PAULO SILVA WOLF

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E AVALIAÇÃO DA
IMUNOGENICIDADE E DO POTENCIAL ADJUVANTE
INDUZIDOS PELA PROTEÍNA “HEAT-SHOCK” CPN60 DA
*BORDETELLA PERTUSSIS***

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Vera C. B. Cainelli
Gebara

Co-orientador: Dr. Alexandre P. Y.
Lopes

São Paulo

2010

RESUMO

WOLF, P. S. **Clonagem, expressão e avaliação da imunogenicidade e do potencial adjuvante induzidos pela proteína “heat-shock” Cpn60 da *Bordetella pertussis***. 102f. Dissertação(mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A proteína “Heat-Shock” Cpn60 é membro da família de chaperoninas 60, grupo de proteínas altamente conservadas que estão envolvidas em funções celulares essenciais e na sinalização celular. Esta proteína é conhecida por ser um dos antígenos bacterianos mais imunogênicos e está implicada na regulação das imunidades inata e adaptativa. Neste trabalho foram realizadas a clonagem e expressão da Cpn60 e a avaliação da resposta imune induzida. Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com 5 ou 10 µg da proteína recombinante (Cpn60r) sozinha ou adicionada à vacina DTP do Instituto Butantan formulada sem hidróxido de alumínio (NADTP). A vacina DTP produzida no Instituto Butantan (DTP) foi usada como controle. Foi avaliada a produção de citocinas por células esplênicas após reestímulo *in vitro* com a Cpn60r. Os animais foram desafiados após o protocolo de imunização. Os resultados mostraram que a Cpn60r sozinha ou misturada à vacina NADTP foi capaz de induzir níveis de anticorpos contra pertussis mais altos do que os induzidos pela DTP. Os níveis de IgG1 e IgG2a foram similares para todos os grupos. Altos níveis de IL-6 e IFN- γ foram produzidos *in vitro* nos grupos imunizados com 5 µg de Cpn60r, comparados com o grupo DTP. Os grupos imunizados com Cpn60r+NADTP apresentaram um índice de proteção entre 60 e 80% contra o desafio pela bactéria virulenta, semelhante ao grupo imunizado com DTP.

A proteína Cpn60r é bastante promissora não somente como imunógeno, mas também como adjuvante podendo ser incluída em protocolos de imunização contra a *B. pertussis*.

Palavras-chave: *Bordetella pertussis*. Coqueluche. Tosse comprida. Cpn60. HSP60. Vacina. Adjuvante.

ABSTRACT

WOLF, P. S. **Molecular cloning, expression and evaluation of immunogenicity and adjuvant potential induced from the “heat-shock” protein Cpn60 from *Bordetella pertussis***. 102f. Master thesis (Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The Cpn60 Heat-Shock protein is a member of the Chaperonin 60 family, that is a group of highly conserved proteins associated with essential cell functions and cell signaling. This protein is known to be one of the most immunogenic bacterial antigens and is involved in innate and adaptive immunity regulations. In this work the Cpn60 was cloned, expressed and the induced immune response was evaluated. BALB/c mice groups were immunized with 5 or 10 µg of the recombinant protein (Cpn60r) alone or mixed with DPT vaccine from Instituto Butantan formulated without aluminum hydroxide (NADPT). The DPT vaccine produced by Instituto Butantan was used as control. We evaluated the cytokines production by spleen cells after *in vitro* reestimulation with Cpn60r. The animals were challenged after the immunization protocol. The results showed that the Cpn60r alone or mixed with NADPT vaccine was able to induce higher antibodies levels than DPT. IgG1 and IgG2a levels were similar in all groups. High levels of IL-6 and IFN-γ were produced *in vitro* in the groups immunized with 5 µg of Cpn60r, compared to DPT group. The groups immunized with Cpn60r+NADTP showed a 60 and 80% protection rate against the challenge with live bacteria, similar to the group immunized with DPT.

These results show the immunogenic and adjuvant potential of the recombinant protein, and suggest that it could be included in immunization protocols against pertussis.

Key-words: *Bordetella pertussis*. Whooping Cough. Cpn60. HSP60. Vaccine. Adjuvant.

INTRODUÇÃO

Bordetella pertussis (Figura 1), agente etiológico da coqueluche, é um cocobacilo Gram-negativo aeróbico, sendo o homem seu único hospedeiro. A sua transmissão se dá por contato direto com os indivíduos portadores, através das secreções do trato respiratório (HIDALGO, 2000).

