

**ELIANE PESSOA DA SILVA**

**Avaliação da resposta imune contra *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* em amostras de sangue humano provenientes de indivíduos de diferentes grupos etários**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

**São Paulo**

**2021**

**ELIANE PESSOA DA SILVA**

**Avaliação da resposta imune contra *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* em amostras de sangue humano provenientes de indivíduos de diferentes grupos etários**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

**Área de concentração:** Biotecnologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite

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

**São Paulo**

**2021**

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Silva, Eliane Pessa da

Avaliação da resposta imune contra Bordetella pertussis e Bordetella parapertussis em amostras de sangue humano provenientes de indivíduos de diferentes grupos etários / Eliane Pessa da Silva; orientadora Luciana Cezar de Cerqueira Leite. -- São Paulo, 2021.

148 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Coqueluche. 2. Vacina. 3. Bordetella pertussis. 4. Bordetella parapertussis. I. Leite, Luciana Cezar de Cerqueira, orientador. II. Título.

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

Candidata: Eliane Pessoa da Silva

Titulo da Tese: **Avaliação da resposta imune contra *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* em amostras de sangue humano provenientes de indivíduos de diferentes grupos etários**

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou a candidata:

**Aprovada**                       **Reprovada**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

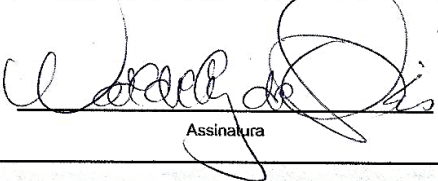
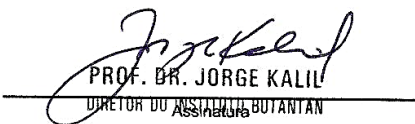
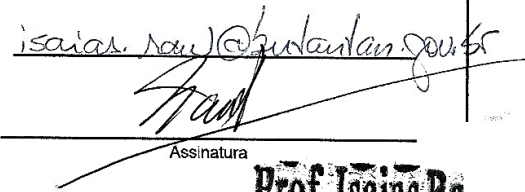
Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



## FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: Avaliação de resposta imune contra Bordetella pertussis e Bordetella parapertussis em amostras de sangue humano provenientes de indivíduos de diferentes grupos etários		2. Número de Participantes da Pesquisa: 1.500	
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas			
<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL</b>			
5. Nome: Waldely de Oliveira Dias			
6. CPF: 013.650.158-31		7. Endereço (Rua, n.º): CAMBERRA VILA FORMOSA 233, ap. 122 SAO PAULO SAO PAULO 03357010	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO		9. Telefone: (11) 2671-7315	10. Outro Telefone:
		11. Email: waldely.dias@butantan.gov.br	
12. Cargo: <i>Pesquisadora Científica VI</i>			
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: <u>11/06/2014</u>		 Assinatura	
<b>INSTITUIÇÃO PROPONENTE</b>			
13. Nome: Instituto Butantan		14. CNPJ: 61.821.344/0001-56	15. Unidade/Órgão:
16. Telefone:		17. Outro Telefone:	
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: <u>PROF. DR. JORGE KALIL</u>		CPF: <u>177.516.590-68</u>	
Cargos/Funções: <u>DIRETOR DO INSTITUTO BUTANTAN</u>			
Data: <u>18/06/2014</u>		 PROF. DR. JORGE KALIL DIRETOR DO INSTITUTO BUTANTAN Assinatura	
<b>PATROCINADOR PRINCIPAL</b>			
18. Nome: 11290 BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONOMICO E SOCIAL		19. Telefone: (21) 2172-7447	20. Outro Telefone:
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.			
Nome: <u>ISAÍAS RAW</u>		CPF: <u>045360538-91</u>	
Cargo/Função: <u>Coordenador Projeto Budes</u>		Email: <u>isaias.raw@butantan.gov.br</u>	
Data: <u>18/06/2014</u>		 Assinatura <b>Prof. Isaias Raw</b>	

Você está em: Pesquisador &gt; Gerir Pesquisa &gt; Detalhar Projeto de Pesquisa

## DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

## Dados do Projeto de Pesquisa

**Título da Pesquisa:** Avaliação de resposta imune contra Bordetella pertussis e Bordetella parapertussis em amostras de sangue humano provenientes de indivíduos de diferentes grupos etários  
**Pesquisador:** Waldely de Oliveira Dias  
**Área Temática:**  
**Versão:** 1  
**CAAE:** 33687114.8.0000.0076  
**Submetido em:** 17/07/2014  
**Instituição Proponente:** Instituto Butantan  
**Situação:** Aprovado  
**Localização atual do Projeto:** Pesquisador Responsável  
**Patrocinador Principal:** BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONOMICO E SOCIAL



## Documentos Postados do Projeto

Tipo Documento	Situação	Arquivo	Postagem
Parecer Consubstanciado do CEP	A	<a href="#">PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_728275.pdf</a>	25/07/2014 11:43:48
Interface REBEC	A	<a href="#">PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml</a>	17/07/2014 12:30:32
Informações Básicas do Projeto	A	<a href="#">PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_348350.pdf</a>	17/07/2014 12:27:20
Projeto Detalhado	A	<a href="#">Projeto detalhado - Bordetella pertussis e Bordetella parapertussis.pdf</a>	17/07/2014 12:11:39
Declarações Diversas	A	<a href="#">Autorização Instituição co-participante HSJ.pdf</a>	17/07/2014 12:09:50
TCLE - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	A	<a href="#">TCLE com alterações.pdf</a>	10/07/2014 16:53:05
Folha de Rosto	A	<a href="#">Folha de rosto assinada.pdf</a>	23/06/2014 19:29:57

Listar Todos ▶

## Documentos - Coparticipante

Tipo Documento	Situação	Arquivo	Postagem
Parecer Consubstanciado do CEP	A	<a href="#">PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_728400.pdf</a>	25/07/2014 12:19:32

Aprovados:0/0

Não aprovado:0/0

Pendente:0/0



São Paulo, 29 de novembro de 2021.

*Il<sup>mo</sup>(a). S<sup>r</sup>(a).*

***Dra. Waldely de Oliveira Dias***  
***Pesquisador(a) responsável***  
Instituto Butantan

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “Avaliação da resposta imune contra Bordetella pertussis e Bordetella parapertussis em amostras de sangue humano provenientes de indivíduos de diferentes grupos etários”

**Equipe de pesquisa:** Eliane Pessoa da Silva, Luciana Cezar de Cerqueira Leite, Sandra Josefina Ferraz Ellero Grisi, Ana Maria Ulhoa Escobar, Ricardo Palacios, Alexander Roberto Precioso, Isaías Raw, João Luiz Miraglia, Antonio Mauricio Matsuda, Maria Helena Valente, Filumena Maria da Silva Gomes, Fredy Amable Paredes Buitron

**CAAE:** 33687114.8.0000.0076

**Registro CEP-HU/USP:** 1400/14

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, no dia 29 de novembro de 2021, considerou APROVADA a Emenda N° 1866695\_E2, datada de 26/11/2021, referente à solicitação de inclusão de duas pesquisadoras no Projeto de Pesquisa: Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite e Eliane Pessoa da Silva.

Aprovada também a prorrogação do prazo de termino do estudo para 31/12/2021.

Atenciosamente,



***Dr. Mauricio Seckler***  
***Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa***  
***Hospital Universitário da Universidade de São Paulo***

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da resposta imune humoral e celular em camundongos vacinados com a vacina celular Plow (menor teor de LPS) contra Bordetella pertussis.", protocolada sob o CEUA nº 3469110820 (ID 002161), sob a responsabilidade de **Luciana César de Cerqueira Leite** e equipe; *Eliane Pessoa da Silva; Dunia Rodriguez Rodriguez Soto; Alex Issamu Kanno; Monalisa Martins Trentini; Lazaro Moreira Marques Neto* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 16/09/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of the humoral and cellular immune response in mice vaccinated with the Plow cellular vaccine (lower LPS content) against Bordetella pertussis", utilizing 60 Isogenics mice (60 females), protocol number CEUA 3469110820 (ID 002161), under the responsibility of **Luciana César de Cerqueira Leite** and team; *Eliane Pessoa da Silva; Dunia Rodriguez Rodriguez Soto; Alex Issamu Kanno; Monalisa Martins Trentini; Lazaro Moreira Marques Neto* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 09/16/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 09/2020 a 09/2021

Área: Centro de Biotecnologia

Origem: Biotério Central

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Fêmeas

idade: 4 a 8 semanas

N: 60

Linhagem: Balb/c

Peso: 20 a 25 g

Local do experimento: Os experimento serão realizados no biotério do Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas em salas com exaustor, controle de temperatura e umidade e com portas com pressão negativa. Estas salas ficam dentro de uma área NB2

São Paulo, 01 de fevereiro de 2021

Maria Leonor Sarno de Oliveira  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan

Nancy Oguiura  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan





**GOVERNO DO ESTADO  
DE SÃO PAULO**

**Secretaria de Estado da Saúde**  
Coordenadoria de Ciência, Tecnologia e  
Insumos Estratégicos de Saúde  
**Instituto Butantan**



Ofício CEUAIB nº 09/2021

São Paulo, 4 de novembro de 2021.

Ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia  
USP/Instituto Butantan/ IPT

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto "Avaliação da resposta imune humoral e celular em camundongos vacinados com a vacina celular Plow (menor teor de LPS) contra *Bordetella pertussis*" (CEUAIB nº 3469110820) foi analisado e aprovado para experimentação de animais no Instituto Butantan. Este projeto é parte da tese de Doutorado "Avaliação da resposta imune contra *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* em amostras de sangue humano provenientes de indivíduos de diferentes grupos etários" desenvolvido pela aluna Eliane Pessoa da Silva (n. USP 7298746), sob orientação da Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite.

Atenciosamente,

Maria Leonor Sarno de Oliveira  
Coordenadora CEUAIB

---

Instituto Butantan  
Avenida Vital Brasil, 1500  
Butantã, São Paulo/SP  
CEP: 05503-900

[www.butantan.gov.br](http://www.butantan.gov.br)

Centro Administrativo  
Avenida da Universidade, 210  
Butantã, São Paulo/SP  
CEP: 05508-040

**SÃO PAULO**  
GOVERNO DO ESTADO

*Aos meus pais, Manoel e Ana e ao meu esposo  
Anderson, pelo amor, incentivo e apoio em  
todas as minhas escolhas e decisões.*

## **AGRADECIMENTOS**

Meu agradecimento especial vai para os meus pais, Manoel e Ana, que infelizmente não tiveram a oportunidade de estudar, mas já na minha infância me fizeram perceber que a única via para se libertar das amarras da exploração e da invisibilidade, em uma sociedade excludente, seria por meio da educação. Se hoje consegui vencer uma barreira social e me tornar a primeira da família com um título de graduação, mestrado e o doutorado, devo muito a eles.

Não posso dizer que cheguei até aqui somente por meus méritos, já em um país cheio de desigualdades sociais como o nosso, oferecer equidade à todos os cidadãos ainda está longe de ser uma realidade. Mas é fundamental existirem políticas de incentivo a permanência de alunos com vulnerabilidade sócio-econômica em cursos de graduação de Instituições públicas de ensino, pois foi a partir da existência de tais políticas que eu pude permanecer na graduação e, conseqüentemente, ter chegado até aqui, nesta longa e fascinante jornada. Assim, não poderia deixar de agradecer todos os auxílios que recebi ao longo a minha vida acadêmica, desde a moradia estudantil, bolsa de extensão universitária e auxílios de instituições de fomento à pesquisa como o CNPq e a CAPES!

Também agradeço ao meu esposo Anderson por todo seu apoio, paciência, amor e companheirismo!

Agradeço imensamente à Doutora Waldely Dias que me acolheu e confiou em meu trabalho, por todo o aprendizado que obtive ao longo desses dez anos sob sua orientação que resultou no meu amadurecimento profissional e acadêmico.

Agradeço ao Doutor Ivo Lebrun pela orientação na fase inicial deste estudo.

A minha eterna gratidão à Doutora Luciana Leite pela empatia, acolhimento e orientação nessa fase final do trabalho!

Agradeço às Doutoradas Filumena e Maria Helena, duas profissionais incríveis que tive a honra conhecer e de ter trabalhado juntas neste projeto! Minha eterna gratidão também por terem me ajudado em um dos momentos mais delicados da minha vida.

Minha admiração e gratidão aos funcionários do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo que me acolheram e me auxiliaram nas coletas: Lilian, Vera, Daniela, Ana Paula, João, Artalei, Ricardo, Alzira, Karen e Fabiana!

Agradeço aos 1500 voluntários que contribuíram com suas amostras de sangue para que parte deste estudo fosse concluído, em especial ao meu primeiro voluntário Ricardo, e a minha última voluntária, a pequena Esther de 5 aninhos que permitiu a coleta de sangue com um lindo sorriso!

Agradeço aos pesquisadores doutores: Ivan, Giovana, Alexandre, Martha e Professor Isaias Raw pelo apoio técnico e científico. Em especial, agradeço aos doutores: Dunia, Monalisa, Alex e Lazaro, pois, os seus conhecimentos científicos, profissionalismo e auxílio nos delineamentos foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Agradeço aos bioestatísticos José Patane e em especial ao Cadu não somente pelo auxílio nas análises estatísticas, mas também por todos os ensinamentos que levarei para a vida.

