

CYNTHIA SOARES GALHARDO

**FATORES QUE DETERMINAM A PRODUÇÃO DE IL-12
EM MACRÓFAGOS MURINOS ATIVADOS POR
Bordetella pertussis e *B. parapertussis***

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

Orientadora: Dra. Monamaris Marques Borges

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

RESUMO

GALHARDO, C. S. **Fatores que determinam a produção de IL-12 em macrófagos murinos ativados por *Bordetella pertussis* e *B. parapertussis*.** 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A coqueluche é uma doença respiratória muito severa em crianças sendo reemergente em países com alta cobertura vacinal, o que lhe atribui alta relevância em saúde pública. Sua reemergência foi atribuída a alguns fatores dentre eles a adaptação do patógeno ao hospedeiro, possibilitando a regulação de fatores de virulência e sua sobrevivência. A *Bordetella pertussis* e *B. parapertussis* são os agentes etiológicos da coqueluche. Estas bactérias diferem na estrutura da molécula de LPS e na expressão da toxina pertussis, o que pode refletir na capacidade de infectar o hospedeiro e na resposta imune induzida. A infecção com *B. pertussis* induz a resposta Th1, crucial no controle de infecções. A IL-12 é sintetizada principalmente por macrófagos e células dendríticas e induz a produção de IFN- γ por células *Natural killer* (NK), linfócitos TCD4 $^{+}$ e TCD8 $^{+}$, promovendo a diferenciação de Th1 e a produção de anticorpos que tem papel na resolução da infecção, além de favorecer a eficácia de vacinas. Os macrófagos possuem receptores Toll-like que reconhecem moléculas padrões associados a patógenos, iniciando a resposta inflamatória devido à produção de quimiocinas, citocinas e outros mediadores imunes importantes para a proteção do hospedeiro. Pouco se conhece sobre os mecanismos de controle da síntese de IL-12 em infecções com *B. pertussis* e *B. parapertussis*, além disto, as vacinas pertussis comerciais disponíveis são ineficientes contra *B. parapertussis*. Neste trabalho investigamos alguns mecanismos de resposta inata que controlam a síntese de IL-12 em macrófagos derivados de medula óssea murina (MφDM) ativados *in vitro* com *B. pertussis* e *B. parapertussis*. Essas informações podem auxiliar na definição de sinais moleculares que possam ser alvo de drogas ou auxiliar no desenvolvimento de vacinas. Nossos resultados mostraram que IL-12p40 e TNF- α foram produzidos pelos MφDM ativados com as duas espécies de bactérias, não havendo diferença significativa entre elas quanto à síntese de IL-12p40, porém a infecção ativa com *B. parapertussis* induziu níveis superiores de TNF- α em relação a *B. pertussis*. Na ativação com qualquer uma das bactérias, a síntese de IL-12p40 foi dependente de TNF- α , MyD88 e NFκB e independente de MAPK p38 e ERK 1/2. No entanto, a produção desta citocina foi dependente de TLR-4 durante a ativação com *B. pertussis*, mas envolveu outras vias independentes de MyD88 e TLR-4 na ativação com *B. parapertussis*. Apesar da complexidade antigênica destas duas bactérias, a ativação de MφDM com qualquer uma delas não induziu a síntese de IL-12p70, necessitando de sinais moleculares adicionais provenientes de IFN- γ que favoreceu a síntese desta citocina em resposta a estimulação com estas bactérias. Além disto, a produção de IL-12p70 foi favorecida igualmente pelo bloqueio da via PI3K, MAPK p38 e ERK1/2 e pela adição exógena de PT (inibidor de proteína G α i) durante a ativação com *B. parapertussis*, comprovando que estas vias de sinalização regulam a produção desta citocina. Portanto, nossos dados mostram que a síntese de IL-12 pelos MφDM ativados por *B. pertussis* e *B. parapertussis* é controlada por diversas vias de sinalização dependentes e independentes de TLR-4 neste modelo.

Palavras-chave: *Bordetella* sp. Coqueluche. Macrófagos. IL-12. Receptores Toll-like. Vias de sinalização.

ABSTRACT

GALHARDO, C. S. **Factors determining the production of IL-12 in murine macrophages activated by *Bordetella pertussis* and *B. parapertussis*.** 2013. 96 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Whooping cough is a severe respiratory disease affecting mainly children around the world. It is reemerging in countries with a high vaccination coverage, which makes it a relevant threat for public health. Its reemergence has been attributed to factors such as the adaptation of the pathogen to the host, enabling the regulation of virulence factors and the survival of the pathogen. *Bordetella pertussis* and *B. parapertussis* are the etiologic agents of the disease and they differ from each other on the LPS molecule structure and on the expression of the pertussis toxin, which may affect the infecting capacity and the induction of the immune response. *B. pertussis* induces the expression of Th1, which is crucial in infection control. IL-12 is mainly synthesized by macrophages and dendritic cells and induces the production of IFN- γ by natural killer cells and TCD4 $^{+}$ and TCD8 $^{+}$ lymphocytes, which then induces Th1 differentiation and the production of antibodies, which play a role in infection resolution and improve the efficacy of vaccines. Macrophages possess Toll-like receptors which recognize pathogen associated molecular patterns, triggering the inflammatory response through the release of chemokines, cytokines and other immune mediators important for host protection. Little is known on the mechanisms controlling IL-12 synthesis in *B. pertussis* and *B. parapertussis* infections. In addition, commercially available pertussis vaccines are inefficient against *B. parapertussis*. In this work we have investigated some of the innate response mechanisms involved in the control of the synthesis of IL-12 by murine bone marrow derived macrophages (MφDM) activated *in vitro* with *B. pertussis* and *B. parapertussis*. This knowledge may help define the molecular signals that could be targets for drugs or be used in the development of vaccines. Our results showed that IL-12p40 and TNF- α are produced by MφDM activated by either bacterial species, with no significant differences between them. On the hand, active *B. parapertussis* infection induced higher levels of TNF- α in comparison with *B. pertussis*. Upon activation with any of the bacteria, synthesis of IL-12p40 depended on TNF- α , MyD88 and NFκB, but did not depend on MAPK p38 and ERK 1/2. However, production of this cytokine was dependent on TLR-4 during activation with *B. pertussis*, although it involved additional MyD88 and TLR-4 independent pathways upon activation with *B. parapertussis*. In spite of their antigenic complexity, MφDM activation with either one of these bacteria did not induce IL-12p70 synthesis, requiring additional molecular signals such as IFN- γ , which did induce IL-12p70 synthesis in response to stimulation with these pathogens. Furthermore, blocking the PI3K, MAPK p38 and ERK1/2 pathways and the addition of exogenous PT (an inhibitor of the Gαi protein) also contributed to induce IL-12p70 production during activation with *B. parapertussis*, confirming that these signaling pathways control the production of this cytokine. Thus, our results show that IL-12 synthesis by MφDM activated with either *B. pertussis* or *B. parapertussis* is controlled through a number of both TLR-4 dependent and independent signaling pathways.

Keywords: *Bordetella* sp. Whooping cough. Macrophages. IL-12. Toll-Like Receptors. Signaling pathways.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Bordetella*

O gênero *Bordetella* comprehende bactérias aeróbias, Gram-negativas, cocobacilos que estão associadas a infecções respiratórias em humanos e animais (KERR; MATTHEWS, 2000). Nove espécies pertencem a este gênero: *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. homensii*, *B. trematum*, *B. petrii* e *B. ansorpii*. Dentre elas, as três primeiras são estreitamente relacionadas, tendo recebido maior atenção devido à sua importância para saúde pública (WOLFE; KIRIMANJESWARA; HARVILL, 2005).

A *B. pertussis*, descrita em 1906 por Bordet e Gengou, infecta somente o trato respiratório de humanos causando a coqueluche ou pertussis (CARBONETTI, 2007).

B. parapertussis é o outro agente etiológico da coqueluche humana, embora tenha sido encontrada associada a infecções respiratórias em ovinos (CULLINANE et al., 1987). Análises filogenéticas mostraram que os isolados bacterianos de humanos são distintos dos isolados de carneiros (VAN DER ZEE et al., 1997). Assim, essa bactéria pode ser classificada em dois grupos, um que infecta somente o homem e o outro que infecta apenas ovinos (CUMMINGS et al., 2004).

Bordetella bronchiseptica raramente infecta o homem sendo responsável pela causa de doença respiratória em cães, suínos, caprinos e equinos (WOOLFREY; MOODY, 1991).

Parkhill et al. (2003) sequenciaram o genoma das três espécies de *Bordetella* descritas acima e mostraram que o genoma de *B. pertussis* é menor que o de *B. parapertussis* que por sua vez é menor que o de *B. bronchiseptica*. A diferença no tamanho e a comparação da sequência desses três genomas suportam a hipótese que *B. pertussis* e *B. parapertussis* evoluíram independentemente de uma cepa de *B. bronchiseptica*. Assim, essas três espécies são coletivamente referidas como “*B. bronchiseptica cluster*” (GERLACH et al., 2001).

Bordetella avium provoca doença respiratória em perus e outras aves, mas não foi encontrada em seres humanos (KERSTERS et al., 1984). Já a *Bordetella hinzii* foi isolada em aves domésticas (VANDAMME et al., 1995) e em humanos sendo reconhecida como um patógeno oportunista que infecta indivíduos imunocomprometidos (HRISTOV et al., 2008). *Bordetella homensii* foi associada à septicemia, endocardite e insuficiência respiratória em humanos (TANG et al., 1998). *Bordetella trematum* foi isolada de feridas e infecções de ouvido em humanos (VANDAMME et al., 1996). Já *Bordetella petrii* é o primeiro membro

desse gênero que foi isolado do ambiente sendo capaz de crescer anaerobiamente (VON WINTZINGERODE et al., 2001). E por fim, a *Bordetella ansorpii* foi isolada do exsudato purulento de um cisto epidérmico humano (KO et al., 2005).

1.2 *Bordetella*: Fatores de virulência

A *Bordetella pertussis* sintetiza e secreta uma série de fatores de virulência que são classificados em adesinas e toxinas e estão envolvidos na sua patogenicidade (BASSINET et al., 2000).

Dentre as adesinas destaca-se a hemaglutinina filamentosa (FHA), uma proteína com 220kDa, que forma estruturas filamentosas na superfície da bactéria. Ela medeia à adesão de *B. pertussis* tanto as células ciliadas do epitélio respiratório quanto aos macrófagos (SMITH et al., 2001). Além da FHA, participam do processo de adesão de *B. pertussis* à célula do hospedeiro, a toxina pertussis (PT), duas fimbrias (tipo 2 e 3), além de uma proteína de membrana externa, a pertactina (PRN) (BASSINET et al., 2000).

A PT é um importante fator de virulência produzido exclusivamente por *B. pertussis* (CARNONETTI, 2010). Essa toxina é uma proteína hexamérica do tipo AB (117 kDa) composta por cinco subunidades distintas (SMITH; GUZMÁN; WALKER, 2001): a subunidade A, também conhecida como S1, possui atividade enzimática. E a subunidade B é composta pelas subunidades S2, S3, duas S4 e S5 (CARNONETTI, 2010).

Os dímeros formados entre S2-S4 e S3-S4 unidos pela subunidade S5 funcionam como adesina, pois se ligam aos receptores celulares fixando a toxina à superfície das células do hospedeiro (células ciliadas do epitélio respiratório e macrófagos alveolares) mediando a entrada de S1 nessas células (CARNONETTI et al., 2007; KERR; MATTHEWS, 2000). No citosol, S1 catalisa a transferência da ADP-ribose do NAD para a subunidade α inibitória da proteína G (G α i) (KATADA; TAMURA; UI, 1983) e assim inibe a atividade dessa proteína (MATOO; CHERRY, 2005). Portanto, a G α i é incapaz de inibir a atividade da adenilato ciclase da célula do hospedeiro que continua ativada promovendo o aumento de AMPc intracelular, o qual interfere no processo metabólico celular e interrompe vias de sinalização. Dessa maneira, tem início os sintomas sistêmicos causados pela infecção com *B. pertussis*, como a leucocitose, hiperinsulinemia, hipoglicemias e sensibilidade histamínica (CARBONETTI, 2010; LOCHT; COUTTE; MIELCAREK, 2011).

As manifestações clínicas da infecção causada por *B. pertussis* geralmente são muito mais severas se comparada a de *B. parapertussis* (MASTRANTONIO et al., 1998),

possivelmente pelo fato do gene responsável pela síntese da PT não ser transcrita em *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* devido a mutações na região promotora (ARICO; RAPPOLI, 1987).