Dois outros organismos similares à *pertussis* são a *Bordetella bronchiseptica* que causa uma síndrome respiratória em animais domésticos e a *Bordetella parapertussis* que causa problemas respiratórios em humanos, mas não tão severos quanto a *B. pertussis*. Das três espécies, somente a *B. pertussis* secreta a toxina pertussis (PT), um antígeno que contribui significativamente para a sua patogênese (EDWARDS e DECKER, 2004).

A *B. pertussis* foi cultivada e isolada pela primeira vez em 1906 (BORDET e GENGOU, 1906), justamente na época em que vacinas celulares com patógenos atenuados ou mortos começaram a ser utilizadas. Há registros de mais de 200 mil casos de pertussis antes de uma vacina ser disponibilizada na década de 40 (CDC, 2008). A bactéria produz diversos antígenos e fatores de virulência, na infecção e na doença, como a toxina pertussis (PT), a hemaglutinina filamentosa (FHA), a pertactina (PRN) ou 69 kDa, a citotoxina traqueal (TCT), as fímbrias (FIM), a toxina adenilato ciclase, a toxina dermonecrótica ou termolábil e a endotoxina lipopolisacáride (LPS), entre outros (MILLS, 2001).

A patogênese está relacionada à adesão aos cílios das células epiteliais do trato respiratório, que induz a produção de toxinas que paralisam esses cílios, causando inflamação e dificuldade na limpeza das secreções pulmonares (CDC, 2008).

Os quatro passos principais da patogênese da *pertussis* são: 1) aderência e invasão; 2) ruptura dos mecanismos de defesa; 3) indução de danos locais; e 4) efeitos sistêmicos (MATTOO e CHERRY, 2005).

Figura 1. *Bordetella pertussis*. Bactéria causadora da coqueluche (SBIM, 2007).

A infecção começa quando a bactéria entra no trato respiratório e adere às células ciliadas através das adesinas PT, FHA, FIM e PRN. A *B. pertussis* sintetiza diversos antígenos que agem no sistema imune do hospedeiro. A PT inibe o sistema imune prevenindo a chegada de linfócitos e macrófagos ao local de infecção (MATTOO e CHERRY, 2005). O antígeno mais associado à indução de danos locais é a TCT, causando paralisia e destruição do epitélio ciliado. A PT também entra na corrente sanguínea e pode causar efeitos sistêmicos como linfocitose e hiperinsulinemia (EDWARDS e DECKER, 2004).

A *Bordetella pertussis* é a bactéria causadora da coqueluche, mais conhecida como “tosse comprida”, uma doença aguda e transmissível que compromete principalmente o trato respiratório. Podendo ser transmitida por contato direto com uma pessoa infectada, sintomática ou não, em espaços confinados ou por contato com secreções respiratórias, nasais ou orais da pessoa infectada. A transmissão pode ainda ocorrer por exposição à tosse, utensílios de uso comum ou exame médico de um paciente (BISGARD, 2007).

É uma doença cosmopolita e endêmica em todo o mundo e ocorre o ano todo, com maior frequência no verão e outono. A suscetibilidade é geral, apresentando uma letalidade em torno de 0,4%. No entanto, a faixa etária de maior risco é a de menores de um ano, alcançando um índice de mortalidade de 1% em crianças menores de seis meses (HIDALGO, 2000). A doença é altamente contagiosa, apresenta um período de incubação de 7 a 10 dias e é causada pelas toxinas ativas e antígenos da bactéria. A causa mais comum das mortes relacionadas à coqueluche é a infecção secundária por um patógeno causador de pneumonia (HIDALGO, 2000; CDC, 2008).

No Brasil, a prevenção da coqueluche no Brasil é feita por uma vacina celular formulada com células mortas da *B. pertussis*. Esta formulação é decorrente do aprimoramento de uma vacina que foi desenvolvida na década de 20 (MADSEN, 1933), padronizada na década de 40 (KENDRICK *et al.*, 1947) e começou a ser administrada à população nos EUA em 1948, combinada aos toxóides diftérico e tetânico (GREENBERG e FLEMING, 1947; CDC, 2008).

A primeira vacina contra a coqueluche era composta de células mortas, em alguns casos combinadas com outros organismos do trato respiratório superior ou com filtrados tóxicos de *B. pertussis*. Somente por volta de 1930 há

dados de que vacinas celulares contra a coqueluche poderiam oferecer uma proteção estatisticamente significativa (LAPIN, 1943).

