicity. **Infect. Immun.**, v.75, p.536-541, 2007.

REEVES, P. Role of O-antigen variation in the immune response. v. 3, **Microbiol.**, v.3, p. 381-386, 1995.

REISS, C. S.; KOMATSU, T. Does nitric oxide play a critical role in viral infections. **J. Virol.**, v.72, p.4547-4551, 1998.

RELMAN, D.; TUOMANEN, E.; FALKOW, S.; GOLENBOCK, D. T.; SAUKKONEN, K.; WROGHT, S. D. Recognition of a bacterial adhesion by na integrin: macrophage CR3 (alpha

M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. **Cell.**, v.61, p.1375-1382, 1990.

RESTIF, O.; WOLFE, D. N.; GOEBEL, E. M.; BJORNSTAD, O. N.; HARVILL, E. T. Of mice and men: assymetric interactions between *Bordetella* pathogen species. **Parasitol.**, v.1, p.1-13, 2008.

RICH, J.; BORTON, A.; WANG, X. Transforming growth factor- β signaling I cancer. **Microsc. Res. Tech.**, v.52, p.363-373, 2001.

RIVAS-SANTIAGO, B.; JUAREZ, E. Toll-Like receptor in lung response to pathogens. **Rev. Invest. Clin.**, v.59, p.481-8, 2007.

ROBERTS, M.; FAIRWEATHER, N. F.; LEININGER, E.; PICKARD, D.; HEWLETT, E. L.; ROBINSON, A.; HAYWARD, C.; DOUGAN, G.; CHARLES, I. G. Construction and characterization of *Bordetella pertussis* mutants lacking the vir-regulated P69 outer membrane protein. **Mol. Microbiol.**, v.5, p.1393-1404, 1991.

ROTHER, H.; KOLB, H. Strategies of protection from nitric oxide toxicity in islets inflammation. **J. Mol. Med.**, v.77, p.40-44, 1999.

RUTSCHMAN, R.; LANG, R.; HESSE, M.; IHLE, J. N.; WYNN, T. A.; MURRAY, P. J. Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. **J. Immunol.**, v.166, p.2173-2177, 2001.

SAEFTEL, M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.**, v.69, p.2252-2259, 2001.

SAUKKONEN, E.; CABELLOS, C.; BURROGHS, M.; PARSAD, S.; TUOMANEN, E. Integrin mediated localization of *Bordetella pertussis* within human macrophages: role in pulmonary colonization. **J. Exp. Med.**, v.173, p.1143-1149, 1991.

SCALABRINO, G.; LORENZINI, E. C.; FERIOLI, M. E. Polyamines and mammalian hormones. i. Biosynthesis, interconversion and hormone effects. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.77, p.1, 1991.

SEBASTIAN, S.; DILLON, S. T.; LYNCH, J. G.; BLALOCK, L. T.; BALON, E.; LEE, K. T.; COMSTOCK, L. E.; CONLAN, J. W.; RUBIN, E. J.; TZIANABOS, A. O.; KASPER, D. L. A defined O-antigen polysaccharide mutant of *Francisella tularensis* live

vaccine strain has attenuated virulence while retaining its protective capacity. **Infect. Immun.**, v.75, p.2591-2602, 2007.

SENZILET, L. D.; HALPERIN, S. A.; SPIKA, J. S.; ALAGARATNAM, M.; MORRIS, A.; SMITH, B. Sentinel Health Unit Surveillance System Pertussis Working Group, Pertussis is a frequent cause of prolonged cough illness in adults and adolescents. **Clin. Infect. Dis.**, v.32, p.1691-7, 2001.

SIKORA, J. P. The role of cytokines and reactive oxygen species in the pathogenesis of sepsis. **Pol. Merkur. Lekarski.**, v.43, p.47-50, 2000.

SKOWRONSKI, D. M.; DE SERRES, G.; MACDONALD, D.; WU, W.; SHAW, C.; MACNABB, J. The changing age and seasonal profile of pertussis in Canada. **J. Infect. Dis.** v.185, p.1448-53, 2002.