A toxina adenilato ciclase (ACT ou CyaA) é secretada por todas as espécies de *Bordetella* que infectam mamíferos (MATOO; CHERRY, 2005) e também induz o aumento de AMPc intracelular, porém de modo diferente ao descrito para PT. O alvo da ACT são as células fagocíticas por se ligar especificamente ao receptor de superfície, $\alpha M\beta 2$ integrina ou CR3 (também conhecido como Mac-1 ou CD11b/CD18). Após entrar nas células eucarióticas, a ACT é ativada pela calmodulina no citoplasma e converte ATP em AMPc (CARBONETTI, 2010). Essa toxina requer cálcio para adquirir mudanças conformacionais que resultam na sua translocação através da membrana para o interior da célula alvo (LADANT; ULMANN, 1999). O aumento dos níveis de AMPc nas células do hospedeiro leva a um processo de intoxicação (GRAY et al., 1998). As consequências da intoxicação são: alteração da capacidade fagocítica, toxicidade celular e indução de apoptose em macrófagos (KHELEF; ZYCHLINSKY; GUIZO, 1983), permitindo a persistência de *B. pertussis* no hospedeiro e a progressão da infecção (GUEIRARD et al., 1998). Além disso, a ACT pode formar pequenos poros seletivos de cátion que são importantes para a sua atividade hemolítica sobre eritrócitos (CARBONETTI, 2010).

Já a citotoxina traqueal (TCT) é um fragmento de peptideoglicano bacteriano de 921 Da (WING). Essa toxina provoca destruição da célula epitelial ciliada respiratória, porém seu mecanismo de ação sobre as células alvo é desconhecido (KERR; MATTHEWS, 2000). Ela também estimula a síntese de IL-1 que regula a temperatura corporal através da sua ligação a receptores termoreguladores no hipotálamo resultando em febre (WING). A destruição das células epiteliais ciliadas pela TCT força o indivíduo infectado a tossir incansavelmente na tentativa de remover o muco produzido pelas células caliciformes (LUKER et al., 1993).

A toxina dermonecrótica (DNT) possui 120 kDa, causa inflamação, vasoconstrição e necrose local ao redor das áreas colonizadas por *B. pertussis* no trato respiratório (BADU et al., 2001). Essa toxina é termolábil sendo inativada a 56 °C (SMITH; GUZMÁN; WALKER, 2001).

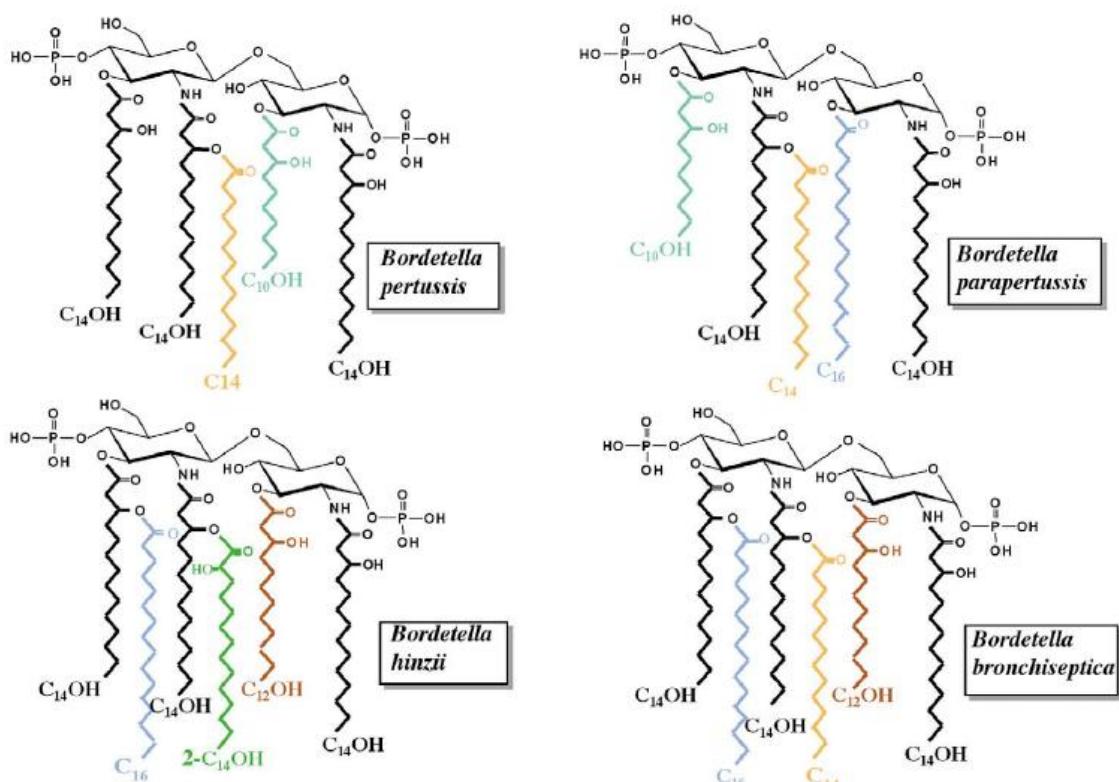
Outro componente, a endotoxina LPS (lipopolissacarídeo) de *B. pertussis* é um potente estimulador das respostas imunológicas (MURRAY et al., 2004).

O LPS bacteriano é encontrado na dupla camada lipídica externa que circunda as paredes celulares de bactérias Gram-negativas. Cada molécula de LPS consiste em um cerne de carboidrato ligado, em um dos lados, ao fosfolipídio (denominado lipídio A) ancorado na

dupla camada e, do outro lado, há uma longa cadeia de polissacarídeo denominado antígeno O, que se estende externamente a partir da superfície bacteriana. O lipídio A é responsável pelos efeitos pró-inflamatórios do LPS, enquanto o antígeno O é altamente variável em LPS de diferentes espécies de bactéria (FUJIHARA et al., 2003).

A molécula do LPS de *B. pertussis* é menor do que o de outras bactérias, diferindo na sua estrutura pela falta do antígeno O, devido a uma deleção de 20kb do locus *wbm* que contém o gene para a biosíntese do antígeno O (GOEBEL et al., 2008; PRESTON et al., 2006). Já o antígeno O expresso em *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* são similares, mas possivelmente desempenham papéis diferentes durante a infecção (BURNS et al., 2003). Quanto a estrutura do lipídio A de *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* e *B. hinzii* há diferença na distribuição das suas cadeias de ácidos graxos, conforme pode ser visto na figura 1 (CAROFF et al., 2002).

Figura 1 - Estrutura do lipídio A do LPS de quatro espécies do gênero *Bordetella*, destacando o número e distribuição das cadeias de ácidos graxos.



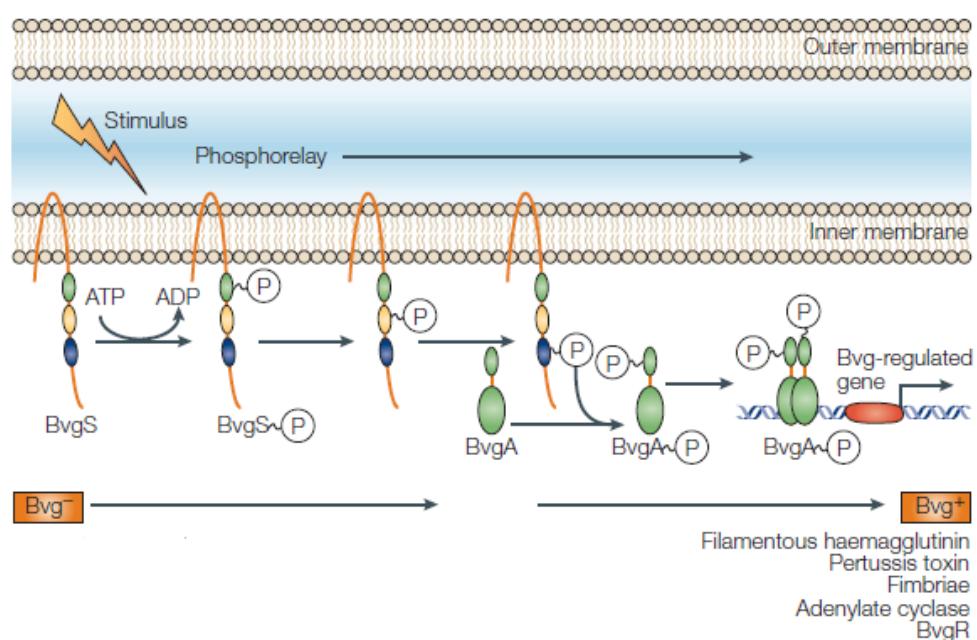
Cada cor representa um determinado ácido graxo mostrando a diferença na estrutura do Lipídio A entre as bactérias.

Fonte: Caroff et al. (2002).

Apesar das diferenças na estrutura do LPS, as demais adesinas e toxinas como: FHA, PRN, fímbrias, ACT, DNT e TCT são encontradas em *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* (PARKHILL et al., 2003).

A expressão de muitos dos fatores de virulência de *Bordetella* é controlada em reposta ao estímulo ambiental usando um sistema regulatório de dois componentes chamado BvgA/S. A temperatura de 37°C, na ausência de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e de ácido nicotínico, a proteína BvgS localizada na membrana interna, que detecta as mudanças no ambiente é autofosforilada, utilizando ATP como doador de grupo fosfato (LOCHT, 1999). Após diversas etapas de fosforilação, o grupo fosfato é finalmente transferido para o domínio amino-terminal da proteína BvgA (LOCHT; ANTOINE; JACOB-DUBUISSON, 2001). Essa proteína fosforilada ativa a transcrição de vários genes de virulência ativados (vags) por se ligar em seus promotores (Figura 2). Um desses genes codifica o regulador BvgR que reprime a transcrição de outros genes denominados genes de virulência reprimidos (vrgs). Assim, a ativação de Bvg muda o perfil da expressão gênica da bactéria. Muitos genes implicados na patogênese são altamente expressos quando o sistema Bvg está ativo, sugerindo que a fase Bvg^+ é importante para a bactéria entrar na célula hospedeira. Por outro lado, a fase Bvg^- é expressa quando a bactéria está no ambiente em condições desfavoráveis como por exemplo a temperatura baixa (PARKHILL et al., 2003).

Figura 2 - Representação esquemática do sistema de dois componentes BvgA/S de *Bordetella*.



Fonte: Modificado de Preston, Parkhill e Maskell (2004).

B. pertussis, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* compartilham um sistema de controle de virulência codificado pelo locus bvgAS similar (MATOO; CHERRY, 2005) que influencia a capacidade da bactéria regular a expressão gênica de fatores de virulência dependendo das mudanças ambientais e, portanto, é importante para o estabelecimento da infecção, persistência, evasão da resposta imune e transmissão (KERR; MATTHEWS, 2000; KINNEAR; MARQUES; CARBONETTI, 2001).

1.3 Aspectos epidemiológicos e controle da infecção por *Bordetella*

A coqueluche ou pertussis, conhecida popularmente como tosse comprida, é uma doença infecciosa aguda, transmissível, caracterizada por clássicos paroxismos de tosse. Sua prevalência é universal e apesar de ser muito severa em crianças pode ocorrer em indivíduos de qualquer idade (VERSTEEGH; SCHELLEKENS; ROORDD, 2005).

A frequência de ocorrência da coqueluche causada por *B. parapertussis* está entre 2 e 36%, dependendo do país (DAVID; VAN FURTH; MOOI, 2004). Embora esta infecção tenha menor incidência e quadro clínico mais ameno se comparada à infecção por *B. pertussis*, seu papel não pode ser minimizado, uma vez que as vacinas atuais protegem contra *B. pertussis*, mas não contra *B. parapertussis* (ZHANG et al., 2009).

Esta doença é importante causa de mortalidade infantil no mundo e continua sendo um problema de saúde pública mesmo em países com alta cobertura vacinal. Estimativas da OMS (Organização Mundial da Saúde) mostraram que em 2008, cerca 16 milhões de casos de coqueluche ocorreram em todo o mundo, 95% dos quais em países em desenvolvimento, e cerca de 195.000 crianças morreram da doença (BLACK et al., 2010).

Em países da Ásia, África e América do Sul os relatos epidemiológicos da coqueluche são limitados, porém estimativas da OMS demonstraram que esses países têm alta incidência da doença. Estimar o número de casos de coqueluche é difícil devido à falta de acesso a métodos de diagnóstico, subnotificação e diagnósticos equivocados, pois os sintomas desta infecção podem ser confundidos com outras espécies de *Bordetella*, vírus e bactérias (FORSYTH et al., 2007; WOOD; MCINTYRE, 2008). Além disto, pertussis é uma das 10 principais causas de morte em crianças menores de um ano em todo o mundo (WOOD; MCINTYRE, 2008).

No Brasil, a coqueluche é uma doença de notificação compulsória. Os casos suspeitos devem ser notificados ao Sistema de Vigilância Epidemiológica pelo SINAN (Sistema de

Informação de Agravos de Notificação) (BRASIL, 2009). As crianças menores de um ano de idade, especialmente com menos de seis meses, são o grupo que apresenta taxas de incidência e letalidade mais acentuadas (PEREIRA, 2010).

Em 2011 foram confirmados 2257 casos de coqueluche notificados ao SINAN no Brasil e registrados 55 óbitos, sendo 53 de crianças menores de um ano. O maior número de casos confirmados foi no estado de São Paulo. Em 2012, o número de casos dobrou em relação ao ano anterior sendo confirmados 4864 casos. Foram registradas 79 mortes de crianças menores de um ano. Além de São Paulo outros estados com alta incidência foram Espírito Santo e Rio Grande do Sul. O critério laboratorial foi utilizado para a confirmação da maioria dos casos relatados nesses dois anos (SINAN).