Aos meus queridos colegas de laboratório Débora, Rebeca, Marcos e Bruna, pelo apoio em todos os momentos!

Agradeço às amigas que cultivei ao longo dessa jornada: Priscila, Pamela, Mírian, Ana Fabíola, Andrea Goes, Andrea Ichizawa, Luciana, Stefani e Tais. A amizade e companheirismo de vocês foram essenciais para que essa etapa fosse concluída.

Aos funcionários do antigo Centro de Biotecnologia: Marisa, Eulália, Carol, Toninho, Marlene, Arleide, Maximo, Marisa (biotério) e Darlene. Em especial a minha companheira e incentivadora Nídia, que além de todo o apoio técnico, também compartilhou comigo muitos dos seus conhecimentos e experiências profissionais.

Sou muito grata às secretárias do programa de Pós-graduação Fabia e Eliane, por todo apoio técnico.

Agradeço aos funcionários da GUIMA pelo apoio técnico.

Aos meus Pets que sempre permaneceram ao meu lado em todos os momentos e madrugadas em que estive escrevendo esta tese, em especial aos meus cinco gatinhos: Tom, Nega, Preto, Meigo e Branquelinho.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, e a Universidade de São Paulo, pelo apoio técnico, administrativo e acadêmico.

Obrigada!

*"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001*

*"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"*

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”  
(**Guimarães Rosa, *Grande Sertão: Veredas***).

“Educação não transforma o mundo. Educação muda pessoas. Pessoas transformam o mundo” (**Paulo Freire**).

## RESUMO

Silva, E. P.: **Avaliação da resposta imune contra *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* em amostras de sangue humano provenientes de indivíduos de diferentes grupos etários.** 2021. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A coqueluche é uma doença causada pela bactéria *B. pertussis* (Bp) ou *B. parapertussis* (Bpp). Está entre as maiores causas de morbidade do mundo, com estimativa de ocorrência de 16 milhões de casos e aproximadamente 195.000 mortes anuais. Estudos têm mostrado maiores incidências em adolescentes e adultos jovens, tendo como possível causa o declínio da imunidade vacinal, tornando-os susceptíveis e prováveis transmissores da doença para populações mais vulneráveis, o que explica o aumento de casos em crianças menores de 6 meses de idade, ainda não completamente imunizadas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um estudo epidemiológico presuntivo da circulação de Bp ou Bpp, baseado na resposta imune, em amostras de sangue de voluntários. Além disso, demonstrar, em um modelo murino, se a memória imunológica após a imunização com uma vacina celular de Bp (WCP) persiste na proteção contra coqueluche, e investigar se um reforço com WCP, vacina acelular (APV) ou uma nova candidata vacinal com menor teor de LPS (Plow) induz uma resposta protetora significativa em relação à ausência do reforço. Para isso, o estudo foi conduzido em duas etapas. Primeiro, avaliou-se a resposta imune humoral e celular de 1500 amostras de sangue de voluntários de seis faixas etárias (5-9; 10-14; 15-19; 20-39; 40-59;  $\geq 60$  anos). Soros de crianças de 5-9 anos apresentaram altos níveis de anticorpos IgG anti-Toxina pertussis (PT) e de citocinas de perfil de resposta Th1, em função do estímulo com WCP, além de menores níveis de IgG anti-Bpp, sugerindo a persistência da imunidade vacinal para Bp e a proteção cruzada da DTP para Bpp. Resultados similares em adolescentes de 10-14 anos sugerem um resquício da imunidade vacinal nesta faixa etária. Altos níveis de IgG anti-PT também foram observados na faixa etária de 15-19 anos e, segundo a literatura, é provável que a imunidade natural tenha se sobreposto à vacinal, indicando exposição recente devido à alta circulação da bactéria. Já soros de adultos e idosos apresentaram os menores níveis de IgG anti-PT, tornando-os mais susceptíveis ao contágio, sendo os adultos de 20-39 os mais prováveis transmissores. Na segunda etapa, foram definidos cinco grupos de camundongos BALB/c, quatro que receberam

duas doses quinzenais da vacina WCP, além de um grupo salina. Na 25ª semana, três grupos receberam um reforço com WCP, APV ou Plow e um grupo não recebeu o reforço. As análises de memória imunológica e de proteção indicaram que animais sem reforço vacinal apresentaram baixas frequências de linfócitos T (CD4 e CD8) e de células B. Em contrapartida, o reforço com APV ou Plow induziu uma maior resposta imune, mediada por linfócitos T e células B, com eliminação completa da bactéria no LBA e níveis estatisticamente inferiores de bactérias nos pulmões. Conclui-se que o reforço vacinal é indicado pelo menos aos adolescentes ou adultos jovens, maiores possíveis transmissores da bactéria, e que a vacina Plow pode ser uma boa alternativa, devido a sua baixa reatogenicidade e o seu baixo custo de produção em relação à APV.

**Palavras chaves:** Coqueluche. Vacina. *Bordetella pertussis*. *Bordetella parapertussis*.



## ABSTRACT

Silva, E. P.: **Immunological evaluation response against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in blood samples from individuals of different age groups.** 2021. 148 f. Ph. D thesis in Science - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Pertussis, also known as whooping cough, is an infectious disease caused by *B. pertussis* (Bp) or *B. parapertussis* (Bpp). It is among the main causes of morbidity worldwide, with an estimated incidence of 16 million cases with approximately 195,000 deaths/year. Studies have shown high occurrence in adolescents and young adults, which is attributed to the immunization wane received in childhood, making them susceptible and possible transmitters of pertussis to more vulnerable populations, and explaining the increase of cases in children under six months of age, who has not yet been fully immunized. In this context, we aimed to develop a presumptive epidemiological study of the circulation of Bp or Bpp, based on the immune response, in blood samples of healthy volunteers. Furthermore, to evaluate, in a murine model, if the immunological memory after immunization with a cellular Bp vaccine (WCP) persists in protection against pertussis, and to investigate whether a booster with WCP, acellular vaccine (APV), or a new vaccine candidate with low LPS content (Plow) induces an increased protective response compared to the absence of booster. For this, the study consisted of two phases. First, the humoral and cellular immune response of 1,500 blood samples of volunteers separated into six groups was evaluated (5-9; 10-14; 15-19; 20-39; 40-59;  $\geq 60$  years). Serum from children aged 5-9 years showed high levels of Pertussis Toxin (PT)-IgG and Th1 response profile cytokines as a result of the stimulation with WCP, in addition to lower levels of Bpp-IgG, suggesting persistence of vaccine-induced immunity to Bp and cross-protection of DTP against Bpp. Similar results in adolescents aged 10-14 years also suggest a residual vaccine immunity in this group. High levels of PT-IgG were also observed in the group aged 15-19-years. According to the literature, it is expected that natural immunity overcame the vaccination, indicating recent exposure to the bacterium due to its high circulation. Sera from adults and older people had the lowest PT-IgG levels, making them more susceptible to infection, with adults aged 20-39-years being probably the main transmitters. In the second phase of the study, five groups of BALB/c were defined: four received two doses of WCP vaccine with fifteen days interval

between the doses and the saline group (control). At week 25, three groups received a booster with WCP, APV, or Plow, and one group did not receive any booster. Immunological memory and protection assay indicated that animals without booster had lower T lymphocytes (CD4 and CD8) and B cells levels. In contrast, boosting with APV or Plow induced a higher and significant immune response, mediated by T- and B- cells, with complete clearance of Bp in BAL and significantly lower levels of the bacterium in the lungs. The conclusion is that the booster vaccine is indicated at least for adolescents or young adults, the main possible transmitters of the Bp, and that the Plow vaccine can be a good alternative due to its low reactogenicity and low production cost compared to APV.

**Keywords:** Whooping cough. Vaccine. *Bordetella pertussis*. *Bordetella parapertussis*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática que descreve a ação do sistema de dois componentes BvgA/S.....	<b>28</b>
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática da estrutura química do LPS .....	<b>32</b>
<b>Figura 3:</b> Estruturas do Lipídio A de <i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> e <i>B. bronchiseptica</i> . .....	<b>32</b>
<b>Figura 4:</b> Coeficiente de Incidência da população por coqueluche e cobertura vacinal. ....	<b>43</b>
<b>Figura 5:</b> Distribuição do percentual de casos confirmados de coqueluche segundo faixa etária em meses/anos .....	<b>44</b>
<b>Figura 6:</b> Comparativo sobre a Incidência de coqueluche no Brasil e no Estado de São Paulo, 2015 a 2020.....	<b>45</b>
<b>Quadro 1:</b> Esquema de formulações vacinais.....	<b>57</b>
<b>Figura 7:</b> Esquema de imunização, sangria, coleta de baço e linfonodo para avaliação da resposta imune.....	<b>57</b>
<b>Figura 8:</b> Esquema de imunização, sangria, infecção intranasal, lavado broncoalveolar (LBA) e coleta de pulmão para avaliação de proteção.....	<b>62</b>
<b>Figura 9:</b> Medianas da concentração de anticorpos IgG anti-PT (UI/mL) em soro de voluntários distribuídos por diferentes faixas etárias.....	<b>66</b>
<b>Figura 10:</b> Média de títulos de anticorpos IgM anti-PT (ABS 492) em soro de voluntários distribuídos por diferentes faixas etárias.....	<b>67</b>
<b>Figura 11:</b> Cruzamento de dados entre concentrações de IgG anti-PT (UI/mL) das análises obtidas a partir de soros da população do presente estudo com porcentagem de casos confirmados de coqueluche no período de 2015 a 2019 por faixa etária (SINAN/DATASUS) .....	<b>68</b>
<b>Figura 12:</b> Distribuição temporal de soroprevalência por pertussis entre diferentes faixas etárias.....	<b>69</b>
<b>Figura 13:</b> Avaliação de títulos de IgG anti-Bpp entre diferentes faixas etárias.....	<b>72</b>
<b>Figura 14:</b> Avaliação de títulos de IgM anti-Bpp entre diferentes faixas etárias.....	<b>73</b>
<b>Figura 15:</b> Indução de citocinas Th1/Th2/Th17 em células do sangue total de voluntários de diferentes faixas etárias, em resposta ao estímulo com vacina WCP.....	<b>75</b>

<b>Figura 16:</b> Cinética da síntese de anticorpos IgG anti-PT após imunização primária com a vacina WCP por via <i>i.p.</i> .....	<b>76</b>
<b>Figura 17:</b> Produção de citocinas nos esplenócitos de animais que receberam 2 doses de WCP e diferentes reforços – Estímulo com <i>B. pertussis</i> .....	<b>78</b>
<b>Figura 18:</b> Produção de citocinas nos esplenócitos de animais que receberam 2 doses de WCP e diferentes reforços – estímulo com Toxina Pertussis.....	<b>79</b>
<b>Figura 19:</b> Estratégia de definição da janela de identificação ( <i>gate</i> ) para a análise da população de linfócitos T CD4 e T CD8 e subpopulações de Células T de Memória, T Efetoras e T Naïve.	<b>81</b>
<b>Figura 20:</b> Avaliação fenotípica da frequência (%) de subpopulações de linfócitos T CD4 Naïve, T CD4 de memória Central e T CD4 efetores em células do baço e linfonodo de animais 7 semanas após imunização de reforço.....	<b>83</b>
<b>Figura 21:</b> Avaliação fenotípica da frequência (%) de subpopulações de Linfócitos T CD8 Naïve, T CD8 de memória Central e T CD8 efetores em células do baço e linfonodo de animais 7 semanas após imunização de reforço.....	<b>85</b>
<b>Figura 22:</b> Estratégia de definição da janela de identificação ( <i>gate</i> ) para a análise da população de linfócitos B, subpopulação de Linfócitos B de memória e expressão de MHC-II por intensidade média de fluorescência (IMF) .....	<b>87</b>
<b>Figura 23:</b> Avaliação de subpopulação de Linfócito B de memória e expressão do MHC-II em células do baço e linfonodo de animais 7 semanas após imunização de reforço.....	<b>88</b>
<b>Figura 24:</b> IgG Total, IgG1 e IgG2a.....	<b>90</b>
<b>Figura 25:</b> Recrutamento de células ao LBA 7 dias após infecção intranasal com <i>B. pertussis</i> em grupos de camundongos após reforço vacinal.....	<b>92</b>
<b>Figura 26:</b> Produção de citocinas no LBA 7 dias após infecção intranasal com <i>B. pertussis</i> em grupos de camundongos após reforço vacinal.....	<b>94</b>
<b>Figura 27:</b> Proteção dos animais induzida por reforço vacinal tardio após infecção intranasal por <i>B. pertussis</i> .....	<b>95</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Distribuição da Incidência de casos de coqueluche por faixa etária no período de 2015-2020.....	<b>44</b>
<b>Tabela 2:</b> Descrição dos anticorpos monoclonais para fenotipagem dos linfócitos T.....	<b>60</b>
<b>Tabela 3:</b> Descrição dos anticorpos monoclonais para fenotipagem dos linfócitos B.....	<b>61</b>
<b>Tabela 4:</b> Distribuição por faixa etária/gênero de amostras de sangue de voluntários coletadas entre 2015-2019 – HU/USP – São Paulo.....	<b>65</b>
<b>Tabela 5:</b> Análise de Regressão logística multivariada associada a prevalência positiva (> 40 UI/mL) de anticorpos IgG anti-PT com indicativo de contato com recente por pertussis nos últimos 12 meses ou com possível infecção recente em diferentes faixas etárias.....	<b>70</b>
<b>Tabela 6:</b> Análise de Regressão Logística multivariada para variáveis demográficas associadas ao indicativo de soroprevalência positiva para IgG anti-PT.....	<b>71</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**ACT**, Adenilato ciclase