Somente por volta de 1940, após o desenvolvimento do teste de desafio intra-cerebral, em camundongos, com a *B. pertussis* viva, é que foi possível se estabelecer um padrão para a produção da vacina celular (KENDRICK *et al.*, 1947).

Apesar de um esquema de vacinação bem estabelecido (vide calendário de vacinação brasileiro – anexo B), a vacina atual contra a coqueluche não confere imunidade completa ou permanente. São descritos dois grupos suscetíveis que apresentam grande importância para o controle da doença: crianças menores de um ano que não completaram o esquema básico de vacinação e adolescentes e adultos que perderam a imunidade (HIDALGO, 2000), o que ainda caracteriza a doença como uma ameaça à saúde pública, mesmo com programas bem definidos de imunização na maioria dos países.

Adolescentes e adultos podem atuar como reservatórios para pertussis e freqüentemente são as fontes de infecção para crianças (LEE *et al.*, 2004). Em 2004 mais de 25 mil casos foram reportados nos Estados Unidos, o maior número desde 1959 (TIWARI *et al.*, 2005), sendo que a maior parte destes casos (34%) ocorreu em adolescentes (CDC, 2006). Um dos fatores que poderia explicar o aumento de pertussis em adultos e adolescentes seria a diminuição da imunidade após a vacinação ou mesmo após a doença (GÜRIS *et al.*, 1999).

Devido a esses eventos, modificações no método de imunização foram cogitadas em países como Brasil e Argentina, além de alguns países da Europa, na tentativa de corrigir as falhas na indução de imunidade permanente (FORSYTH *et al.*, 2005; WIRSING VON KONIG *et al.*, 2005).

Apesar do sucesso da vacinação por décadas, a coqueluche continua a ser uma doença problemática. Na década de 70 houve uma diminuição da cobertura vacinal na Suécia, Inglaterra e Japão, devido à reatogenicidade atribuída à vacina DTP celular (IVANOFF e ROBERTSON, 1997; SHAH e SHAH, 2003). Diversos efeitos colaterais da vacina DTP foram relatados, desde reações brandas e moderadas até severas complicações neurológicas (BARKIN e PICHICHERO, 1979; MILLER *et al.*, 1981; SCHMITT e WAGNER, 1993), assim como problemas locais e sistêmicos como eritema, formação de

abscesso, febre, letargia, anorexia, e crises de choro prolongado (.CHERRY *et al*, 1988; CODY *et al*, 1981).

A ocorrência dessas reações indesejáveis da vacina celular estimulou o desenvolvimento de uma vacina acelular contra pertussis, contendo componentes purificados e inativados da bactéria (por exemplo as vacinas da Tabela 1) (SATO *et al.*, 1984). Os estudos em busca de um componente acelular para *pertussis* iniciaram na época de 1950.

A vacina acelular atual começou a ser usada no Japão em 1981 (KIMURA e KUNO-SAKAI, 1988) e nos Estados Unidos a partir de 1991 como quarta e quinta doses no calendário de vacinação contra difteria-tétano-pertussis (MMWR, 1992), sendo ainda assim a vacina celular mais utilizada do que a vacina acelular. A vacina acelular também é utilizada como substituta da vacina celular em casos de pessoas com reações adversas aos componentes desta última.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos evidenciaram a atividade imunogênica e adjuvante da Cpn60r.

A proteína recombinante foi capaz de:

- induzir a produção de anticorpos anti-DTP;
- induzir a produção de anticorpos dos isotipos IgG1 e IgG2a, o que demonstra um possível balanço entre as respostas Th1 e Th2;
- induzir a produção das citocinas IL-6 e IFN- γ ;
- conferir uma proteção parcial ao desafio com a *B. pertussis* viva.

A proteína Cpn60r é uma boa candidata a adjuvante vacinal, podendo servir como substituta do hidróxido de alumínio numa vacina contra a *B. pertussis*.

Uma vez estabelecidas as condições experimentais ótimas para a produção e purificação da proteína recombinante e para os procedimentos de imunização, poderemos avaliar a Cpn60r em outros sistemas antigênicos e em concentrações variadas da proteína.

Certamente, outros estudos com relação à interação patógeno-hospedeiro ainda são necessários para um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na doença, de modo a permitir a melhoria e o desenvolvimento de novas vacinas.