Na Califórnia, somente em 2010, do total de 27.550 notificações em todo território norte-americano foram confirmados 9.774 casos pelos Centros de Prevenção e Controle de Doenças (CDC). Dez bebês com apenas dois meses de idade morreram durante o surto. Na Europa foram confirmados 15.749 casos em 2010, sendo 46% deles na Noruega e na Holanda. Na Austrália, houve 35 mil registros entre os meses de julho de 2010 e 2011 (BARRA, 2011).

Em países como a Argentina, Chile e Colômbia foram relatados 1.042, 348 e 2.581 casos de coqueluche, respectivamente no primeiro semestre de 2012 (LU FERNANDES, 2012). Enquanto em Washington, o número de casos foi de 2.520 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012).

Atualmente tenta-se compreender porque a coqueluche tem reemergido em populações vacinadas. Algumas hipóteses foram levantadas para explicar este fato (CARVALHO; PEREIRA, 2006):

- 1) possível modificação genética das bactérias tornando as vacinas menos eficazes;
- 2) disponibilidade de melhores testes diagnósticos;

3) perda da imunidade adquirida por meio da vacina, na ausência de reforços vacinais, após 5 a 10 anos. Este último aspecto já seria suficiente para explicar a ocorrência da doença entre adolescentes e adultos (LUZ; CODEÇO; WERNECK, 2003). Segundo Jenkinson (1988), a imunidade é completa somente no primeiro ano após a imunização caindo gradualmente com o passar do tempo, tendo 84% de eficácia após quatro anos, aproximadamente 50% nos três anos seguintes e após 12 anos nenhuma proteção foi evidenciada.

A infecção por este microrganismo se dá pela inalação da bactéria presente em aerossóis e gotículas provenientes de secreção da orofaringe que são eliminadas por tosse,

espirro ou ao falar. A transmissão ocorre, principalmente, pelo contato direto do portador da doença com a pessoa susceptível (BRASIL, 2005).

Embora *B. pertussis* tenha sido descrita como um microrganismo extracelular, produzindo adesinas e toxinas na superfície do epitélio respiratório, alguns estudos demonstraram que essa bactéria pode aderir e invadir as células epiteliais (BASSINET et al., 2000), persistir intracelularmente em macrófagos alveolares murinos, além de invadir e sobreviver dentro de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares humanos (STEED; AKPORIAYE; FRIEDMAN, 1992).

O período de incubação pode variar entre 6 e 21 dias, mas é tipicamente de 7 a 10 dias (TOZZI et al., 2005). Após esse período, tem-se a manifestação da infecção que geralmente começa com a secreção nasal, mal-estar, anorexia, febre baixa e tosse progressiva. Esse estágio é denominado catarral. Nessa fase a doença é mais contagiosa e é clinicamente indistinguível de uma infecção leve do trato respiratório superior. Depois de 1 ou 2 semanas, inicia-se o estágio paroxístico que é caracterizado pelos clássicos paroxismos de tosse (série de tosses seguidas de guincho inspiratório). O guincho é conhecido como um ruído típico. Os paroxismos terminam frequentemente com vômito e exaustão (COVISA, 2009).

Após 2 a 6 semanas a doença entra na fase de convalescença que dura de 1 a 3 semanas e caracteriza-se pela redução da intensidade e gravidade dos paroxismos, mas podem ocorrer complicações secundárias (MURRAY et al., 2004) como broncopneumonia e encefalopatia que, frequentemente, se manifesta por convulsões (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

A infecção por *B. pertussis* é diagnosticada por cultura de secreções da nasofaringe, PCR (Reação em cadeia da polimerase) e teste sorológico por meio de ELISA. Esse teste é baseado na identificação de uma significativa variação de títulos de IgG ou IgA contra alguns fatores de virulência da bactéria como FHA, PRN, PT, fimbrias (FIM) (TOZZI et al., 2005; MATTOO; CHERRY, 2005). O resultado deste teste é baseado em um valor de corte (cut off) de concentração de anticorpo definido para cada antígeno (GUISO et al., 2011).

O tratamento da coqueluche é feito com a eritromicina, porém há isolados de *B. pertussis* resistentes a esse antibiótico (KORGENSKI; DALY, 1997). Azitromicina e claritromicina também são efetivos para o tratamento de pertussis (ANGLEY et al., 2004; LEBEL; MEHRA, 2001). O tratamento com antibióticos elimina a bactéria, se este for iniciado durante o estágio catarral ou início do estágio paroxístico, promovendo a redução do período de transmissão, duração e severidade da doença (BRASIL, 2005; COVISA, 2009; MARCHANT; CHANG, 2009).

As vacinas preparadas com a *B. pertussis* morta (*Whole cell*) estão disponíveis a mais de 50 anos, sendo um dos componentes da vacina tríplice bacteriana (DTP) que protege também contra a difteria e o tétano. Ela é preparada com células bacterianas obtidas da cultura em meios líquidos, submetidos à inativação por formaldeído, calor ou timerosal (DIAS et al., 2007). A vacina tríplice bacteriana é recomendada a partir de 2 meses de idade. As crianças devem receber três doses até 1 ano de idade, um reforço aos 15 meses e outro entre 4 a 6 anos. A DTP pode ser administrada concomitante a outras vacinas (LIPHALUS; GONÇALVES; CARVALHANAS, 2008). Apesar de ser muito eficiente, a vacina celular mostrou em alguns casos uma série de reações adversas que incluem choros prolongados, irritabilidade, convulsões febris, episódio hipotônico-hiporresponsivo caracterizado por palidez, diminuição ou desaparecimento do tônus muscular ou ausência de resposta a estímulos, e reações locais como vermelhidão e edema (MARZOUQUI et al., 2010).

Estas preocupações motivaram o desenvolvimento da vacina pertussis acelular em 1970 que consiste de um a cinco antígenos de *B. pertussis* (FHA, PRN, PT inativada e fímbrias 2 e 3). A maioria das preparações difere entre si quantitativamente em relação às concentrações dos componentes antigênicos utilizados (DIAS et al., 2007). Na vacina acelular para adolescentes e adultos a quantidade de toxóide diftérico e dos componentes pertussis difere das preconizadas para crianças. No Brasil existem duas formulações licenciadas: uma composta por três componentes da bactéria para uso em pessoas com mais de 11 anos de idade (BRICKS, 2007) e outra composta por cinco componentes lançada em 2011 como dose de reforço para crianças a partir de 3 anos, adolescentes e adultos (SANOFI, 2011).

O Instituto Butantan desenvolveu nos últimos anos uma vacina *whole cell* com baixo teor de LPS que foi denominada de P_{low} (DIAS et al., 2007).

O custo da DTP *whole-cell* é de US\$ 0,15/dose, enquanto o da vacina DTP acelular é de US\$ 8,15 (RAW; HIGASHI, 2008). A formulação da DTP acelular possui custo elevado, pois requer várias etapas cromatográficas de purificação do sobrenadante ou filtrado da cultura, a fim de obter cada um dos componentes antigênicos da vacina (DIAS et al., 2007).

A imunização de adolescentes e adultos com a vacina pertussis acelular constitui uma estratégia para controlar a reemergência da doença e poderia ser administrada em adição a dose reforço da vacina dT (difteria, tétano) que não contém o componente *pertussis*. A vacina dT é utilizada a partir de 7 anos de idade com reforços a cada dez anos (LIPHALUS; GONÇALVES; CARVALHANAS, 2008). A partir do segundo semestre de 2013, as gestantes brasileiras passarão a ser vacinadas com a DTpA (vacina tríplice acelular) com o objetivo de garantir que o bebê já nasça com alguma proteção contra a coqueluche, evitando

que a infecção ocorra antes dos 6 meses de idade e também que a mãe seja fonte de infecção para o seu próprio filho (LABOISSÈRE, 2013).

No entanto, ainda é necessário melhorar o rendimento protéico dos antígenos, reduzir o custo da vacina acelular e desenvolver vacinas que proporcionem proteção a longo prazo, pois a imunidade conferida pelas vacinas atuais duram em média 10 anos. As vacinas de DNA utilizando genes que codificam PT, FHA e PRN; mutantes vivos atenuados e antígenos dessa bactéria encapsulados em partículas biodegradáveis representam potenciais alternativos para as vacinas existentes (MARZOUQI et al., 2010).

Em modelo murino, imunizações com os componentes da vacina acelular, com a vacina celular, a infecção ativa com *B. pertussis* (KHELEF et al., 1993) ou transferência passiva de soro imune (WATANABE; NAGAI, 2003) não protegeu os animais quando estes foram infectados com *B. parapertussis*, porém, houve proteção contra a espécie homóloga. Isto sugere que cada uma dessas espécies de *Bordetella* pode modular diferentemente a resposta imune do hospedeiro devido em parte às diferenças quanto à expressão e estrutura de alguns fatores de virulência. Além disso, aspectos que envolvem as interações parasita-hospedeiro nestas infecções não estão completamente esclarecidos (MARTINS, 2006), indicando a necessidade de novos estudos neste sentido.

1.4 O papel dos macrófagos na imunidade inata e a síntese de IL-12

As células sanguíneas derivam de uma célula-tronco hematopoiética pluripotente da medula óssea que se diferencia em duas linhagens: a linfóide que dá origem aos linfócitos e a mielóide que origina os eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas (VALLEDOR et al., 1998).

Os monócitos da circulação periférica migram para os tecidos e se diferenciam em macrófagos (MURRAY; WYNN, 2011) e na presença de componentes de microrganismos, mediadores da inflamação ou outros sinais de lesão tecidual aumentam seu metabolismo, motilidade e atividade fagocítica visando o combate de vários patógenos e reparo tecidual (ZANONI; GRANUCCI, 2009).

As principais funções dos macrófagos são: fagocitose, processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T, além de liberação de citocinas, quimiocinas e outros mediadores envolvidos na resposta imune. Estas células possuem vários receptores de superfície que

auxiliam no reconhecimento, fagocitose e destruição de patógenos (GEISSMANN et al., 2010; MURRAY; WYNN, 2011).

1.4.1 Os receptores Toll-like na ativação da imunidade inata

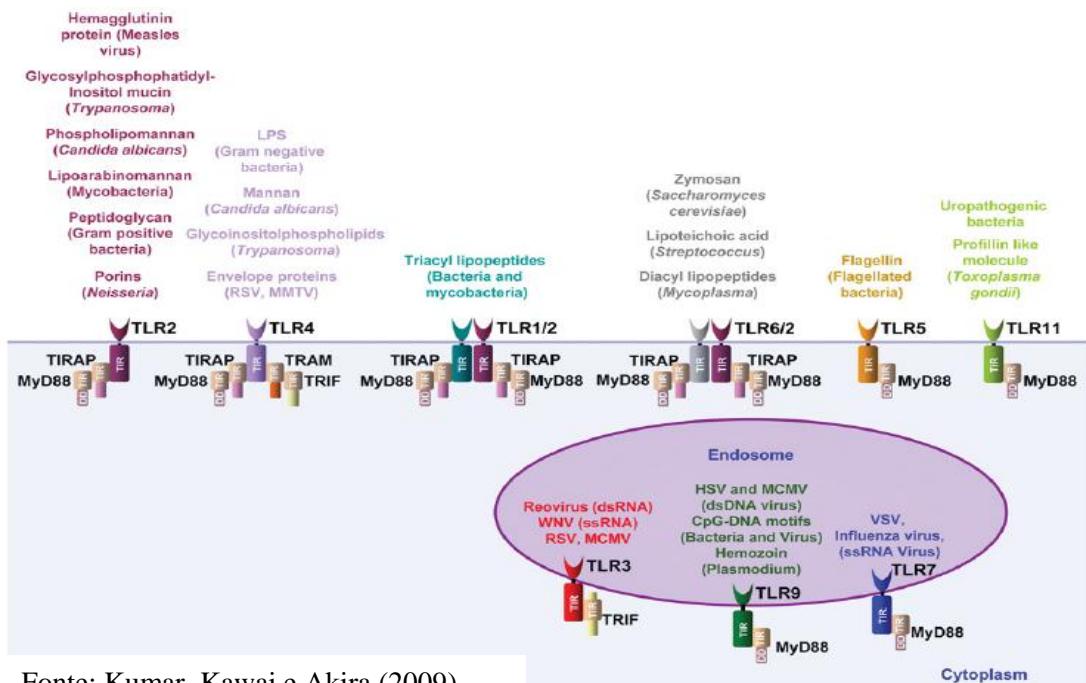
Os receptores Toll-like (TLRs) são proteínas transmembrana que reconhecem estruturas conservadas presentes em patógenos denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e ativam vias de sinalização intracelular (MOGENSEN, 2009) que resultam na produção de citocinas e na regulação de moléculas de superfície celular essenciais para a resposta imune inata e adaptativa (MANN et al., 2005). Além dos TLRs, outras classes de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) foram descritas e incluem os receptores intracelulares NOD-like (NLRs), os receptores de gene 1 induzido por ácido retinóico, RIG-1-like (RLRs) e os receptores de lectina tipo C (CLRs) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Os TLRs foram identificados em vertebrados com base na sua homologia a proteína Toll encontrada em *Drosophila*, importante na defesa destes insetos contra fungo. Em humanos foram identificados 10 membros de TLRs e em camundongos 13 (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009). O TLR-10 é expresso em humanos, mas não em camundongos. O TLR-10, TLR-12 e TLR-13 não estão bem caracterizados e suas funções ainda não foram esclarecidas (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011).

