PRISCILA SILVA CUNEGUNDES

Avaliação imunológica de vacina contra pertussis com menor
teor de LPS (Plow) na infecção com *Bordetella pertussis*
e *Bordetella parapertussis*, em camundongos

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

São Paulo
2016

PRISCILA SILVA CUNEGUNDES

Avaliação imunológica de vacina contra pertussis com menor teor de LPS (Plow) na infecção com *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis*, em camundongos

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dra. Waldely de Oliveira Dias

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Cunegundes, Priscila Silva.

Avaliação imunológica de vacina contra pertussis com menor teor de LPS (Plow) na infecção com *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis*, em camundongos / Priscila Silva Cunegundes. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Waldely de Oliveira Dias.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Imunologia, vacinas.

Versão do título para o inglês: Immunological evaluation of a whole cell pertussis vaccine with low LPS content in the infection with *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* in mice

1. *B. pertussis* 2. *B. parapertussis* 3. Vacinas 4. Vacinas pertussis low (Plow) 5. Coqueluche I. Dias, Prof. Dr. Waldely de Oliveira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0121/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Priscila Silva Cunegundes.

Título da Dissertação: Avaliação imunológica de vacina contra pertussis com menor teor de LPS (Plow) na infecção com *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis*, em camundongos .

Orientador(a): Prof. Dr. Waldely de Oliveira Dias.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação imunológica da vacinação contra pertussis na infecção com *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis*, em modelo animal", protocolo nº 1305/14, sob a responsabilidade de Waldely de Oliveira Dias e Priscila Silva Cunegundes - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 15/10/2014.

This is to certify that the proposal "Immunological evaluation of vaccination against pertussis in infection with *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an animal model", protocol nº 1305/14, under the responsibility of Waldely de Oliveira Dias and Priscila Silva Cunegundes - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 10/15/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
02/2015 - 07/2016	
Centro de Biotecnologia	314 Camundongos Balb/c 18-22g (F); 24 Camundongos C57BL/6 18-22g (F)

São Paulo, 6 de fevereiro de 2015

Dra. Wafa H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar e estar comigo, colocando somente pessoas do bem nessa minha trajetória.

À Dra. Waldely de Oliveira Dias por me aceitar e orientar como sua aluna de iniciação científica, mestrado e também pelas dicas valiosas e pensamento crítico. Tenho aprendido muito com você.

Às minhas amadas amigas: Ana Fabíola, Luciana e em especial, a Eli, Pam e Míriam que me acompanharam e ajudaram ao longo desse trajeto tornando-o menos penoso e mais divertido.

Às meninas lá de casa Nay, Jel, Ba, Simone e Mônica, minha família aqui em São Paulo. Adoro vocês!

Aos funcionários do Prédio Central de Biotecnologia: André, Vera, Toninho e em especial à Marisa, Fátima e Nídia pelo cuidado, suporte e carinho comigo.

À Dra. Luciana Leite, pela disponibilização do laboratório de Biologia Molecular II para realização de ensaios.

Aos pesquisadores: Dra. Dúnia Rodriguez e Dr. Ivan Nascimento, pelo apoio técnico e teórico.

Aos funcionários da Fermentação: Ana, Seu Lori e Seu Hélio pelo trabalho técnico e apoio. Vocês são anjos.

Às funcionárias do Biotério: Marisa e Rosa pelo cuidado, paciência e zelo com os camundongos e também pela amizade e compreensão.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão de bolsa de Mestrado, assim como à Fundação Butantan, pelo financiamento desta pesquisa.

Aos meus irmãos, Paloma e Pedro Aldo, e meus pais, Ana Lúcia e Pedro, pelo apoio incondicional em mais uma etapa na minha busca por um sonho e por não me deixarem desistir. A vocês, meu eterno agradecimento e todo o meu amor!

Muito obrigada!

RESUMO

CUNEGUNDES, P. S. **Avaliação imunológica de vacina contra pertussis com menor teor de LPS (Plow) na infecção com *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis*, em camundongos** 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Bordetella pertussis e *B. parapertussis* são cocobacilos gram-negativos aeróbios estritos, causadores da coqueluche ou tosse comprida. Por mais de 40 anos, as vacinas de células inteiras (WCP) contra a coqueluche têm se mostrado eficazes, mas foram associadas a efeitos colaterais indesejáveis, causando resistência na aceitação por parte da população, o que levou ao desenvolvimento das vacinas pertussis acelulares. Essas vacinas, embora menos reatogênicas, são caras, o que as torna inviáveis para países em desenvolvimento. Apesar disso, segundo dados da OMS (2014) ainda existem 50 milhões de casos da doença com 300.000 mortes por ano, principalmente entre crianças com até um ano de idade. Neste estudo, buscamos avaliar a reposta imune induzida por uma vacina celular contra pertussis com menor teor de LPS (Plow), menos reatogênica e de baixo custo, desenvolvida pelo Instituto Butantan. Para isso, camundongos C57BL-6 foram imunizados com Plow, comparativamente a uma vacina pertussis celular tradicional (WCP) e duas vacinas triplíce bacterianas com componente pertussis acelular, Pertacel ou Adacel. Foi avaliada a resposta imune humoral e celular contra *B. pertussis* e *B. parapertussis*, além da resposta inata a um antígeno não relacionado, vacina BCG. Também foi realizado ensaio de transmissão de *B. pertussis* e *B. parapertussis*, após desafio intranasal, dos animais imunizados para não imunes. Nossos resultados mostraram altos títulos de IgG anti-pertussis e anti-parapertussis induzidos pelas vacinas Plow e WCP, significativamente maiores que os induzidos pela Pertacel, assim como títulos similares de IgG1/IgG2a, sugerindo resposta balanceada Th1/Th2. A análise da resposta imune celular em células de sangue periférico dos animais imunizados com Plow e WCP e estimuladas *in vitro* com Plow, WCP e *B. parapertussis* evidenciou a produção de TNF- α , IL-6 e em menor grau, IL-17 A, em reposta aos diferentes estímulos. Na avaliação da resposta inata, por estímulo *ex vivo* com BCG em células de sangue periférico de animais imunizados, a vacina Plow foi capaz de induzir a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α , e essa produção foi significativamente aumentada quando a vacina foi formulada com MPLA como adjuvante. Foi observada acentuada queda na taxa de transmissão de *B. pertussis* dos animais imunizados para não imunes, quando utilizadas as vacinas Plow ou Pertacel (50%), em relação ao grupo controle, injetado com PBS (100%). Quando desafiados com *B. parapertussis*, a transmissão bacteriana dos animais imunizados com Plow foi de apenas 33%, enquanto que para os imunizados com a vacina tradicional (WCP), com Pertacel ou Adacel foi de 67%, e para o controle PBS de 83%. O estudo consolidou a avaliação da resposta imune induzida pela Plow, além de apresentar resultados bastante interessantes relativos à atividade da Plow na diminuição da transmissão bacteriana, tanto de pertussis quanto de parapertussis.

Palavras-chaves: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, coqueluche, Vacinas, Vacina Pertussis Low.

ABSTRACT

CUNEGUNDES, P. S. **Immunological evaluation of a whole cell pertussis vaccine with low LPS content (Plow) in the infection with *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* in mice** 2016. 73 f. [Masters thesis (Biotechnonology)] – Instituto Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Bordetella pertussis and *B. parapertussis* are gram-negatives coccobacilli, the causative agents of pertussis or whooping cough. For more than 40 years, whole cell pertussis (wPs) vaccines have been used, and although effective, were associated with undesirable effects, which led to resistance from part of the population in 70-80 decades and development of the acellular pertussis (aP) vaccines in 1980. aP vaccines are less reactogenic, but expensive, which made their use unable for developing countries. According to World Health Organization (WHO) 2014, there are still 50 million cases of pertussis worldwide with 300.000 dead/year, mainly in children with less one year age. In this study, we assessed the immunological response induced by a whole cell pertussis vaccine with low LOS content (Plow), developed by Instituto Butantan. C57BL-6 mice were immunized with traditional whole cell pertussis vaccine (WCP) or Plow, administrated with Monophosphoril lipid A from *B.pertussis* or Aluminum hydroxide, and diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccines, Pertacel or Adacel. After the immunization scheme, were evaluated humoral and cellular immune responses against *B.pertussis* and *B.parapertussis*, in addition to innate response to an unrelated antigen, BCG vaccine. Transmission assay from immune mouse to unimmunized mice was also performed, after *B.pertussis* or *B.parapertussis* challenge. Our results showed high IgG, IgG1 and IgG2a anti-pertussis and anti-parapertussis titers induced by Plow and WCP, significantly higher than Pertacel, as well similar IgG1/IgG2a titers, indicating balanced Th1/Th2 response. Cellular Immune response of peripheral blood cells from mice immunized with Plow or WCP *in vitro* stimulated with Plow, WCP or *B.parapertussis* induced TNF- α and IL-6. After *in vitro* stimulation with BCG peripheral blood cells from Plow immunized mice induced significantly higher TNF- α production when formulated with MPL-A as adjuvant. It was observed marked decrease in transmission of *B.pertussis* from animals immunized with Plow or Pertacel (50%) with regards to control group (100%). When inoculated with *B.parapertussis*, the transmission rate from mice immunized with Plow was only 33%, whereas the immunized with WCP, Pertacel or Adacel was 67% and control group 83%. This study consolidated the immune response induced by Plow, besides interesting results with regards the efficacy of the vaccine in decreasing the transmission of *B.pertussis* and *B.parapertussis* from immune to unimmunized mice.

Keywords: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, whooping cough, Vaccines, whole cell pertussis with low LPS (Plow).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de infecção de <i>B. pertussis</i> e <i>B. parapertussis</i>	19
Figura 2 - Coeficiente de incidência de coqueluche e cobertura vacinal com DTP e DTP/Hib. Brasil de 1990 a 2013.	22
Figura 3 - Distribuição de casos de coqueluche por faixa etária, segundo o ano de ocorrência. Brasil de 2010 a 2014.	23
Figura 4 - Óbitos por coqueluche segundo faixa etária. Brasil de 2010 a 2014.....	23
Figura 5 - Microscopia eletrônica de vacina celular de pertussis antes do tratamento com solvente orgânico (wP) (A) e após tratamento com solvente orgânico (Plow) (B)	26
Figura 6 - Esquema do processo de produção da Vacina Pertussis com menor teor de LPS e do adjuvante MPL-A.	27
Figura 7 - Exp I. Esquema de imunização e sangria.	31
Figura 8 - Exp II. Esquema de imunização e sangria	32
Figura 9 - Exp III. Esquema de imunização e sangria.	33
Figura 10 - Títulos médios de IgG total anti-pertussis	42
Figura 11 - Títulos de IgG anti-PT	42
Figura 12 - Títulos médios de IgG total anti-parapertussis	43
Figura 13 - Títulos médios de IgG1 anti-pertussis.	44
Figura 14 - Títulos médios de IgG2a anti-pertussis	45
Figura 15 - Títulos médios de IgG1 anti-parapertussis.	46
Figura 16 - Títulos médios de IgG2a anti-parapertussis.	46
Figura 17 - (A) Indução de TNF- α em células do sangue periférico dos animais imunizados e controles em resposta ao estímulo com Plow. (B) Indução de IL-17A em células do sangue periférico dos animais imunizados e controles em resposta ao estímulo WCP.	49
Figura 18 - Indução de IL-6 em células do sangue periférico dos animais imunizados e controles em resposta ao estímulo com WCP (A) , Plow (B) e Bpp em cultivo de 48h (C) ou 6 dias (D) e de TNF- α em resposta ao estímulo com Bpp (E)	50
Figura 19 - Indução de TNF- α em células do sangue periférico dos animais imunizados e controles em resposta ao estímulo com BCG.	54

Figura 20 - Exp II - Transmissão bacteriana: (A) camundongos não imunes, 18 dias em contato com os imunizados; (B) camundongos imunizados e desafiados com <i>B. pertussis</i> . Porcentagem média obtida em dois experimentos independentes.	56
Figura 21 - Exp III - Transmissão bacteriana: (A) camundongos não imunes, 18 dias em contato com os imunizados; (B) camundongos imunizados e desafiados com <i>B. pertussis</i> . Porcentagem média obtida em dois experimentos independentes.	57
Figura 22 - Exp II - Transmissão bacteriana: (A) camundongos não imunes, 19 dias em contato com os imunizados; (B) camundongos imunizados e desafiados com <i>B. parapertussis</i> . Porcentagem média obtida em dois experimentos independentes.	58
Figura 23 - Exp III - Transmissão bacteriana: (A) camundongos não imunes, 18 dias em contato com os imunizados; (B) camundongos imunizados e desafiados com <i>B. parapertussis</i> . Porcentagem média obtida em dois experimentos independentes.	59

LISTA DE SIGLAS

APCs - Vacinas pertussis acelulares

BCG - Bacilo de Calmette e Guérin

BG - meio de cultura Bordet Gengou

Bpp - *B. parapertussis*

BSA - Albumina Sérica Bovina

CBA - do inglês “*Cytometric Beads Array*”

CD11b - receptor, membro da família das integrinas, possui papel na migração e adesão de leucócitos do sangue periférico para o sítio de inflamação

CEUA/IB - Comissão de Ética no Uso de Animais/ Instituto Butantan

DTP - Vacina Tríplice Bacteriana - Difteria, Tétano e Pertussis

DTPa - Vacina Tríplice Bacteriana - Difteria, Tétano com componente pertussis acelular

ELISA - do inglês “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”

FHA -Hemaglutinina filamentosa

Fim - Fimbrias

H₂SO₄ - Ácido Sulfúrico

IFN-γ - Interferon gamma

IgG - Imunoglobulina G

IL-10 - Interleucina dez

IL-12p70 - Interleucina doze p70

IL-17A - Interleucina dezessete A

IL-2 - Interleucina dois

IL-4 - Interleucina quatro

IL-6 - Interleucina seis

LPS - Lipopolissacarídeo

MCP -1 - Proteína quimioatraente de monócitos

MPLA - Monofosforil lipídeo A

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPD - orto – fenilendiamina dicloridrato