REFERÊNCIAS

ALTINDIS, E.; TEFON, B. E.; YILDIRIM, V.; ÖZCENGİZ, E.; BECHER, D.; HECKER, M.; ÖZCENGİZ G. Immunoproteomic analysis of *Bordetella pertussis* and identification of new immunogenic proteins. **Vaccine**, v. 27, p. 542-548, 2009.

ALTMAN, A.; DIXON F. J. Immunomodifiers in vaccines. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v. 33, p. 301-343, 1989.

AUTHIER, F-J.; SAUVAT, S.; CHRISTOV, C.; CHARLOT, P.; RAISBECK, G.; PORON, M-F.; YIOU, F.; GHERARDI, R. Al(OH)₃-adjuvanted vaccine-induced acrophagic myofasciitis in rats is influenced by the genetoc background. **Neuromuscular Disorders**, v. 16, p. 347-352, 2006.

AYMÉ, G.; CAROFF, M.; CHABY, R.; HAEFFNER-CAVAILLON, N.; LEDUR, A.; MOREAU, M.; MUSEY, M.; MYNARD, M. C.; ROUMIANTZEFF, M.; SCHULZ, D.; SZABÓ, G. Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties. **Infect. Immun.**, v. 27, p. 739-745, 1980.

BALOUET, G.; BARET, M.; RELYVELD, E.; RAVISSE, P.; LEVADITI, J. Rôle des antigènes et des substances adjuvantes dans la réponse histologique au cours des granulomes expérimentaux ("granulome immunogène"). **Ann Anat Pathol** (Paris), v. 22, p. 159-170, 1977.

BARBIC, J.; LEEF, M. F.; BURNS, D. L.; SHAHIN, R. D. Role of gamma interferon in natural clearance of *Bordetella pertussis* infection. **Imfect. Immun.**, v.65, p. 4904-4908, 1997.

BARKIN, R. M.; PICHICHERO, M. E. Diphtheria-Pertussis-Tetanus vaccine: reactogenicity of commercial products. **Pediatrics**, v. 63, p. 256-260, 1979.

BEGFORS, E.; TROFFORS, B.; INEROT, A. Unexpectedly high incidence of persistent itching nodules and delayed hypersensitivity to aluminium in children after use of adsorbed vaccine from a single manufacturer. **Vaccine**, v. 22, p. 64-69, 2003.

BERZOFKY, I. M.; AHLERS, J. D.; BELYAKOV, I. M. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. **Nat Rev Immunol**; v. 1, p. 209-219, 2001.

BISGARD, K. Definitions. In: Centers for Disease Control and Prevention. **Guidelines for the Control of Pertussis Outbreaks**. Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, 2000.

BOMFORD, R. The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity. **Clin Exp Immunol**, v. 39, p. 435-441, 1980.

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

BURNS, D. L.; GOULD-KOSTKA, J. L.; KESSEL, M.; ARCINIEGA, J. L. Purification and immunological characterization of a GroEL-like protein from *Bordetella pertussis*. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 1417-1422, 1991.

CAINELLI GEBARA, V. C. B. **Estudo de componentes imunogênicos e adjuvantes da parede celular de *Bordetella pertussis***. 146f. Dissertação (Doutorado em Immunologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1994.

CAINELLI GEBARA, V. C. B.; RISOLÉO, L.; LOPES, A. P. Y.; DIAS, W. O.; FERREIRA, V.R.F.; QUINTILIO, W.; SILVA, W.D.; RAW, I. Adjuvant activity of two isolated proteins from *Bordetella pertussis*, In: **Immunology 2004**. 12. International Congress of Immunology and 4 Annual Conference of FOCIS. Bologna: Medimond S.r.l., 2004. P. 317-320.

CAINELLI GEBARA, V. C. B.; RISOLÉO, L.; LOPES, A. P. Y.; FERREIRA, V. R. F.; QUINTILIO, W.; LÉPINE, F.; SILVA, W. D.; RAW, I. Adjuvant and immunogenic activities of the 73 kDa N-terminal α -domain of BrkA autotransporter and Cpn60/60 kDa chaperonin of *Bordetella pertussis*. **Vaccine**, v. 25, p. 621-629, 2007.

CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Preventing tetanus, diphtheria and pertussis among adolescents: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization practices (ACIP). **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 55, p. 1-43, 2006.

CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases**. Atkinson W, Hamborsky J, McIntyre L, Wolfe S. Eds 10. ed 2. printing. Washington, DC. Public Health Foundation, 2008. p. 199-216.

CHABY, R.; CAROFF, M. Lipopolysaccharides of *Bordetella pertussis* endotoxin. In: Wardlaw AC, Parton R, eds. **Pathogenesis and immunity in pertussis**. New York: John Wiley, 1988. p. 247-271.

CHEERS, C.; GRAY, D.F. Macrophage behavior during the complaisant phase of murine pertussis. **Immunol.**, v. 17, p. 875-887, 1969.

CHERRY, J. D.; BRUNELL, P. A.; GOLDEN, G. S.; DAVID, T. K. Report of the task force on Pertussis immunization - 1988. **Pediatrics**; v. 81, p. 939-984, 1988.

CODY, C. L.; BARAFF, L. J.; CHERRY, J. D.; MARCY, S. M.; MANCLARK, C. R. Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children. **Pediatrics**; v. 68, p. 650-660, 1981.

COGNÉ, M.; BALLEST, J. J.; SCHMITT, C.; BIZZINI, B. Total and IgE antibody levels following booster immunization with aluminium adsorbed and non-adsorbed tetanus toxoid in humans. **Ann Allergy**, v. 54, p. 148-151, 1986.

COMOY, E. E.; CAPRON, A.; THYPHRONITIS, G. In vivo induction of types 1 and 2 immune responses against protein antigens. **Int Immunol**, v. 9, p. 523-531, 1997.

COX, J. C.; COULTER, A. R. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v. 15, p. 248-256, 1997.

DEL GIUDICE, G.; GERVAIX, A.; CONSTANTINO, P.; WYLER, C.A.; TOUGNE, C.; DE GRAEFF-MEEDER, E. R.; VAN EMBDEN, J.; VAN DER ZEE, R.; NENCIONI, L.; RAPPUOLI, R.; SUTER, S.; LAMBERT, P-H. Priming to heat shock proteins in infants vaccinated against pertussis. **J. Immunol**, v. 150, p. 2025-2032, 1993.

EDWARDS, K.; DECKER, M.D. Pertussis Vaccine. In: Plotkin, S.A.; Orenstein, W.A. **Vaccines**. 4. Ed. Philadelphia: Saunders, 2004. p. 471-528.

FERNANDEZ, R. C.; WEISS, A. A. Cloning and sequencing of the *Bordetella pertussis* *cpn10/cpn60* (*groESL*) homolog. **Gene**, v. 158, p. 151-152, 1995.

FINK, A. L. E-mediated protein folding. **Physiol Rev**, v. 79, p. 425-449, 1999.

FORSYTH, K.; NAGAI, M.; LEPTIC, A.; TRINDADE, E. Pertussis immunization in the global pertussis initiative international region: recommended strategies and implementation considerations. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 24, p. 593-7, 2005.

FREUND, J.; CASALS, J.; HOSMER, E. P. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil **Proc Soc Exp Biol Medical**, v. 37, p. 509-513, 1937.

FRIEDE, M.; AGUADO, M. T. Need for new vaccines formulations and potential of particulate antigens and DNA delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, p. 325-31, 2005.

GARCIA-PATOS, V.; PUJOL, R. M.; ALOMAR, A.; CISTERÓ, A.; CURELL, R.; FERNANDEZ-FIGUERAS, M. T.; DE MORAGAS, J. M. Persistent subcutaneous nodules in patients hyposensitized with aluminum-containing allergen extracts. **Arch Dermatol**, v. 131, p. 1421-1424, 1995.

GERMAN, D.; LEE, A. **Clinical guide pertussis**. New York: Haymarket Media Publication, 2008. 48p.

GHERARDI, R. K.; COQUET, M.; CHERIN, P.; BELEC, L.; MORETTO, P.; DREYFUS, P. A.; PELLISSIER, J-F.; CHARIOT, P.; AUTHIER, F-J. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. **Brain**, v. 124, p. 1821-1831, 2001.

GLENNY, A. T.; POPE, C. G.; WADDINGTON, H.; WALLACE, U. J. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. **J Path Bact**, v. 29, p. 31-40, 1926.

GOTO, N.; AKAMA, K. Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminum-adsorbed tetanus-toxoid. **Microbiol. Immunol.**, v. 26, p. 1121-1132, 1982.