Alguns TLRs são expressos sobre a superfície celular (TLR-1, 2, 4, 5, 6, 10 e 11) enquanto outros estão localizados em compartimentos intracelulares (TLR-3, 7, 8, 9). Cada TLR reconhece um PAMP específico, assim os TLRs são capazes de reconhecer diversos microrganismos (MOGENSEN, 2009). Por exemplo, TLR-2 reconhece lipoproteínas bacterianas, peptideoglicano, glicolipídio micobacteriano e zymozan (polissacarídeo de *Saccharomyces cerevisiae*); TLR-3 reconhece dupla fita de RNA viral; TLR-4 reconhece LPS de bactérias Gram-negativas; TLR-5 reconhece a flagelina; TLR-7 e TLR-8 reconhecem RNA simples fita, TLR-9 reconhece DNA bacteriano não metilado (CpG) e TLR-11 reconhece profilinas de *Toxoplasma gondii* e *Escherichia coli* uropatogênica (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009) (Figura 3). O reconhecimento dos PAMPs pelos seus respectivos TLRs leva a ativação do fator de transcrição nuclear NF κ B que é translocado do citoplasma para o núcleo e controla a transcrição de genes importantes para ativação da resposta imune (BONIZZI; KARIN, 2004).

Após o reconhecimento do PAMP, as moléculas adaptadoras citosólicas contendo o domínio TIR se ligam ao domínio TIR de TLRs. Como observado na figura 3, são quatro as moléculas adaptadoras: MyD88 (proteína de diferenciação mielóide 88), TIRAP/Mal que liga TLR ao MyD88, TRIF (também chamado de TICAM1) e TRAM que liga o TLR-4 ao TRIF (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009). O TLR-1, TLR-2, TLR-4 e TLR-6 recrutam TIRAP para iniciar a sinalização dependente de MyD88 (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011). A molécula MyD88 é utilizada por todos os TLRs, exceto o TLR-3, o qual requer o TRIF como molécula adaptadora (KOH et al., 2010). O TLR-4 é o único que utiliza os quatro adaptadores (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009). Dessa maneira, duas vias de sinalização podem ser ativadas em resposta aos TLRs, uma dependente e outra independente de MyD88.

Figura 3 - PAMPs reconhecidos pelos diferentes TLRs e suas moléculas adaptadoras



Fonte: Kumar, Kawai e Akira (2009).

A via dependente comum aos TLRs ativa NF κ B e as MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos) para produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1, IL-6 e IL-12, essenciais para a eliminação de microrganismos (ZHANG; DONG, 2005; KAWAI; AKIRA, 2006). Enquanto que a via independente de MyD88 é mediada por sinais que envolvem TLR-3 e TLR-4 e ativa os fatores reguladores de interferon (IRF) 3 e 7 que induzem IFN do tipo I, particularmente o IFN- β , que é importante para a resposta imune do hospedeiro contra vírus. Essa via também está envolvida com a ativação de NF κ B e MAPKs (KAWAI; AKIRA, 2006; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011).

A molécula MyD88 é essencial para a estimulação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-6 em resposta aos agonistas de TLR (NETEA et al., 2004). Assim, camundongos deficientes em MyD88 são altamente susceptíveis a infecção com uma grande variedade de patógenos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Toxoplasma gondii*, indicando um importante papel desta molécula na resistência do hospedeiro a infecção microbiana (FENG et al., 2003). No entanto, foi observado que a capacidade fagocítica dos macrófagos de camundongos MyD88 $^{-/-}$ permanece intacta (NETEA et al., 2004) e suas células mantém a capacidade de ativar NF κ B e MAPK, sendo essa ativação tardia em comparação com o camudongo selvagem (KAWAI; AKIRA, 2006).

Apesar do LPS induzir a resposta inflamatória via TLR-4, foi sugerido que o TLR-2 pode interagir com o LPS de algumas bactérias não entéricas (GIRARD et al., 2003). A importância de TLR-4 no controle da infecção por *B. pertussis* tem sido objeto de intenso estudo nos últimos anos (BANUS et al., 2006).

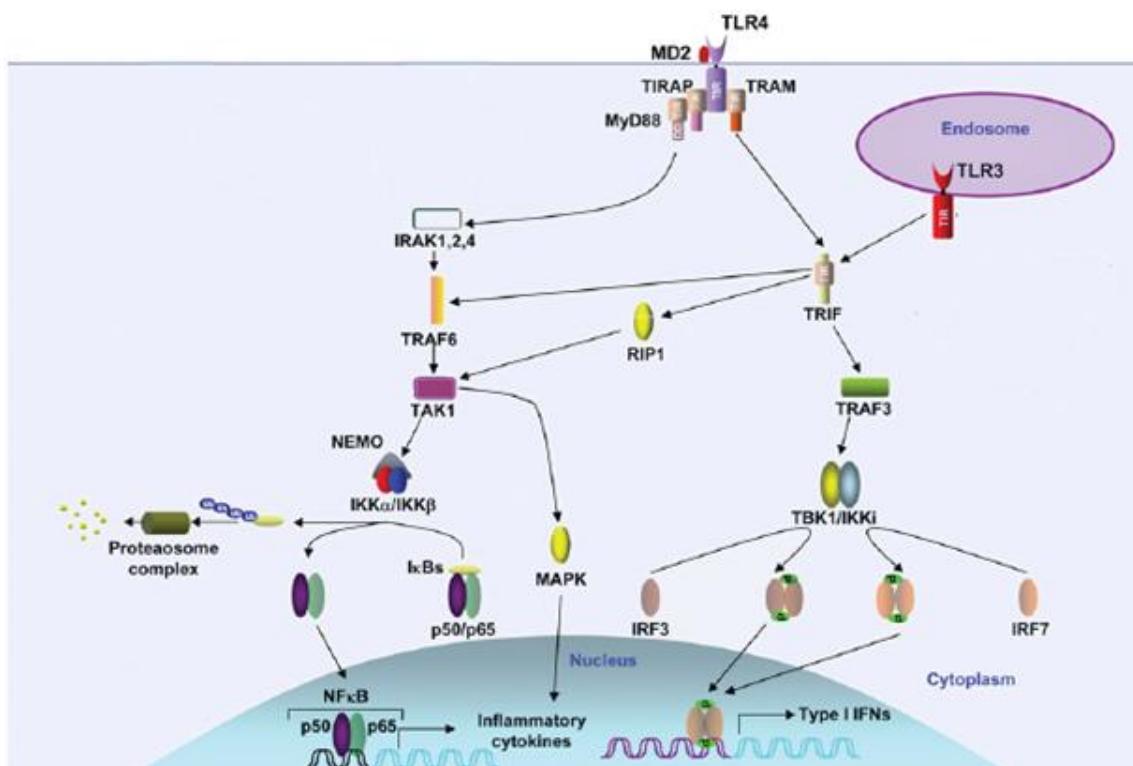
O lipídio A da molécula de LPS é reconhecido por um complexo constituído por TLR-4, MD-2 (proteína de diferenciação mielóide 2) e CD14 (MARR et al., 2010). Para isso, o LPS se liga a proteína plasmática de ligação do LPS (LBP) que catalisa a transferência do LPS para o CD14 na superfície da célula. Isso forma um complexo com TLR-4 e MD-2 que está associado ao domínio extracelular de TLR-4 (MIYAKE, 2004).

O domínio citoplasmático do TLR-4 interage com MyD88 recrutando membros da família de proteínas quinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAKs) que são ativadas por fosforilação e interagem com o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF-6) (MONGENSEN, 2009; TAKEDA; AKIRA, 2004). Isto promove a ativação de MAPKs e do complexo IKK que medeia a fosforilação de IkBs, proteínas inibitórias de NF κ B, que são ubiquitinadas e degradadas no proteassomo. Esse processo resulta na ativação do NF κ B que é translocado para o núcleo (GHOSH; MAY; KOPP, 1998; MIYAKE, 2004) onde inicia a transcrição de genes que codificam quimiocinas, citocinas, moléculas co-estimulatórias, moléculas de adesão endotelial, além de enzimas como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e inibidores de apoptose (BONIZZI; KARIN, 2004; JONES et al., 2001) (Figura 4). A ativação das MAPKs resulta na fosforilação e indução de outro fator de transcrição, AP-1, que assim como o NF κ B pode regular genes de citocinas (TAKRUCHI; AKIRA, 2010).

Durante a sinalização mediada por TLR-3 e TLR-4, a molécula TRIF se associa com TRAF-6 e a proteína 1 de interação com o receptor (RIP1) ativando NF κ B e MAPKs, além de se associar com o TRAF-3 que é responsável pela fosforilação de IRF-3 e IRF-7. Em seguida,

estes IRFs fosforilados são translocados para o núcleo e induzem a transcrição de genes de interferons do tipo I (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009; TAKEUCHI; AKIRA, 2010) como ilustrado na Figura 4 abaixo.

Figura 4 - Vias de sinalização mediadas por TLR-4 e TLR-3



TLR-4 ativa a via dependente e a independente de MyD88, a via dependente de TRIF. A via dependente de MyD88 ativa NF κ B e as MAPKs (p38, ERK 1/2 e JNK) que controla a produção de citocinas inflamatórias. A via independente de MyD88 ativa IRF3 e IRF7, importantes para induzir IFNs do tipo I. TLR-3 localizado no endossomo utiliza somente a via independente de MyD88.

Fonte: Modificado de Kumar, Kawai e Akira (2009).

As MAPKs são serinas/tirosinas quinases ativadas por fosforilação em resposta aos sinais extracelulares e modulam a expressão gênica no núcleo (KIM; KIM; SHARMA, 2004). Elas são importantes para a proliferação celular, resposta a estresse, apoptose e imunidade (LIU; SHEPHERD; NELIN, 2007). Em mamíferos há três grupos principais de MAPKs: *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs), *c-jun amino-terminal kinases* (JNKs) e p38 MAP kinases (COBB; GOLDSMITH, 1995). ERK1 (p44) e ERK2 (p42) são preferencialmente ativadas em resposta a fatores de crescimento e ésteres de forbol, enquanto JNK e p38 MAPKs são sensíveis aos estímulos de estresse ambiental como o choque osmótico, a radiação ionizante e a estimulação por citocinas como TNF- α e IL-1 (LU et al., 1999; ROUX; BLENIS, 2004).

Estímulos via TLRs também podem ativar a enzima fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) (KRISHNAN et al., 2007). A PI3K regula vários processos celulares como a proliferação, crescimento, apoptose e rearranjo do citoesqueleto (RUSE; KNAUS, 2006; VANHAESEBROECK et al., 2001).

Uma vez ativada, a PI3K cataliza a geração de um segundo mensageiro que ativa Akt, também conhecida como proteína quinase B. Essa via de sinalização pode ser ativada por vários receptores de superfície celular como receptores Fc, de insulina (CREMER; BUTCHAR; TRIDANDAPANI, 2011) e receptores ligados a proteína G (DEANE; FRUMAN, 2004). A via PI3K-Akt é importante na regulação da produção de mediadores inflamatórios em monócitos/macrófagos humanos e murinos (MARTIN et al., 2003).

1.4.2 O papel da IL-12 na resposta imune

A IL-12 é produzida principalmente por células apresentadoras de抗ígenos (APC) como macrófagos e células dendríticas favorecendo o controle de infecções e o estabelecimento da imunidade protetora (LAMONT; ADORINI, 1996; TRINCHIERI, 1995). Esta citocina é produzida devido à exposição de APCs a patógenos e seus produtos, independente da presença de células T, no entanto a interação da molécula CD40L presente em linfócitos T e CD40 expresso em APCs pode acentuar a sua liberação (MARRIOTT; CLARKE; DALGLEISH, 2001). Os neutrófilos e em menor extensão os linfócitos B também sintetizam IL-12 (WATFORD et al., 2003).

Essa citocina é um heterodímero composto de duas subunidades, uma de 35 kDa (p35) e uma de 40 kDa (p40) ligadas por ponte de dissulfeto. A subunidade p40 é compartilhada pela IL-12 e IL-23 que neste caso está associada à subunidade p19 (VECCHIO et al., 2007). Seu receptor IL-12R também consiste de duas subunidades: a β_1 , que interage com a IL-12p40, e a β_2 que interage com a IL-12p35 (PRESKY et al., 1996).

A forma biologicamente ativa, IL-12p70, é fundamental para a resposta imune a tumores, parasitas intracelulares, fungos, bactérias e vírus (ZHANG; WANG, 2008). Produtos microbianos como LPS, ácido lipoteicólico (LTA), peptideoglicano e DNA bacteriano (CpG) induzem a produção dessa citocina (WATFORD et al., 2003).