PBMC - Células mononucleares de Sangue Periférico

PBS - tampão do inglês “phosphate buffered saline”, pH 7,2

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

Plow - Vacina Pertussis low

PRN - Pertactina

PT - Toxina pertussis

RPMI - meio de cultura de desenvolvido no Roswell Park Institute

SBF - Soro Fetal Bovino

SS - Meio de cultivo Stainer & Scholte

SUS - Sistema Único de Saúde

TCB - Tampão Carbonato Bicarbonato, pH 9,6

TCT - Citotoxina Traqueal

Th1/Th2/Th17 - Resposta auxiliar do tipo 1,2 e 17

TLR-4 - Toll like receptor quatro

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

UFC - Unidade Formadora de Colônia

UO - Unidades opacitométricas

WCPs - Vacinas Pertussis Celulares

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Fatores de Virulência e Patogenicidade	14
1.1.1 <i>Adesinas</i>	14
1.1.1.1 Hemaglutinina Filamentosa (FHA)	15
1.1.1.2 Pertactina (PRN)	15
1.1.1.3 Fator de colonização traqueal	15
1.1.1.4 Fimbrias	15
1.1.2 <i>Toxinas</i>	16
1.1.2.1 Adenilato Ciclase/Hemolisina (CyaA)	16
1.1.2.2 Toxina Dermonecrótica	16
1.1.2.3 Citotoxina Traqueal (TCT)	16
1.1.2.4 Toxina Pertussis (PT)	16
1.2 Doença, manifestações clínicas e sintomas	18
1.3 Diagnóstico	20
1.4 Epidemiologia	21
1.5 Vacinas contra coqueluche	24
1.6 Vacina Pertussis Low	26
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Vacinas e adjuvantes	30
4.2 Esquemas de Imunização e sangria	30
4.3 Avaliação de resposta imune humoral por ensaio imunoenzimático (ELISA)	34
4.3.1 <i>Avaliação de anticorpos anti- pertussis</i>	34
4.3.2 <i>Avaliação de anticorpos anti-parapertussis</i>	35
4.3.3 <i>Avaliação de IgG1 e IgG2a anti-pertussis</i>	35
4.3.4 <i>Avaliação de IgG1 e IgG2a anti-parapertussis</i>	35

4.4 Avaliação de resposta imune celular.....	35
4.4.1 <i>Em Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC).....</i>	<i>35</i>
4.4.2 <i>Em células de sangue total</i>	<i>36</i>
4.4.3 <i>Ensaio de citometria de fluxo</i>	<i>37</i>
4.5 Avaliação de potencialização de resposta inata - Estimulação in vitro de células de sangue total dos animais imunizados e controles com BCG	38
4.6 Avaliação da transmissão bacteriana de camundongos imunizados para não imunes	38
5 Análise estatística dos resultados.....	39
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1 Avaliação de Resposta Imune Humoral	41
6.1.1 <i>Avaliação de IgG total anti-pertussis</i>	<i>41</i>
6.1.2 <i>Avaliação de IgG total anti-parapertussis</i>	<i>43</i>
6.2 Títulos de IgG1 e IgG2a anti-pertussis e anti-parapertussis	43
6.2.1 <i>Avaliação de IgG1 e IgG2a anti-pertussis</i>	<i>44</i>
6.2.2 <i>Avaliação de IgG1 e IgG2a anti-parapertussis</i>	<i>45</i>
6.3 Avaliação de Resposta Imune Celular.....	47
6.4 Potencialização de resposta inata nos animais imunizados.....	53
6.5 Transmissão de B. pertussis e B. parapertussis de camundongos imunizados para não-imunes	55
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS*	64

1 INTRODUÇÃO

Bordetella pertussis e *Bordetella parapertussis* são cocobacilos gram-negativos aeróbios estritos causadores da coqueluche, também conhecida como pertussis ou tosse comprida. São distinguidos através de características bioquímicas e derivados de um único ancestral, a *Bordetella bronchiseptica*, sendo as três espécies pertencentes ao gênero *Bordetella*, do qual fazem parte outras seis espécies: *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. petri*, *B. ansorpii* e *B. trematum*, raramente isoladas em humanos (BJØRNSTAD; HARVILL, 2005; GENTILE, 2010; et al., 2003; VAN DER ARK et al., 2012).

Dentre as espécies desse gênero, tem-se maior interesse pela *Bordetella pertussis*, um patógeno estritamente humano, sem reservatórios, vetores ou transportadores até o momento conhecidos (STEED et al., 1992) e *B. parapertussis*, que possui duas linhagens distintas, uma associada a doenças respiratórias em ovinos (*B. parapertussis*_{OV}) e a segunda, que possui o humano como hospedeiro (*B. parapertussis*_{HU}), sendo que não existem evidências de transmissão entre os dois hospedeiros (VAN DER ZEE et al., 1996). Tanto *B. pertussis* quanto *B. parapertussis* são altamente eficientes em estabelecer a infecção pela via respiratória do trato superior, onde permanecem localizadas (HEGERLE; GUIZO, 2014; MATTOO; CHERRY, 2005).

1.1 Fatores de Virulência e Patogenicidade

Ao longo dos últimos 30 anos, estudos têm demonstrado que a patogenicidade desses microrganismos envolve diversas proteínas, que podem ser divididas em duas famílias principais: adesinas e toxinas (MATTOO; CHERRY, 2005).

1.1.1 Adesinas

As adesinas permitem a adesão da bactéria ao epitélio respiratório e desempenham papel como imunomoduladores (HEGERLE; GUIZO, 2014). Durante o processo de infecção, todas as adesinas são capazes de levar à produção de anticorpos (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2014).

1.1.1.1 Hemaglutinina Filamentosa (FHA)

É uma proteína de aproximadamente 220 kDa (RENAULD-MONGENIE et al., 1996) que se encontra na superfície da bactéria e que também pode ser secretada. É capaz de se ligar a carboidratos, heparina e ao sítio CR3 da integrina. Sua alta capacidade de ligação permite que se fixe a células ciliadas e não ciliadas em humanos e é de extrema importância para o início do processo patogênico do microrganismo (LEININGER et al., 1991).

1.1.1.2 Pertactina (PRN)

Trata-se de uma proteína auto transportadora, de membrana externa, com 69 kDa em *B. pertussis* e 70 kDa em *B. parapertussis* de humanos. Pode atuar em conjunto com a FHA para fixação da bactéria (MATTOO; CHERRY, 2005; MÜLLER; HOPPE; VON KÖNIG, 1997).

1.1.1.3 Fator de colonização traqueal

É uma proteína rica em prolina, de 34 kDa, membro da família de auto transportadores e codificada pelo gene TcfA, expresso somente em *B. pertussis*. Embora não tenha sido elucidado completamente o mecanismo de contribuição desse gene, camundongos desafiados com cepas de *B. pertussis* sem o gene TcfA, tiveram 10 vezes menos bactérias presentes na traqueia quando comparados com os animais desafiados com a cepa selvagem (HENDERSON; NATARO, 2001).

1.1.1.4 Fimbrias

Assim como a maioria das bactérias patogênicas gram-negativas, *Bordetella* expressa fimbrias, proteínas poliméricas da superfície celular envolvidas na adesão dos microrganismos às células epiteliais. *B. pertussis* e *B. parapertussis* expressam principalmente os sorotipos Fim2 e Fim3, sob regulação positiva do BvgAS. Esse sistema é formado por duas proteínas, BvgA e BvgS, que controlam os fatores de virulência de *B. pertussis* e *B. parapertussis* (HEGERLE; GUIO, 2014; MATTOO; CHERRY, 2005; UHL; MILLER, 1996).

1.1.2 Toxinas

As toxinas alteram o sistema imunológico, impedindo o *clearance* do microrganismo no trato respiratório (HEGERLE; GUIZO, 2014).

1.1.2.1 Adenilato Ciclase/Hemolisina (CyaA)

É uma proteína bifuncional, com aproximadamente 130 kDa e apresenta três características importantes: é secretada por bactérias virulentas, ativada pela calmodulina eucariótica (CaM) e pode penetrar em células eucarióticas, onde catalisa a síntese de altos níveis de adenosina 3,5- monofosfato cíclico (AMPc), após ativação pela CaM endógena, alterando a fisiologia da célula. Possui papel importante no estágio inicial de colonização da bactéria no trato respiratório (LADANT; ULLMANN, 1999; MATTOO; CHERRY, 2005).

1.1.2.2 Toxina Dermonecrótica

Essa toxina foi um dos primeiros fatores de virulência descritos em *B. pertussis*. É uma toxina termo lábil, que induz lesões necróticas locais em camundongos quando injetada intradermicamente e letal quando administrada por via intravenosa. É praticamente idêntica em *B. pertussis* e *B. parapertussis* (~99% de homologia dos aminoácidos) (MATTOO; CHERRY, 2005).

1.1.2.3 Citotoxina Traqueal (TCT)

É um tetrapeptídio-dissacarídico, proveniente do peptideoglicano, e embora não se saiba o papel clínico dessa toxina na doença, *in vitro* está envolvida na morte de células epiteliais do trato respiratório por um mecanismo que envolve óxido nítrico e interleucina -1 (HEISS et al., 1993).

1.1.2.4 Toxina Pertussis (PT)

Expressa somente em *B. pertussis*, a PT é uma toxina importante na manifestação dos sintomas da coqueluche, sendo responsável por alterações da proteína G, afetando a transdução de sinal em muitos tipos de células. Como efeito biológico leva à alteração na secreção de insulina, indução de linfocitose, aumento da sensibilidade à histamina e outros mediadores, tanto em humanos como em

animais. Esses efeitos contribuem para a patofisiologia da doença (MATTOO; CHERRY, 2005; PADDOCK et al., 2008).

B. pertussis e *B. parapertussis* compartilham vários fatores de virulência, como FHA, TCT, PRN, toxina dermonecrótica e adenilato ciclase. A PT não é produzida por *B. parapertussis*, uma vez que o gene dessa toxina não é transcricionalmente ativo nessa bactéria (MASTRANTONIO et al., 1999). Por esse motivo, inicialmente acreditava-se que *B. parapertussis*, causasse a doença de forma mais branda e que *B. pertussis* era responsável pelos quadros mais severos da doença (KHELEF et al., 1993). Contudo, foi demonstrado que ambos os microrganismos podem levar tanto a casos mais brandos quanto mais severos da doença, sendo impossível distinguir qual o agente causador somente pelos sintomas clínicos (NOVOTNY; MONACK; FALKOW, 1990).

Sabe-se também que a molécula de LPS em *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* e *B. parapertussis* apresenta características estruturais básicas, como um domínio lipídio A e um oligossacarídeo de cadeia ramificada. Porém, somente *B. bronchiseptica* e *B. parapertussis* possuem um polissacarídeo de cadeia longa, o homopolímero 2,3- didesoxi-2,3-diN- ácido acetilgalactoaminurônico, mais conhecido como antígeno O. Essa diferença estrutural na molécula de LPS entre essas três espécies é suficiente para conferir diferentes propriedades de superfície entre elas (CAROFF et al., 1990; PRESTON et al., 1999). Diferenças na expressão do antígeno O pela *B. parapertussis*, que não está presente em *B. pertussis* e que impede a ligação de anticorpos anti-pertussis na superfície bacteriana, assim como diferenças entre os epítomos protetores para antígenos comuns e a não expressão de PT em *B. parapertussis* podem explicar a falta de proteção cruzada entre as duas espécies conferida por vacinas contra a coqueluche, especialmente as vacinas acelulares (GOEBEL; ZHANG; HARVILL, 2009; MASTRANTONIO et al., 1999). Sabe-se também que, embora a função e regulação de alguns desses fatores tenham sido definidas, isoladamente não são suficientes para gerar proteção contra a coqueluche (CROWCROFT; PEBODY, 2006).

1.2 Doença, manifestações clínicas e sintomas

A coqueluche ou tosse comprida trata-se de uma doença altamente contagiosa, que afeta especificamente o trato respiratório. É particularmente séria em recém-nascidos, mas afeta também adolescentes e adultos, sendo considerada uma das principais causas de morte em crianças com até um ano de vida (NICOLAI et al., 2013; PARKHILL et al., 2003; VAN DER ARK et al., 2012). Além disso, tem sido observada alta taxa de incidência da bactéria em adultos e adolescentes, que atuam como reservatórios, podendo transmitir a doença para grupos de risco, como neonatos e lactantes (VADASZ et al., 2013).

O processo de infecção ocorre através da liberação de perdigotos da pessoa infectada para o indivíduo saudável, e pode ser dividido em quatro passos, cada um deles mediado por diferentes fatores de virulência: 1º) Colonização, por aderência da bactéria ao trato respiratório superior; 2º) Evasão do sistema imune do hospedeiro; 3º) Danos ao tecido do epitélio respiratório e 4º) Manifestações sistêmicas (GOUW et al., 2011; PARTON, 1999; SCHELLEKENS; VON KÖNING; GARDNER, 2005) (Figura 1).

Figura 1 - Processo de infecção de *B. pertussis* e *B. parapertussis*.

Fonte: <http://medicsindex.ning.com/m/blogpost?id=5826870%3ABlogPost%3A123355>

As manifestações clínicas da doença variam de acordo com a idade do indivíduo, a imunização prévia, o estado clínico e o estágio da infecção, sendo o curso clínico dividido em três fases: a) a *fase catarral*, que ocorre após o período de incubação da bactéria é a mais contagiosa, durando em média de 1 a 2 semanas, não apresentando diferença de outro tipo de infecção do trato respiratório superior. É caracterizada por febre baixa, tosse, coriza e tosse progressiva; b) a *fase paroxística*, com duração de 3 a 6 semanas, tem como principais sintomas tosse intensa e espasmódica, muitas vezes com cianose e vômitos após as crises de tosse, sendo os ataques paroxísticos mais frequentes à noite e c) a *fase de convalescença*, com duração de até meses, marcada por diminuição progressiva da tosse (FEDELE; BIANCO; AUSIELLO, 2013; TOZZI et al., 2005; VERSTEEGH, 2005), embora possa persistir por meses (VAN DER ARK, et al., 2012).