GOTO, N.; AKAMA, K. Local histopathological reactions to aluminum-adsorbed tetanus toxoid. **Naturwissenschaften**, v. 71, p. 427-428, 1984.

GOTO, N.; KATO, H. Accumulation of ascites and increase in skin vascular permeability observed by injection of adsorbed diphtheria-purified pertussis-tetanus combined vaccine in guinea pigs. **Microbiol. Immunol.**, v. 35, p. 1143-1148, 1991.

GOTO, N.; KATO, H.; MAEYAMA, J.; ETO, K.; YOSHIHARA, S. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. **Vaccine**, v. 11, p. 914-918, 1993.

GREENBERG, J.; FLEMING, D. Increased efficiency of diphtheria toxoid when combined with pertussis vaccine. **Can J Public Health**, v. 38, p. 279-282, 1947.

GÜRIS, D.; STREBEL, P. M.; BARDENHEIER, B.; BRENNAN, M.; TACHDJIAN, R.; FINCH, E.; WHARTON, M.; LIVENGOOD, J. R. Changing epidemiology of pertussis in the United States: increased reported incidence among adolescents and adults. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, p. 1230-1237, 1999.

GUPTA, R. K. Aluminium compounds as vaccine adjuvants. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 32, p. 155-172, 1998.

GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 505-517, 2007.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, p. 1852-1858, 2002.

HIDALGO, N. T. R.; DA SILVA, C. R. C.; GONÇALVES, C. R.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. **Manual de Coqueluche – 2000**. São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), 2000. [s. pag.]

IVANOFF, B.; ROBERTSON, S. E. Pertussis: a worldwide problem. **Dev. Biol. Stand**, v. 89, p. 3-13, 1997.

JEFFERSON, T.; RUDIN, M.; PIETRANTONI, D. C. Adverse events after immunisation with aluminium containing DTP vaccine: systematic review of the evidence. **Lancet Infect Dis.**, v. 4, p. 84-90, 2004.

JENNER, E. An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccine, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cowpox. In: **Camac CNB, ed. Classics of Medicine and Surgery**, New York: Dover, 1959, p. 213-240.

KAECH, S. M; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. **Nat Rev Immunol**; v. 2, p. 251-262, 2002.

KAUFMANN, S. H. E.; VÄTH, U.; THOLE, J. E. R.; VAN EMBDEN, J. D. A.; EMMRICH, F. Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64 kilodalton protein. **Eur J Immunol**, v. 17, p. 351-357, 1987.

KAUFMANN, S. H. E.; SCHOEL, B.; VAN EMBDEM, J. D. A.; Koga, T.; WAND-WÜRTTENBERGER, A.; MUNK, M. E.; STEINHOFF, U. Heat-shock protein 60: implication for pathogenesis of and protection against bacterial infections. **Immunol. Rev**, v.121, p. 67-90, 1991.

KENDRICK, P. L.; ELDERING, G.; DIXON, M. K. Mouse protection tests in the study of pertussis vaccine: A comparative series using intracerebral route for challenge. **Am. J. Public Health**, v. 37, p. 803-810, 1947.

KIMURA, M; KUNO-SAKAI, H. Pertussis vaccines in Japan. **Acta Paediatr Jpn**, v. 30, p. 143-153, 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAPIN, J. H. Whooping Cough. Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1943. p. 43-48.

LAVIGNE, M. V.; CASTRO, M.; MATEO, N.; DELUCHI, S.; ATZORI, C.; PIUDO, L.; CALCAGNO, M.; BRERO, M. L.; MANGHI, M. Whole-cell *Bordetella pertussis* vaccine component modulates the mouse immune response to an unrelated soluble antigen. **Infect.**, v.4, p.815-820, 2002.

LEE, G. M.; LETT, S.; SCHAUER, S.; LEBARON, C.; MURPHY, T. V.; LIEU, T. A.; MASSACHUSETTS PERTUSSIS STUDY GROUP. Societal costs and morbidity of pertussis in adolescents and adults. **Clin. Infect. Dis.**, v. 11, p. 1572-1580, 2004.

LEEF, M.; ELKINS, K. L.; BARBIC, J.; SHAHIN, R. D. Protective immunity to *Bordetella pertussis* requires both Bcells and CD4+ T cells for key functions other than specific antibody production. **J. Exper. Med.**, v. 11, p. 1841-1852, 2000.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annu. Rev. Genet.**, v. 22, p. 631-677, 1988.