Em humanos, o gene da subunidade p40 se localiza no cromossomo 5 e o gene da p35 no cromossomo 3, enquanto em camundongos, os genes p35 e p40 se localizam nos cromossomos 3 e 11, respectivamente (ROMANI; PUCCETTI; BISTONI, 1997). A

subunidade p40 murina e p40 humana possui 70% de identidade, enquanto p35 murina tem 60% de identidade (SCHOENHAUT et al., 1992).

A subunidade p40 é secretada de 10 a 100 vezes mais em relação a IL-12p70, indicando que a produção das subunidades p35 e p40 é diferentemente regulada (TRINCHIERI, 1996). A subunidade p40 também pode formar um homodímero, IL-12p80 ou IL-12(p40)₂ que atua como antagonista da IL-12 e IL-23 por competir com seus receptores (HÖLSCHER, 2004; NIGG et al., 2007).

Foi sugerido inicialmente que p35 seria expressa constitutivamente em vários tipos celulares, enquanto que a transcrição de p40 seria altamente regulada e assim, a produção da subunidade p40 seria indicativa da expressão do heterodímero IL-12p70 (MURPHY et al., 1995). Porém, posteriormente, observou-se que a expressão de p35 também pode determinar o nível de produção do heterodímero IL-12p70, pois essa subunidade pode não ser sintetizada pelas células (BABIK et al., 1999; SNIJDERS et al., 1996).

A regulação da subunidade p40 se dá a nível transcracional enquanto a subunidade p35 é regulada tanto em nível de transcrição como de tradução. O promotor do gene p40 humano e murino contém sítios de ligação para diversos fatores de transcrição como NF κ B e IRF-1 (membro da família de fatores reguladores de interferon) (KANG; KIM; KIM, 2005).

A produção da IL-12 é regulada por diversos fatores, dentre eles: AMP cíclico, canais de íons na membrana celular, óxido nítrico, MAPK p38 (KANG; KIM; KIM, 2005) e PI3K (FUKAO et al., 2002). Além disso, a sinalização via proteína G α i pode controlar a síntese de IL-12 e a diferenciação de subpopulações de linfócitos Th1 (HE et al., 2000). Como a PT atua sobre a proteína G α i, ela pode contribuir com a regulação desta citocina durante a infecção com *B. pertussis*.

Esta citocina aumenta a atividade fagocítica e bactericida dos macrófagos, atua na geração de outras citocinas pró-inflamatórias e direciona o desenvolvimento da resposta celular Th1 (GOODRIDGE et al., 2003). A IL-12 ativa as células NK (*Natural Killer*) e linfócitos Th1 a produzirem IFN- γ , além de aumentar a atividade citotóxica das células NK e dos linfócitos T CD8 $^{+}$ ativados por promover a transcrição de genes que codificam fatores citolíticos incluindo a perforina e as granzimas (TRINCHIERI, 2003).

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória que favorece a fagocitose e a atividade microbicida dos macrófagos, pois aumenta a síntese de intermediários reativos do nitrogênio e oxigênio, além de estimular a produção de IL-12 (ROMANI; PUCCETTI; BISTONI, 1997). Ao contrário, IL-10 e TGF- β (Th3) controlam a produção desta citocina inibindo sua

produção pelos macrófagos, pois reprimem a transcrição da subunidade p40, limitando a quantidade de IL-12p70 (VECCHIO et al., 2007).

As diferenças entre *B. pertussis* e *B. parapertussis* quanto à estrutura da molécula de LPS e expressão da PT que inibe a função da proteína Gαi podem ser características importantes para a geração de IL-12 quando os macrófagos são infectados com estas bactérias.

1.5 A *Bordetella* e a resposta imune do hospedeiro

Ao entrar no trato respiratório, a *B. pertussis* se liga às células epiteliais ciliadas e os macrófagos alveolares e as DCs, células da imunidade inata do hospedeiro, são as primeiras a reconhecer e iniciar a resposta imune local contra esta bactéria. Posteriormente, os linfócitos T e B que são células efetoras do sistema imune adquirido medeiam à eliminação da bactéria através do desenvolvimento da imunidade específica (GOUW et al., 2011). Neste processo, foi demonstrado que a infecção por *B. pertussis* promove o desenvolvimento da resposta Th1 devido à produção de grande quantidade de IFN- γ (MILLS, 2001). Além disso, Higgins et al. (2006) mostraram que as células Th17 são importantes para a imunidade celular contra essa bactéria.

O sistema de secreção do tipo III (TTSS), um aparato especializado que permite as bactérias Gram-negativas injetarem proteínas efetoras diretamente dentro do citosol de células eucariotas, pode facilitar a colonização e sobrevivência de *B. pertussis* por promover a adesão bacteriana, por inibir a resposta inflamatória local, a indução da resposta antígeno específica Th1, Th17 e a produção de anticorpos que permitem a eliminação da bactéria do trato respiratório (FENNELLY et al., 2008).

Outro fator de virulência, a FHA de *B. pertussis* pode suprimir a resposta Th1 por estimular a produção de IL-10 por DCs inibindo assim a produção de IL-12. Isto direciona a diferenciação de células T *naive* em células efetoras T regulatórias (Treg) (MCGUIRK et al., 2002). Além da FHA, a ação sinérgica da ACT com o LPS de *B. pertussis* também estimula os macrófagos e DCs a produzirem IL-10 inibindo a produção de IL-12 (ROSS et al., 2004). Em *B. bronchiseptica*, a síntese desta citocina anti-inflamatória parece associada ao TTSS III (PILIONE; HARVILL, 2006). Nagamatsu et al. (2009) demonstraram que BopN, molécula efetora translocada para o interior da célula hospedeira pelo TTSS III, seria uma das

responsáveis pela indução da produção de IL-10 por inibir ERK1/2 MAPKs evitando assim a resposta inflamatória.

Em infecção com *B. parapertussis*, a redução do número de bactérias no pulmão está associada ao acúmulo de linfócitos T CD4⁺ e a produção de IFN-γ por estas células. Contudo, a resposta mediada por IFN-γ é atrasada devido à produção de IL-10 que reduz o acúmulo de leucócitos no local e atrasa a eliminação de *B. parapertussis* do pulmão. Isto é mais uma comprovação de que nesta infecção a presença de IL-10 limita a produção de IFN-γ, permitindo que a bactéria persista no trato respiratório do hospedeiro. Dessa maneira, a produção de IL-10 pode ser uma estratégia usada por esta bactéria para evadir-se da resposta imune (WOLFE; BUBOLTZ; HARVILL, 2010).

Analizando os dados da literatura observamos que durante a resposta imune desenvolvida pela infecção com *B. pertussis* pode haver a produção de IL-12 pelas APCs que leva a polarização da resposta Th1, enquanto a IL-1β e a IL-23 dirigem a diferenciação de células Th17. Entretanto, no início da infecção, a resposta mediada por linfócitos Th1 e Th17 é suprimida devido à produção de IL-10 pelas células do sistema imune inato em resposta a FHA, ACT ou o TTSS e consequentemente pelas células T regulatórias (Treg) geradas. As toxinas bacterianas, especialmente LPS e TCT induzem a produção de óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF-α. A IL-17 sintetizada por células Th17 promove a produção de uma quimiocina denominada proteína inflamatória de macrófagos 2 (MIP-2) e a ativação e o recrutamento de neutrófilos. Assim, a *B. pertussis* é fagocitada por neutrófilos e macrófagos (HIGGS et al., 2012).

O NO produzido por macrófagos é um importante agente tóxico para o controle de uma variedade de patógenos. É sintetizado por ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS2) a partir do aminoácido L-arginina (TRIPATHI et al., 2007). O trabalho de ROSETTI (2009) realizado no laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan utilizando macrófagos derivados de medula óssea murina estimulados *in vitro* com Ag solúvel de *B. pertussis* ou infectadosativamente teve como objetivo investigar o envolvimento de alguns fatores na regulação de NO e mostrou que TGF-β e a arginase, enzima que assim como a iNOS utiliza o substrato L-arginina, contribuem para a síntese de NO durante a ativação dos macrófagos. E que este mecanismo é dependente de TLR-4 (Dados não publicados).

A importância em estudar os mecanismos de controle da IL-12 se dá também pelo fato da vacina celular incluir PAMPs, como resíduos de LPS, que ativa a produção desta citocina além de IL-1, IL-6 e IL-23 por macrófagos e DCs. Estas citocinas pró-inflamatórias induzem

a resposta Th1 e Th17. Em contraste, a vacina acelular inclui o hidróxido de alumínio como adjuvante que estimula a produção de IL-1 e consequentemente células Th17. Os linfócitos Th2 também são induzidos e auxiliam os linfócitos B a secretarem anticorpos que neutralizam toxinas e previnem a adesão de *B. pertussis* às células do trato respiratório (HIGGS et al., 2012). As células B também são necessárias para a eliminação de *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* do trato respiratório de camundongos (KIRIMANJESWARA; MANN; HARVILL, 2003).

Segundo Mahon et al. (1996), a adição exógena de IL-12 a vacina acelular induziu a mudança na polarização de uma resposta Th2 para Th1.

Apesar de *B. pertussis* ser considerada um patógeno intracelular facultativo, os mecanismos pelos quais a ativação dos macrófagos resulta na morte desse tipo de patógeno ainda não estão completamente esclarecidos (CANTHABOO et al., 2002). Foi demonstrado que essa bactéria opsonizada pode ser fagocitada via receptor Fc para IgA, Fc α RI (CD89), e pelos receptores Fc para IgG, Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16) (HELLWIG et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2001). No entanto, *B. pertussis* pode sobreviver intracelularmente dentro de macrófagos humanos na ausência de anticorpos opsonizantes (LAMBERTI et al., 2010).

A presença de IgA parece ser essencial para o controle de *B. bronchiseptica* na cavidade nasal e traqueia, mas não nos pulmões (WOLFE et al., 2007). Enquanto que a eliminação de *B. parapertussis* da traqueia e pulmões requer anticorpos IgG e IgM, mas não IgA, além de linfócitos T e leucócitos polimorfonucleares. Porém, os receptores FcR não são necessários para a sua redução, diferentemente do observado com *B. pertussis*, embora possam contribuir para a eliminação da bactéria. Isto indica que a resposta imune de *B. pertussis* e *B. parapertussis* não é idêntica (WOLFE; KIRIMANJESWARA; HARVILL, 2005).

Estudos com *B. pertussis* tem recebido maior atenção da comunidade científica, diferentemente do observado com *B. parapertussis* que também pode ser responsável por uma grande porcentagem dos casos dessa doença. Portanto, o estudo da resposta imune gerada pelo hospedeiro contra *B. parapertussis* também é de alta relevância (WOLFE; KIRIMANJESWARA; HARVILL, 2005).

O fato da proteção contra *B. pertussis* estar relacionada com a produção de IFN- γ por linfócitos Th1 e a IL-12 ser uma importante citocina que promove a ligação entre a imunidade inata e adaptativa, direcionando a diferenciação de células T CD4 $^{+}$ *naive* em células Th1 efetoras, além do seu uso como adjuvante em vacinas ser de grande interesse mostra que

outros estudos são necessários para elucidar os mecanismos de sinalização envolvidos na regulação da produção desta citocina. Soma-se a isso, o fato de vacinas produzidas contra *B. pertussis* não protegerem conta *B. parapertussis* e não haver dados que descrevam a contribuição da IL-12 na resposta imune principalmente durante a infecção com esta última bactéria. Essas duas espécies de *Bordetella* apresentam ainda diferenças na estrutura da molécula de LPS e na expressão da PT. Logo, estes aspectos reforçam a importância de investigarmos se essas bactérias modulam diferentemente a síntese de IL-12.

5 CONCLUSÃO

Nosso trabalho mostrou que a regulação da síntese de IL-12 por M ϕ DM ativados *in vitro* com *B. pertussis* e *B. parapertussis* envolve os seguintes aspectos:

- 1) é regulada pela presença de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ ;
- 2) envolve sinais intracelulares mediados via receptores Toll-Like dependente e independente da molécula adaptadora MyD88;
- 3) a produção de IL-12p40 foi dependente de TLR-4 apenas durante a ativação dos M ϕ DM com *B. pertussis* ao contrário do observado com *B. parapertussis*;
- 4) a produção de IL-12p40 foi controlada via NF κ B, mas foi independente de sinais moleculares via MAPKs p38 e ERK1/2;
- 5) a síntese de IL-12p70 foi regulada negativamente pelas vias de sinalização MAPKs p38 e ERK1/2, PI3K e proteína G α i.