**APC**, Células apresentadoras de antígenos

**APV**, Vacina pertussis acelulares

**CBA**, do inglês “*cytometric beads array*”

**CD**, *Cluster of differentiation* (designação de grupos)

**CD4**, Molécula marcadora de células T auxiliar

**CD8**, Molécula marcadora de células T citotóxica

**CEUAIB**, Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan

**ConA**, Concanavalina A

**CRIES**, Centros de Referências para Imunobiológicos Especiais

**DTP**, Vacina tríplice bacteriana - difteria, tétano e pertussis celular

**DTPa**, Vacina tríplice bacteriana com componente pertussis acelular

**DTPlow**, Vacina Plow combinada com os toxóides tetânico e diftérico

**ECDC**, *European Centre for Disease Prevention and Control*

**FHA**, Hemaglutinina filamentosa

**FITC**, Isotiocianato de fluoresceína

**HB**, Hepatite B recombinante

**IFN- $\gamma$** , Interferon-gama

**IL**, Interleucina

**LBA**, Lavado Broncoalveolar

**LOS**, Lipooligossacarídeo

**LPS**, Lipopolissacarídeo

**MHC**, Complexo de histocompatibilidade principal

**mL**, mililitro

**mM**, milimolar

**NaCl**, Cloreto de sódio

**NIBSC**, *National Institute for Biological Standards and Control*

**NK**, Células *Natural Killer*

**NO**, Óxido Nítrico

**OMS**, Organização Mundial da Saúde

**PBS**, Tampão fosfato-salino

**PCR**, Reação em cadeia da polimerase

**Plow**, Vacina Pertussis celular com menor teor de LPS (lipopolissacarídeo).

**PNI**, Programa Nacional de Imunização

**PRN**, Pertactina

**PT**, Toxina pertussis

**RPMI**, meio de cultura desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute

**SFB**, Soro fetal bovino

**SINAN**, Sistema de Informação de Agravos de Notificação

**SINASC**, Sistema de Informação sobre Nascidos Vivos

**SNP**, *single nucleotide polymorphism*

**SUS**, Sistema Único de Saúde

**TCT**, Toxina dermonecrótica

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

**TLR4**, *Toll-like 4*

**TNF- $\alpha$** , Fator de necrose tumoral alfa

**Treg**, Linfócito T regulador

**UFC**, Unidade formadora de colônia

**UI**, Unidade internacional

**UO**, Unidades opaciométricas

**vag**, *virulence-activated gene*

**vrg**, *virulence-repressed gene*

**WCP**, Vacinas pertussis celular

**$\mu\text{g}$** , Micrograma

**$\mu\text{L}$** , Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>1.1</b>	<b>AGENTE CAUSAL DA COQUELUCHE</b> .....	<b>26</b>
<b>1.2</b>	<b>REGULAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA</b> .....	<b>27</b>
<b>1.3</b>	<b>FATORES DE VIRULÊNCIA</b> .....	<b>28</b>
<b>1.4</b>	<b>PATOGÊNESE</b> .....	<b>33</b>
<b>1.5</b>	<b>DIAGNÓSTICO</b> .....	<b>34</b>
<b>1.6</b>	<b>TRATAMENTO</b> .....	<b>37</b>
<b>1.7</b>	<b>IMUNIDADE NATURAL</b> .....	<b>37</b>
<b>1.8</b>	<b>VACINAS PERTUSSIS</b> .....	<b>38</b>
<b>1.9</b>	<b>VACINA PERTUSSIS LOW (PLOW)</b> .....	<b>41</b>
<b>1.10</b>	<b>EPIDEMIOLOGIA</b> .....	<b>41</b>
<b>1.11</b>	<b>RESSURGÊNCIA DA COQUELUCHE</b> .....	<b>46</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS</b> .....	<b>50</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>DELINEAMENTO PARA ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO COM AMOSTRAS DE SANGUE HUMANO</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1.1</b>	<b>COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS HUMANAS</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1.2</b>	<b>AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1.2.1</b>	<b>Quantificação de IgG anti-PT</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1.2.2</b>	<b>Quantificação de IgG anti-Bpp</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1.2.3</b>	<b>Quantificação de IgM anti-PT</b> .....	<b>54</b>
<b>3.1.2.4</b>	<b>Quantificação de IgM anti-Bpp</b> .....	<b>54</b>
<b>3.1.3</b>	<b>AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM AMOSTRAS DE SANGUE DE VOLUNTÁRIOS</b> .....	<b>54</b>
<b>3.1.3.1</b>	<b>Avaliação de citocinas th1/th2/th17 em amostras de sangue de voluntários</b> .....	<b>54</b>
<b>3.1.4</b>	<b>SOROPREVALÊNCIA</b> .....	<b>55</b>
<b>3.2</b>	<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM MODELO MURINO</b> .....	<b>56</b>
<b>3.2.1</b>	<b>AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL E MEMÓRIA IMUNOLÓGICA</b> .....	<b>56</b>
<b>3.2.1.1</b>	<b>Esquema de imunização</b> .....	<b>56</b>
<b>3.2.2</b>	<b>AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE IgG ANTI-PT PARA PADRONIZAÇÃO DA DOSE DE REFORÇO</b> .....	<b>58</b>
<b>3.2.3</b>	<b>AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR</b> .....	<b>58</b>



3.2.3.1	<b>Avaliação de citocinas em cultura de células do baço.....</b>	<b>58</b>
3.2.3.2	<b>Imunofenotipagem de linfócitos T CD4 e T CD8 em células de baço e linfonodos por Citometria de Fluxo.....</b>	<b>59</b>
3.2.3.3	<b>Imunofenotipagem de linfócitos B em células de baço e linfonodos por Citometria de Fluxo.....</b>	<b>60</b>
3.2.4	<i>AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL.....</i>	<i>61</i>
3.2.4.1	<b>Detecção de anticorpos IgG Total, IgG1 e IgG2a.....</b>	<b>61</b>
3.2.5	<i>AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E PROTEÇÃO PÓS-INFECÇÃO.....</i>	<i>61</i>
3.2.5.1	<b>Ensaio de infecção com cepa de <i>Bordetella pertussis</i> .....</b>	<b>61</b>
3.2.5.2	<b>Lavado broncoalveolar (LBA) e contagem diferencial de leucócitos .....</b>	<b>62</b>
3.2.5.3	<b>Avaliação de citocinas em cultura de células do LBA.....</b>	<b>63</b>
3.2.5.4	<b>Contagem de bactérias no LBA por unidades formadoras de colônias (UFC).....</b>	<b>64</b>
3.2.5.5	<b>Contagem de bactérias no pulmão por UFC.....</b>	<b>64</b>
4	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....</b>	<b>64</b>
5	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
5.1	<b><i>AVALIAÇÃO SORO-EPIDEMIOLÓGICA EM AMOSTRAS DE SOROS HUMANO.....</i></b>	<b><i>65</i></b>
5.1.1	<i>DOSAGENS DE IgG E IgM ANTI-PT .....</i>	<i>66</i>
5.1.2	<i>RELAÇÃO ENTRE CASOS CONFIRMADOS DE COQUELUCE E NÍVEIS DE ANTICORPOS IgG ANTI-PT EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS.....</i>	<i>67</i>
5.1.3	<i>ANÁLISE SOBRE A CORRELAÇÃO POSITIVA IgG ANTI-PT ASSOCIADAS A DIFERENTES VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS. ....</i>	<i>67</i>
5.1.4	<i>DOSAGENS DE IgG E IgM ANTI-PARAPERTUSSIS (ANTI-BPP).....</i>	<i>71</i>
5.1.5	<i>ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR A PARTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE DE VOLUNTÁRIOS.....</i>	<i>73</i>
5.2	<b><i>RESPOSTA IMUNE E PROTETORA APÓS IMUNIZAÇÃO DE REFORÇO EM MODELO MURINO.....</i></b>	<b><i>76</i></b>
5.2.1	<i>ANÁLISE DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-PT ANTES DA IMUNIZAÇÃO DE REFORÇO.....</i>	<i>76</i>
5.2.2	<i>RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR REFORÇO VACINAL 7 SEMANAS APÓS A IMUNIZAÇÃO.....</i>	<i>77</i>
5.2.2.1	<b>Avaliação de citocinas em cultura de células do baço.....</b>	<b>77</b>
5.2.2.2	<b>Estratégia de fenotipagem de Linfócitos T CD4 e T CD8.....</b>	<b>80</b>

5.2.2.2.1	<u>Análise fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4 Efetores, células de Memória Central e Naïve.....</u>	<b>81</b>
5.2.2.2.2	<u>Análise fenotípica de subpopulações de linfócito T CD8 Naïve, de memória Central e efetores.....</u>	<b>84</b>
<b>5.2.2.3</b>	<b>Estratégia de fenotipagem de linfócitos B.....</b>	<b>86</b>
5.2.2.3.1	<u>Análise fenotípica de linfócitos B de memória e expressão de MHC-II.....</u>	<b>87</b>
5.2.2.4	<b>Avaliação de IgG Total, IgG1 e IgG2a anti- <i>B. pertussis</i> ou anti-PT.....</b>	<b>89</b>
5.2.3	<i>AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA VACINAÇÃO DE REFORÇO APÓS DESAFIO INTRANASAL.....</i>	<b>91</b>
5.2.3.1	<b>Recrutamento de Leucócitos.....</b>	<b>91</b>
5.2.3.2	<b>Produção de citocinas Th1/Th2/Th17.....</b>	<b>93</b>
5.2.3.3	<b>Proteção induzida pelo reforço vacinal em animais BALB/c após infecção intranasal com <i>B. pertussis</i>.....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>96</b>
6.1	<i>ANÁLISE DO PERFIL SOROLÓGICO DA POPULAÇÃO EM RELAÇÃO A BORDETELLA PERTUSSIS.....</i>	<b>96</b>
6.2	<i>ANÁLISE DO PERFIL SOROLÓGICO DA POPULAÇÃO EM RELAÇÃO A BORDETELLA PARAPERTUSSIS.....</i>	<b>105</b>
6.3	<i>PERFIL DE CITOCINAS INDUZIDAS PELO ESTÍMULO COM WCP.....</i>	<b>107</b>
6.4	<i>AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PROTETORA APÓS REFORÇO VACINAL EM MODELO EXPERIMENTAL.....</i>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>119</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>121</b>
	<b>ANEXO I – Termo de consentimento livre e esclarecido.....</b>	<b>135</b>
	<b>ANEXO II – Questionário.....</b>	<b>138</b>
	<b>APÊNDICE – Artigo publicado.....</b>	<b>139</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 AGENTE CAUSAL DA COQUELUCHE

A coqueluche é uma doença infecciosa do trato respiratório, altamente contagiosa, mas prevenível por vacinação. É mais grave e pronunciada em crianças não imunizadas (BOUCHEZ; GUIZO, 2015; MOOI, F. R.; BRUISTEN, S.; LINDE, I.; REUBSAET, F. *et al.*, 2012), cujas complicações relacionadas à infecção podem incluir: hipertensão pulmonar, pneumonia, convulsões febris, encefalopatia e hemorragias cerebrais, segundo a Organização Mundial da Saúde (ORGANIZATION, 2015). Mesmo com a alta cobertura vacinal, nos últimos anos, tem sido observado o ressurgimento dos casos de coqueluche em todo o mundo, sendo considerada uma doença infecciosa reemergente (KLINE; LEWIS; SMITH; TRACY *et al.*, 2013; ORGANIZATION, 2014).

A coqueluche é causada por bactérias gram-negativas, pertencentes ao gênero *Bordetella*, que infectam o trato respiratório superior de mamíferos. Dentre as espécies mais estudadas se destacam *Bordetella pertussis*, *Bordetella bronchiseptica* e *Bordetella parapertussis*, esta última, causadora da forma menos grave da doença (DE MELKER; SCHELLEKENS; NEPPELENBROEK; MOOI *et al.*, 2000). Dentre essas espécies, a *B. pertussis* é o único patógeno causador de infecções estritamente em humanos e conhecida por causar a forma mais grave da doença, enquanto que *Bordetella bronchiseptica* afeta mais frequentemente pacientes imunocomprometidos (PARKHILL; SEBAIHIA; PRESTON; MURPHY *et al.*, 2003). *Bordetella spp* são classificadas morfológicamente como cocobacilos, dispostos em arranjos individuais ou em pares, aeróbios e gram-negativos. As colônias no meio Bordet-Gengou são lisas, convexas, peroladas, brilhantes, quase transparentes e rodeadas por uma zona de hemólise. *B. pertussis* é uma espécie fastidiosa, catalase e oxidase-positiva, enquanto que a *B. parapertussis* é menos fastidiosa, oxidase negativa, urease positiva e produz pigmento marrom em meio *Bordet-Gengou* devido à expressão de tirosinase (JOHNSON; BECK, 2018; SANDEN; WEYANT, 2005).