Outras complicações também podem ocorrer, como otite média, pneumonia, convulsões e encefalopatia (FEDELE; BIANCO; AUSIELLO, 2013; VERSTEEGH, 2005).

1.3 Diagnóstico

No diagnóstico, são marcadores clássicos da coqueluche o aumento na contagem de linfócitos e leucócitos, associados com os sintomas clínicos típicos e o ensaio microbiológico positivo (FUNG et al., 2004).

Os métodos tradicionais para a identificação de *B. pertussis* são: cultivo de secreção nasofaríngea, testes sorológicos para a avaliação da soroconversão de anticorpos específicos na fase convalescente e PCR, além do diagnóstico clínico (TOZZI et al., 2005; WOOD; McINTYRE, 2008).

Para o cultivo, a coleta das secreções nasofaríngeas é feita por *swab* ou aspiração. Embora seja considerado o diagnóstico padrão ouro, esse método leva vários dias para ser concluído, necessitando de enriquecimento do meio para evitar a proliferação de outros microrganismos do trato respiratório, e embora o valor preditivo dessa técnica seja de 100%, sua sensibilidade é afetada de acordo o estágio da infecção, o uso de antibióticos, a idade do paciente e condições de transporte das amostras (CROWCROFT; PEBODY, 2006; TOZZI et al., 2005).

Os métodos sorológicos consistem na avaliação de anticorpos IgA e IgG contra antígenos específicos para *B. pertussis*, como PT, utilizando ensaios

imunoenzimáticos. O diagnóstico por PCR pode ser uma vantagem, pois permite a identificação do microrganismo mesmo quando ele não é mais cultivável (TOZZI et al., 2005). Apresenta como vantagem ser mais rápido do que o cultivo, possui alta especificidade e sensibilidade, e utilizado em conjunto com a sorologia pode ser uma ferramenta importante também para estudos epidemiológicos. A utilização dessa técnica, entretanto, requer profissionais qualificados e bem treinados a fim de evitar a contaminação de amostras com outros DNAs bacterianos, além de laboratórios apropriados para o seu desenvolvimento (GRIMPREL et al., 1993).

1.4 Epidemiologia

Após a implementação do programa de vacinação infantil com as vacinas pertussis houve significativa redução nos casos de coqueluche (CHERRY, 1996). Embora a vacinação tenha diminuído a circulação de *B. pertussis*, a bactéria tem distribuição universal, e adultos e adolescentes podem contribuir para a transmissão da doença para os grupos de risco (GRIMPREL, et al., 1999; SKOWRONSKI et al., 2002; YIH et al., 2000). Apesar da vacinação contra pertussis, utilizada há mais de 40 anos ser eficaz, evitando cerca de 760.000 mortes por ano no mundo, dados da OMS (2014) atestam que ainda existem 50 milhões de casos da doença com 300.000 mortes por ano, principalmente entre crianças com até um ano de idade. Mesmo em países com alta cobertura vacinal, a coqueluche continua a causar a doença na forma grave e morte entre recém-nascidos e crianças que ainda não completaram a primeira série de vacinação.

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, entre 2010 e 2014 foram notificados 72.901 casos de coqueluche, com 22.426 confirmados (31%), segundo Boletim Epidemiológico Coqueluche, 2015 (Figura 2).

Figura 2 - Coeficiente de incidência de coqueluche e cobertura vacinal com DTP e DTP/Hib. Brasil de 1990 a 2013.

Fonte: Ministério da Saúde, 2014.

Grande parte dos casos de coqueluche ocorreu principalmente na primavera e no verão entre os anos de 2011 e 2013 no país. Em 2014 foi observada alta incidência da doença ao longo do ano todo, com o maior número de casos relatados em crianças com menos de um ano de vida, variando de 487 a 4.574 casos entre 2010 e 2014. Também se observou considerável aumento nos casos de coqueluche em crianças nas faixas etárias de 1 a 9 anos, idade em que deveriam estar imunes. O maior número de óbitos se concentrou na região Sudeste, com o maior percentual no estado de São Paulo (Boletim Epidemiológico Coqueluche, 2015) (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Distribuição de casos de coqueluche por faixa etária, segundo o ano de ocorrência. Brasil de 2010 a 2014.

Fonte: Boletim Epidemiológico, Ministério da Saúde, 2015.

Figura 4 - Óbitos por coqueluche segundo faixa etária. Brasil de 2010 a 2014.

Fonte: Boletim Epidemiológico, Ministério da Saúde, 2015.

Embora não se saiba especificamente a contribuição epidemiológica de *B. pertussis* e *B. parapertussis* para a reemergência da coqueluche, estudos recentes sugeriram que a incidência de *B. parapertussis* é maior do que o relatado, mesmo em países com ampla cobertura vacinal. Porém, como os sintomas da infecção causada por esse patógeno não estão bem definidos, dados baseados na ocorrência dessa bactéria ainda são escassos (HE et al., 1998; RESTIF et al., 2008).

Foi observado em populações com alta cobertura vacinal em países da Europa e Estados Unidos, casos de coqueluche causados por *B. parapertussis* sem serem notadas diferenças na frequência dos sintomas causados por *B. pertussis* e *B. parapertussis* (HE et al., 1998; KOEPKE et al., 2015). Da mesma forma, em um pequeno surto de coqueluche ocorrido no Paquistão entre 2009 - 2010, as culturas positivas isoladas de pacientes sintomáticos foram todas de *B. parapertussis* (JAVED et al., 2015).

Tem sido notado aumento nos casos de coqueluche causados por *B. parapertussis* em países com ampla cobertura vacinal com as vacinas acelulares, enquanto que a proteção gerada pelas vacinas celulares não está bem definida. Embora não se saiba exatamente a contribuição epidemiológica dessa bactéria na infecção pertússica, tem sido observado relativo aumento de infecções por esse patógeno, em contraste com certa diminuição de infecções por *B. pertussis* devido à vacinação (LIESE et al., 2003), o que justifica a busca por vacinas que levem à proteção contra *B. parapertussis*.

1.5 Vacinas contra coqueluche

As primeiras tentativas de desenvolvimento de uma vacina contra *B. pertussis* ocorreram de forma totalmente empírica, após o cultivo dessa bactéria em laboratório por Jules Bordet e Octave Gengou do Instituto Pasteur em Bruxelas, em 1906 (BORDET et al., 1906), cujos nomes foram dados ao meio de cultivo desse patógeno, meio *Bordet Gengou* (BG).

A primeira vacina contra pertussis efetiva foi desenvolvida na década de 1930 por Pearl Kendrick e Grace Eldering a partir de bactérias inteiras inativadas por mertiolato ou fenol (KENDRICK; ELDERING, 1939), as vacinas pertussis celulares (WCPs). As WCPs se mostraram bastante eficazes e posteriormente foram combinadas com os toxóides diftérico e tetânico para a formulação da vacina tríplice

bacteriana (DTP). A introdução dessas vacinas no final da década de 1940 reduziu grandemente a incidência da doença (MATTOO; CHERRY, 2005). Atualmente, a vacina é utilizada em combinação pentavalente (Difteria, Tétano, Pertussis, Hepatite B + *Haemophilus influenzae* tipo b), no Brasil implementada ao Calendário Básico de Vacinação pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em 2012 (INFORME TÉCNICO DA INTRODUÇÃO DA VACINA PENTAVALENTE, 2012).

Embora eficazes, as WCPs foram associadas a efeitos colaterais indesejáveis (BARAFF; ABLON; WEISS, 1983; MATTOO; CHERRY, 2005), o que levou ao desenvolvimento, no final da década de 1980, das vacinas pertussis acelulares (APVs) (AOYAMA et al., 1985; SATO; SATO, 1999). Essas vacinas consistem da combinação de um ou mais antígenos de *B. pertussis*, dentre eles PT, PRN, FHA e Fim 2 e 3 (LAMBERT, 2014; ZHANG, RODRÍGUEZ; HARVILL, 2009). Uma vez que não contêm LPS ou apenas pequenas quantidades (MATTOO; CHERRY, 2005), essas preparações são menos reatogênicas, mas apesar de protetoras são caras, o que as torna inviáveis para países em desenvolvimento, razão pela qual têm sido adotadas, há mais de duas décadas, somente em países desenvolvidos. Além disso, também existe controvérsia entre os diferentes autores, sobre a efetividade protetora das APVs, que se mostraram protetoras contra as formas mais severas da coqueluche, porém menos efetivas contra infecções associadas com formas mais brandas (CROWCROFT et al., 2003; MATTOO; CHERRY, 2005). Tais fatos colocaram em discussão se a imunidade induzida pelas APVs é a mais efetiva na proteção dos indivíduos vacinados e na prevenção da disseminação da doença (HIGGS et al., 2012).

Tanto as WCPs quanto as APVs são capazes de induzir altos níveis de anticorpos protetores contra importantes fatores de virulência da bactéria, mas trabalhos bem conduzidos atestam que as WCPs ativam resposta Th1 mais efetiva, importante no controle e *clearance* da infecção por *B. pertussis* (BARBIC et al., 1997; RYAN et al., 1998). Por outro lado, as APVs induzem predominantemente resposta Th2, que embora efetiva na proteção do indivíduo vacinado, pode não conter a disseminação da bactéria, o que pode explicar a coincidente reincidência da doença, mesmo em países com alta taxa de cobertura vacinal (ALLEN, 2013; HIGGS et al., 2012; RYAN et al., 1998).

1.6 Vacina Pertussis Low

Os efeitos indesejáveis causadas pelas WCPs foram associados com a presença da endotoxina de pertussis na vacina (GEIER; STANBRO; MERRIL, 1978). Considerando que as vacinas pertussis celulares detoxificadas com formaldeído possuem em média 400 µg/ dose de LPS e que este é um dos fatores que contribuem para sua toxicidade, o Instituto Butantan (IB) desenvolveu um processo que remove até 95% da endotoxicidade do LPS da bactéria sem alterar sua morfologia (DIAS et al., 2012; HIGASHI et al., 2009; QUINTILIO et al., 2009) (Figura 5) gerando uma vacina pertussis celular com menor teor de LPS, a Plow (DIAS et al., 2012; RAW et al., 2006). No mesmo processo de produção da Plow, após hidrólise ácida do LPS, é gerado um subproduto, o monofosforil lipídeo A de *B. pertussis* (MPL-A), que vem sendo avaliado como adjuvante em outras vacinas produzidas pelo Instituto (Figura 6) (DIAS et al., 2007; QUINTILIO et al., 2009).

Comparativamente à vacina pertussis tradicional, a Plow foi avaliada em relação à imunogenicidade, segurança e potência e se mostrou tão eficaz quanto a vacina tradicional na indução de anticorpos contra células de *B. pertussis* ou componentes antigênicos da bactéria, como PT, FHA e PRN e na resposta celular contra *B. pertussis*, porém menos reatogênica. A extração com solvente orgânico resultou na perda de aproximadamente 20% de LPS e até 95% da sua toxicidade sem alterar a potência e estabilidade da Plow (DIAS et al., 2012). Avaliada em ensaio de campo em recém-nascidos, apresentou resultados similares ao da vacina celular tradicional (ZORZETO et al., 2009).

Figura 5 - Microscopia eletrônica de vacina celular de pertussis antes do tratamento com solvente orgânico (wP) (A) e após tratamento com solvente orgânico (Plow) (B).

Fonte: Dias et al., 2012.

Figura 6 - Esquema do processo de produção da Vacina Pertussis com menor teor de LPS e do adjuvante MPL-A.

Fonte: Prestes, 2008.

Estudos preliminares em nosso laboratório mostraram que a vacina Plow também é capaz de proteger contra *B. parapertussis*, em ensaios de imunização e desafio em modelo murino (dados não publicados), sugerindo papel importante no controle desse patógeno, que não tem sido atingido por vacinação com vacinas pertussis acelulares (DAVID; FURTH; MOOI, 2004; KHELEF et al., 1993; LIESE et al., 2003; STEHR et al., 1998; WILLEMS et al., 1998).

Ainda nesse contexto, estudos também demonstraram que a produção da Plow não influencia no custo da vacina tradicional, o que torna seu uso viável em países em desenvolvimento, como o Brasil (HIGASHI et al., 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando os dados epidemiológicos atuais que atestam para a necessidade premente de propostas vacinais alternativas e que sejam eficazes não somente no controle da infecção, mas também da transmissão de *B. pertussis* e *B. parapertussis*, faz-se importante a avaliação da eficácia da vacina Plow na infecção contra esses dois microrganismos, como uma alternativa economicamente viável para países em desenvolvimento.

3 OBJETIVO

Avaliar em modelo murino, o efeito da imunização com Plow na resposta humoral, celular e inata, contra infecção e transmissão de *B. pertussis* e *B. parapertussis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Vacinas e adjuvantes

- **Vacina Pertussis Low (Plow)** – Lote N° IB-VPL 03/06 – Lote experimental produzido pelo IB - Uso: 5,6 unidades opacimétricas (UO)/ dose.
- **Vacina Pertussis Celular (WCP)** – Lote N°: IB-VP/PAG17/07 – Vacina pertussis tradicional, produzida pelo IB - Uso: 5,6 (UO)/ dose.
- **Pertacel** - Vacina tríplice bacteriana comercial com componente pertussis acelular (difteria, tétano e pertussis acelular), para uso pediátrico – toxóide pertussis – PT – 10 µg; pertactina - PRN - 3 µg; Hemaglutinina filamentosa - FHA - 5 µg; Fímbrias - Fim 2 e 3 – 5 µg; toxóide diftérico - ≥ 30 UI; toxóide tetânico - ≥ 40 UI. Lote: C4388AS - Uso $\frac{1}{2}$ dose humana.
- **Adacel** - Vacina tríplice bacteriana comercial com componente pertussis acelular (difteria, tétano e pertussis acelular) para uso adulto e pediátrico - toxóide pertussis – PT - 2,5 µg; pertactina - PRN - 3 µg; Hemaglutinina filamentosa - FHA - 5 µg; Fímbrias - Fim 2 e 5 -µg; toxóide diftérico - ≥ 2 UI; toxóide tetânico - ≥ 20 UI. Lote: C4771AC - Uso $\frac{1}{2}$ dose humana.
- **Monofosforil lipídeo A de *Bordetella pertussis* (MPL-A)** - Lote experimental produzido pelo IB – Uso: 20 µg/ dose.
- **Hidróxido de Alumínio (Al)** – Uso: 0.625 mg/ dose.