REFERÊNCIAS*

- ABRAMSON, T.; KEDEM, H.; RELMAN, D. A. Modulation of the NF-kappa B pathway by *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. **PLoS One**, v. 3, n. 11, p. e3825, 2008.
- ARICO, B.; RAPPOLI, R. *Bordetella parapertussis* and *B. bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 2847-2853, 1987.
- BABIK, J. M.; ADAMS, E.; TONE, Y.; FAIRCHILD, P. J.; TONE, M.; WALDMANN, H. Expression of Murine IL-12 Is Regulated by Translational Control of the p35 Subunit. **The Journal of Immunology**, v. 162, p. 4069-4078, 1999.
- BADU, M. M.; BHARGAVI, J.; SAUND, R. S.; SINGH, K. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. **Current Science**, v. 12, p. 1512-1522, 2001.
- BANUS, H. A.; VANDEBRIEL, R. J.; RUITER, H.; DORMANS, J. A. M. A.; NAGELKERKE, N. J.; MOOI, F. R.; HOEBEE, B.; VAN KRANEN, H. J.; KIMMAMI, 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, n. 5, p. 2596-2605, 2006.
- BARRA, M. Adultos são as principais fontes de transmissão da coqueluche a bebês. **G1**, sept 2011. Disponível em: <<http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2011/09/adultos-sao-principais-fontes-de-transmissao-da-coqueluche-bebes.html>>. Acesso em: 20 fev. 2012.
- BARRIE, A. M.; PLEVY, S. E. The interleukin-12 family of cytokines: Therapeutic targets for inflammatory disease mediation. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 5, p. 225-240, 2005.
- BASSINET, L.; GUEIRARD, P.; MAITRE, B.; HOUSSET, B.; GOUNON, P.; GUISSON, N. Role of Adhesins and Toxins in Invasion of Human Tracheal Epithelial Cells by *Bordetella pertussis*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 1934-1941, 2000.
- BLACK, R. E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H. L.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; BASSANI, D. G.; JHA, P.; CAMPBELL, H.; WALKER, C. F.; CIBULSKIS, R.; EISELE, T.; LIU, L.; MATHERS, C. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, v. 375, p. 1969-1987, 2010.
- BOLTZ-NITUDESCU, G.; WILTSCHKE, C.; HOLZINGER, C.; FELLINGER, A.; SHERNER, O.; GESSI, A.; FÖRSTER, O. Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. **J. Leukocyte Biology**, v. 41, p. 83-91, 1987.
- BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends Immunol.**, v. 25, n. 6, p. 280-288, 2004.

* De acordo com:

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

BOST, K. L.; CLEMENTS, J. D. Intracellular *Salmonella dublin* induces substantial secretion of the 40-kilodalton subunit of interleukin-12 (IL-12) but minimal secretion of IL-12 as a 70-kilodalton protein in murine macrophages. **Infect Immun.**, v. 65, n. 8, p. 3186-3192, 1997.

BOUCHER, J. G.; PARATO, K. A.; FRAPPIER, F.; FAIRMAN, P.; BUSCA, A.; SAXENA, M.; BLAHOIANU, M. A.; MA, W.; GAJANAYAKA, N.; PARKS, R. J.; KUMAR, A.; ANGEL, J. B. Disparate regulation of LPS-induced MAPK signaling and IL-12p40 expression between different myeloid cell types with and without HIV infection. **Viral Immunol.**, v. 23, n. 1; p. 17-28, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.** 6. ed. Brasília, 2005. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.** 7. ed. Brasília, 2009. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRAUN, M. C.; KELSALL, B. L. Regulation of interleukin-12 production by G-protein-coupled receptors. **Microbes Infect.**, v. 3, n. 2, p. 99-107, 2001.

BRICKS, L. F. Vacinas acelulares pertussis para adolescentes e adultos: revisão. **Pediatría**, v. 29, n. 3, p. 208-215, 2007.

BURNS, V. C.; PISHKO, E. J.; PRESTON, A.; MASKELL, D. J.; HARVILLI, E. T. Role of *Bordetella* O Antigen in Respiratory Tract Infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 86-94, 2003.

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, n. 2, p. 679-684, 2002.

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

CARBONETTI, N. H.; ARTAMONOVA, G. V.; VAN ROOIJEN, N.; AYALA, V. I. Pertussis toxin targets airway macrophages to promote *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 1713-1720, 2007.

CARBONETTI, N. H. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. **Future Microbiol.**, v. 5, p. 455-469, 2010.

CAROFF, M.; KARIKIAN, D.; CAVAILLON, J. M.; HAEFFNER-CAVAILLON, H. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 915-926, 2002.

CARVALHO, A. P.; PEREIRA, E. M. Acellular pertussis vaccine for adolescents. **J Pediatr.**, v. 82, n. 3, p. S15-24, 2006.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Pertussis Epidemic - Washington, 2012. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 61, n. 28, p. 517-543, 2012.

CHILTON, P. M.; EMBRY, C. A.; MITCHELL, T. C. Effects of Differences in Lipid A Structure on TLR4 Pro-Inflammatory Signaling and Inflammasome Activation. **Front Immunol.**, v. 154, n. 3, p. 1-8, 2012.

COBB, M. H.; GOLDSMITH, E. J. How MAP kinases are regulated. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 25, p. 14843- 14846, 1995.

COORDENAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (COVISA). Coqueluche Vigilância Epidemiológica e Triagem Diagnóstica. **Boletim informativo**, São Paulo, n. 2, 2009.

CREMER, T. J.; BUTCHAR, J. P.; TRIDANDAPANI, S. Francisella Subverts Innate Immune Signaling: Focus On PI3K/Akt. **Front Microbiol.**, v. 2, n. 13, p. 1-6, 2011.

CULLINANE, L. C.; ALLEY, M. R.; MARSHALL, R. B.; MANKTELOW, B. W. *Bordetella parapertussis* from lambs. **N. Z. Vet. J.**, v. 35, n. 10, p. 175, 1987.

CUMMINGS, C. A.; BRINIG, M. M.; LEPP, P. W.; VAN DE PÁS, S.; RELMAN D. A. *Bordetella* species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 5, p. 1484-1492, 2004.

DAVID, S.; VAN FURTH, R.; MOOI, F. R. Efficacies of whole cell and acellular pertussis vaccines against *Bordetella parapertussis* in a mouse model. **Vaccine**, v. 22, n. 15-16, p. 1892-1898, 2004.

DEANE, J. A.; FRUMAN, D. A. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 563-598, 2004.

DIAS, W. O.; LEITE, L. L.; HORTON, D. S. P. Q.; SAKAUCHI, M. A.; KUBRUSLY, F. S.; FURUYAMA, N.; NASCIMENTO, I. P.; QUINTILIO, W.; HIGASHI, H. G.; RAW, I. New approaches in pertussis vaccines for developing countries. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 668-672, 2007.

DOBREVA, Z. G.; STANISOVA, S. A.; MITEVA, L. D. Differences in the inducible gene expression and protein production of IL-12p40, IL-12p70 and IL-23: involvement of p38 and JNK kinase pathways. **Cytokine**, v. 43, p. 76-82, 2008.

FEDELE, G.; STEFANELLI, P.; SPENCIERI, 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. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1590-1597, 2005.

FEDELE, G.; CELESTINO, I.; SPENSIERI, F.; FRASCA, L.; NASSO, M.; WATANABE, M.; REMOLI, M. E.; COCCIA, E. M.; ALTIERI, F.; AUSIELLO, C. M. Lipooligosaccharide from *Bordetella pertussis* induces mature human monocyte-derived dendritic cells and drives a Th2 biased response. **Microbes Infect.**, v. 9, n. 7, p. 855-863, 2007.

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, n. 1, p. 208-216, 2008.

FEDELE, G.; SPENSIERI, F.; PALAZZO, R.; NASSO, M.; CHEUNG, G. Y.; COOTE, J. G.; AUSIELLO, C. M. *Bordetella pertussis* commits human dendritic cells to promote a Th1/Th17 response through the activity of adenylate cyclase toxin and MAPK-pathways. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8734, 2010.

FENG, G.; GOODRIDGE, H. S.; HARRETT, M. M.; WEI, X.; NIKOLAEV, A. V.; HIGSON, A. P.; LIEW, F. Extracellular Signal-Related Kinase (ERK) and p38 Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases Differentially Regulate the Lipopolysaccharide-Mediated Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase and IL-12 in Macrophages: *Leishmania* Phosphoglycans Subvert Macrophage IL-12 Production by Targeting ERK MAP Kinase. **J. Immunol.**, v. 163, p. 6403-6412, 1999.

FENG, C. G.; SCANGA, C. A.; COLLAZO-CUSTODIO, C. M.; CHEEVER, A. W.; HIENY, S.; CASPAR, P.; SHER, A. Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to *Mycobacterium avium* infection not exhibited by Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4-deficient animals. **J. Immunol.**, v. 171, n. 9, p. 4758-4764, 2003.

FENNELL, N. K.; SISTI, F.; HIGGINS, S. C.; ROSS, P. J.; VAN DER HEIDE, H.; MOOI, F. R.; BOYD, A.; MILLS, K. H. *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. **Infect Immun.**, v. 76, n. 3, p. 1257-1266, 2008.

FLESCH, I. E.; HESS, J. H.; HUANG, M.; AGUET, M.; ROTHE, J.; BLUETHMANN, H.; KAUFMANN, S. H. Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon γ and tumor necrosis factor α . **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 1615-1621, 1995.

FORSYTH, K. D.; WIRSING VON KONING, C. H.; TAN, T.; CARO, J.; PLOTKIN, S. Prevention of pertussis: Recommendation derived from the second global pertussis initiative roundtable meeting. **Vaccine**, v. 25, p. 2634-2642, 2007.

FUJIHARA, M.; MUROI, M.; TANAMOTO, K.; SUZUKI, T.; AZUMA, H.; IKEDA, H. Molecular mechanisms of macrophage activation and desactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 100, p. 171-194, 2003.

FUKAO, T.; TANABE, M.; TERAUCHI, Y.; OTA, T.; MATSUDA, S.; ASANO, T.; KADOWAKI, T.; TAKEUCHI, T.; KOYASU, S. PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 875-881, 2002.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M. H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. **Science**, v. 327, p. 656-661, 2010.

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

GERSUK, G.; HIRAOKA, A.; MARR, K. A. Human monocytes differentiate into macrophages under the influence of human KPB-M15 conditioned medium. **J. Immunol. Methods**, v. 299, n. 1-2, p. 99-106, 2004.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF- κ B and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 225-260, 1998.

GIRARD, R. PEDRON, T.; UEMATSU, S.; BALLOY, V.; CHIGNARD, M.; AKIRA, S.; CHABY, R. Lipopolysaccharides from Legionella and Rhizobium stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll like receptor 2. **J. Cell Science**, v. 116, p. 293-302, 2003.

GOEBEL, E. M.; WOLFE, D. N.; ELDER, K.; STIBITZ, S.; HARVILL, E. T. O Antigen Protects *Bordetella parapertussis* from Complement. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 4, p. 1774-1780, 2008.

GOODRIDGE, H. S.; HARNETT, W.; LIEW, F. Y.; HARNETT, M. M. Differential regulation of interleukin-12 p40 and p35 induction via ERK MITOGEN-activated protein kinase –dependent and independent mechanisms and the implications for bioactive IL-12 and IL-23 responses. **Immunology**, v. 109, p. 415-425, 2003.

GOUW, D.; DIAVATOPoulos, D. A.; BOOTSMA, H. J.; HERMANS, P. W.; MOOI, F. R. Pertussis: a matter of immune modulation. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 35, n. 3, p. 441-474, 2011.

GRAY, M.; SZABO, G.; OTERO, A. S. A.; GRAY, L.; HEWLETT, E. Distinct mechanisms for K efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 18260–18267, 1998.

GUEIRARD, P.; DRUILHE, A.; PRETOLANI, M.; N. GUIZO. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection in vivo. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1718–1725, 1998.

GUIZO, N.; BERBERS, G.; FRY, N. K.; HE, Q.; RIFFELMANN, M.; WIRSING VON KÖNIG, C. H.; EU PERTSTRAIN GROUP. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 30, n. 3, p. 307-312, 2011.

HAUSCHILDT, S.; BRABETZ, W.; SCHROMM, A. B.; HAMANN, L.; ZABEL, P.; RIETSCHEL, E. T.; MÜLLER-LOENNIES, S. Structure and Activity of Endotoxins. In: **Bacterial Protein Toxins**. Springer Berlin Heidelberg; 2000. Cap. 27, p. 619-667. (Handbook of Experimental Pharmacology, 145).

HE, J.; GURUNATHAN, S.; IWASAKI, A.; ASH-SHAHEED, B.; KELSALL, B. L. Primary Role for Gi Protein Signaling in the Regulation of Interleukin 12 Production and the Induction of T Helper Cell Type 1 Responses. **J. Exp. Med.**, v. 191, n. 9, p. 1605-1610, 2000.

HELLWIG, S. M.; VAN SPRIEL, A. B.; SCHELLEKENS, J. F.; MOOI, F. R.; VAN DE WINKEL, J. G. Immunoglobulin A-mediated protection against *Bordetella pertussis* infection. **Infect Immun.**, v. 69, n. 8, p. 4846-4850, 2001.

HIGGINS, S. C.; LAVELLE, E. C.; MCCANN, C.; KEOGH, B.; MCNEELA, E.; BYRNE, P.; O'GORMAN, B.; JARNICKI, A.; MCGUIRK, P.; MILLS, K. H. 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, n. 6, p. 3119-3127, 2003.