MADSEN, T. Vaccination against whooping cough. **JAMA**, v. 101, p. 187-188, 1933.

MAGUIRE, M.; COATES, A. R.; HENDERSON, B. Chaperonin 60 unfolds its secrets of cellular communication. **Cell Stress Chaperones**, v. 7, p. 317-329, 2002.

MAHON, B. P.; SHEAHAN, B. J.; GRIFFIN, F.; Murphy, G.; Mills, K. H. Atypical disease after *Bordetella pertussis* respiratory infection of mice with targeted disruptions of interferon-gamma receptor or immunoglobulin mu chain genes. **J. Exp. Med**, 186, p.1843-1851, 1997.

MANCINO, D.; OVARY, Z. Adjuvant effects of amorphous silica and of aluminium hydroxide on IgE and IgG1 antibody production in different inbred mouse strains. **Int Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 61, p. 253-258, 1980.

MARCIANI, D. J. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. **Drug Discov. Today**, v. 8, p. 934-943, 2003.

MARCOVISTZ, R.; MATOS, D. C.; GEORGINI, R. A.; SAKAUCHI, D. Potency controlo f diphteria component in adsorbed vaccines by in vitro neutralization tests. **Biologicals**, v. 30, n. 2, p. 105-112, 2002.

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. 68, p. 1383-1390, 2000.

MCGUIRK, P.; MILLS, K. H. A regulatory role for interleukin 4 in differential inflammatory responses in the lung following infection of mice primed with Th1- or Th2-inducing Pertussis vaccines. **Infect. Immun.**, v. 18, p. 326-382, 2005.

MILIAUSKAS, J. R.; MUKHERJEE, T.; DIXON, B. Postimmunization (vaccination) injection-site reactions. A report of four cases and review of the literature. **Am J Surg Pathol**, v. 17, p. 516-524, 1993.

MILLER, D. L.; ROSS, E. M.; ALDERSLADE, R.; BELLMAN, M. H.; RAWSON, N. S. B. Pertussis immunization and serious acute neurological illness in children. **Br. Med. J.**, v. 282, p. 1595-1599, 1981..

MILLS, K. H. G.; RYAN, M.; RYAN, E.; MAHON, B. P. A murine model in wich protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 594-602, 1998.

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

MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report). Pertussis vaccination: Acellular pertussis vaccine for reinforcing and booster use. **MMWR**, 41(RR-1), p. 1-10, 1992.

MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report). Pertussis vaccination: Acellular pertussis vaccine for reinforcing and booster use. **MMWR**, 41(RR-15), p. 1-5, 1992.

MRAK, E. R. Muscle granulomas following intramuscular injection. **Muscle Nerve**, v. 5, p. 637-639, 1982.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI).
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 16 maio 2007.

O'HAGAN, D. T.; VALIANTE, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nat Rev Drug Discov**; v. 2, p. 727-735, 2003.

OTT, G.; BARCHFELD, G. L.; CHERNOFF, D.; RADHAKRISHNAN, R.; VAN HOOGEVEST, P.; VAN NEST, G. MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. **Pharm. Biotechnol.**, v. 6, p. 277-296, 1995.

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

PASHINE, A.; VALIANTE, N. M.; ULMER, J. B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. **Nat Med Suppl**; v. 11, p. 563-568, 2005.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. **Immunol Cell Biol**; v. 82, p. 488-96, 2004.

POCKLEY, A. G. Heat shock proteins as regulators of the immune response. **Lancet.**, v. 362, p. 469-476, 2003.

PODDA, A.; DEL GIUDICE, G. MF59-adjuvanted vaccines: increased immunogenicity with an optimal safety profile. **Expert Rev Vaccines**, v. 2, p. 197-203, 2003.

RADOSEVIC, K.; RODRIGUEZ, A.; MINTARDJO, R.; TAX, D.; BENGTSSON, K. L.; THOMPSON, C.; ZAMBON, M.; WEVERLING, G. J.; UYTDEHAAQ, F.;

GOUDSMIT, J. Antibody and T-cell responses to a virosomal adjuvanted H9N2 influenza vaccine: impact of distinct additional adjuvants. **Vaccine**, v. 26, p. 3640-3646, 2008.

RAMOS, C. R. R.; ABREU, P. A. E.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.

RANFORD, J. C.; COATES, A. R. M.; HENDERSON, B. Chaperonins are cell-signaling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. **Expert Rev. Mol. Med.**, v. 2, n. 8, p. 1-17, 2000.