Análises filogenéticas indicam que *B. pertussis* e *B. parapertussis* evoluíram de forma independente, através de massiva perda e/ou inativação gênica (DIAVATOPOULOS; CUMMINGS; SCHOULS; BRINIG *et al.*, 2005; MELVIN; SCHELLER; MILLER; COTTER, 2014), a partir de um ancestral comum com a *B.*

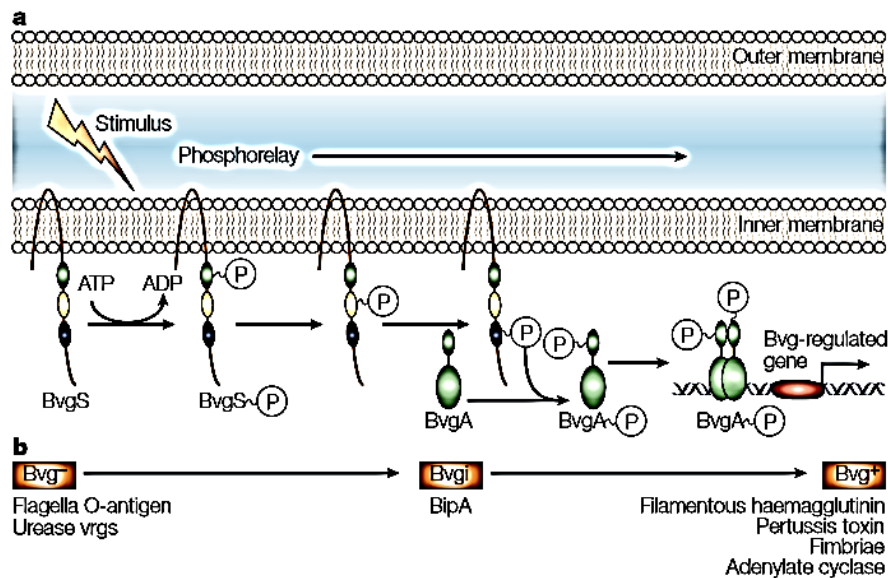
*bronchiseptica*, patógeno respiratório que infecta vários hospedeiros mamíferos, geralmente causando doença respiratória crônica e leve (CHERRY; GRIMPREL; GUIISO; HEININGER *et al.*, 2005). Estudos comparativos de hibridização genômica e tipagem de sequência multilocus mostraram menor diversidade genética entre *B. bronchiseptica* e *B. parapertussis* quando comparada com *B. pertussis*, sugerindo que a associação de *B. parapertussis* com humanos é mais recente do que a com *B. pertussis* (PRESTON; MASKELL, 2007; VAN DER ZEE; MOOI; VAN EMBDEN; MUSSER, 1997).

## 1.2 REGULAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA

A expressão de genes de virulência por *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*, é regulada pelo sistema de dois componentes conhecido como BvgA/S (BOCK; GROSS, 2001; MELVIN; SCHELLER; MILLER; COTTER, 2014).

O sistema BvgA/S controla a expressão de dois subconjuntos distintos de genes de maneira positiva, *vag* (*virulence-activated gene*) ou negativa, *vrg* (*virulence-repressed gene*). É composto por uma enzima quinase sensora de membrana (BvgS) e pelo regulador de resposta (BvgA) e sua ativação ocorre por sinais ambientais constituída por pelo menos 3 fases fenotípicas específicas. Na fase 1, em temperatura de 37° C e ausência de moduladores químicos como sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) ou de nicotinamida, o BvgS detecta as mudanças no meio ambiente e se autofosforila (BvgS-P), o que resulta na: a) na fosforilação do fator BvgA (BvgA-P), b) expressão dos genes *vags* (Bvg+) e c) codificação de fatores de virulência, como toxinas e adesinas (Figura 1a). Na fase 2, em temperatura de 25°C e na presença de MgSO<sub>4</sub> ou nicotinamida, o BvgS é inativado e o BvgA não é fosforilado, em consequência, não há expressão de genes *vags*. (BOCK; GROSS, 2001; DE ARAÚJO; DE ARAÚJO; BARBOSA, 2019; MELVIN; SCHELLER; MILLER; COTTER, 2014; MOON; BONOCORA; KIM; CHEN *et al.*, 2017).

Uma terceira fase, também conhecida como Bvg intermediária (Bvgi), ocorre quando as bactérias são cultivadas na presença de baixas concentrações de moduladores químicos ou nas primeiras horas após a mudança das condições da fase Bvg- para as condições da fase Bvg +, mas seu papel na biologia do gênero *Bordetella* ainda não é claro (Figura 1b) (MELVIN; SCHELLER; MILLER; COTTER, 2014).



Fonte: Modificado de (PRESTON; PARKHILL; MASKELL, 2004).

**Figura 1:** Representação esquemática que descreve a ação do sistema de dois componentes BvgA/S.

### 1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Toda infecção bacteriana está associada a diferentes fatores de virulência, constituídos por componentes estruturais do microrganismo ou seus produtos, que contribuem para a relação de parasitismo com o hospedeiro. Dentre esses fatores destacam-se as evasinas, adesinas e as toxinas, que lesam as células, tecidos e órgãos do hospedeiro (DE ARAÚJO; DE ARAÚJO; BARBOSA, 2019). Alguns fatores de virulência são comuns a diversas espécies de *Bordetella*, e a produção dessas proteínas se relaciona diretamente à patogenicidade da *B. pertussis* (DE ARAÚJO; DE ARAÚJO; BARBOSA, 2019; PARKHILL; SEBAIHIA; PRESTON; MURPHY *et al.*, 2003).

A **hemaglutinina filamentosa** (FHA) é uma proteína altamente imunogênica, com massa molecular (MM) de 220 kDa, que forma estruturas filamentosas na superfície da célula bacteriana, participando da adesão da bactéria tanto ao epitélio respiratório quanto aos macrófagos do hospedeiro (SCHELLER; MELVIN; SHEETS; COTTER, 2015).

A **pertactina** (PRN) é uma adesina pertencente à família de proteínas de superfície auto transportadoras com MM de 70 kDa. A proteína é codificada pelo gene

*prn*, presente em *B. pertussis* e *B. parapertussis* (DORJI; MOOI; YANTORNO; DEORA *et al.*, 2018; EBY; GRAY; WARFEL; PADDOCK *et al.*, 2013).

As **fímbrias** são proteínas poliméricas de superfície celular envolvidas na adesão do patógeno às células epiteliais do hospedeiro. *B. pertussis* e *B. parapertussis* produzem tipos de fímbrias sorologicamente distintas (sorotipos 2 e 3), compostas de subunidades principais Fim2 e Fim3, sob regulação positiva do sistema BvgA/S (CHEN; DECKER; BOUCHER; HINTON *et al.*, 2010; CHERRY; GRIMPREL; GUIISO; HEININGER *et al.*, 2005; DORJI; MOOI; YANTORNO; DEORA *et al.*, 2018).

A **toxina dermonecrótica** (TCT) foi um dos primeiros fatores de virulência descritos por Bordet e Gengou (1909) em *B. pertussis* (BORDET; GENGOU, 1909). É um fragmento de peptidoglicano (921 Da) liberado quando a célula sofre lise ou durante o seu crescimento normal. É uma toxina termo-lábil, pertencente à família de peptídeos muramil, componentes poliméricos da parede celular que fornecem rigidez estrutural. Induz lesões necróticas localizadas em camundongos quando injetada por via intradérmica e letal quando administrada por via intravenosa (BORDET; GENGOU, 1909; PARTON, 1985). Possui homologia de 99% entre *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* e *B. parapertussis* (CHERRY, 2005; DORJI; MOOI; YANTORNO; DEORA *et al.*, 2018; MATTOO; CHERRY, 2005). Apresenta várias funções biológicas importantes, incluindo imunogenicidade e pirogenicidade (LUKER; COLLIER; KOLODZIEJ; MARSHALL *et al.*, 1993).

A **Adenilato ciclase** (ACT), importante fator de virulência produzido na fase inicial da doença, é uma toxina imunomodulatória produzida por *B. pertussis* e *B. parapertussis*; ela é cálcio/calmodulina-dependente e formadora de poros na membrana celular do hospedeiro (EBY; GRAY; WARFEL; PADDOCK *et al.*, 2013; GUIISO; GRIMPREL; ANJAK; BEGUE, 1993).

A **Toxina Pertussis** (PT), produzida exclusivamente por *B. pertussis*, é uma exotoxina, do tipo AB (117 kDa). A subunidade enzimática A (S1) participa da transdução de sinais para o interior da célula do hospedeiro, catalisando a ADP-ribosilação da proteína Gi (inibitória), que leva ao aumento excessivo de 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (AMPC) intracelular (MILLIGAN; KOSTENIS, 2006). O oligômero B é constituído de 4 subunidades (S2, S3, S4 e S5), responsável pela ligação da toxina na célula do hospedeiro (DORJI; MOOI; YANTORNO; DEORA *et al.*, 2018; LINZ; IVANOV; PRESTON; BRINKAC *et al.*, 2016). A PT é transportada através

da membrana externa bacteriana por um sistema de secreção do tipo IV, caracterizando-se como o mais importante fator de virulência e responsável por grande parte dos sintomas típicos da coqueluche. *B. parapertussis* possui genes que codificam a toxina, porém estes não são funcionais (MARZOUQI; RICHMOND; FRY; WETHERALL *et al.*, 2010).

A letalidade de *B. pertussis* induzida por PT foi descrita pela primeira vez em 1984. Em experimento de infecção em camundongos, verificou-se que cepas mutantes de *B. pertussis* deficientes na secreção de PT apresentaram letalidade significativamente menor quando comparadas a cepas selvagens (WEISS; GOODWIN, 1989; WEISS; FALKOW, 1984). Em humanos, patologias exacerbadas mediadas por PT, ocorrem devido à resposta imune inadequada ou insuficiente e geralmente se manifesta em crianças menores de 3 meses. Essas complicações podem incluir: leucocitose, hipertensão pulmonar e patologias cerebrais, resultando em hospitalizações em 40% dos indivíduos nesta faixa etária e uma taxa de letalidade de 1 a cada 100 indivíduos infectados (SCANLON; SKERRY; CARBONETTI, 2019).

Estudos na avaliação do papel de PT na leucocitose durante a infecção demonstraram que os anticorpos policlonais e monoclonais anti-PT administrados antes do ensaio de infecção em camundongos foram capazes de limitar a leucocitose e a mortalidade induzida por *B. pertussis* (SATO; SATO, 1990; SATO; IZUMIYA; SATO; COWELL *et al.*, 1981). Outros estudos demonstraram que anticorpos monoclonais anti-PT foram capazes de diminuir a leucocitose induzida por pertussis em modelos com babuínos (NGUYEN; WAGNER; LABER; GOODFIELD *et al.*, 2015). Há evidências de que a leucocitose desencadeia a formação de trombos leucocitários em capilares sanguíneos pulmonares, contribuindo para a hipertensão pulmonar em recém-nascidos (HALASA; BARR; JOHNSON; EDWARDS, 2003; PADDOCK; SANDEN; CHERRY; GAL *et al.*, 2008). Um estudo demonstrou que camundongos jovens infectados com uma cepa de *B. pertussis* secretoras de PT apresentaram hipertensão pulmonar, enquanto que camundongos infectados com cepa deficiente na secreção de PT não apresentaram a patologia (MURRAY; NIEVES; BRADLEY; GARGAS *et al.*, 2013).

Recém-nascidos com coqueluche grave também podem manifestar várias patologias cerebrais, incluindo convulsões, encefalopatia e hemorragia (KILGORE; SALIM; ZERVOS; SCHMITT, 2016; WORTIS; STREBEL; WHARTON;

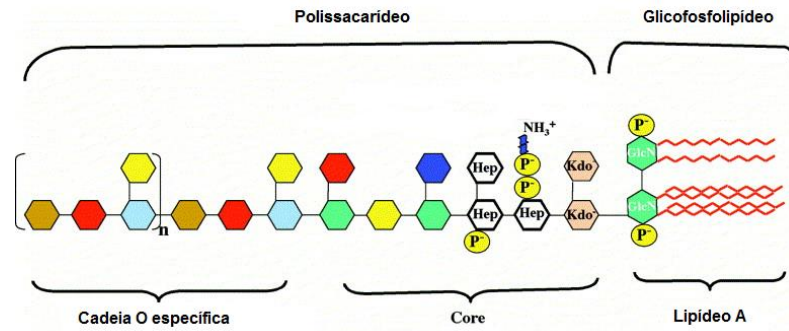
BARDENHEIER *et al.*, 1996). Estudos *in vitro* sugerem que a PT pode se disseminar sistemicamente e intoxicar as células do endotélio microvascular cerebral, devido ao aumento da permeabilidade celular e a transmigração de macrófagos, que contribui para exacerbar encefalopatias (KÜGLER; BÖCKER; HEUSIPP; GREUNE *et al.*, 2007).

Modelos animais indicam um papel importante da PT na modulação de respostas inflamatórias e imunes, que juntamente com outros efeitos fisiológicos, podem contribuir para a patologia da infecção por pertussis. Estudos demonstraram que macrófagos alveolares, sendo as primeiras células a interagir com o patógeno, são alvos precoces da intoxicação por PT, que promove a sobrevivência de *B. pertussis* no trato respiratório (CARBONETTI; ARTAMONOVA; VAN ROOIJEN; AYALA, 2007). Em outro estudo, usando monócitos do sangue periférico de humanos, foi demonstrada a capacidade da PT em reduzir a fagocitose de monócitos (SCHAEFFER; WEISS, 2001). A PT também está ligada à supressão da resposta imune ao lipopolissacarídeo mediada por células B, à quimiotaxia de linfócitos e à produção de IgM (SPANGRUDE; SACCHI; HILL; VAN EPPS *et al.*, 1985).