SMITH, A. M.; GUZMÁN, C. A.; WALKER, M. J. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control, **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 25, p.309-333, 2001.

SPENSIERI, F.; FEDELE, G.; FAZIO, C.; NASSO, M.; STEFANELLI, P.; MASTRANTONIO, P.; AUSIELLO, C. M. *Bordetella pertussis* inhibition of interleukin-12 (IL-12) p70 in human monocyte-derived dendritic cells blocks IL-12 p35 through adenylyate cyclase toxin-dependent cyclic AMP induction. **Infect. Immun.**, v.74, p.2831-2838, 2006.

STEED, L. L.; AKPORIAYE, E. T.; FRIEDMAN, R. L. *Bordetella pertussis* induces respiratory burst activity in human polymorphonuclear leukocytes. **Infect. Immun.**, v.60, p.2101-2105, 1992.

STEHR, K.; HEININGER, U.; UHLENBUSCH, R.; ANGERSBACH, P.; HACKELL, J.; ECKHARDT, T. Immunogenicity and safety of a monovalent, multicomponent acellular pertussis vaccine in 15 month-6-year-old German children. Monovalent Acellular Pertussis Vaccine Study Group. **Eur. J. Pediatr.**, v.154, p.209-14, 1995.

STENGER, S.; DONHAUSER, N.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.**, v.183, p.1501-1514, 1996.

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; MANNING, P.; BOGDAN, C. L-N6-(1-iminoethyl)lysine potently inhibits inducible nitric oxide synthase and is superior to NG-monomethyl-arginine in vitro and in vivo. **Eur. J. Pharmacol.**, v.294, p.703-712, 1995.

TAMURA, M.; NOGIMORI, K.; MURAI, S.; YAJIMA, M.; ITO, K.; KATADA, T.; UI, M.; ISHII, S. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. **Biochemistry**, v.21, p.5516-5522, 1982.

TAN, T.; TRINDADE, E.; SKOWRONSKI, D. Epidemiology of pertussis. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.24, p.10-18, 2005.

TANAKA, M.; VITEK, C. R.; PASCUAL, F. B.; BISGARD, K. M.; TATE, J. E.; MURPHY, T. V. Trends in pertussis among infants in the United States, 1980-1990. **FAMA**, v.290, p.2968-75, 2003.

TAYLOR-ROBINSON, A. W.; LIEW, F. Y.; SEVERN, A.; XU, D.; MCSORLEY S. J.; GARSIDE, P.; PADRON, J.; PHILLIPS, R. S. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. **Eur. J. Immunol.**, v.24, p.980-984, 1994.

TIPPING, P. G. Toll-Like receptors: The interface between Innate and Adaptive Immunity. **J Am. Soc. Nephrol.**, v.17, p.1769-1771, 2006.

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.51, p.443-452, 2007.

TUOMANEN, E. Piracy of adhesins: attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesin of *Bordetella pertussis*. **Infect. Immun.**, v. 54, p.905-908, 1986.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: Complexity in action. **Annu. Rev. Immunol.**, v.20, p.825-52, 2002.

VAN DAMME, P.; HEYNDRICKX, M.; VANCANNEYT, M.; HOSTE, B.; DEVOS, P.; FALSEN, E.; KERSTERS, K.; HINZ, K. H. *Bordetella trematum* sp. nov. isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, p. 849-858, 1996.

VAN DAMME, P.; HOMMEZ, J.; VANCANNEYT, M.; MOUSIEURS, M.; HOSTE, B.; COOKSON, B.; WIRSING VON KONIG, C. H.; KERSTERS, K.; BLACKALL, P. J. *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.45, p.37-45, 1995.

VAN DEN AKKER, W. M. R. Lipopolysaccharide expression within the genus *Bordetella* – influence of temperature and phase variation. **Microbiol.**, v.144, p.1527-1535, 1998.