4.2 Esquemas de Imunização e sangria

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais do Instituto Butantan (CEUAIB) - N° 1305/14.

Grupos de camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 ou Balb/c, entre 6 - 8 semanas de idade, com 18 - 22 gramas, foram imunizados com diferentes formulações vacinais por via subcutânea (200 µl/ dose), em grupos com 7 ou 12 camundongos. As vacinas pertussis WCP e Plow foram utilizadas na concentração de 5,6 Unidades Opacimétricas (UO)/ ml, que corresponde a 1/5 da dose humana preconizada pela OMS para imunização com vacinas pertussis celulares (dose humana: 28 UO/ml). As vacinas Pertacel e Adacel foram utilizadas com $\frac{1}{2}$ dose

humana. Os adjuvantes utilizados foram MPL-A de *B. pertussis* (20 µg/dose) ou Al (0,625 mg/dose). Foram administradas duas doses, com intervalo quinzenal. Quinze dias após a segunda imunização foi feita a sangria por punção retro orbital.

Foram realizados três experimentos (Exp I a III).

Exp I – Resposta Imune Humoral, Celular e Inata

Foram utilizados camundongos C57BL/6 e administradas duas doses das diferentes formulações vacinais, com quinze dias de intervalo (Figura 7). Quinze dias após a segunda imunização, os animais foram sangrados e os soros avaliados individualmente para IgG, IgG1 e IgG2a contra células de *B. pertussis* e *B. paraptussis* (item 4.3).

A avaliação de resposta imune celular (item 4.4) em células mononucleares de sangue periférico foi feita 54 dias após a última imunização e em células de sangue total, 83 dias após a última imunização. A avaliação de potencialização de resposta inata (item 4.5) foi feita 90 dias após a última imunização (Figura 7).

Figura 7 - Exp I. Esquema de imunização e sangria.

Grupos

1. PBS
2. Vacina Pertussis Low (Plow)
3. Plow + Monofosforil Lipídeo A de *B. pertussis* (Plow + MPL-A)
4. Plow + Hidróxido de alumínio (Plow + Al)
5. Vacina Pertussis Tradicional (WCP)
6. MPL-A

Exp II – Resposta Imune Humoral e Celular Transmissão Bacteriana

Foram utilizados camundongos C57BL/6, sob o mesmo protocolo de imunização descrito no Exp I, e como adjuvante somente o Al. Quinze dias após a segunda imunização, os animais foram sangrados, e os soros avaliados individualmente para IgG, IgG1 e IgG2a contra células de *B. pertussis* e *B. paraptussis*. A avaliação de resposta imune celular foi feita em células de sangue total, 30 dias após a última imunização (Figura 8).

Noventa dias após a última imunização foi feito o ensaio de avaliação de transmissão bacteriana (item 4.6) (Figura 8).

Figura 8 - Exp II. Esquema de imunização e sangria

Grupos

1. PBS
2. Plow + Hidróxido de alumínio (Plow + Al)
3. Vacina Pertussis Tradicional + Hidróxido de alumínio (WCP+ Al)
4. Pertacel

Exp III – Transmissão Bacteriana

Foram utilizados camundongos C57BL/6, sob o mesmo protocolo de imunização descrito no Exp I, e Al como adjuvante (Figura 9).

Quinze dias após a segunda imunização, os animais foram sangrados, e os soros avaliados individualmente para IgG, contra células de *B. pertussis* e *B. parapertussis*.

Trinta dias após a última imunização foi feito o ensaio de avaliação de transmissão bacteriana (item 4.6) (Figura 9).

Figura 9 - Exp III. Esquema de imunização e sangria.

Grupos

1. PBS
2. Plow + Hidróxido de alumínio (Plow + Al)
3. Vacina Pertussis Tradicional + Hidróxido de alumínio (WCP+ Al)
4. Adacel

4.3 Avaliação de resposta imune humoral por ensaio imunoenzimático (ELISA)

O sangue coletado dos animais imunizados e controles foi mantido em estufa a 37 °C por 30 minutos e em seguida centrifugado por 15 minutos, 5000 xg a 4 °C, para obtenção do soro, armazenado a - 20 °C até o uso. Posteriormente foi feita a análise de IgG, IgG1 e IgG2a anti-pertussis e anti-parapertussis, por ensaio imunoenzimático (ELISA).

4.3.1 Avaliação de anticorpos anti- pertussis

Foram utilizadas placas de 96 poços (Costar®). O *coating* foi feito com Vacina Pertussis Tradicional (WCP) (1 UO/ ml) ou Toxina Pertussis (PT) (Sigma 2 µg/ ml) em tampão carbonato bicarbonato (Carbonato de sódio 0,05 M, bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6 -TCB), incubando-se a 4 °C, *overnight*. No dia seguinte, as placas foram colocadas em estufa a 37 °C por 30 minutos e em seguida lavadas 3 vezes com PBS/ Tween 20 0,1%. O bloqueio foi feito com Leite desnatado Molico® 10% em água destilada, seguido de incubação por 1 hora a 37 °C e nova etapa de lavagem. Os soros foram adicionados em diluição seriada de base 1: 2 em PBS/BSA 1% (NaCl 1,37 Mm, KCL 2,7 mM, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ 1,5 mM, BSA 1%, pH 7,2) seguido de incubação por 2 horas a 37 °C. Após nova lavagem, foi adicionado o conjugado anti mouse IgG peroxidase produzido em cabra (Sigma) (1: 5000 em PBS/BSA 1%). As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C e após nova lavagem foi adicionado o substrato (orto – fenilendiamina dicloridrato (OPD) 20 mg em 40 ml de tampão fosfato citrato pH 5,0 (citrato de sódio 0,1 M, fosfato de sódio monobásico 0,2 M) e 20 µl H₂O₂ (50 µl/ poço). As placas foram mantidas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 10 minutos, quando então a reação foi parada com 30 µl de H₂SO₄ 4 M.

Foi realizada a leitura a 492 nm, em leitora de ELISA modelo Labsystems Uniscience MultiScan EX.

4.3.2 Avaliação de anticorpos anti-parapertussis

Seguindo-se o mesmo protocolo descrito no item 4.3.1, o *coating* foi feito com *Bordetella parapertussis* inativada com formaldeído 2% (10^{10} UFC/ ml), diluída em TCB e os soros testes adicionados em diluição seriada de base 1:2. As placas foram mantidas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 20 minutos, e a reação foi parada com 30 μ l de H_2SO_4 4 M. A leitura foi realizada em leitora de ELISA (Multiscan EX – Uniscience) a 492 nm.

4.3.3 Avaliação de IgG1 e IgG2a anti-pertussis

Para a avaliação dos subtipos IgG1 e IgG2a foi seguido o mesmo protocolo descrito no item 4.3.1, exceto que após a etapa de adição dos soros testes, foi adicionado anticorpo anti-mouse IgG1 ou IgG2a produzido em cabra (Sigma), diluído 1: 500 em tampão PBS/BSA 1%, por 1 hora a 37 °C, seguido de lavagem e adição do conjugado anti-IgG total de cabra/peroxidase (1:5000 em PBS/BSA 1%).

4.3.4 Avaliação de IgG1 e IgG2a anti-parapertussis

Foi realizada a mesma metodologia descrita no item 4.3.1 para avaliação de IgG1 e IgG2a anti-parapertussis. O *coating* foi feito com *B.parapertussis* (10^{10} UFC/ ml) inativada, diluída em tampão TCB.

4.4 Avaliação de resposta imune celular

4.4.1 Em Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)

Para avaliação da resposta imune celular dos animais imunizados e controles em PBMC, foi feito um *pool* do sangue dos camundongos de cada grupo, coletados 54 dias após a última imunização e transferidos para tubos de heparina (BD Vacutainer®). As amostras de sangue foram diluídas em PBS estéril apirogênico, volume/ volume. Foram adicionados 2 ml de Ficoll- Paque em tubo Falcon de 15 ml. Em seguida, foram colocados cuidadosamente 2 ml do sangue diluído com PBS sobre o Ficoll-Paque, evitando que o sangue se misturasse ao Ficoll. As amostras

foram centrifugadas a 400 xg durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anel opaco formado na interface entre o Ficoll e o plasma, onde as PBMCs se concentram, foi cuidadosamente coletado com pipeta estéril e transferido para novo tubo Falcon de 15 ml estéril com PBS à temperatura ambiente, centrifugando-se a 800 xg durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as PBMCs foram ressuspensas em 2 ml de RPMI incompleto + polimixina B (10 mg/ml) + gentamicina (50 mg/ml) + soro fetal bovino (10% estéril) (RPMI completo) e contadas em câmara Neubauer com Trypan blue, 1:20.

As PBMCs foram colocadas em placas de cultura de células de 24 poços Corning (2×10^6 células/ ml). Os estímulos foram diluídos em 500 µl de meio RPMI completo e adicionados nos respectivos poços. Foram utilizados como estímulos: Plow (10^5 ou 10^6 células/ml); WCP (10^5 ou 10^6 células/ ml), MPL-A (5 µg/ ml), *B. paraptussis* inativada (Bpp) (10^5 ou 10^6 células/ ml). Foi utilizado meio de cultura como controle negativo e Concanavalina A (ConA – 10 µg/ ml) como estímulo inespecífico da mitose celular. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37 °C. Foram feitas coletas de sobrenadantes de cultivo após 8 e 24 horas. Para a coleta, as placas foram centrifugadas a 2000 xg por 20 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram armazenados e mantidos a - 20 °C até o uso.

A avaliação da produção de citocinas (TNF- α, INF-γ e IL-4) foi feita por kits Elisa para citocinas da BD Bioscience.

4.4.2 Em células de sangue total

Noventa dias após a última imunização foi feita a coleta do sangue dos animais dos grupos teste e controles por punção retro orbital, em *pool* de 2 ml, para cada grupo e colocados em tubos de heparina (BD Vacutainer®).

Foram colocados 125 µl de sangue em criotubos estéreis contendo 125 µl dos estímulos previamente preparados (Plow - 10^6 células/ poço; WCP - 10^6 células/ poço; *B. paraptussis* inativada - 10^6 células/ poço; ConA -10 µg/ como controle positivo e meio de cultivo para controle sem estímulo) e 250 µl de meio RPMI completo.

Os tubos foram homogeneizados suavemente e armazenados em estufa de CO₂ 5% a 37 °C até a coleta, realizada com 48 horas, 72 horas e 6 dias de cultivo.

No momento da coleta foram adicionados 50 µl de Triton X-100 a 5%, e as preparações foram agitadas em *vórtex* para lise das células. As amostras foram então armazenadas a - 80 °C até o uso.

No dia da análise, as amostras foram descongeladas a 4 °C e centrifugadas a 4000 xg, 4 °C por 7 minutos. A análise de citocinas foi feita a partir do sobrenadante coletado, por kits CBA (Cytometric Bead Array) Th1/Th2/Th17 contendo as citocinas IL-2, TNF-α, IL-4, IL-6, IFN-γ, IL-17A e IL-6. A leitura foi realizada por citometria de fluxo (Fluorescence Activated Cell Strong-FACs), de acordo com especificações do fabricante.

4.4.3 Ensaio de citometria de fluxo

Para análise por citometria de fluxo, foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo cônico (Costar®), tendo sido adicionados nos respectivos poços, 25 µL da mistura das *beads* presentes no Kit, e em seguida 6,5 µl de amostra em 18,5 µl de tampão diluente (diluição 1: 4) e 25 µl do reagente de detecção, PE. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão das *beads*. As microplacas foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e após esse período centrifugadas a 200 xg, 4 °C, por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspensos em 200 µl de tampão diluente e transferidos para tubos cônicos de poliestireno apropriados para leitura por FACS. Os resultados foram obtidos em gráficos e tabelas utilizando-se o *software CellQuest* (BD) e a quantidade de citocinas foi expressa em pg/ ml.

4.5 Avaliação de potencialização de resposta inata - Estimulação in vitro de células de sangue total dos animais imunizados e controles com BCG

Foi realizado o mesmo protocolo do item 4.4.2, utilizando-se como estímulo vacina BCG (cepa Moreau) (10^3 ou 10^5 células/poço), ConA (10 µg/ poço) como estímulo mitogênico inespecífico e meio de cultivo como controle negativo. Os sobrenadantes foram coletados após 24 e 48 horas de cultivo, e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.

As amostras foram analisadas por kit CBA (Cytometric Bead Array) Inflamatório contendo as citocinas IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α e IL-12p70 e a leitura realizada por citometria de fluxo (*Fluorescence Activated Cell Strong-FACs*).

4.6 Avaliação da transmissão bacteriana de camundongos imunizados para não imunes

Para avaliar se a vacina Plow é capaz de impedir a transmissão de *B. pertussis* e *B. parapertussis* dos animais imunizados para os não imunes, 90 dias (Exp II) ou 30 dias (Exp III) após a última imunização, um camundongo de cada grupo teste e do controle foi desafiado por via nasal com 20 µl de *B. pertussis* 18323 ou *B. parapertussis* 15311 (10^6 UFC/ml) e colocado em contato com três camundongos não imunizados. Durante 18 ou 19 dias, respectivamente para pertussis e parapertussis, em dias alternados, foi avaliada a existência da bactéria nas fossas nasais dos camundongos imunes e não imunes. Para isso, um *swab* foi passado por 20 - 30 segundos nas narinas desses animais e a seguir mergulhado em tubo falcon contendo 1 ml de meio Stainer & Scholte (SS) para posterior cultivo em placas de BG com 200 µl de cefalexina (10 mg/ml). As placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante dois dias para *B. parapertussis* e sete dias para *B. pertussis*. A identidade das bactérias isoladas foi confirmada por características morfológicas das colônias, tempo de crescimento, teste de Gram e teste de oxidase. Após 21 dias, todos os animais foram sacrificados e a transmissão bacteriana confirmada em lavado nasotraqueal. Os experimentos foram feitos em duplicata.