Em 1974, pesquisadores isolaram e caracterizaram antígenos protetores de *B. pertussis* compostos principalmente por PT e hemaglutinina filamentosa (FHA). Em 1981, foi aprovada no Japão uma vacina acelular em substituição da vacina celular contra coqueluche, sendo amplamente aceita como mais segura e eficaz. Atualmente, sabe-se que o toxóide PT presente na vacina é essencial e o principal antígeno para proteção contra coqueluche (SATO; SATO, 1990).

O **Lipopolissacarídeo** (LPS) é uma molécula localizada na membrana externa das bactérias gram-negativas. Geralmente consiste em três domínios estruturais distintos: (1) O domínio lipídeo A, que consiste em uma região basal glicolipídica ancorada a membrana externa e forma o componente bioativo da molécula; (2) uma região central conhecida como *core* formada por um oligossacarídeo complexo; e (3) uma cadeia polissacarídica lateral denominada antígeno O (Figura 2), associado a mecanismos de escape contra a resposta imune das células do hospedeiro (GEURTSEN; DZIECIATKOWSKA; STEEGHS; HAMSTRA *et al.*, 2009).

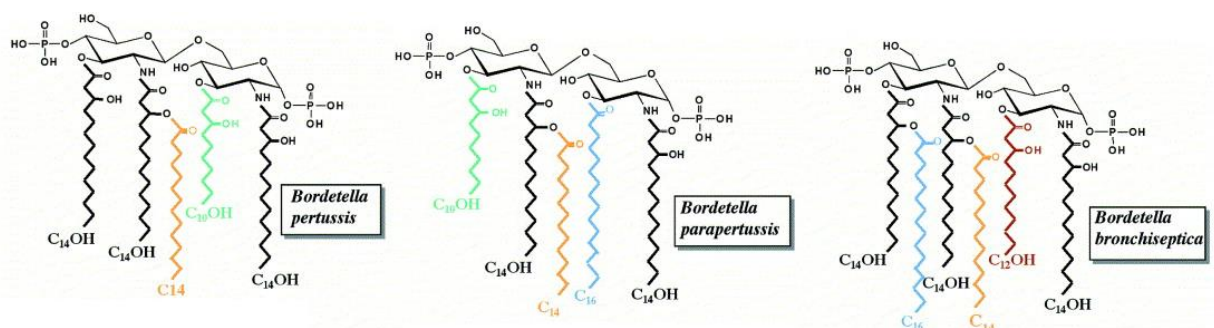




Fonte: Modificado de (CAROFF; KARIBIAN; CAVAILLON; HAEFFNER-CAVAILLON, 2002).

**Figura 2:** Representação esquemática da estrutura química do LPS.

As moléculas de LPS de *Bordetella bronchiseptica* e *Bordetella parapertussis*, possuem um lipídeo A ligado de forma similar a uma região central (*core*) de trissacarídeos e repetições de antígeno O. Em contraste, LPS de *Bordetella pertussis* produz um lipídeo A com ausência do domínio antígeno O, apresentando menor estrutura molecular e frequentemente referido como lipooligossacarídeo (LOS) (Figura 3) (GEURTSEN; DZIECIATKOWSKA; STEEGHS; HAMSTRA *et al.*, 2009; MELVIN; SCHELLER; MILLER; COTTER, 2014).



Fonte: Modificado de (CAROFF; KARIBIAN; CAVAILLON; HAEFFNER-CAVAILLON, 2002).

**Figura 3.** Estruturas do Lipídeo A de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*.

O LPS possui propriedades endotóxicas e adjuvantes baseadas no reconhecimento pelo receptor *Toll-like 4* (TLR4) do hospedeiro, que interage com vários co-receptores, incluindo CD14 e proteína de diferenciação mielóide (MD-2) (DECKER; JAMES; STIBITZ; HINTON, 2012; LOCHT; COUTTE; MIELCAREK, 2011). O LPS de *B. pertussis* pode estar envolvido na síndrome da coqueluche por indução da produção de Óxido Nítrico (NO) pelas células traqueais infectadas, prejudicando a atividade das células ciliadas respiratórias (FLAK; GOLDMAN, 1999).

A TCT pode atuar sinergicamente com o LPS na indução de NO, mas nem a TCT nem o LPS sozinhos foram capazes de induzir a síntese de NO (FLAK; HEISS; ENGLE; GOLDMAN, 2000). O LPS de *B. pertussis* presente na vacina celular, também está associado a reações adversas em crianças, ocasionando principalmente a febre após a imunização (BARAFF; MANCLARK; CHERRY; CHRISTENSON *et al.*, 1989; MOSS; SCOTT, 2009).

#### 1.4 PATOGÊNESE

A transmissão da coqueluche ocorre principalmente por contato direto, por meio do sujeito sintomático para o sadio/suscetível através de gotículas de secreção. Após a infecção, o patógeno entra em período de incubação, com duração média de 5-10 dias, variando de 1 a 3 semanas (DE ARAÚJO; DE ARAÚJO; BARBOSA, 2019; MENDES; CASIMIRO, 2011). Neste período, ocorre a adesão às células ciliadas e aos fagócitos do epitélio respiratório do hospedeiro, e a produção de toxinas, o que caracteriza as manifestações clínicas sistêmicas. Os sintomas duram cerca de 6 semanas e podem ser divididos em três estágios consecutivos; **estágio catarral** (uma ou duas semanas): febre baixa, coriza, espirros, lacrimejamento, falta de apetite, mal-estar e tosse noturna. Nessa fase, os sintomas podem ser confundidos com os da gripe e dos resfriados comuns; **estágio paroxístico** (duas semanas): acessos de tosse paroxística ou espasmódica. De início repentino, esses episódios são breves, mas sucessivos, seguidos de cianose e vômitos; **estágio de convalescença**: em geral, a partir da quarta semana, os sintomas vão regredindo até desaparecerem completamente. No entanto, as crises paroxísticas geralmente se repetem com infecções respiratórias subsequentes por muitos meses após o indivíduo ser acometido pela coqueluche (CONTROL; PREVENTION; PROGRAM; PREVENTION, 2005).

A infecção por *B. pertussis* desencadeia resposta imune a vários antígenos, incluindo FHA, PRN, fímbrias e PT, e com exceção de PT, antígeno exclusivo de *B. pertussis*, todos podem reagir de forma cruzada com outras espécies do gênero *Bordetella* (TROLLFORSS; LAGERGÅRD; GUNNARSSON; TARANGER, 2003).

*B. parapertussis* é responsável pela minoria dos casos de infecção (aproximadamente 14%) e embora menos capaz de causar doença grave (CHERRY (CHERRY; SEATON, 2012), está associada ao aumento dos casos de coqueluche,

pois crianças infectadas pelo patógeno podem manifestar sintomas típicos da doença, incluindo tosse prolongada, crises paroxísticas e vômitos pós-tosse (KARALIUS; RUCINSKI; MANDREKAR; PATEL, 2017). Tem sido sugerido que o mecanismo de desenvolvimento da doença após a infecção por *B. parapertussis* é semelhante ao da infecção com *B. pertussis* (LI; DOUGAN; NOVOTNY; CHARLES, 1991; PARKHILL; SEBAIHIA; PRESTON; MURPHY *et al.*, 2003), entretanto, a *B. parapertussis* não expressa a Toxina Pertussis (PT), devido a diversas mutações, particularmente na região promotora do gene da toxina (TOUBIANA; AZARNOUSH; BOUCHEZ; LANDIER *et al.*, 2019). Por outro lado, a *B. parapertussis* tem o antígeno O, que confere proteção contra a imunidade mediada pelo complemento do hospedeiro podendo ser considerado fator de virulência (TOUBIANA; AZARNOUSH; BOUCHEZ; LANDIER *et al.*, 2019).

## **1.5 DIAGNÓSTICO**

Métodos diagnósticos são imprescindíveis para acompanhar a tendência da doença em diferentes regiões, e detectar oportunamente surtos e epidemias; isso permite a adoção de métodos de controle e a monitoração das cepas circulantes, com estudos moleculares e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos (DE OLIVEIRA; SILVA; MEDEIROS; LOPES *et al.*, 2007).

No Brasil e em outros países as principais limitações para o diagnóstico precoce da coqueluche são o custo e a não disponibilidade de testes diagnósticos em muitos laboratórios (JONES; GASSER; ERB; OECHSLIN, 2004). Isso reforça o questionamento se em nosso meio a coqueluche estaria sob controle, como parecem indicar os dados de notificação, ou se existiria uma gradual modificação na dinâmica da transmissão que não tem sido detectada pelos sistemas de vigilância epidemiológica (DE OLIVEIRA; SILVA; MEDEIROS; LOPES *et al.*, 2007; LUZ; CODEÇO; WERNECK, 2003).

Atualmente o isolamento de *B. pertussis* em cultura, em meio *Bordet-Gengou* ou Regan-Lowe, é o método mais seguro para o diagnóstico da coqueluche e é considerado o método “padrão ouro” (WIRSING VON KÖNIG, 2014). A cultura, além de isolar o patógeno, também é capaz de diferenciar *B. pertussis* de *B. parapertussis*, seja através da hemólise ao redor das colônias, em *B. pertussis*, seja pela produção de pigmento escuro associado à expressão de tirosinase, característica exclusiva de

colônias de *B. parapertussis* (BOUCHEZ; GUIISO, 2015; GUIISO, 2014; HEWLETT; KIM; LEE; GRAY, 2000). No entanto, para se aumentar a sensibilidade da cultura é imprescindível a correta definição de casos suspeitos com a coleta cuidadosa de material de nasofaringe. Embora os métodos de coleta e transporte tenham sido padronizados pelo Ministério da Saúde/CVE-SP/IAL desde 2001, é necessário que as equipes de saúde sejam treinadas para a sua correta realização (DE OLIVEIRA; SILVA; MEDEIROS; LOPES *et al.*, 2007).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o teste diagnóstico com maior sensibilidade, variando entre 70% e 99% quando realizado entre três e quatro semanas de tosse, mesmo com o uso de antimicrobianos. Porém, resultados falso-positivos podem acontecer por contaminação no laboratório ou durante a coleta da amostra, ou ainda, dependendo da especificidade do segmento amplificado, por similitude genética com outras espécies do gênero *Bordetella* (LOEFFELHOLZ, 2012).

O ensaio de imunofluorescência direta de amostras da nasofaringe é um método rápido, baseado na visualização microscópica de anticorpos fluorescentes ligados a células de *B. pertussis*, mas a cultura, o PCR ou a sorologia devem sempre estar associados, devido à sua baixa sensibilidade e especificidade (VAN DER ZEE; SCHELLEKENS; MOOI, 2015).

Os testes sorológicos, utilizando o método de ensaio imunoenzimático (ELISA), têm sido utilizados no diagnóstico de infecções recentes por coqueluche (WENDELBOE; VAN RIE, 2006), pois a infecção natural com *B. pertussis* resulta na produção de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgG contra uma variedade de antígenos (CHERRY; GRIMPREL; GUIISO; HEININGER *et al.*, 2005). Durante a infecção primária, os anticorpos IgM são detectados primeiro, entre 5-10 dias após o início da doença, IgA podem ser determinados após 1-2 semanas, enquanto os anticorpos IgG ocorrem após 2-3 semanas e atingem seu máximo após 6-8 semanas, podendo ser detectados por vários anos (TEST LINE CLINICAL DIAGNOSTIC, 2017). Além disso, as respostas de IgM e IgA demonstraram serem maiores em crianças não vacinadas e com coqueluche confirmada por cultura, quando comparadas com crianças vacinadas (GRANSTRÖM; WRETLIND; SALENSTEDT; GRANSTRÖM, 1988; WATANABE; CONNELLY; WEISS, 2006). Assim, testes de detecção de anticorpos IgM e IgA têm sido utilizados como importante ferramenta no diagnóstico

de uma infecção adquirida mesmo com vacinação recente (RUUSKANEN; VILJANEN; SALMI; LEHTONEN *et al.*, 1980).

Testes em ensaios de padronização e avaliações de soroprevalência também usam anticorpos IgG anti-Toxina Pertussis (anti-PT), por ser componente antigênico exclusivo de *B. pertussis*, diferenciando as reações cruzadas com outras espécies do gênero *Bordetella* (GIAMMANCO; CHIARINI; MAPLE; ANDREWS *et al.*, 2003). Altos títulos de IgG anti-PT são parâmetros sorológicos para sugerir infecção recente por *B. pertussis* em adolescentes e adultos, inclusive até seis meses após o recebimento do reforço da vacina tríplice bacteriana, contra difteria, tétano e componente pertussis acelular pertussis (DTPa) (PAWLOSKI; QUEENAN; CASSIDAY; LYNCH *et al.*, 2014). Entretanto, principalmente em crianças e recém-vacinados, o diagnóstico sorológico ainda é um desafio, pela dificuldade de distinção da resposta de anticorpos à infecção natural ou aos antígenos vacinais (MINK; CHERRY; CHRISTENSON; LEWIS *et al.*, 1992; WENDELBOE; VAN RIE, 2006).