HIGGINS, S. C.; JARNICKI, A. G.; LAVELLE, E. C.; MILLS, K. H. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. **J. Immunol.**, v. 177, p. 7980- 7989, 2006.

HIGGS, R.; HIGGINS, S. C.; ROSS, P. J.; MILLS, K. H. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. **Mucosal Immunol.**, v. 5, n. 5, p. 485-500, 2012.

HOEPELMAN, A. I. M.; TUOMANEN, E. I. Consequences of Microbial Attachment: Directing Host Cell Functions with Adhesins. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 5, p. 1729-1733, 1992.

HÖLSCHER, C. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 193, p. 1-17, 2004.

HRISTOV, A. C.; AUWAERTER, P. G.; ROMAGNOLI, M.; CARROLL, K. C. *Bordetella hinzii* septicemia in association with Epstein-Barr virus viremia and an Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 61, p. 484-486, 2008.

JENKINSON, D. Duration of effectiveness of pertussis vaccine: evidence from 10 years community study. **Br. Med. J.**, v. 296, p. 612-614, 1988.

JOHN, C. M.; LIU, M.; JARVIS, G. A. Profiles of structural heterogeneity in native lipooligosaccharides of *Neisseria* and cytokine induction. **J Lipid Res.**, v. 50, n. 3, p. 424-438, 2009.

JONES, B.; HELDWEIN, K.; MEANS, T.; SAUKKONEN, J.; FENTON, M. Differential roles of toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. **Ann Rheum Dis.**, v. 60, n. 3, p. 6-12, 2001.

KADOWAKI, T.; SHIMADA, M.; INAGAWA, H.; KOHCHI, C.; HIRASHIMA, M.; SOMA, G. Reconsideration of macrophage and dendritic cell classification. **Anticancer Res.**, v. 32, n. 6, p. 2257-2261, 2012.

KANG, B. Y.; KIM, E.; KIM, T. S. Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 665-673, 2005.

KATADA, T.; TAMURA, M.; UI, M. The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. **Arch Biochem Biophys.**, v. 224, p. 290-298, 1983.

KAWAI, T; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death Differ.**, v. 13, n. 5, p. 816-825, 2006.

KERR, J. R.; MATTHEWS, R. C. *Bordetella* pertussis infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.**, v. 19, p. 77-88, 2000.

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

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

KHELEF, N.; DANVE, B.; QUENTIN-MILLET, M. J.; GUISO, N. *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: two immunologically distinct species. **Infect. Immun.**, v. 161, n. 2, p. 486-490, 1993.

KIM, S. H.; KIM, J.; SHARMA, R. P. Inhibition of p38 and ERK MAP kinases blocks endotoxin-induced nitric oxide production and differentially modulates cytokine expression. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 5, p. 433-439, 2004.

KINNEAR, S. M.; MARQUES, R. R.; CARBONETTI, N. Differential Regulation of Bvg-Activated Virulence Factors Plays a Role in *Bordetella pertussis* Pathogenicity. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 4, p. 1983-1993, 2001.

KIRIMANJESWARA, G. S.; MANN, P. B.; HARVILL, E. T. Role of antibodies in immunity to *Bordetella* infections. **Infect Immun.**, v. 71, n. 4, p. 1719-1724, 2003.

KIRIMANJESWARA, G. S.; AGOSTO, L. M.; KENNETT, M. J.; BJORNSTAD, O. N.; HARVILL, E. T. Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of *Bordetella pertussis*. **J Clin Invest.**, v. 115, n. 12, p. 3594-3601, 2005.

KO, K. S.; PECK, K. R.; OH, W. S.; LEE, N. Y.; LEE, J. H.; SONG, J-H. New Species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., Isolated from the Purulent Exudate of an Epidermal Cyst. **J. Clin. Microb.**, v. 43, n. 5, p. 2516–2519, 2005.

KOH, Y. S.; KOO, J. E.; BISWAS, A.; KOBAYASHI, K. S. MyD88-dependent signaling contributes to host defense against ehrlichial infection. **PLoS One**, v. 5, n.7, p. 1-11, 2010.

KORGENSKI, E. K.; DALY, J. A. Surveillance and detection of erythromycin resistance in *Bordetella pertussis* isolates recovered from a pediatric population in the Intermountain West region of the United States. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2989–2991, 1997.

KRISHNAN, J.; SELVARAJOO, K.; TSUCHIYA, M.; LEE, G.; CHOI, S. Toll-like receptor signal transduction. **Exp Mol Med.**, v. 39, n. 4, p. 421-438, 2007.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition in the innate immune response. **Biochem. J.**, v. 420, p. 1–16, 2009.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int Rev Immunol.**, v. 30, n. 1, p. 16-34, 2011.

LABOISSIÈRE, P. Grávidas serão vacinadas contra coqueluche a partir do segundo semestre deste ano. **Agência Brasil**, feb 2013. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/noticia/2013-02-19/gravidas-serao-vacinadas-contra-coqueluche-partir-do-segundo-semestre-deste-ano>>. Acesso em: 02 maio 2013.

LADANT, D.; ULLMANN, A. *Bordetella pertussis adenylate cyclase: A toxin with multiple talents*. **Trends Microbiol.**, v. 7, p. 172–176, 1999.

LAMBERTI, Y. A.; HAYES, J. A.; VIDAKOVICS, M. L. P.; HARVILL, E. T.; RODRIGUEZ, M. E. Intracellular Trafficking of *Bordetella pertussis* in Human Macrophages. **Infect Immun.**, v. 78, n. 3, p. 907–913, 2010.

LAMONT, A. G.; ADORINI, L. IL-12: a key cytokine in immune regulation. **Immunol. Today**, v. 17, p. 214-217, 1996.

LANGLEY, J. M.; HALPERIN, S. A.; BOUCHER, F. D.; SMITH, B. Azithromycin is as effective as and better tolerated than erythromycin estolate for the treatment of pertussis. **Pediatrics**, v. 114, p. 96–101, 2004.

LEBEL, M. H.; MEHRA, S. Efficacy and safety of clarithromycin versus erythromycin for the treatment of pertussis: a prospective, randomized, single blind trial. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 20, p. 1149–1154, 2001.

LIPHALUS, B. L.; GONÇALVES, M. I. C.; CARVALHANAS, T. R. M. P. Coqueluche: epidemiologia e controle: Pertussis: epidemiology and control. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 53, n. 5, may 2008. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa53_coqueluche.htm>. Acesso em: 09 abr. 2011.

LIU, J.; CAO, S.; HERMAN, L. M.; MA, X. Differential Regulation of Interleukin (IL)-12 p35 and p40 Gene Expression and Interferon (IFN)- γ -primed IL-12 Production by IFN Regulatory Factor 1. **J. Exp. Med.**, v. 198, n. 8, p. 1265–1276, 2003.

LIU, J.; GUAN, X.; TAMURA, T.; OZATO, K.; MA, X. Synergistic activation of interleukin-12p35 gene transcription by interferon regulatory factor-1 and interferon consensus sequence-binding protein. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 53, p. 55609-55617, 2004.

LIU, Y.; SHEPHERD, E. G.; NELIN, L. D. MAPK phosphatases regulating the immune response. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 202-212, 2007.

LOCHT, C. Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. **Internatl Microbiol.**, v. 2, p. 137-144, 1999.

LOCHT, C.; ANTOINE, R.; JACOB-DUBUISSON, F. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 82–89, 2001.

LOCHT, C.; COUTTE, L.; MIELCAREK, N. The ins and outs of pertussis toxin. **FEBS Journal**, v. 278, p. 4668–4682, 2011.

LU FERNANDES COMUNICAÇÃO E IMPRENSA. Aumento do número de casos de coqueluche no Brasil e no mundo motiva campanha Internacional contra a doença. Disponível em:< <http://www.lufernandes.com.br/2010/ultimas-noticias/aumento-do-numero-de-casos-de-coqueluche-no-brasil-e-no-mundo-motiva-campanha-internacional-contra-a-doenca/>>. Acesso em: 15 fev. 2013.

LU, H-T.; YANG, D. D.; WYSK, E. G.; MELLMAN, I.; DAVIS, R. J.; FLAVELL, R. A. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 7, p. 1845-1857, 1999.

LUKER, K. E.; TCOLLIER, J. L.; KOLODZIEJ, E. W.; MARSHALL, G. R.; GOLDMANN, W. E. *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology. **Proc. Natl Acad Sci USA.**, v. 90, n. 6, p. 2365-2369, 1993.

LUZ, P. M.; CODEÇO, C. T.; WERNECK, G. L. A reemergência da coqueluche em países desenvolvidos: um problema também para o Brasil? **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 4, p. 1209-1213, 2003.

LYAKH, L.; TRINCHIERI, G.; PROVEZZA, L.; CARRA, G.; GEROSA, F. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. **Immunol Rev.**, v. 226, p. 112-131, 2008.

MA, X.; SUN, J.; PAPASAVVAS, E.; RIEMANN, H.; ROBERTSON, S.; MARSHALL, J.; BAILER, R. T.; MOORE, A.; DONNELLY, R. P.; TRINCHIERI, G.; MONTANER, L.J. Inhibition of IL-12 production in human monocyte-derived macrophages by TNF. **J. Immunol.**, v. 164, n. 4, p. 1722-1729, 2000.

MAHON, B. P.; RYAN, M.; GRIFFIN, F.; MILLS, K. H. G. IL-12 is produced by live or killed *Bordetella pertussis* and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5295-5301, 1996.

MANGMOOL, S.; KUROSE, H. Gi/o Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX). **Toxins**, v. 3, p. 884-899, 2011.

MANN, P. B.; WOLFE, D.; LATZ, E.; GOLENBOCK, D.; PRESTON, A.; HARVILL, E.T. Comparative Toll-Like Receptor 4-Mediated Innate Host Defense to *Bordetella* infection. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 12, p. 8144-8152, 2005.

MARCHANT, J.; CHANG, A. Managing pertussis in adults. **Aust Prescr.**, v. 32, p. 36-38, 2009.

MARR, N.; HAJJAR, A. M.; SHAH, N. R.; NOVIKOV, A.; YAM, C. S.; CAROFF, M.; FERNANDEZ, R. C. Substitution of the *Bordetella pertussis* Lipid A Phosphate Groups with Glucosamine Is Required for Robust NF-κB Activation and Release of Proinflammatory Cytokines in Cells Expressing Human but Not Murine Toll-Like Receptor 4–MD-2–CD14. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 5, p. 2060-2069, 2010.

MARRIOTT, J. B.; CLARKE, I. A.; DALGLEISH, A. G. Inhibition of p38 MAP kinase during cellular activation results in IFN- γ -dependent augmentation of IL-12 production by human monocytes/macrophages. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 125, p. 64 -70, 2001.

MARTIN, M.; SCHIFFERLE, R. E.; CUESTA, N.; VOGEL, S. N.; KATZ, J.; MICHALEK, S. M. Role of the Phosphatidylinositol 3 Kinase-Akt Pathway in the Regulation of IL-10 and IL-12 by *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, v. 171, p. 717-725, 2003.

MARTINS, J. F. **Estudo sobre a reação inflamatória produzida pela vacina contra a difteria, o tétano e a coqueluche (DTP) em camundongos**. 2006. 101 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

MARZOUQI, I.; RICHMOND, P.; FRY, S.; WETHERALL, J.; MUKKUR, T. Development of improved vaccines against whooping cough Current status. **Human Vaccines**, v. 6, n. 7, p. 543-553, 2010.

MASTRANTONIO, P.; STEFANELLI, P.; GIULIANO, M.; ROJAS, Y. H.; ATTIL, M. D. C.; ANEMONA, A.; TOZZI, A. E. *Bordetella parapertussis* Infection in Children: Epidemiology, Clinical Symptoms, and Molecular Characteristics of Isolates. **J. Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 999-1002, 1998.

MASUMI, A.; TAMAOKI, S.; WANG, I. M.; OZATO, K.; KOMURO, K. IRF-8/ICSBP and IRF-1 cooperatively stimulate mouse IL-12 promoter activity in macrophages. **FEBS Lett.**, v. 531, n. 2, p. 348-353, 2002.

MATOO, S.; CHERRY, J. D. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 326-382, 2005.

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

MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. **Trends Microbiol.**, v. 12, n. 4, p. 186-192, 2004.

MOGENSEN, T. H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 22, n. 2, p. 240-273, 2009.

MUNFORD, R. S.; VARLEY, A. W. Shield as signal: lipopolysaccharides and the evolution of immunity to gram-negative bacteria. **PLoS Pathog.**, v. 2, n. 6, p. e67, 2006.

MURPHY, T. L.; CLEVELAND, M. G.; KULESZA, P.; MAGRAM, J.; MURPHY, K. M. Regulation of Interleukin 12 p40 Expression through an NF- κ B Half-Site. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 10, p. 5258-5267, 1995.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 762 p.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat. Rev. Immun.**, v. 11, p. 723-737, 2011.