5 Análise estatística dos resultados

Para análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney para comparação entre dois grupos e o teste não paramétrico ANOVA, com Teste de Dunnett's, em que é feita a comparação de médias de dois grupos diferentes. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incidência da coqueluche, uma doença severa com alto índice de mortalidade principalmente em crianças no primeiro ano de vida, teve acentuado declínio após a introdução das vacinas pertussis celulares, no final dos anos 1940 (MATTOO; CHERRY, 2005). Efeitos colaterais correlacionados à vacina pertussis celular levaram à gradativa substituição dessas vacinas pelas acelulares, à partir da década de 1980 (CHERRY, 2013). As vacinas pertussis acelulares, embora menos reatogênicas, têm custo mais elevado, razão pela qual são rotineiramente utilizadas por países desenvolvidos. Entretanto, nas últimas décadas tem sido reportado aumento substancial da incidência da doença, mesmo em países com elevada taxa de cobertura vacinal (CROWCROFT, et al., 2003; DE GREEFF et al., 2010; GURIS et al., 1999; HELLENBRAND et al., 2009; QUINN; MCINTYRE, 2007).

Após mais de 50 anos de ampla utilização da vacinação contra pertussis, várias incógnitas ainda persistem quanto aos mecanismos de imunidade conferida por essas vacinas, que em última análise estão inter-relacionados aos mecanismos epidemiológicos que controlam a circulação das bactérias envolvidas na patogênese da doença. Embora a vacinação contra pertussis proteja a maioria dos indivíduos quanto aos aspectos mais severos, as vacinas atuais não são capazes de conduzir eficazmente aos benefícios da imunidade de rebanho, ao impedir a transmissão da bactéria dos indivíduos vacinados para os suscetíveis (ROLIN et al., 2014; SMALLRIDGE et al., 2014;). Dados da OMS atestam que, independentemente do índice de cobertura vacinal, a incidência de infecção por *B. pertussis* em crianças é de quase 100%, até os quinze anos de idade (LAVINE; KING; BJØRNSTAD, 2011).

A existência de vacinas que previnam a transmissão da *B. pertussis*, mas também da *B. parapertussis*, um patógeno intimamente relacionado, teria aplicações epidemiológicas importantes, não apenas na proteção de indivíduos suscetíveis, mas na diminuição da carga bacteriana em circulação, com evidentes efeitos globais no controle da coqueluche.

Há mais de duas décadas são reportados aspectos conflitantes relativos à resposta imune induzida por vacinas DTP. Em modelo animal, a vacinação com vacinas pertussis celulares, do mesmo modo que uma infecção prévia leva a um “*clearence*” bacteriano mais rápido do que a primo infecção ou imunização com vacinas pertussis acelulares (WARFEL; ZIMMERMANN; MERKEL, 2014). Enquanto

ambas as vacinas levam a robusta resposta de anticorpos, diferenças importantes na resposta celular de memória sugerem que as vacinas pertussis acelulares induzem resposta imune sub-ótima, incapaz de prevenir a infecção, o que pode ser uma explicação plausível para a ressurgência de pertussis, o que ressalta a importância do desenvolvimento de novas estratégias vacinais capazes de prevenir a colonização e a transmissão da bactéria (WARFEL; ZIMMERMANN; MERKEL, 2014).

Neste trabalho descrevemos aspectos relacionados à resposta imune conferida por uma nova vacina pertussis celular em desenvolvimento no Instituto Butantan, com baixo teor de LOS, a vacina Plow (DIAS et al., 2007.), comparativamente à vacina tradicional produzida pelo Instituto (WCP) e a vacinas acelulares comerciais, a Adacel ou a Pertacel. A Plow já foi avaliada quanto à imunogenicidade e efeito protetor em modelo animal, em nosso laboratório (DIAS et al., 2012) e em ensaio de campo de Fase I em recém nascidos (ZORZETO et al., 2009).

No atual estudo procuramos consolidar essas informações, em modelo animal, correlacionando a resposta imune à transmissibilidade da *B. pertussis* e da *B. parapertussis* do animal vacinado para o não imunizado.

6.1 Avaliação de Resposta Imune Humoral

6.1.1 Avaliação de IgG total anti-pertussis

As vacinas Plow e WCP, sem adjuvantes, levaram a títulos similares de IgG contra células de *B. pertussis*, mas a Plow sozinha ou formulada com MPL-A, induziu títulos significativamente mais elevados do que a WCP + Al. A vacina acelar Pertacel não foi capaz de induzir títulos detectáveis de IgG contra células de *B. pertussis*. (Figura 10), mas induziu anticorpos IgG anti-PT (Figura 11).

Figura 10 - Títulos médios de IgG total anti-pertussis, obtidos em dois experimentos independentes, 15 dias após o esquema de imunização. Todos os grupos testes apresentaram títulos significativamente maiores do que os dos controles ($p < 0,05$). (*) $p = 0,002$.

Figura 11 - Títulos de IgG anti-PT 15 dias após o esquema de imunização. O grupo imunizado com Pertacel apresentou títulos significativamente maiores em relação aos do controle PBS. (*) $p < 0,0001$.

6.1.2 Avaliação de IgG total anti-parapertussis

Tanto a Plow quanto a WCP induziram títulos semelhantes de IgG anti-parapertussis quando utilizadas sem adjuvantes. Entretanto, a vacina Plow formulada com hidróxido de alumínio levou a títulos de IgG anti-parapertussis significativamente maiores do que os induzidos pela WCP ou WCP+AI (Figura 12). A vacina Pertacel induziu títulos meramente detectáveis de IgG contra células de *B. parapertussis* (título médio 50), significativos em relação aos controles (PBS e MPL-A), mas significativamente inferiores aos induzidos pelas vacinas celulares (Figura 12).

Figura 12 - Títulos médios de IgG total anti-parapertussis, obtidos em dois experimentos independentes, 15 dias após o esquema de imunização. Todos os grupos teste apresentaram títulos significativamente maiores do que os dos controles ($p < 0,05$).

(*) $p = 0,004$; (**) $p = 0,005$; *** $p < 0,0001$ em relação aos demais grupos teste.

6.2 Títulos de IgG1 e IgG2a anti-pertussis e anti-parapertussis

Numa inferência de resposta imune do perfil Th1/IgG2a e Th2/IgG1 (HUBER et al, 2006), foram avaliadas as subclasses de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-pertussis e anti-parapertussis, nos grupos testes e controles.

6.2.1 Avaliação de IgG1 e IgG2a anti-pertussis

Não houve diferença significativa nos títulos de IgG1 anti-pertussis entre as vacinas Plow e WCP, quando utilizadas com ou sem adjuvantes. Dos doze animais imunizados com a vacina Pertacel, três apresentaram títulos detectáveis de IgG1 contra células de *B. pertussis* (título médio 50), significativos em relação aos controles (PBS e MPL-A), mas significativamente inferiores aos induzidos pelas vacinas celulares (Figura 13).

A formulação da Plow com hidróxido de alumínio não elevou os níveis de IgG2a anti-pertussis, mas a WCP induziu títulos mais elevados, quando utilizada com adjuvante (Figura 14). Quando comparadas em formulação com hidróxido de alumínio, as duas vacinas foram semelhantes na indução de IgG2a anti-pertussis. Dos doze animais imunizados com a vacina Pertacel, apenas um respondeu com título detectável de IgG2a contra células de *B. pertussis* (título igual a 50) (Figura 14).

Quando os títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-pertussis foram comparados grupo a grupo, não houve diferença significativa, sugerindo resposta balanceada Th1/Th2 induzida pela Plow e WCP (dados não mostrados).

Figura 13 - Títulos médios de IgG1 anti-pertussis, obtidos em dois experimentos independentes, 15 dias após o esquema de imunização. Todos os grupos testes apresentaram títulos significativamente maiores do que os dos controles ($p < 0,05$), mas foram semelhantes entre si. (*) $p < 0,0001$ em relação a Plow+Al.

Figura 14 - Títulos médios de IgG2a anti-pertussis, obtidos em dois experimentos independentes, 15 dias após o esquema de imunização. Todos os grupos testes apresentaram títulos significativamente maiores do que os dos controles ($p < 0,05$). (*) $p = 0,02$; (**) $p = 0,004$.

6.2.2 Avaliação de IgG1 e IgG2a anti-parapertussis

Os títulos de anticorpos IgG1 anti-parapertussis foram sensivelmente menores do que os obtidos contra pertussis. A Plow, com ou sem adjuvantes (AI ou MPL-A), levou a resposta de IgG1 anti-parapertussis mais robusta do que a vacina tradicional.

Dos doze animais imunizados com a Pertacel, apenas um respondeu com título detectável de IgG1 contra células de *B. parapertussis* (título igual a 200) (Figura 15).

Não foi obtida diferença significativa nos títulos de IgG2a anti-parapertussis induzidos pela Plow ou WCP e a adição de adjuvantes (AI ou MPL-A) à Plow também não elevou significativamente esses títulos (Figura 16). Os títulos obtidos com os grupos teste foram significativos em relação aos dos grupos controle.

Figura 15 - Títulos médios de IgG1 anti-paraptussis, obtidos em dois experimentos independentes, 15 dias após o esquema de imunização. (*) $p < 0,05$. Todos os grupos testes apresentaram títulos significativamente maiores do que os dos controles ($p < 0,05$).

Figura 16 - Títulos médios de IgG2a anti-paraptussis, obtidos 15 dias após o esquema de imunização. Todos os grupos testes apresentaram títulos significativamente maiores do que os dos controles ($p < 0,05$).

Como esperado, as vacinas celulares (Plow e WCP) induziram resposta robusta de anticorpos séricos contra células de *B. pertussis*, independentemente de sua formulação com ou sem adjuvantes, levando à resposta balanceada, quando avaliado pelos isotipos IgG2a/IgG1, respectivamente como marcadores de resposta Th1 e Th2.

Plow e WCP induziram títulos semelhantes anti-parapertussis, quando utilizadas sem adjuvantes, mas quando comparadas em formulação com hidróxido de alumínio, a Plow induziu títulos de IgG e IgG1 anti-parapertussis significativamente mais elevados do que os induzidos pela WCP. A adição de adjuvantes à Plow não elevou significativamente os títulos séricos de IgG anti-parapertussis. Não foi obtida diferença significativa nos títulos de IgG2a anti-parapertussis induzidos pela Plow ou WCP.

Embora a vacina Pertacel se mostrasse efetiva na indução de resposta humoral anti-PT, apenas alguns animais imunizados apresentaram títulos de anticorpos séricos contra células de *B. pertussis* ou *B. parapertussis*, sempre significativamente inferiores aos induzidos pelas vacinas celulares.

Em trabalho anterior realizado por nosso grupo, demonstramos que a imunidade humoral veiculada pela vacina Plow é capaz de reconhecer antígenos importantes da *B. pertussis*, notadamente PT, FHA e pertactina (DIAS et al., 2012).

No projeto atual, as duas vacinas celulares foram capazes de montar resposta humoral contra pertussis e parapertussis com títulos elevados, a níveis que possivelmente camuflaram a influência da ação dos adjuvantes. Por outro lado, a vacina pertussis acelular comercial Pertacel, formulada com PT, FHA, Pertactina e antígenos fimbriais, não foi capaz de suscitar resposta de anticorpos capaz de reconhecer antígenos de superfície da bactéria.

6.3 Avaliação de Resposta Imune Celular

As vacinas pertussis celulares e acelulares são capazes de gerar eficientemente resposta humoral com altos títulos de anticorpos, reconhecendo componentes bacterianos presentes na composição vacinal (SMALLRIDGE et al., 2014). Entretanto, somente as vacinas de células inteiras são capazes de ativar eficientemente a resposta Th1, importante no controle da infecção pertussis (BARBIC et al., 1997; RYAN et al., 1998).

Estudos clínicos de *cohort* na Austrália durante a transição da vacinação celular para acelular atestaram que uma dose inicial de vacina pertussis celular tem efeito significativo na redução da incidência da doença, comparativamente a grupos que receberam todas as doses com vacinas acelulares (SHERIDAN et al., 2012), sugerindo que as vacinas celulares melhoram o *priming* e alongam a imunidade, o que em última análise afeta a incidência da doença (SMALLRIDGE et al., 2014).

Em ensaio de campo da Plow em recém-nascidos, nosso grupo observou, em PBMC dos grupos imunizados com a vacina tríplice bacteriana usando a Plow (DTPlow) ou a WCP (DTP), a proliferação *in vitro* de linfócitos T específicos para *B. pertussis* e produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10, após estimulação com a bactéria inativada, um mês após a terceira dose da vacina (ZORZETO et al., 2009).

Neste trabalho avaliamos a resposta imune celular induzida pelas vacinas Plow, WCP e Pertacel, em células de sangue total dos animais imunizados e controles, após estimulação *in vitro* com Plow, WCP ou células inativadas de *B. paraptussis* (Bpp). Possíveis diferenças estimulatórias nessas preparações celulares de *Bordetella* poderiam ser evidenciadas pela produção de diferentes citocinas pelas células dos animais imunizados com as vacinas.