Estudos sorológicos realizados na Alemanha (WIRSING VON KÖNIG, 2014), Holanda (DE MELKER; SCHELLEKENS; NEPELENBROEK; MOOI *et al.*, 2000) e EUA (BAUGHMAN; BISGARD; EDWARDS; GURIS *et al.*, 2004) em populações com alta cobertura vacinal, demonstraram que anticorpos IgG anti-PT aumentaram rapidamente para níveis acima de 100 unidades internacionais por mL (UI/mL) após infecção recente, diminuindo progressivamente, e após cinco anos, todos os indivíduos tinham níveis de IgG anti-PT < 10 UI/mL. Diante desses resultados, foi proposto um ponto de corte para diagnóstico sorológico de infecção em adolescentes e adultos, considerando valores de IgG-anti-PT > 100-125 EU/mL (equivalente a UI/mL) com sensibilidade de 88,1% e especificidade de 98,8% (DE GREEFF; TEUNIS; DE MELKER; MOOI *et al.*, 2012).

O diagnóstico de *B. parapertussis* tem sido negligenciado devido à aparente menor incidência e aos sintomas frequentemente mais leves em relação à *B. pertussis*. No entanto, a infecção por *B. parapertussis* pode variar de infecção assintomática a doença leve ou com sintomas típicos de coqueluche, sendo cada vez mais reconhecida e reportada aos órgãos de saúde pública (KOEPEKE; BARTHOLOMEW; EICKHOFF; AYELE *et al.*, 2015; LIKO; ROBISON; CIESLAK, 2017; MATTOO; CHERRY, 2005). Estudo realizado em nove estados dos EUA entre 2008-2010 evidenciou que dentre as cepas isoladas do trato respiratório superior

identificadas por PCR, 14% foram de *B. parapertussis* (CHERRY; SEATON, 2012; LIKO; ROBISON; CIESLAK, 2017). O diagnóstico correto e o conhecimento mais preciso deste patógeno e de seus antígenos protetores permitiriam desenvolver vacinas mais apropriadas contra essa bactéria (ELAHI; THOMPSON; STROM; O'CONNOR *et al.*, 2008).

## **1.6 TRATAMENTO**

A antibioticoterapia deve ser iniciada antes da confirmação diagnóstica, para que na fase catarral, possa reduzir a gravidade dos sintomas e a duração da doença, bem como acelerar a eliminação da bactéria na nasofaringe. Na fase paroxística, é indicada por reduzir a transmissibilidade, eliminando a bactéria da nasofaringe após 5-7 dias do início do tratamento (DIERIG; BECKMANN; HEININGER, 2015). Os macrolídeos como a azitromicina e a claritromicina são a primeira opção terapêutica, sendo preconizado a todas as pessoas próximas do doente, qualquer que seja sua idade ou seu estado de imunização (INSTITUT PASTEUR, 2019).

## **1.7 IMUNIDADE NATURAL**

A expressão de múltiplos fatores de virulência por *B. pertussis* contribuem diretamente para a patogênese ou efeitos imunomoduladores (CARBONETTI; ARTAMONOVA; VAN ROOIJEN; AYALA, 2007), que evitam a eliminação precoce do patógeno no organismo do hospedeiro (HIGGS; HIGGINS; ROSS; MILLS, 2012; MELVIN; SCHELLER; MILLER; COTTER, 2014). Primeiramente, a bactéria se liga às células do epitélio ciliado da traqueia, brônquios, bronquíolos e de forma intracelular em macrófagos alveolares. Logo após a fagocitose, uma alta proporção de bactérias fagocitadas é destruída dentro dos compartimentos ácidos dos macrófagos, mas uma parcela residindo nos compartimentos não ácidos escapam da destruição e se replicam (CARBONETTI; ARTAMONOVA; VAN ROOIJEN; AYALA, 2007).

Além de fornecer um nicho intracelular para a sobrevivência da bactéria, os macrófagos também contribuem para a imunidade protetora. A morte da bactéria pelos macrófagos é potencializada na presença de IFN- $\gamma$ , que induz a produção de óxido nítrico, e IL-17, evidenciando a importância de células T helper (Th) 1 e Th17 no *clearance* de bactérias intracelulares (HIGGS; HIGGINS; ROSS; MILLS, 2012).

O principal papel das células dendríticas (CD) é apresentar antígenos às células T e expressar citocinas que promovem a diferenciação de células T *naïve*. As CD imaturas residentes e infiltradas no trato respiratório detectam padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPS). Esse reconhecimento promove fortes sinais pró-inflamatórios que são cruciais para desencadear a produção precoce de citocinas e acompanhar a infiltração de leucócitos, seguida pela ativação das respostas das células T do hospedeiro à infecção. A ligação do LPS ao receptor Toll-like 4 (TLR4) nas CDs promove a maturação e a secreção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , que induzem as células Th1 (DE ARAÚJO; DE ARAÚJO; BARBOSA, 2019; HIGGS; HIGGINS; ROSS; MILLS, 2012). As CDs ativadas com toxina Adenilato Ciclase por sua vez, promovem a indução de linfócitos Th17, a partir da produção de IL-1 $\beta$  e IL-23, importantes para o *clearance* bacteriano e recrutamento de neutrófilos (HIGGS; HIGGINS; ROSS; MILLS, 2012). FHA e o LPS podem promover resposta anti-inflamatória pelas células dendríticas com a indução de secreção de IL-10, o que leva à geração de Tregs produtoras de IL-10, inibindo a geração de células efetoras Th1 e retardando a eliminação da bactéria (HIGGS; HIGGINS; ROSS; MILLS, 2012).

Diferentemente dos macrófagos, os neutrófilos não são considerados reservatórios intracelulares da *B. pertussis*, devido à meia vida curta, embora mantenham um papel imprescindível no combate às bactérias com a fagocitose. A citocina IL-6 foi descrita por estimular a resposta inflamatória a partir de macrófagos, ao mesmo tempo que neutrófilos, células Th1 e Th17 são recrutados para o sítio de infecção (HIGGS; HIGGINS; ROSS; MILLS, 2012; MCGUIRK; JOHNSON; RYAN; MILLS, 2000).

As células *Natural Killer* (NK) são uma linhagem de células relacionadas aos linfócitos que reconhecem células infectadas e respondem as destruindo. Além de ter essa finalidade, esse tipo de célula constitui uma relevante fonte de IFN- $\gamma$ , pelo qual ocorre a ativação dos macrófagos para atuar na destruição dos patógenos, bem como ativação de resposta Th1 (HIGGS; HIGGINS; ROSS; MILLS, 2012).

## **1.8 VACINAS PERTUSSIS**

As vacinas pertussis celulares (WCP) foram introduzidas em meados do século XX, mas devido à sua alta reatogenicidade, a partir de 1981 foram substituídas pelas vacinas acelulares (APV). Estas últimas, menos reatogênicas (ANDERSON; BELSHE;

BARTRAM, 1988), são amplamente utilizadas em países desenvolvidos, mas seu alto custo de produção as torna proibitivas para países em desenvolvimento.

Embora eficazes, as WCPs foram associadas a efeitos colaterais indesejáveis (BARAFF; MANCLARK; CHERRY; CHRISTENSON *et al.*, 1989; CHERRY, 2005), o que levou ao desenvolvimento, no final da década de 1980, das vacinas APVs (AOYAMA; MURASE; KATO; IWATA, 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; BOOY; HARRISON; SPICER *et al.*, 2003; MATTOO; CHERRY, 2005). 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 e Th17 mais efetiva, importante no controle e *clearance* da infecção por *B. pertussis* (BARBIC; LEEF; BURNS; SHAHIN, 1997; RYAN; MCCARTHY; RAPPUOLI; MAHON *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 (HIGGS; HIGGINS; ROSS; MILLS, 2012; RYAN; MCCARTHY; RAPPUOLI; MAHON *et al.*, 1998).

Apesar de altamente efetivas na redução da incidência da infecção pertússica (MATTOO; CHERRY, 2005), as APVs têm pouca ou nenhuma eficácia contra a *B. parapertussis* (LIESE; RENNER; STOJANOV; BELOHRADSKY *et al.*, 2003; LONG; KARANIKAS; HARVILL; READ *et al.*, 2010; MOOI, FRITS R; BRUISTEN, SYLVIA; LINDE, INEKE; REUBSAET, FRANS *et al.*, 2012; WILLEMS; KAMERBEEK; GEUIJEN; TOP *et al.*, 1998). Alguns autores afirmam que a vacinação com APV pode interferir com o *clearance* da *B. parapertussis*, facilitando a performance adaptativa do



patógeno, o que poderia levar ao surgimento de hospedeiros mais suscetíveis à infecção por *B. parapertussis* (LONG; KARANIKAS; HARVILL; READ *et al.*, 2010). Em uma abordagem experimental com camundongos, a infecção primária por *B. pertussis* não promoveu imunidade protetora contra uma posterior infecção por *B. parapertussis*, no entanto, a infecção prévia com *B. parapertussis* conferiu proteção cruzada; tais resultados sugerem que introdução da vacinação anti-pertussis tem pouco efeito sobre a prevalência absoluta de *B. parapertussis* (RESTIF, O.; WOLFE, D.; GOEBEL, E.; BJORNSTAD, O. *et al.*, 2008; RESTIF, O.; WOLFE, D.; GOEBEL, E.; BJORNSTAD, O. N. *et al.*, 2008). Esses dados reforçam as evidências do aumento potencial de indivíduos portadores de espécies não incluídas na vacina, no caso a *B. parapertussis*, de forma semelhante à da sorotipo-especificidade observada em outras doenças infecciosas, cuja utilização de vacinas conjugadas contendo alguns sorotipos prevalentes levou à troca de prevalência para outros sorotipos (LIPSITCH, 1997; OBARO, 1996).

Outro estudo com camundongos demonstrou a necessidade de combinação entre resposta de mucosa e Th1 para a proteção recíproca contra *B. pertussis* e *B. parapertussis*, sugerindo que a via de imunização e/ou formulação da vacina possam ser importantes para a indução de respostas imunes recíprocas (WATANABE; NAGAI, 2001).

No Brasil a vacina pentavalente é uma combinação de cinco vacinas individuais em uma (DTP + HB + Hib). Hepatite B recombinante (HB) e *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) conjugada, com a vacina tríplice bacteriana - difteria, tétano, pertussis celular (DTP) são disponibilizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), na rotina dos serviços de saúde de todo o país. A vacina tríplice bacteriana com componente pertussis acelular (DTPa), recomendada para crianças com risco de desenvolver ou que desenvolveram eventos graves adversos à vacina está disponibilizada nos Centros de Referências para Imunobiológicos Especiais (CRIES). Em 2014 o Ministério da Saúde incluiu no Calendário Nacional de Vacinação a DTPa para todas as gestantes (a partir da 20ª semana) e profissionais de saúde que atuam em maternidades e em unidades de internação neonatal (MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2019).

## **1.9 VACINA PERTUSSIS LOW (PLOW)**

O Instituto Butantan, produz a vacina celular DTP (difteria – tétano – pertussis) desde 1953. Atualmente, mais de 90% das crianças brasileiras são vacinadas, com idade de 2-4-6 e 18 meses de vida, o que representa cerca de 250 milhões de doses administradas anualmente. Nos últimos 20 anos, o Instituto Butantan vem investindo na investigação de novas vacinas pertussis, menos reatogênicas e de baixo custo. Nesse sentido, foi desenvolvida uma vacina pertussis celular, com baixa endotoxicidade (Plow), obtida por extração química da fração de LPS da membrana externa da célula bacteriana (DIAS; VAN DER ARK; SAKAUCHI; KUBRUSLY *et al.*, 2013). A vacina Plow foi avaliada em ensaio de campo em recém-nascidos, mostrando-se menos reatogênica e de igual imunogenicidade e efeito protetor que a vacina pertussis celular tradicional, produzida neste Instituto (ZORZETO; HIGASHI; DA SILVA; DE FARIA CARNIEL *et al.*, 2009).

O desenvolvimento da vacina Plow, com baixo teor de LPS é um aperfeiçoamento importante para as vacinas pertussis celulares e alternativa promissora para países em desenvolvimento, onde as vacinas pertussis acelulares têm custo muito elevado para serem introduzidas nos esquemas de vacinação. Devido à sua baixa reatogenicidade, a Plow poderá, eventualmente, ser introduzida como dose de reforço na vacinação de adolescentes e adultos jovens no Brasil, com potencial de diminuir a circulação da *B. pertussis* e evitar a infecção de recém-nascidos não imunizados ou com o esquema de imunização ainda incompleto, que são o alvo principal para o bloqueio da disseminação da doença.