RANFORD, J. C.; HENDERSON, B. Chaperonins in disease: mechanisms, models, and treatments. **J. Clin. Mol. Pathol.**, v. 55, p. 209-213, 2002.

RISOLÉO, L. **Purificação e caracterização de uma fração solúvel de *Bordetella pertussis* e avaliação de sua atividade imunogênica e adjuvante**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), 58f, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2005.

SAKURAI, S.; KAMACHI, K.; KONDA, T.; KOMURO, K.; UCHIDA, T. Interferon- γ -mediated protection against intracerebral challenge with *Bordetella pertussis* in mice. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, v. 50, p. 35-43. 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning – a laboratory manual**, 2nd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, vol. 1-3.

SATO, Y; KIMURA, M; FUKUMI, H. Development of a pertussis component vaccine in Japan. **Lancet**, v. 1, p. 122-126, 1984.

SBIM (Sociedade Brasileira de Imunizações). **Informe Coqueluche**, n. 6, ano II, 2007.

SCHMITT, H. J.; WAGNER, S. Pertussis vaccines – 1993. **Eur. J. Pediatr.**, v. 152, p. 462-466, 1993.

SCHIRMBECK, R.; MELBER, K.; KUHROBER, A.; JANOWICZ, Z. A.; REIMANN, J. Immunization with soluble hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. **J Immunol**, v. 152, p. 1110-9, 1994.

SEALEY, P. G.; SOUTHERN, E.M. Gel electrophoresis of DNA. In: Rickwood D e Hames BD. **Gel electrophoresis of nucleic acids: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1982. p. 39-76.

SHAH, R. C.; SHAH, A. R. Pertussis vaccine controversies and acellular pertussis vaccine. **Indian. J. Pediatr.**, v. 70, n. 6, p. 485-488, 2003.

SHER, A.; COFFMAN, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 385-409, 1992.

SIEGRIST, C. A. Vaccine adjuvants and macrophagic myofasciitis. **Bull. Acad. Natl. Med.**, v. 187, p. 1508-1511, 2004.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. Advance in vaccine adjuvants. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 1075-1081, 1999.

SOUZA-MATOS, D. C.; MARCOVISTZ, R.; CABELLO, P. H.; GEORGINI, R. A.; SAKAUCHI, D.; DA SILVA, L. L. Immunogenicity test of tetanus component in adsorbed vaccines by toxin binding inhibition test. **Memórias Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 909-913, 2002.

STEWART, G. R.; YOUNG, D. B. Heat-shock proteins and the host-pathogen interaction during bacterial infection. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 16, p. 506-510, 2004.

STORNI, T.; KÜNDIG, T. M.; SENTI, G.; JOHANSEN, P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev**; v. 57, p. 333-355, 2005.

TIWARI, T.; MURPHY, T. V.; MORAN, J. Para o National immunization program, Centers for Disease Control and Prevention. Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis. **MMWR Recomm Rep.**, v. 54(RR-14), p. 1-16, 2005.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TSAN, M.; GAO, B. Cytokine function of heat shock proteins. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 286, p. C739-C744, 2004.

VAN EDEN, W.; KOETS, A.; VAN KOOTEN, P.; PRAKKEN, B.; VAN DER ZEE, R. Immunopotentiating heat shock proteins: negotiators between innate danger and control of autoimmunity. **Vaccine**, v. 21, p. 897-901, 2003.

VAN EDEN, W.; VAN DER ZEE, R.; PRAKKEN, B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 318-330, 2005.

VOGEL, F. R.; HEM, S. L. Immunologic adjuvant. In: Plottkin SA, Oresteina WA, Offit PA. USA: **Vaccine**, p. 69-79. 2004.

WARDLAW, A. C.; PARTON, R. *Bordetella pertussis* toxins. **Pharmac. Ther.**, v. 19, p. 1-53, 1983.

WADMAN, M. Race is on for flu vaccine. **Nature.**, v. 438, n. 7064, p. 23, 2005.

WARREN, H. S.; VOGEL, F. R.; CHEDID, L. A. Status of immunological adjuvants. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 369-388, 1986.

WIRSING VON KONIG, C. H.; CAMPIS-MARTI, M.; FINN, A.; GUIZO, N.; MERTSOLA, J.; LIESE, J. Pertussis immunization in the global pertussis initiative international region: recommended strategies and implementation considerations. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 24, p. 93-97, 2005.