Em um primeiro experimento (Exp I - Figura 17), após estímulo com Plow, foram obtidos níveis significativos de TNF- α produzidos por células do grupo imunizado com Plow e aparentemente mais elevados do que os induzidos pela vacina tradicional (Figura 17A). Em sobrenadantes de cultivo de células do grupo imunizado com WCP foram observados níveis significativos de IL-17A, após estímulo homólogo com WCP (Figura 17B). Embora para os demais grupos vacinais os níveis produzidos dessa citocina não tenham sido significativos em relação aos controles, também não houve diferença significativa entre os níveis de IL-17 induzidos pelo grupo imunizado com a WCP e a Plow+AI. Não foram obtidos níveis detectáveis de citocinas após estímulo com Bpp.

(A)

(B)

Figura 17 - (A) Indução de TNF- α em células do sangue periférico dos animais imunizados e controles em resposta ao estímulo com Plow (10^6 cél/poço). **(B)** Indução de IL-17A em células do sangue periférico dos animais imunizados e controles em resposta ao estímulo WCP (10^6 cél/poço) (*) $p < 0.05$.

Em outro experimento (ExpII), a vacina Plow foi comparada à WCP (ambas em preparações formuladas com hidróxido de alumínio) e à Pertacel (Figura 18).

Foram obtidos níveis significativos da citocina pró-inflamatória IL-6, em células dos grupos imunizados com as vacinas celulares, Plow e WCP, tanto após estímulo com WCP (Figura 18A), quanto com Plow (Figura 18B), significativamente mais elevados do que os obtidos no grupo imunizado com Pertacel. Níveis significativos de IL-6 também foram evidenciados após estímulo com Bpp, nos grupos imunizados com WCP, em cultivos de 48h (Figura 18C) e mais tardiamente, no grupo Plow, em cultivo de 6 dias (Figura 18D). O estímulo com Bpp também

levou à produção de altos níveis de TNF- α pelo grupo imunizado com Plow, após 6 dias de cultivo (Figura 18E). Não foram obtidos níveis detectáveis das demais citocinas avaliadas.

Figura 18 - Indução de IL-6 em células do sangue periférico dos animais imunizados e controles em resposta ao estímulo com WCP (A), Plow (B) e Bpp em cultivo de 48h (C) ou 6 dias (D) e de TNF- α em resposta ao estímulo com Bpp (E). (*) $p < 0,05$.

O LPS é um importante fator de virulência e um antígeno de proteção importante em bactérias Gram-negativas. A *B. pertussis* perdeu o domínio O-polissacarídeo específico do LPS, ficando uma molécula de lipooligossacarídeo (LOS). A atividade tóxica e adjuvante do LOS se baseia no reconhecimento dessa molécula pelo sistema imune inato do hospedeiro, sendo regulada por citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias do sistema imune celular (MILLS, 2001; RYAN et al., 1998).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que induz a produção de quimiocinas por uma variedade de tipos celulares (BUTLER et al., 1994; HAWORTH et al., 1991) e sua ação em células endoteliais e leucócitos circulantes provoca aumento de moléculas de adesão, facilitando o extravasamento de leucócitos da corrente sanguínea (MACKAY et al., 1993; SLOWIK et al., 1993), induzindo à degranulação e atividade bactericida dessas células (BRANDT; PETERSEN; FLAD, 1992; KHAWAJA; CARVER; LINCH, 1992). Já foi demonstrado que o TNF- α induzido por sinalização de receptor *Toll-like* 4 (TLR-4) é imprescindível na resposta à *B. bronchiseptica*, e camundongos deficientes na produção desse receptor são incapazes de limitar a infecção e a doença por essa bactéria (MANN et al., 2004). A sinalização pelo TLR-4 é também crucial para a resposta precoce à *B. pertussis*, e embora não seja essencial para a sobrevivência pós-infecção, a deficiência desse receptor leva à supercolonização após uma semana, sugerindo que o TNF- α seja importante mais tardiamente na infecção (HIGGINS et al., 2003; MANN et al., 2005). Foi também sugerido que o TNF- α tenha papel essencial para o hospedeiro contra os efeitos da toxina pertussis, levando ao controle tanto da colonização quanto do processo inflamatório causado pela infecção (WOLFE et al., 2007).

A produção da citocina pró-inflamatória IL-6 é aceita como um parâmetro de medida de uma série de respostas a pirógenos e tem sido utilizada como medida da toxicidade de vacinas pertussis celulares (GEURTSSEN et al., 2007).

Neste estudo foram obtidos níveis significativos de TNF- α produzidos por células do sangue periférico do grupo imunizado com a Plow, após estimulação *in vitro* com Plow e mais tardiamente com Bpp, enquanto que embora tenha sido detectada certa indução dessa citocina no grupo imunizado com WCP, esses níveis não foram significativos. Tais resultados atestam que a vacina Plow foi capaz de

eficientemente suscitar a resposta imune celular, levando à proliferação de linfócitos específicos, capazes de produzir níveis significativos de TNF- α . Sabe-se que o LPS de *B. paraptussis* estimula fracamente o TLR-4, o que pode permitir a evasão da bactéria da imunidade do hospedeiro, possivelmente pela inibição de citocinas mediadas por esse receptor, como por exemplo, o TNF- α (WOLFE; BUBOLTZ; HARVILL, 2009). Aqui, vimos a indução de TNF- α nos grupos imunizados com a Plow em resposta à *B. paraptussis* inativada, evidenciando o potencial da vacina em induzir resposta protetora também contra esse patógeno.

Por outro lado, foram obtidos níveis significativos de IL-6 nos grupos imunizados com as vacinas celulares, Plow ou WCP, após estímulos com Plow, WCP ou Bpp, não sendo significativos os níveis dessa citocina em células do grupo imunizado com a vacina acelular, Pertacel.

Em estudo anterior realizado em nosso laboratório, avaliamos os níveis séricos de IL-6 em camundongos, 4 e 6 horas após a administração da Plow, formulada com toxóides tetânico e diftérico (DTPlow), tendo sido observada redução significativa da reatogenicidade, comparativamente à DTP tradicional (DIAS et al., 2012).

Embora aparentemente contraditórios, os resultados atuais foram obtidos com células de animais submetidos ao esquema completo de imunização, 15 dias após a segunda dose, enquanto que no trabalho anterior a dosagem de IL-6 foi feita 4 h e 6 h após a administração da vacina. Tomados em conjunto, tais resultados atestam que a vacina Plow apresentou menor reatogenicidade no momento da administração, mas manteve a capacidade imunoestimulatória no controle de produção efetiva de citocinas pró-inflamatórias. De fato, o processo de produção da Plow envolve a extração química do LOS da célula bacteriana, levando a significativa declínio do conteúdo de endotoxina (20%), mas a até 97% de diminuição da atividade endotóxica (DIAS et al., 2012). Estudo realizado por Zhang et al. (2011) mostrou que camundongos IL-6 γ/γ são menos eficientes em gerar resposta imune contra *B. pertussis* quando comparados a camundongos selvagens, assim como para o *clearance* da infecção contra esse patógeno, e a ausência da produção dessa citocina, como observamos no grupo imunizado com a vacina acelular, poderia comprometer a resposta contra a bactéria.

Tem sido cada vez mais bem estabelecido o papel da IL-17 na resposta imune das mucosas respiratórias superficiais, na proteção contra vários patógenos bacterianos extracelulares (YE et al., 2001), incluindo *B. pertussis*. A IL-17 se liga a receptores nas células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, induzindo a expressão de citocinas e quimiocinas que levarão à diferenciação e proliferação de neutrófilos, assim como à quimiotaxia dessas células, de linfócitos e macrófagos para o tecido de mucosa infectado (KOLLS; KHADER, 2010). As vacinas pertussis celulares induzem células Th17 (ROSS et al., 2013), considerada crucial para proteção eficaz contra a coqueluche (DUNNE et al., 2010). Em nosso estudo obtivemos níveis detectáveis de IL-17 em células do grupo imunizado com a vacina tradicional, e em menor grau, no grupo imunizado com a Plow com hidróxido de alumínio.

6.4 Potencialização de resposta inata nos animais imunizados

O *Mycobacterium bovis*, bacillus Calmette-Guérin (BCG), é um estímulo potente da resposta inata inespecífica (MENDEZ-SAMPERIO, VASQUEZ, AYALA, 2003; WATKINS et al., 2008), amplamente utilizado como vacina contra a tuberculose em humanos.

Estudos têm apontado que a exposição prévia a determinados componentes microbianos pode levar a maior proteção contra patógenos não relacionados (SUN; BEILKE; LANIER, 2009). Foi demonstrado que a vacinação com BCG em indivíduos saudáveis induz ao aumento na produção de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IFN- γ e IL-1 β em resposta a diferentes patógenos, assim como melhora a função de monócitos circulantes, acompanhado do aumento da expressão de marcadores de ativação, como CD11b e TLR-4. Esses estudos concluíram que o BCG induz proteção inespecífica de infecções por meio de reprogramação epigenética de células do sistema imune inato (KLEINNIJENHUIS et al., 2012).

Neste trabalho a produção de citocinas por células de sangue total dos animais imunizados e controles foi avaliada após estimulação *in vitro* com um antígeno não relacionado, uma vacina BCG. O intuito desse experimento foi avaliar se a imunização com as vacinas Plow ou WCP poderia potencializar a resposta inata, aumentando a resposta ao estímulo veiculado pelo BCG.

As células dos grupos imunizados com Plow e WCP responderam significativamente à estimulação com BCG, relativamente aos controles injetados

com PBS e MPL-A. Entretanto, o MPL-A formulado com a Plow potencializou significativamente a produção de TNF- α após estímulo com BCG em relação aos demais grupos, e o MPL-A também induziu estimulação significativa em relação ao controle PBS. Não foram obtidos níveis detectáveis das demais citocinas avaliadas (Figura 19).

Figura 19 - Indução de TNF- α em células do sangue periférico dos animais imunizados e controles em resposta ao estímulo com BCG (10^5 cél/poço). (*) $p < 0,05$.

O MPL-A de *Salmonella minnesota*, com propriedades adjuvantes extensivamente estudadas, atua como agonista de TLR-4 (McALEER; VELLA, 2010; O'HAGAN; VALIANTE, 2003; QURESHI et al., 1985), estimulando a resposta imune inata, ao ativar o fator de transcrição NF-Kb, e conseqüentemente a produção de citocinas inflamatórias. As citocinas pro-inflamatórias, por sua vez, secretadas por células residentes, irão estimular diretamente as células apresentadoras de antígenos, e em seguida o linfonodo de drenagem (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004).

O Instituto Butantan vem desenvolvendo MPL-A de *B. pertussis*, como subproduto na mesma linha de produção da vacina Plow, que foi avaliado positivamente como adjuvante em vacina de influenza, levando à redução de até 4 vezes a dose da vacina (DIAS et al., 2007; QUINTILIO et al., 2009). Em estudo realizado em nosso laboratório, sobre a imunização transcutânea de antígenos de leptospira, em camundongos, a coadministração da proteína LipL32 com MPL-A levou a efeito moderador da reação pró-inflamatória, redirecionando a resposta adaptativa, tanto humoral quanto celular (dados ainda não publicados).

Nossos resultados sugerem efeito potenciador do MPL-A na vacina Plow, com potencialização da resposta inata ao BCG.

6.5 Transmissão de *B. pertussis* e *B. parapertussis* de camundongos imunizados para não-imunes

O desenvolvimento de vacinas está focado na sua capacidade em reduzir a doença em hospedeiros individuais, mas pouca atenção é dada aos efeitos dessas vacinas na transmissão do patógeno entre hospedeiros (SMALLRIDGE et al., 2014).

Em modelo animal, tentamos avaliar os efeitos da vacinação com vacinas pertussis celulares ou acelulares na transmissão de *B. pertussis* ou *B. parapertussis*.

Camundongos imunizados com Plow, WCP, Pertacel ou Adacel foram desafiados intranasalmente com *B. pertussis* ou *B. parapertussis* e colocados em contato com outros não imunes, para avaliar se a imunidade induzida pelas preparações vacinais era capaz de inibir a transmissão bacteriana (Figuras 20 a 23). Foram realizados dois experimentos distintos, um com os animais submetidos ao protocolo do Exp II, onde o ensaio de Transmissão Bacteriana foi feito 90 dias após a última dose de imunização (Figura 8) e outro com os animais do Exp. III com ensaio de Transmissão feito 30 dias após a última dose (Figura 9). Também foi avaliada a persistência da bactéria nas narinas dos camundongos imunizados e desafiados com *B. pertussis* ou *B. parapertussis* (Figuras 20 a 23), tanto no experimento de imunidade tardia (Exp II) quanto no de resposta mais precoce (Exp III). Saliente-se que estamos considerando um animal imunizado e desafiado por caixa, com os experimentos feitos em duplicata, totalizando apenas dois animais imunizados e desafiados por experimento, contra seis não imunes (três por caixa).

Tanto na resposta de memória (Exp II) quanto na imunidade precoce (Exp III), a vacina Plow foi capaz de inibir em 50% a transmissão de *B. pertussis* para animais não imunes. No Exp II (Figura 20A), realizado três meses após a imunização, pode ser comprovada a resposta de memória suscitada pelas preparações vacinais, e os grupos imunizados com Plow ou Pertacel foram semelhantes na inibição da transmissão da bactéria para os animais não imunes, enquanto que os imunizados com a vacina celular tradicional transmitiram a bactéria para 83%. Nesse experimento, o grupo controle não imune, injetado com PBS e desafiado com *B. pertussis*, transmitiu a bactéria para 100% dos não imunes. Dos dois animais

imunizados e desafiados com *B. pertussis*, a bactéria pode ser recuperada em um animal do grupo controle (PBS) no 6º dia, persistindo até o 18º; em um imunizado com Pertacel no 6º dia e em um imunizado com Plow, no 9º dia e persistindo até o 18º (Figura 20B).

Figura 20 - Exp II - Transmissão bacteriana: **(A)** camundongos não imunes, 18 dias em contato com os imunizados; **(B)** camundongos imunizados e desafiados com *B. pertussis*. Porcentagem média obtida em dois experimentos independentes.