## **1.10 EPIDEMIOLOGIA**

Dados epidemiológicos indicam que a coqueluche é uma doença de distribuição universal, predominantemente em países em desenvolvimento, com ciclos endêmicos a cada três ou cinco anos. Está entre as maiores causas de morbidade do mundo, com estimativa de ocorrência de 16 milhões de casos e aproximadamente 195.000 mortes anuais (KILGORE; SALIM; ZERVOS; SCHMITT, 2016). A distribuição etária dos casos foi modificada após a introdução da vacinação em massa em crianças. Na era pré-vacinal, a maior incidência ocorria em menores de seis anos de idade. Por outro lado, a era pós-vacinal caracterizou-se por uma alta proporção de

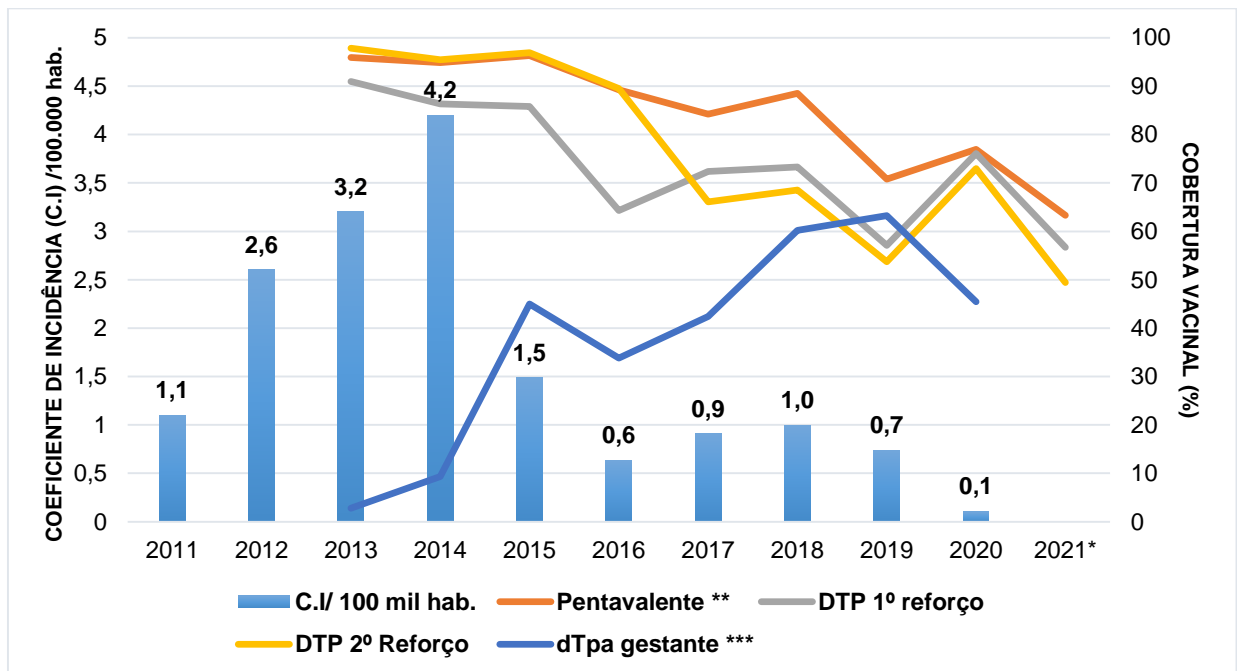
casos em menores de seis meses, ou seja, crianças ainda não completamente imunizadas (LUZ; CODEÇO; WERNECK, 2003).

Na segunda metade do século XX, a imunização de crianças com a vacina DTP levou ao controle da doença, com uma queda drástica nas taxas de incidência, de 200 casos/100 mil habitantes, antes de 1940, para 0,5 caso/100 mil habitantes em 2000 (MATTOO; CHERRY, 2005). Entretanto, a partir do ano 2000, vem sendo registrada a ressurgência da doença em vários países com alta cobertura vacinal, com aumento do número de casos reportados, principalmente em adolescentes e adultos, responsáveis pela transmissão da bactéria para crianças e recém-nascidos, grupo mais propenso a adquirir a forma mais grave da doença por não terem sido vacinados, ou por não terem recebido todas as doses vacinais (HE; MERTSOLA, 2008).

No Brasil, a ressurgência da coqueluche também foi observada, embora mais tardia (MACHADO; PASSOS, 2019). No início da década de 80, 40 mil casos anuais de coqueluche foram notificados com incidência superior a 30/100 mil habitantes (LUZ; CODEÇO; WERNECK, 2003). Desde a década de 1990, houve importante redução na incidência, após aumento das coberturas vacinais da vacina Tetravalente, adsorvida com difteria, tétano, pertussis celular e *Haemophilus influenzae* tipo b (DTP + Hib) devido a elevada adesão da população brasileira à vacinação e o bom desempenho do Programa Nacional de Imunização (PNI). Nos anos seguintes, à medida em que as coberturas vacinais se elevaram e se mantiveram em valores próximos a 100%, houve diminuição gradativa da incidência da doença, chegando em 2010 a 0,32/100 mil habitantes.

No entanto, a partir de meados de 2011, mesmo com a alta cobertura vacinal, se observou-se um aumento súbito de casos de coqueluche no país. Segundo dados registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no período de 2011 a 2014 foram confirmados 22.772 casos de coqueluche, em todo o país. Em 2011 foram confirmados 2.248 casos e em 2014, 8.614 casos, o que representou um incremento de 283% do número de casos. Nesse mesmo período a incidência variou de 1,2 a 4,2/100 mil habitantes (Figura 4) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Crianças menores de um ano foram as mais acometidas nos casos de coqueluche, aproximadamente 61% (13.935/22.772), e dentre estas 87% (12.135/13.935) eram menores de seis meses de idade, grupo etário que também concentrou quase todos os óbitos por coqueluche (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A partir de 2015, observa-se uma diminuição do número de casos, a incidência da doença passou de 4,2/100 mil habitantes em 2014 para 0,1/100 mil habitantes em 2020 (Figura 4). Dois principais fatores podem ter contribuído para esse decréscimo: (i) a inclusão da vacina DTPa desde 2014 para gestantes partir da 27ª semana de gestação e (ii) a ampliação da quimioprofilaxia aos contatos dos casos suspeitos e pelo próprio ciclo epidêmico da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).



FONTE: TABNET/DATASUS (SAÚDE, 2021)

População: IBGE/DATASUS.

\*Dados sujeitos à revisão.

\*\*Vacina Introduzida no PNI a partir de 2013 em substituição a tetravalente.

\*\*\* Vacina introduzida no PNI a partir de 2014.

**Figura 4:** Coeficiente de Incidência da população por coqueluche e cobertura vacinal. Brasil, 2013-2021.

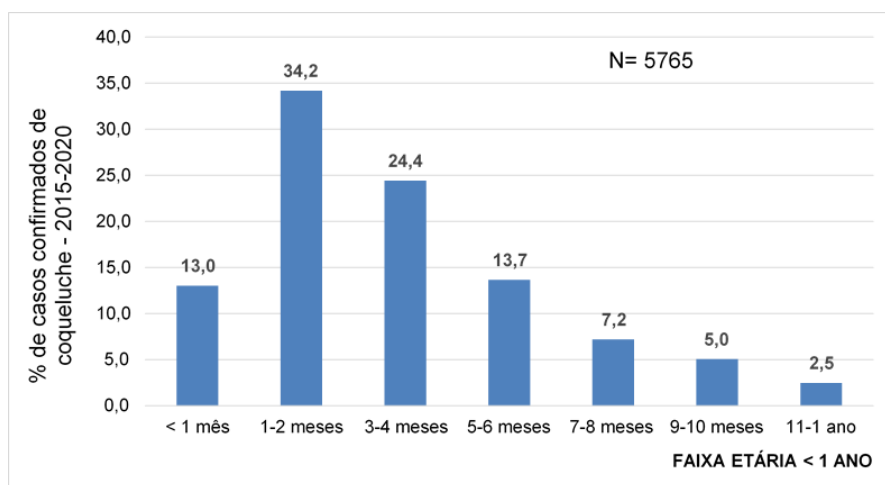
No período de 2015 a 2020, após a epidemia de 2014, foram notificados no Sistema de Agravos de Notificação (SINAN) 10.012 casos de coqueluche no país, sendo que 57,6% (5765/10012) ocorreram em crianças menores de um ano de idade. A série histórica dos últimos seis anos mostram elevada incidência de casos notificados por 100 mil hab. em crianças com menos de 1 ano de idade, quando comparada às demais faixas etárias, variando de 69,5/100 mil habitantes em 2015 a 4,64/100 mil habitantes em 2020, (Tabela 1). Ressalta-se que entre os menores de

um ano, 85,3% (4917/5765) eram menores de seis meses de idade (Figura 5), grupo mais suscetível à doença, uma vez que não receberam o esquema vacinal completo (ao menos três doses da vacina Pentavalente), conforme preconizado no Calendário Nacional de Vacinação da Criança (SAÚDE, 2021). Dentre os menores de 6 meses, 34,2% (1681/4917) eram crianças entre 1-2 meses de idade, período que antecede a primeira dose da vacina pentavalente, administrada aos 2 meses de idade. Nesse período foram registrados um total de 93 óbitos, sendo 87 confirmados em crianças com menos de um ano de vida, 4 óbitos ocorridos na faixa etária de 1-4 anos e 2 óbitos em adolescentes de 10-14 anos (SINAN/DATASUS).

**Tabela 1** – Distribuição da Incidência de casos de coqueluche por faixa etária no período de 2015-2020.

Faixa Etária	Total de Casos	%	Coeficiente de Incidência (C.I)/ 100.000 habitantes por ano – 2015-2020					
			2015	2016	2017	2018	2019	2020
<1 Ano	5765	57,6	69,5	30,5	38,4	40,0	29,45	4,64
1-4	1632	16,3	3,88	1,73	2,7	3,20	2,84	0,37
5-9	861	8,6	1,90	0,71	1,35	1,16	0,69	0,05
10-14	600	6,0	0,94	0,29	0,85	1,11	0,85	0,06
15-19	167	1,7	0,30	0,13	0,23	0,24	0,16	0,02
≥ 20	987	9,9	0,18	0,08	0,11	0,15	0,10	0,02
<b>Total</b>	<b>10012</b>							

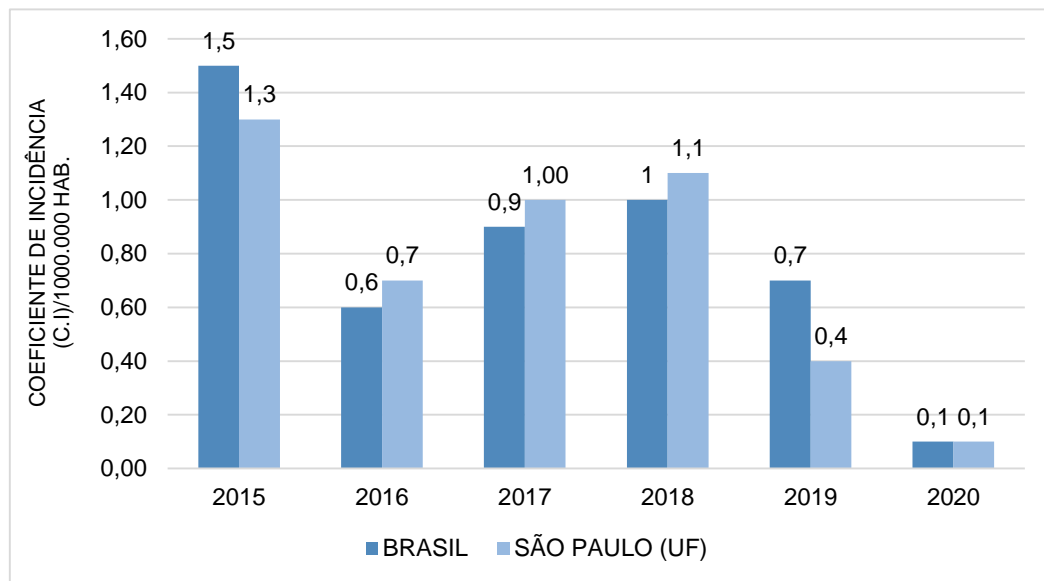
Fonte: SINAN/DATASUS / População: IBGE/ DATASUS



Fonte: SINAN/DATASUS População: IBGE/DATASUS

**Figura 5:** Distribuição do percentual de casos confirmados de coqueluche segundo faixa etária em meses/anos. Brasil, 2015 a 2020.

No Estado de São Paulo, entre 2015 e 2020, foram confirmados 1926 casos de coqueluche, 55% (1060/1926) em crianças com menos de 1 ano de idade. Não houve diferença sobre as incidências anuais, quando comparado com dados nacionais (Figura 6). Neste mesmo período, foram notificados 34 óbitos no Estado, todos em menores de um ano de idade (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – SP, 2020).



Fonte: SINAN/DATASUS/CVE-SP - População: IBGE/DATASUS

**Figura 6:** Comparativo sobre a Incidência de coqueluche no Brasil e no Estado de São Paulo, 2015 a 2020.

A partir de 2016, foi registrado um declínio geral em relação às coberturas vacinais, incluindo a Pentavalente e a DTP com tendência de queda ao longo dos anos (Figura 4) (PACHECO, et al., 2019). Um dado preocupante foi observado 2019, quando se registrou os menores índices de cobertura vacinal em relação ao 1º e 2º reforço da vacina DTP dos últimos 6 anos com 57% e 53,7%, respectivamente (Figura 4) (SAÚDE, 2021).

Em março de 2020, o Brasil foi atingido pela pandemia do vírus Sars-COV-2, causador da doença Covid-19, que modificou intensamente o modo de viver da população e o uso dos serviços de saúde, nos quais o comparecimento presencial caiu drasticamente, inclusive para a vacinação infantil, tendo como possíveis causas as medidas de distanciamento social para se evitar a transmissão do vírus (SATO, 2020).

A pandemia também causou alterações importantes nos indicadores epidemiológicos e operacionais. Foram observados acentuada redução no total de notificações de casos de coqueluche no ano de 2020 com incidência de 0,1/100 mil habitantes em comparação com o ano de 2019 com incidência de 0,7/100 mil habitantes, dados que podem indicar a diminuição no diagnóstico da doença (Figura 4). Por outro lado, as medidas de prevenção contra a covid-19 como lavagem das mãos, uso de álcool em gel, uso de máscara e distanciamento social, podem ter contribuído para uma queda na transmissão da doença.