VAN DER VEEN, R. C. Nitric oxide and T helper cell immunity. **Int. Immunopharmacol.**, v.1, p.1491–1500, 2001.

VANNIER, E.; MILLER, L. C.; DINARELLO, C. A. Coordinated antiinflammatory effects or interleukin 4: interleukin 4 supress interleukin 1 production but up-regulates gene expresión and síntesis of interleukin 1 receptor antagonist . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 89, p.4076-4080, 1992.

VITEK, C. R.; PASCUAL, F. B.; BAUGHMAN, A. L.; MURPHY, T. V. Increase in deaths from pertussis among young infants in the United States in the 1990s. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.22, p.628-34, 2003.

VODOVOTZ, Y.; BOGDAN, C.; PAIK, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. - Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor B. **J. Exp. Méd.**, v.178, p. 605, 1993.

WALDMAN, E.; DA SILVA, L. J.; MONTEIRO, C. A. Trajetória das doenças infecciosas: Da eliminação da poliomielite à reintrodução da cólera. **Informe Epidemiológico do SUS**, v.8, p.5-47, 1999.

WATANABE, M.; TAKIMOTO, H.; KUMAZAWA, Y.; AMANO, K. Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis*. **J. Gen. Microbiol.**, v.136, p.489-493, 1990.

WATANABE, M.; NAGAI, N. Reciprocal protective immunity against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in a murine model of respiratory infection. **Infect. Immun.**, v.69, p.6981-6986, 2001.

WEISS, A. A.; GOODWIN, M. S. Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. **Infect. Immun.**, v. 57, p.3757-3764, 1989.

WEISS, G.; WACHTER, H.; FUCHS, D. Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism. **Immunol. Today**, v.16, p. 495-500, 1995.

WEYANT, R. S.; HOLLIS, D. G.; WEAVER, R. E.; AMIN, M. F. M.; STEIGER-WALT, A. G.; OCONNOR, S. P.; WHITNEY, A. M.; DANESHVAR, M. I.; MOSS, C. W.; BRENNER, D. J. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new Gram-negative species associated with septicemia. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p. 1-7, 1995.

WILLEMS, R. J.; GEUIJEN, C.; VAN DER HEIDE, H. J. G.; MATHESON, M.; ROBINSON, A.; VERSLUIS, L. F.; EBBERINK, R.; THEELEN, J.; MOOI, F. R. Isolation of a putative fimbrial adhesin from *Bordetella pertussis* and the identification of its gene. **Mol. Microbiol.**, v.9, p.623-634, 1993.

WILLEMS, R. J.; VAN DER HEIDE, H. G.; MOOI, F. R. Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. **Mol. Microbiol.**, v.6, p.2661-2671, 1992.

WIRSING VON KONIG. C. H.; HALPERIN, S.; RIFFELMANN, M.; GUIISO, N. Pertussis of adults and infants . **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, p.744-50, 2002.

WOLFE, D. N.; GOEBEL, E. M.; BJORNSTAD, O. N.; RESTIF, O.; HARVILL, E. T. The O antigen enables *Bordetella parapertussis* to avoid *Bordetella pertussis* – Induced Immunity, **Infect. Immun.**, v. 75, p.4972-4979, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **The World Health Report 2005**: make every mother and child count. Geneva, 2005.

WORTIS, N.; STREBEL, P. M.; WHARTON, M.; BARENHEIER, B.; HARDY, I. R. Pertussis deaths: report of 23 cases in the United States, 1992 and 1993, **Pediatrics**, v. 97, p. 607-612, 1996.

XING, D. K.; CANTHABOO, C.; CORBEL, M. J. Effect of pertussis toxin on the induction of nitric oxide synthesis in murine macrophages and protection in vivo. **Vaccine**, v.18, p.:2110-2119, 2000.

ZHANG, X.; MORRISON, D. C. Pertussis toxin-sensitive factor differentially regulates lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v.150, p.1011-8, 1993.