No Exp III (Figura 21A) a vacina Plow confirmou a inibição em 50% de transmissão da bactéria, comparativamente aos imunizados com Adacel, com taxa de transmissão de 83% e WCP de 67%. A bactéria foi recuperada em um animal imunizado com Adacel já no 3º dia. Nos demais grupos a bactéria foi recuperada no 6º dia, persistindo até o 18º (Figura 21B).

Figura 21 - Exp III - Transmissão bacteriana: **(A)** camundongos não imunes, 18 dias em contato com os imunizados; **(B)** camundongos imunizados e desafiados com *B. pertussis*. Porcentagem média obtida em dois experimentos independentes.

Quando desafiados com *B. parapertussis*, os animais imunizados com Plow, em resposta de memória no Exp II, transmitiram a bactéria para 33% dos não imunes, enquanto que os imunizados com WCP ou Pertacel apresentaram taxa de transmissão de 67% (Figura 22A). Nesse experimento, no grupo controle, injetado com PBS, a porcentagem de transmissão foi de 83%, com persistência da bactéria desde o 3º dia até o 18º. Por outro lado, para os desafiados com *B. parapertussis*, no 3º dia foi possível se recuperar a bactéria nos controles e nos imunizados com WCP ou Pertacel, e em apenas um dos animais imunizados com Plow, mais tardiamente, no 19º dia (Figura 22B).

Figura 22 - Exp II - Transmissão bacteriana: **(A)** camundongos não imunes, 19 dias em contato com os imunizados; **(B)** camundongos imunizados e desafiados com *B. paraptussis*. Porcentagem média obtida em dois experimentos independentes.

No Exp III, os animais imunizados com a Plow não transmitiram a bactéria até o 9º dia, atingindo 50% de transmissão tardiamente, no 18º dia, enquanto que os imunizados com a WCP tiveram taxa de transmissão de 83% e os imunizados com Adacel, de 67%, ambas transmitindo a bactéria para 50% dos animais não imunes, já no 3º dia (Figura 23A). A bactéria não foi recuperada nos animais imunizados com Plow, mas em todos os demais grupos, no 3º dia (Figura 23B).

Figura 23 - Exp III - Transmissão bacteriana: (A) camundongos não imunes, 18 dias em contato com os imunizados; (B) camundongos imunizados e desafiados com *B. parapertussis*. Porcentagem média obtida em dois experimentos independentes.

Pudemos comprovar que os animais imunizados foram colonizados pela bactéria no desafio nasal, em diferentes intensidades e tempo. Para que a transmissão aconteça é necessário que a bactéria colonize adequadamente o indivíduo infectado e chegue a número suficiente no seu nicho em outro hospedeiro (ROLIN et al., 2014).

No grupo imunizado com Plow, no Exp II, além da menor taxa de transmissão de *B. pertussis* em relação à WCP, o início da transmissão foi mais tardia do que o das vacinas WCP e Pertacel, provavelmente devido ao menor número de bactérias capazes de colonizar as narinas do animal imune, onde a bactéria foi detectada apenas no 9º dia e em só um dos animais imunizados. No Exp III a transmissão de

B. pertussis começou a ser detectada no 6º dia para os grupos Plow e WCP, e no 3º para a Adacel, coincidindo com o dia em que a bactéria foi detectada na narina do animal transmissor imune.

Esse efeito foi confirmado na transmissão de *B. parapertussis*. Na resposta tardia (ExpII), no grupo imunizado com Plow a bactéria foi detectada na narina do animal imunizado e desafiado, apenas no 19º dia, e a transmissão não superou os 33%. No Exp III no grupo Plow a *B. parapertussis* possivelmente estava em número tão reduzido que não pode ser capturada pelo *swab* nasal, e a transmissão da bactéria foi detectada só a partir do 9º dia, possivelmente após o período de colonização das narinas dos animais não imunes, enquanto que para a WCP e Adacel a bactéria foi detectada nas narinas do animal transmissor imune no 3º dia e a transmissão da bactéria foi evidenciada também a partir do 3º dia, em 50% dos animais não imunes, atingindo os 67% e 83%, respectivamente para Adacel e WCP.

Os resultados sugerem que a colonização nasal tanto com *B. pertussis* quanto com *B. parapertussis* diminuiu nos animais imunizados com vacina Plow e foi em geral mais tardia, levando à transmissão também mais tardia. A vacina tradicional, embora tenha inicialmente retardado a transmissão, levou a índices de transmissão mais elevados, fazendo-nos pressupor que neste caso o número de bactérias nas narinas dos animais imunes tenha sido mais elevado, permitindo que a infecção dos não imunes fosse mais efetiva. Por outro lado, a Pertacel foi semelhante à Plow no controle da transmissão de *B. pertussis*, mas não impediu a transmissão de *B. parapertussis*. A vacina Adacel não segurou a transmissão de pertussis (taxa de transmissão de 83%), o que nos faz pressupor que a menor concentração de PT na formulação de Adacel (2,5 µg), em relação à da Pertacel (10 µg) possa ter alguma relação com esse aspecto.

Pela metodologia utilizada, não podemos afirmar se a transmissão percebida nos animais não imunes ocorreu ao longo de todo o experimento somente a partir do animal imunizado, uma vez que ela também pode ter ocorrido de animais não imunes que se infectaram e se tornaram transmissores.

A natureza e a duração da resposta imune podem ter influenciado tais resultados, afetando a transmissibilidade da *B. pertussis* e *B. parapertussis* pelos animais imunizados. Nossos resultados confirmam os descritos por outros autores, para *B. pertussis* e *B. bronchiseptica* (SMALLRIDGE et al., 2014), que utilizando um

modelo experimental usando camundongos, hospedeiros naturais de *B. bronchiseptica*, determinaram os efeitos da vacinação com vacina celular e acelular, na colonização e transmissão do patógeno. Segundo eles, a resposta imune adaptativa gerada pelas vacinas celulares deve alterar o recrutamento de células imunes específicas ao sítio de infecção, controlando a colonização e a transmissão bacteriana. Dados clínicos e experimentais ressaltam que as vacinas atuais contra a coqueluche são bastante eficazes contra a *B. pertussis*, mas não contra a *B. parapertussis* (DAVID; FURTH; MOOI, 2004; HE et al., 1998; HEININGER et al., 1999; LIESE et al., 2003; MASTRANTONIO et al., 1998), por razões ainda não completamente compreendidas. Se por um lado as vacinas não são capazes de gerar imunidade cruzada efetiva contra *B. parapertussis*, também pode ser possível que haja a evasão da *B. parapertussis* do sistema imune. Dentre as possíveis hipóteses está o fato de que o antígeno-O, não sendo expresso pela *B. pertussis*, permite que a *B. parapertussis* colonize o trato respiratório inferior, protegendo-a do controle mediado por complemento e evitando a imunidade cruzada.

Foi visto que a resposta humoral e celular são importantes para o controle da colonização e transmissão, e que a vacina celular foi eficaz em conter a transmissão, ao passo que a Adacel é capaz de controlar de maneira eficaz a doença, porém é falha em impedir a colonização e a transmissão da bactéria (SMALLRIDGE et al., 2014). Sabe-se que o perfil de resposta imune Th2, gerado pelas vacinas acelulares, relacionado com a secreção de IL-4 e resposta humoral, foi associado à menor eficiência na indução de reposta protetora contra *B. pertussis*, e embora efetivo na proteção do indivíduo vacinado, pode não conter a disseminação da bactéria (ALLEN, 2013; HIGGS et al., 2012; RYAN et al., 1998). Por outro lado, a resposta Th1, gerada pelas vacinas celulares e associado com a secreção de IFN- γ , é importante no controle e *clearance* da infecção por *B. pertussis* (BARBIC et al., 1997; HIGGS et al., 2012; RYAN et al., 1998).

Em nosso estudo, as alterações celulares da amostra vacinal de *B. pertussis* na produção da Plow, diminuindo a camada de LOS, de certo modo podemter favorecido a exposição de componentes de superfície celular que facilitem a indução de resposta cruzada entre *B. pertussis* e *B. parapertussis*, promovendo interações

celulares que levem à ativação de células imunocompetentes e efeitos importantes no controle cruzado da transmissão das duas bactérias.

A nosso ver, o trabalho resultou em dados que podem levar a maior segurança na avaliação de pré-requisitos para tomadas de decisão na escolha de vacinas pertussis que sejam mais efetivas e contribuam para o controle e disseminação da doença.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho descrevemos aspectos relacionados à resposta imune conferida por uma nova vacina pertussis celular em desenvolvimento no Instituto Butantan, com baixo teor de LOS, a vacina Plow, comparativamente à vacina tradicional produzida pelo Instituto (WCP) e a vacinas acelulares comerciais, a Adacel ou a Pertacel. A resposta imune induzida pelas vacinas foi correlacionada à transmissibilidade da *B. pertussis* e da *B. parapertussis* do animal vacinado para o não imunizado.

Após imunização com a Plow e as suas diferentes formulações, foi vista a indução de altos títulos de anticorpos contra células de *B.pertussis* e *B.parapertussis* e também a produção de citocinas como TNF- α , IL-17A e IL-6 envolvidas na resposta celular e importantes na geração de resposta imune contra essas bactérias. Da mesma forma, foi vista a potencialização de resposta imune inata após imunização com as vacinas pertussis celulares e o efeito potenciador do MPL-A na vacina Plow, levando à indução de níveis significativos de TNF- α com estímulo não relacionado. A menor porcentagem de transmissão apresentada nos grupos de camundongos não imunes que ficaram em contato com animais imunizados com Plow e desafiados com *B. pertussis* e *B. parapertussis*, sugerem a eficácia dessa vacina em diminuir a carga bacteriana nas narinas de animais imunizados, apresentando a mesma efetividade tanto na indução de resposta de memória precoce quanto tardia, impedindo a transmissão desses patógenos para animais susceptíveis, especialmente *B. parapertussis*, cuja incidência não pode mais ser negligenciada.

REFERÊNCIAS*

1. ALLEN, A. The pertussis paradox. **Science**, v. 341, n. 6145, p. 454-455, 2013.
2. AOYAMA, T. et al. Efficacy of an acellular pertussis vaccine in Japan. **J. Pediatr.**, v. 107, n. 2, p. 180-183, 1985.
3. BARAFF, L. J.; ABLON, W. J.; WEISS, R. C. Possible temporal association between diphtheria-tetanus toxoid-pertussis vaccination and sudden infant death syndrome. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 2, n. 1, p. 7-11, 1983.
4. BARBIC, J. et al. Role of gamma interferon in natural clearance of *Bordetella pertussis* infection. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 12, p. 4904-4908, 1997.
5. BJØRNSTAD, O. N.; HARVILL, E. T. Evolution and emergence of *Bordetella* in humans. **Trends in microbiol.**, v. 13, n. 8, p. 355-359, 2005.
6. **Boletim Epidemiológico Coqueluche**. Secretária de Vigilância em Saúde. v. 46, n. 39, p. 1-8, 2015.
7. BORDET, J.; GENGOU, O. Le microbe de la coqueluche. **Ann. Inst. Pasteur.**, v. 2, p. 731-741, 1906.
8. BRANDT, E.; PETERSEN, F.; FLAD, H. Recombinant tumor necrosis factor-alpha potentiates neutrophil degranulation in response to host defense cytokines neutrophil-activating peptide 2 and IL-8 by modulating intracellular cyclic AMP levels. **J. Immun.**, v. 149, n. 4, p. 1356-1364, 1992.
9. BUTLER, D. M. et al. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 6, n. 4, p. 225-230, 1994.
10. CAROFF, M. et al. Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features. **J. Bacteriol.**, v. 172, n. 2, p. 1121-1128, 1990.
11. CHERRY, J. D. Historical review of pertussis and the classical vaccine. **J. Infect. Dis.**, v. 174, n. Supplement 3, p. S259-S263, 1996.

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

12. CHERRY, J. D. Pertussis: challenges today and for the future. **PLoS Pathog.**, v. 9, n. 7, p. e1003418, 2013.
13. CROWCROFT, N. S. et al. How best to estimate the global burden of pertussis?. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 3, n. 7, p. 413-418, 2003.
14. CROWCROFT, N. S. et al. Severe and unrecognised: pertussis in UK infants. **Arch. Dis. Child.**, v. 88, n. 9, p. 802-806, 2003.
15. CROWCROFT, N. S.; PEBODY, Richard G. Recent developments in pertussis. **The Lancet**, v. 367, n. 9526, p. 1926-1936, 2006.
16. DAS, P. Whooping cough makes global comeback. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 2, n. 6, p. 322, 2002.
17. 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, p. 1892-1898, 2004.
18. DE GREEFF, S. C. et al. Seroprevalence of pertussis in The Netherlands: evidence for increased circulation of *Bordetella pertussis*. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e14183, 2010.
19. DIAS, W. O. et al. An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. **Hum. Vaccin. Immunother.**, v. 9, n. 2, p. 339 - 348, 2012.
20. DIAS, W. O. et al. New approaches in pertussis vaccines for developing countries In: **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology** ed. Badajoz :Formatex, v.2, p. 668-672, 2007.
21. DUNNE, A. et al. Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*. **J. Immunol.**, v. 185, n. 3, p. 1711-1719, 2010.
22. FEDELE, G; BIANCO, M; AUSIELLO, C.M. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: talented modulators of host immune response. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 61, n. 6, p. 445-457, 2013.
23. FUNG, K. S. C. et al. Pertussis—a re-emerging infection?. **J. Infect.**, v. 48, n. 2, p. 145-148, 2004.
24. GEIER, M. R.; STANBRO, H.; MERRIL, C. R. Endotoxins in commercial vaccines. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 36, n. 3, p. 445-449, 1978.
25. GENTILE, Á. Infección por *Bordetella pertussis*. **Arch. Argent. Pediatr.**, v. 108, n. 1, p. 78-81, 2010.
26. GEURTSEN, J. et al. Lipopolysaccharide analogs improve efficacy of acellular pertussis vaccine and reduce type I hypersensitivity in mice. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 7, p. 821-829, 2007.