NASSO, M.; FEDELE, G.; SPENSIERI, F.; PALAZZO, R.; COSTANTINO, P.; RAPPUOLI, R.; AUSIELLO, C. M. Genetically detoxified pertussis toxin induces Th1/Th17 immune response through MAPKs and IL-10-dependent mechanisms. **J. Immunol.**, v. 183, n. 3, p. 1892-1899, 2009.

NAGAMATSU, K.; KUWAE, A.; KONAKA, T.; NAGAI, S.; YOSHIDA, S.; EGUCHI, M.; WATANABE, M.; MIMURO, H.; KOYASU, S.; ABE, A. *Bordetella* evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN. **J. Exp. Med.**, v. 206, n. 13, p. 3063-3088, 2009.

NETEA, M. G. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, p. 749-755, 2004.

NIGG, A. P.; ZAHN, S.; RÜCKERL, D.; HÖLSCHER, C.; YOSHIMOTO, T.; EHRCHEN, J. M.; WÖLBING, F.; UDEY, M. C.; VON STEBUT, E. Dendritic Cell-Derived IL-12p40 Homodimer Contributes to Susceptibility in Cutaneous Leishmaniasis in BALB/c Mice. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 7251-7258, 2007.

PARKHILL, J.; SEBAIHIA, M.; PRESTON, A.; MURPHY, L. D.; THOMSON, N.; HARRIS, D. E.; HOLDEN, M. T. G.; CHURCHER, C.; BENTLEY, S. D.; MUNGALL, K. L.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M.; TEMPLE, L.; JAMES, K.; HARRIS, B.; QUAIL, M. A.; ACHTMAN, M.; ATKIN, R.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BASON, N.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T.; COLLINS, M.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DOGGETT, J.; FELTWELL, T.; GOBLE, A.; HAMLIN, N.; HAUSER, H.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; LEATHER, S.; MOULE, S.; NORBERCZAK, H.; O'NEIL, S.; ORMOND, D.; PRICE, C.; RABBINOWITSCH, E.; RUTTER, S.; SANDER, M.; SAUNDERS, D.; SEEGER, K.; SHARP, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; UNWIN, L.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G.; MASKELL, D. J. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. **Nature Genetics**, v. 35, n.1, p. 32-40, 2003.

PEREIRA, G. A. **Boletim Informativo do Diagnóstico Laboratorial de Coqueluche**. Brasil, 2010.

PILIONE, M. R.; HARVILL, E. T. The *Bordetella bronchiseptica* type III secretion system inhibits gamma interferon production that is required for efficient antibody-mediated bacterial clearance. **Infect Immun.**, v. 74, n. 2, p. 1043-1049, 2006.

PRESKY, D. H.; YANG, H.; MINETTI, L. J.; CHUA, A. O.; NABAVI, N.; WU, C. Y.; GATELY, M. K.; GUBLER, U. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two betatype cytokine receptor subunits. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 93, p. 14002-14007, 1996.

PRESTON, A.; PARKHILL, J.; MASKELL, D. J. The Bordetellae: lessons from genomics. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 379-390, 2004.

PRESTON, A.; PETERSEN, B. O.; DUUS, J.; KUBLER-KIELB, J.; BEN-MENACHEM, G.; LI, ; VINOGRADOV, E. Complete Structures of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis* Lipopolysaccharides*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 26, p. 18135–18144, 2006.

REISSINGER, A.; SKINNER, J. A.; YUK, M. H. Downregulation of mitogen-activated protein kinases by the *Bordetella bronchiseptica* Type III secretion system leads to attenuated nonclassical macrophage activation. **Infect Immun.**, v. 73, n.1, p. 308-316, 2005.

RAW, I.; HIGASHI, H. G. Auto-suficiência e inovação na produção de vacinas e saúde pública. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 155-170, 2008.

RODRIGUEZ, M. E.; HELLWIG, S. M.; HOZBOR, D. F.; LEUSEN, J.; VAN DER POL, W. L.; VAN DE WINKEL, J. G. Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*. **J. Immunol.**, v. 67, n. 11, p. 6545-6551, 2001.

ROMANI, L.; PUCCETTI, P.; BISTONI, F. Interleukin-12 in Infectious Diseases. **Clin. Microb. Rev.**, v. 10, n. 4, p. 611-636, 1997.

ROSETTI, A. S. *Bordetella pertussis*: participação da arginase, TGF-β e TLR-4 no controle da síntese de óxido nítrico em macrófagos derivados de medula óssea murina. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ROSS, P. J.; LAVELLE, E. C.; MILLS, K. H.; BOYD, A. P. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* synergizes with lipopolysaccharide to promote innate interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 1568-1579, 2004.

ROUX, P. P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 2, p. 320-344, 2004.

RUSE, M.; KNAUS, U. G. New players in TLR-mediated innate immunity: PI3K and small Rho GTPases. **Immunol Res.**, v. 34, n. 1, p. 33-48, 2006.

SANOFI. Sanofi Pasteur lança a vacina Adacel Quadra para evitar que adolescentes e adultos transmitam coqueluche aos bebês. São Paulo, sept 2011.

SCHOENHAUT, D. S.; CHUA, A. O.; WOLITZKY, A. G.; QUINN, P. M.; DWYER, C. M.; McCOMAS, W.; FAMILLETTI, P. C.; GATELY, M. K.; GUBBER, U. Cloning and expression of murine IL-12. **J. Immunol.**, v. 148, p. 3433–3440, 1992.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN). Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/coqueluche/bases/coquebmet.def>>. Acesso em: 16 abr. 2013.

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

SNIJDERS, A.; HILKENS, C. M. U.; VAN DER POUW KRAAN, T. C. T. M.; ENGEL, M.; AAEDEN, L. A; KAPSENBERG, M. L. Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. **J. Immunol.**, v. 156, p. 1207-1212, 1996.

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 Adenylate Cyclase Toxin-Dependent Cyclic AMP Induction. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, p. 2831-2838, 2006.

STEED, L. L.; AKPORIAYE, E. T.; FRIEDMAN, R. L. *Bordetella pertussis* Induces Respiratory Burst Activity in Human Polymorphonuclear Leukocytes. **Infection and Immunity**, v. 50, n. 5, p. 2101-2105, 1992.

SURESH, A.; SODHI, A Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by bone marrow-derived macrophages: effect of cisplatin and lipopolysaccharide. **Immunol. Lett.**, v. 30, n. 1, p. 93-100, 1991.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Seminars Immunol.**, v. 16, p. 3-9, 2004.

TANG, Y-W.; HOPKINS, M. K.; KOLBERT, C. P.; HARTLEY, P. A.; SEVERANCE, P. J.; PERSING, D. H. *Bordetella holmesii*-Like Organisms Associated with Septicemia, Endocarditis, and Respiratory Failure. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, p. 389-92, 1998.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

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.

TOZZI, A. E.; CELENTANO, L. P.; ATTU, M. L. C. D.; SALMASO, S. Diagnosis and management of pertussis. **Canadian Medical Association or its licensors**, v. 172, n. 4, p. 509-515, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.

TRINCHIERI, G. Interleukine-12 a proinflamatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptative immunity. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 251-276, 1995.

TRINCHIERI, G.; GEROSA, F. Immunoregulation by interleukin-1 2. **J. Leukoc. Biol.**, v. 59, p. 505-511, 1996.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 133-146, 2003.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat Rev Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 179-190, 2007.

VALLEDOR, A. F.; BORRA'S, F. E.; CULLELL-YOUNG, M.; CELADA, A. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 63, p. 405-417, 1998.

VANDAMME, P.; HOMMEZ, J.; VANCANNEVT, M.; MONSIEURS, M.; HOSTE, B.; COOKSON, B.; WIRSING VON KÖNIG, C. H.; KERSTERS, K.; BLACKALL, P. J. *Bordetella hinzii* sp. nov., Isolated from Poultry and Humans. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 5, n. 1, p. 37-45, 1995.

VANDAMME, P.; HEYNDRICKX, M.; VANCANNEYT, M.; HOSTE, B.; DE VOS, 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, n. 4, p. 849-858, 1996.

VAN DER ARK, A. A.; HOZBOR, D. F.; BOOG, C. J.; METZ, B.; VAN DEN DOBBELSTEEN, G. P.; VAN ELS, C. A. Resurgence of pertussis calls for re-evaluation of pertussis animal models. **Expert Rev. Vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1121-37, 2012.

VAN DER ZEE, A.; MOOI, F.; VAN EMBDEN, J.; MUSSER, J. Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. **J Bacteriol.**, v. 179, n. 21, p. 6609-6617, 1997.

VANHAEBROECK, B.; LEEVERS, S. J.; AHMADI, K.; TIMMS, J.; KATSO, R.; DRISCOLL, P. C.; WOSCHOLSKI, R.; PARKER, P. J.; WATERFIELD, M. D. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 70, p. 535-602, 2001.

VECCHIO, M. D.; BAJETTA, E.; CANOVA, S.; LOTZE, M.; WESA, A.; PARMIANI, G.; ANICHINI, A. Interlekin-12: Biological Properties and Clinical Application. **Clin Cancer Res.**, v. 13, n. 16, p. 4677-4685, 2007.

VERSTEEGH, F G. A.; SCHELLEKENS, A. F.; ROORDD, J. J. Pertussis: a concise historical review including diagnosis, incidence, clinical manifestations and therole of treatment and vaccination in management. **Rev. Medical Microbiology**, v. 16, p. 79-89, 2005.

VON WINTZINGERODE, F.; SCHATTKE, A.; SIDDIQUI, R. A.; RÖSICK, U.; GÖBEL, U. B.; GROSS, R. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1257-1265, 2001.

WANG, Z. Y.; YANG, D.; CHEN, Q.; LEIFER, C. A.; SEGAL, D. M.; SU, S. B.; CASPI, R.; HOWARD, Z. O.; OPPENHEIM, J. J. Induction of dendritic cell maturation by pertussis

toxin and its B subunit differentially initiate Toll-like receptor 4-dependent signal transduction pathways. **Exp Hematol.**, v. 34, p. 1115–1124, 2006.

WATANABE, M.; NAGAI, M. Role of systemic and mucosal immune responses in reciprocal protection against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in a murine model of respiratory infection. **Infect Immun.**, v. 71, n. 2, p. 733–738, 2003.

WATFORD, W. T.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J. J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 14, n. 5, p. 361-368, 2003.

WING, C. **Patogenesis, colonisation and LPS endotoxin of *Bordetella pertussis*.** Disponível em: <<http://www.uea.ac.uk/menu/acaddepts/cap/carbohydrate/CCCPeople/Corin/welcome.htm>>. Acesso em: 14 ago. 2011.

WOOD, N.; MCINTYRE, P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. **Pediatric Respiratory Reviews**, v. 9, p. 201-212, 2008.

WOLFE, D. N.; KIRIMANJESWARA, G. S.; HARVILL, E. T. Clearance of *Bordetella parapertussis* from the Lower Respiratory Tract Requires Humoral and Cellular Immunity. **Infection and Immunity**, v. 73, n.10, p. 6508-6513, 2005.

WOLFE, D. N.; KIRIMANJESWARA, G. S.; GOEBEL, E. M.; HARVILL, E. T. Comparative role of immunoglobulin A in protective immunity against the Bordetellae. **Infect Immun.**, v. 75, n. 9, p. 4416-4422, 2007.

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.

WOLFE, D. N.; MANN, P. B.; BUBOLTZ, A. M.; HARVILL, E. T. Delayed Role of Tumor Necrosis Factor- α in Overcoming the Effects of Pertussis Toxin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, p. 1228–1236, 2007.

WOLFE, D. N.; BUBOLTZ, A. M.; HARVILL, E. T. Inefficient Toll-like receptor-4 stimulation enables *Bordetella parapertussis* to avoid host immunity. **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. e4280, 2009.

WOLFE, D. N.; KARANIKAS, A. T.; HESTER, S. E.; KENNEDY, M. J.; HARVILL, E. T. IL-10 induction by *Bordetella parapertussis* limits a protective IFN-gamma response. **J. Immunol.**, v. 184, n. 3, p. 1392-1400, 2010.

WOOLFREY, F. B.; MOODY, J. A. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 234-255, 1991.

YUK, M. H.; HARVILL, E. T.; COTTER, P. A.; MILLER, J. F. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 991–1004, 2000.

ZAKHAROVA, M.; ZIEGLER, H. K. Paradoxial Anti-Inflammatory Actions of TNF- α Inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in Macrophages and Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 5024-5033, 2005.

ZANONI, I.; GRANUCCI, F. Dendritic Cells and Macrophages: Same Receptors but Different Functions. **Current Immunology Reviews**, v. 5, p. 311-325, 2009.

ZHANG, Y.; DONG, C. MAP Kinases in Immune Responses. **Cellular & Molecular Immunology Review**, v. 2, n. 1, p. 20-27, 2005.

ZHANG, S.; WANG, Q. Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: Regulatory mechanisms for IL-12p70 synthesis and inhibition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, p. 509-515, 2008.

ZHANG, X.; GOEBEL, E. M.; RODRIGUEZ, M. E.; PRESTON, A.; HARVILL, E. T. The O antigen is a critical antigen for the development of a protective immune response to *Bordetella parapertussis*. **Infect Immun.**, v. 77, n. 11, p. 5050-5058, 2009.