27. GOEBEL, E. M.; ZHANG, X.; HARVILL, E. T. *Bordetella pertussis* infection or vaccination substantially protects mice against *B. bronchiseptica* infection. **PloS one**, v. 4, n. 8, p. e6778, 2009.
28. GOUW, D. et al. Pertussis: a matter of immune modulation. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 35, n. 3, p. 441-474, 2011.
29. GRANSTROM, M. et al. Specific immunoglobulin for treatment of whooping cough. **The Lancet**, v. 338, n. 8777, p. 1230-1233, 1991.
30. GRIMPREL, E. et al. Comparison of polymerase chain reaction, culture, and western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 10, p. 2745-2750, 1993.
31. GRIMPREL, E. et al. Influence of vaccination coverage on pertussis transmission in France. **The Lancet**, v. 354, n. 9191, p. 1699-1700, 1999.
32. GÜRIŞ, D. et al. Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990-1996. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, n. 6, p. 1230-1237, 1999.
33. HAWORTH, C. et al. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: Regulation by tumor necrosis factor- α . **Eur. J. Immun.**, v. 21, n. 10, p. 2575-2579, 1991.
34. HE, Q. et al. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. **Jama.**, v. 280, n. 7, p. 635-637, 1998.
35. HEGERLE, N.; GUIZO, N. *Bordetella pertussis* and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines. **Expert. Rev. Vaccines.**, v. 13, n. 9, p. 1135-1146, 2014.
36. HEISS, L. N. et al. Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 8, p. 3123-3128, 1993.
37. HELLENBRAND, W. et al. The epidemiology of pertussis in Germany: past and present. **BMC Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 1 - 11, 2009.
38. HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P. Virulence functions of autotransporter proteins. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 3, p. 1231-1243, 2001.
39. HIGASHI, H. G. et al. Acellular and "low" pertussis vaccines: adverse events and the role of mutations. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 51, n. 3, p. 131-134, 2009.
40. HIGGINS, S. C. et al. 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. Immun.**, v. 171, n. 6, p. 3119-3127, 2003.

41. HIGGS, R. et al. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. **Mucosal Immunol.**, v. 5, n. 5, p. 485-500, 2012.
42. HUBER, V. C. et al. Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 13, n. 9, p. 981-990, 2006.
43. INFORME TÉCNICO DA INTRODUÇÃO DA VACINA PENTAVALENTE. Ministério da Saúde, 2012.
44. IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat. Immunol.**, v. 5, n. 10, p. 987-995, 2004.
45. JAVED, S. et al. *Bordetella parapertussis* outbreak in Bisham, Pakistan in 2009–2010: fallout of the 9/11 syndrome. **Epidemiol. Infect.**, v. 143, n. 12, p. 2619-2623, 2015.
46. KENDRICK, P. ELDERING. G. A. Study in Active Immunization against Pertussis. With Statistical Analyses of the Data by AJ BOROWSKI. **Am. J. Epidemiol.**, v. 29, p. 133-53, 1939.
47. KHELEF, N. DANVE, B; QUENTIN-MILLET, M.J; GUIZO, N. *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: Two immunologically distinct species. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 2, p.486-490, 1993.
48. KHAWAJA, A.; CARVER, J. E.; LINCH, D. C. Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor alpha in the priming of the neutrophil respiratory burst. **Blood**, v. 79, n. 3, p. 745-753, 1992.
49. KLEINNIJENHUIS, J. et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 109, n. 43, p. 17537-17542, 2012.
50. KOEPKE, R et al. Widespread *Bordetella parapertussis* Infections—Wisconsin, 2011–2012: Clinical and Epidemiologic Features and Antibiotic Use for Treatment and Prevention. **Clin. Infect. Dis.**, v.61, n.1, p. 1421-1431, 2015.
51. KOLLS, J. K.; KHADER, S. A. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 21, n. 6, p. 443-448, 2010.
52. KUBRUSLY, F. S; DIAS, W. O; ESTEVES, M. I. ; HORTON, D. S. P. Q.; FURUYAMA, N.; QUINTILIO, W. ; SAKAUCHI, M. A. ; MENDES, E.; RAW, I. Process for obtention of new cellular pertussis vaccine. 2004, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: 2006/002502 data de depósito: 13/09/2004, título: "Process for obtention of new cellular pertussis vaccine", Instituição de registro: WIPO - World Intellectual Property Organization. Instituições financiadoras: Fundação Butantan, FAPESP, 2006.

53. LADANT, D.; ULLMANN, A. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. **Trends Microbiol.**, v. 7, n. 4, p. 172-176, 1999.
54. LAMBERT, L.C. Pertussis vaccine trials in the 1990s. **J. Infect. Dis.**, v. 209, n. suppl 1, p. S4-S9, 2014.
55. LAVINE, J. S.; KING, A. A.; BJØRNSTAD, O. N. Natural immune boosting in pertussis dynamics and the potential for long-term vaccine failure. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 108, n. 17, p. 7259-7264, 2011.
56. LEININGER, E. et al. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, n. 2, p. 345-349, 1991.
57. LIESE, J. G. et al. Clinical and epidemiological picture of *B. pertussis* and *B. parapertussis* infections after introduction of acellular pertussis vaccines. **Arch. Dis. Child.**, v. 88, n. 8, p. 684-687, 2003.
58. MACKAY, F. et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. **J. Exp. Med.**, v. 177, n. 5, p. 1277-1286, 1993.
59. MANN, P. B. et al. Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to *Bordetella* infection. **Infect Immun.**, v. 73, n. 12, p. 8144-8152, 2005.
60. MANN, P. B. et al. Toll-like receptor 4-dependent early elicited tumor necrosis factor alpha expression is critical for innate host defense against *Bordetella bronchiseptica*. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 11, p. 6650-6658, 2004.
61. MASTRANTONIO, P. et al. *Bordetella parapertussis* infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 4, p. 999-1002, 1998.
62. MASTRANTONIO, P. et al. Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. **Microbiology**, v. 145, n. 8, p. 2069-2075, 1999.
63. MATTOO S.; CHERRY J.D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. **Clin. Microbiol. Rev.**; v. 18, n. 2, p. 326-382, 2005.
64. MCALEER, J. P.; VELLA, A. T. Educating CD4 T cells with vaccine adjuvants: lessons from lipopolysaccharide. **Trends Immunol.**, v. 31, n. 11, p. 429-435, 2010.
65. MENDEZ-SAMPERIO, P.; VAZQUEZ, A.; AYALA, H. Infection of human monocytes with *Mycobacterium bovis* BCG induces production of CC-chemokines. **J. Infect.**, v. 47, n. 2, p. 139-147, 2003.

66. MILLS, K. H.G. Immunity to *Bordetella pertussis*. **Microbes Infect.**, v. 3, n. 8, p. 655-677, 2001.
67. MULLER, F. M.; HOPPE, J. E.; VON KÖNIG, C. H. W. Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 10, p. 2435 - 2443, 1997.
68. NICOLAI, A. et al. *Bordetella pertussis* in infants hospitalized for acute respiratory symptoms remains a concern. **BMC Infect. Dis.**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2013.
69. NOVOTNY, P.; MONACK, D.; FALKOW, S. Pathogenesis in *Bordetella* Species [with Reply]. **J. Infect. Dis.**, v.161, n.3, p. 581-583, 1990.
70. O'HAGAN, D.T.; VALIANTE, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 9, p. 727-735, 2003.
71. PADDOCK, C. D. et al. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, n. 3, p. 328-338, 2008.
72. PARKHILL, J. et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. **Nat. Genet.**, v. 35, n. 1, p. 32-40, 2003.
73. PARTON, R. Review of the biology of *Bordetella pertussis*. **Biologicals**, v. 27, n. 2, p. 71-76, 1999.
74. PRESTES, A. F. R. O. **Avaliação de adjuvantes em novas formulações de vacina tríplice bacteriana**. 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.
75. PRESTON, A. et al. Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in bordetellae. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 8, p. 3763-3767, 1999.
76. QUINN, H. E. et al. Pertussis epidemiology in Australia over the decade 1995-2005-trends by region and age group. **Commun. Dis. Intell. Q. Rep.**, v. 31, n. 2, p. 205 - 215, 2007.
77. QUINTILIO, W. et al. *Bordetella pertussis* monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4219-4224, 2009.
78. QURESHI, N. et al. Monophosphoryl lipid A obtained from lipopolysaccharides of *Salmonella minnesota* R595. Purification of the dimethyl derivative by high performance liquid chromatography and complete structural determination. **J. Biol. Chem.**, v. 260, n. 9, p. 5271-5278, 1985.
79. RENAULD-MONGENIE, G. et al. Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 4, p. 1053-1060, 1996.

80. RESTIF, O. et al. Of mice and men: asymmetric interactions between *Bordetella* pathogen species. **Parasitology**, v. 135, n. 13, p. 1517-1529, 2008.
81. ROLIN, O. et al. Toll-like receptor 4 limits transmission of *Bordetella bronchiseptica*. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85229, 2014.
82. ROSS, P. J. et al. Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. **PLoS Pathog.**, v. 9, n. 4, p. e1003264, 2013.
83. RYAN, M. et al. Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children. **Immunology**, v. 93, n. 1, p. 1-10, 1998.
84. SATO, Y; SATO, H. Development of acellular pertussis vaccines. **Biologicals**, v. 27, n. 2, p. 61-69, 1999.
85. SCHELLEKENS, J; VON KÖNIG, C. H. W; GARDNER, Pierce. Pertussis sources of infection and routes of transmission in the vaccination era. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 24, n. 5, p. S19-S24, 2005.
86. SHERIDAN, S. L. et al. Number and order of whole cell pertussis vaccines in infancy and disease protection. **Jama**, v. 308, n. 5, p. 454-456, 2012.
87. SKOWRONSKI, D. M. et al. The changing age and seasonal profile of pertussis in Canada. **J. Infect. Dis.**, v. 185, n. 10, p. 1448-1453, 2002.
88. SLOWIK, M. R. et al. Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration. **Am. J. Pathol.**, v. 143, n. 6, p. 1724-1730, 1993.
89. SMALLRIDGE, W. E. et al. Different effects of whole-cell and acellular vaccines on *Bordetella* transmission. **J. Infect. Dis.**, v. 209, n. 12, p. 1981-1988, 2014.
90. STEED, L. L. et al. *Bordetella pertussis* induces respiratory burst activity in human polymorphonuclear leukocytes. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 5, p. 2101-2105, 1992.
91. STEHR, K. et al. A comparative efficacy trial in Germany in infants who received either the Lederle/Takeda acellular pertussis component DTP (DTaP) vaccine, the Lederle whole-cell component DTP vaccine, or DT vaccine. **Pediatrics**. v. 101, n. 1, p. 1-11, 1998.
92. SUN, J. C.; BEILKE, J. N.; LANIER, L. L. Adaptive immune features of natural killer cells. **Nature**, v. 457, n. 7229, p. 557-561, 2009.
93. TOZZI, A. E. et al. Diagnosis and management of pertussis. **CMAJ**, v. 172, n. 4, p. 509-515, 2005.

94. UHL, M. A.; MILLER, J. F. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. **EMBO J.**, v. 15, n. 5, p. 1028-1036, 1996.
95. VADASZ, Z. et al. Toll-like receptor-4 expression in infants with pertussis infection. **Infection**, v. 41, n. 1, p. 195-198, 2013.
96. VAN DER ARK, A. A. J et al. Resurgence of pertussis calls for re-evaluation of pertussis animal models, **Expert Rev. Vaccine**. v.11, n.9, p 1121-1137, 2012.
97. VAN DER ZEE, A. et al. The differentiation of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenetic relationship. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, n. 3, p. 640-647, 1996.
98. VERSTEEGH, F. G. A. **Pertussis: new insights in diagnosis, incidence and clinical manifestations**. Proefschrift. Amsterdam: Vrije Universiteit, Chapter 1, p. 10-29, 2005.
99. WARFEL, J. M.; BEREN, Joel; MERKEL, Tod J. Airborne transmission of *Bordetella pertussis*. **J. Infect. Dis.**, v. 206, n. 6, p. 902-906, 2012.
100. WATKINS, M. L. V. et al. Exposure of cord blood to Mycobacterium bovis BCG induces an innate response but not a T-cell cytokine response. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, n. 11, p. 1666-1673, 2008.
101. WILLEMS, R. J. et al. The efficacy of a whole cell pertussis vaccine and fimbriae against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections in a respiratory mouse model. **Vaccine** v.16, n.4, p. 410-416, 1998.
102. WOLFE, D. N. et al. Delayed Role of Tumor Necrosis Factor— α in Overcoming the Effects of Pertussis Toxin. **J. Infect. Dis.**, v. 196, n. 8, p. 1228-1236, 2007.
103. WOLFE, D. N.; KIRIMANJESWARA, G. S.; HARVILL, Eric T. Clearance of *Bordetella parapertussis* from the lower respiratory tract requires humoral and cellular immunity. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 10, p. 6508-6513, 2005.
104. WOOD, N.; MCINTYRE, P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. **Paediatr. Respir. Rev.**, v. 9, n. 3, p. 201-212, 2008.
105. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Laboratory Manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*. 2014.
106. YE, P. et al. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 25, n. 3, p. 335-340, 2001.

107. YIH, W. K. et al. The increasing incidence of pertussis in Massachusetts adolescents and adults, 1989–1998. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 5, p. 1409-1416, 2000.
108. ZHANG, X. et al. Decreased leukocyte accumulation and delayed *Bordetella pertussis* clearance in IL-6^{-/-} mice. **J. Immunol.**, v. 186, n. 8, p. 4895-4904, 2011.
109. ZHANG, X; RODRÍGUEZ, M. E; HARVILL, E.T. O Antigen Allows *B. paraptussis* to Evade *B. pertussis* Vaccine–Induced Immunity by Blocking Binding and Functions of Cross-Reactive Antibodies. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e6989, 2009.
110. ZORZETO, T. Q et al. Immunogenicity of a whole-cell pertussis vaccine with low lipopolysaccharide content in infants. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, n. 4, p. 544-550, 2009.