O enfrentamento da pandemia de covid-19, somados a crise político-econômica já enfrentada desde anos anteriores, a diminuição do apoio governamental ao SUS (SOUZA, 2019) e a difusão por redes sociais de informações distorcidas sobre vacinas, possivelmente são fatores que contribuirão para a queda das coberturas vacinais nos próximos anos e conseqüentemente, crianças, principalmente àquelas em condições socioeconômicas desfavoráveis, estarão entre mais suscetíveis a doenças imunopreveníveis (SATO, 2020).

### **1.11 RESSURGÊNCIA DA COQUELUCHE**

A ressurgência da coqueluche pode estar associada a diferentes fatores que incluem: (i) o fato de crianças serem vacinadas e/ou parcialmente vacinadas antes da maturação do sistema imune; (ii) o declínio mais rápido da imunização adquirida com a vacina APV em comparação à vacina WCP (DE ARAÚJO; DE ARAÚJO; BARBOSA, 2019; KLEIN; BARTLETT; ROWHANI-RAHBAR; FIREMAN *et al.*, 2012; MAIA; FRIAS; ASSUNÇÃO; VIDAL *et al.*, 2019); (iii) novas adaptações e evolução de *B. pertussis* e *B. parapertussis*, incluindo mudanças em seus genomas (DE ARAÚJO; DE ARAÚJO; BARBOSA, 2019; WEIGAND; WILLIAMS; PENG; KANIA *et al.*, 2019); (iv) adolescentes e adultos tornando-se vulneráveis à doença com declínio natural da resposta imune adquirida pela vacinação (LIBSTER; EDWARDS, 2012).

A imunidade vacinal diminui com o tempo, sendo de 5–14 anos para vacina DTP e de 4–7 anos para DTPa (KILGORE; SALIM; ZERVOS; SCHMITT, 2016; MACHADO; PASSOS, 2019), promovendo a permanência da circulação da bactéria e, conseqüentemente a queda da proteção contra a doença e formação das principais

fontes de infecção para os recém nascidos (CORNIA; HERSH; LIPSKY; NEWMAN *et al.*, 2010; FORSYTH; VON KONIG; TAN; CARO *et al.*, 2007).

Outras possíveis causas da ressurgência da coqueluche podem estar relacionadas à mudança na população de *B. pertussis* desde a introdução da vacinação (BARKOFF; MERTSOLA; PIERARD; DALBY *et al.*, 2019; DE ARAÚJO; DE ARAÚJO; BARBOSA, 2019). Estudos conduzidos na Austrália e em outros países desenvolvidos constataram o surgimento e expansão de cepas com polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* – SNP); SNPs são variações do DNA que afetam somente uma base nitrogenada na sequência do genoma. O surgimento e expansão de cepas com SNP têm sido associados a duas grandes mudanças genéticas em *B. pertussis*: a) uma mudança no promotor da toxina pertussis (PT) de *ptxA* (antes da introdução da vacinação) para *ptxP3*, que leva ao aumento da produção de PT, e b) à mudança do alelo do gene da pertactina (*PRN*), que leva ao aumento de cepas com deficiência de *PRN* (*PRN*-negativa) (LAN; OCTAVIA, 2019; OCTAVIA; MAHARJAN; SINTCHENKO; STEVENSON *et al.*, 2011). Na França, desde 2005, 7 anos após a introdução das vacinas acelulares (APVs), foi observado o aparecimento de isolados de *B. pertussis* e *B. parapertussis* PRN-negativas (BOUCHEZ; BRUN; DORE; NJAMKEPO *et al.*, 2011). Cepas de *B. pertussis* PRN-negativas foram identificadas em 85% dos isolados obtidos de oito Estados dos EUA entre 2011 e 2013 (MARTIN; PAWLOSKI; WILLIAMS; WEENING *et al.*, 2015). Essas amostras emergiram rapidamente e não expressam o *PRN* contido na vacina DTPa, sugerindo vantagem seletiva, pois indivíduos previamente vacinados tiveram maior chance de infecção com as cepas deficientes em PRN do que com a cepa expressando essa proteína (PAWLOSKI; QUEENAN; CASSIDAY; LYNCH *et al.*, 2014; QUEENAN; CASSIDAY; EVANGELISTA, 2013).

Ainda não está claro se *B. parapertussis* pode responder como *B. pertussis* à pressão seletiva exercida pela vacinação em larga escala, devido aos poucos estudos e a poucas sequências genômicas analisadas (BOUCHEZ; GUIZO, 2015). Apesar do aumento constante no número de isolados de *B. parapertussis* PRN-negativos em pacientes com sintomas de coqueluche desde a introdução das vacinas DTPa, Bouchez (2011) relata que o aparecimento desses isolados não pode ser atribuído à introdução dessas vacinas, já que não induzem imunidade protetora contra *B. parapertussis*. O aumento de *B. parapertussis* PRN-negativos pode estar vinculado à



adaptação contínua desse patógeno ao hospedeiro humano, pois a expressão de *PRN* não é requerida por *B. parapertussis* durante a interação com seu hospedeiro (BOUCHEZ; GUIZO, 2015).

No Brasil, apesar da disponibilidade de vacinas eficazes e das altas taxas de cobertura vacinal, há fortes indícios de que esteja ocorrendo o mesmo padrão epidemiológico observado em países desenvolvidos, com aumento de casos de coqueluche associados a adolescentes e adultos devido ao declínio da imunidade induzida pela vacina (FORSYTH; VON KONIG; TAN; CARO *et al.*, 2007). No entanto, quando se analisa os dados atuais de vigilância do país, se observa que não há um aumento significativo nas taxas de incidência de coqueluche (FREITAS; OKANO; PEREIRA, 2011). Uma possível explicação para este dado está relacionada ao subdiagnóstico e a subnotificação de casos principalmente neste grupo etário, que geralmente ao adquirir a doença apresentam sintomas inespecíficos, dificultando o diagnóstico adequado, os tornando potenciais transmissores do patógeno para indivíduos mais susceptíveis (HEWLETT; KIM; LEE; GRAY, 2000).

Diante deste cenário, estudos soroepidemiológicos podem ser uma importante ferramenta para se estimar de forma mais realista a incidência de coqueluche no Brasil, auxiliando no entendimento real do impacto da doença para rever as estratégias de vacinação, bem como a necessidade de implantação de doses de reforço. Tais estudos visam compreender a cadeia de transmissão da doença e dando suporte a busca pelo desenvolvimento de vacinas mais efetivas que forneçam proteção duradoura. Portanto, propomos um estudo epidemiológico presuntivo da circulação de *B. pertussis* e *B. parapertussis*, através da avaliação da resposta imune humoral e celular em amostras de sangue de voluntários humanos, de ambos os gêneros e diferentes faixas etárias, vacinados ou não contra pertussis. Em uma segunda etapa, como complemento ao estudo soroepidemiológico, também foi proposto um modelo experimental murino de desafio respiratório para avaliar a memória imunológica à vacinação com a WCP, na proteção persistente contra *B. pertussis* após o declínio dos níveis de anticorpos promovidos pela vacina. E se um reforço com vacinas WCP, APV ou Plow induz uma resposta imune protetora mais significativa em relação a ausência do reforço.

Os resultados deste estudo poderão ser utilizados como subsídio para um Ensaio de Campo de Fase I/II, a ser realizado com uma nova vacina pertussis celular (Plow), assim que for disponibilizada pelo setor de produção do Instituto Butantan.

## 2 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver um estudo epidemiológico presuntivo da circulação por *B. pertussis* e *B. parapertussis*, baseado na resposta imune presente contra os respectivos antígenos em indivíduos de diferentes faixas etárias, vacinados ou não com vacina pertussis, provenientes da região metropolitana de São Paulo.

Avaliar, através de um modelo animal murino, a memória imunológica à vacinação com a WCP na proteção persistente contra *B. pertussis* após o declínio dos níveis de anticorpos promovidos pela vacina. Além disto, investigar se um reforço, com vacinas WCP, APV ou Plow induz uma resposta imune protetora mais significativa em relação a ausência do reforço.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resposta imune humoral e celular contra *B. pertussis* e *B. parapertussis*, em amostras de sangue de voluntários humanos;
- Quantificar por ELISA anticorpos IgG anti-PT e IgM anti-PT em amostras de soro, de modo a identificar faixa etária possivelmente relacionada ao estado de portador sintomático ou assintomático de *B. pertussis* ou *B. parapertussis* circulantes, correlacionando com possível declínio da resposta imune protetora da vacina.
- Analisar a influência de diferentes variáveis demográficas (faixa etária, gênero, fumo, tosse prolongada, doença crônica, contato com criança e se já teve coqueluche) no aumento dos níveis de anticorpos IgG anti-PT associados com indicativo de contato por pertussis nos últimos 12 meses ou com forte indicativo de infecção recente.
- Avaliar em modelo animal a memória imunológica à vacinação com a WCP na proteção persistente contra *B. pertussis* após o declínio dos níveis de anticorpos promovidos pela vacina.
- Avaliar a resposta imune protetora induzida após um reforço com vacinas WCP, APV ou Plow em relação a ausência do reforço.
- Analisar possíveis mudanças no perfil de resposta celular Th1/Th2/Th17 após um reforço com APV ou Plow.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 DELINEAMENTO PARA ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO COM AMOSTRAS DE SANGUE HUMANO.**

Esta primeira etapa do delineamento se trata de um estudo indireto de prevalência, em epidemiologia também conhecido como Estudo transversal, pois o perfil de resposta imune reflete a prevalência da doença. Na investigação de surtos epidêmicos, a realização de um estudo transversal avaliando exposição é, em geral, o primeiro passo para a determinação da sua causa (BONITA; BEAGLEHOLE; KJELLSTRÖM, 2008). Neste estudo foi investigado a relação entre os níveis de IgG anti-PT (fator de exposição) e a possível relação com infecção por *B. pertussis*.

##### **3.1.1 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS HUMANAS**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Humanos do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (Plataforma Brasil – CAAE - 33687114.8.3001.0076; Número de Parecer: 728400)

Os ensaios foram desenvolvidos de acordo com protocolos estabelecidos pelo grupo de ensaios clínicos da Fundação Butantan, em conjunto com o Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP), seguindo as normas para realização de pesquisa em seres humanos descritas na Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 2013).

Foram incluídos na pesquisa amostras de sangue de 1500 indivíduos saudáveis, não imunizados ou previamente imunizados com vacina pertussis, seguindo os esquemas de vacinação preconizados. Foram selecionadas para participar da pesquisa pessoas de 5 a 76 anos de idade, sem histórico de tuberculose, imunodeficiência ou doenças neoplásicas. Gestantes e puérperas (até 40 dias) ou pessoas em tratamento com antibióticos não participaram da pesquisa.

Foram abordados indivíduos voluntários em acompanhamento ambulatorial no HU-USP, previamente encaminhados ao setor de Apoio Diagnóstico para coleta de sangue. Após a leitura, compreensão e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I), os indivíduos foram submetidos a um questionário (Anexo II),

com questões sobre sua saúde e vacinação, e direcionados à coleta de sangue, feita por funcionários do hospital.

Foram coletados, de cada voluntário maior de 18 anos, 10 mL de sangue periférico em tubo com heparina para os ensaios de proliferação linfocitária e quantificação de citocinas e 4 mL em tubo com gel separador e ativador de coágulo para a dosagem de anticorpos. Os volumes de sangue coletados estavam de acordo com a Portaria nº 1.353 do Ministério da Saúde, que aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Para os menores de 18 anos foram coletados 8 mL em um tubo com heparina e 2 mL em tubo com gel separador. O material foi transportado em caixa térmica, de polietileno ou similar, lavável, resistente à desinfecção e portando a identificação “Risco Biológico”. O sangue anticoagulado foi transportado à temperatura ambiente e o soro fracionado foi congelado. Após as análises, as sobras das amostras foram descartadas, seguindo as normas estabelecidas na Resolução 306, de 7 de dezembro de 2004, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde (AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 2004). As amostras de sangue, assim que chegavam ao laboratório, foram processadas: As amostras de sangue contidas no tubo gel separador e ativador de coágulo, utilizadas para avaliação da resposta imune humoral, foram centrifugadas a 3200 por 10 min. Os soros foram separados, distribuídos em alíquotas e armazenados a -20 °C até o uso. Foram utilizados protocolos anteriormente descritos para a dosagem de anticorpos IgM e IgG anti-PT, anti- *B. pertussis* (anti-WCP) e anti- *B. parapertussis* (anti-Bpp) através de teste imunoenzimático (ELISA).

As amostras de sangue contidas em tubo com heparina foram utilizadas para avaliação da produção de citocinas, através de estímulos *in vitro* das células de sangue total conforme protocolo preconizado por Kirchner (1982) (KIRCHNER; KLEINICKE; DIGEL, 1982).

### 3.1.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

#### 3.1.2.1 Quantificação de IgG anti-PT

Foram analisados soros de 1500 voluntários por ensaio imunoenzimático (ELISA) para quantificação de IgG anti-PT. Para o estudo de correlação temporal indicativa de contato recente ou infecção por pertussis, títulos de IgG anti-PT foram soro-convertidos para IgG anti-PT em UI/mL, através de uma curva padrão dose-resposta em escala log, utilizando soro padrão *Pertussis Antiserum (human) 1st IS-WHO international Standard* (NIBSC 06/140), com 335 UI/mL por ampola (1 mL), conforme preconizado pela Organização Mundial da Saúde (GUIISO; BERBERS; FRY; HE *et al.*, 2011); EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2012).

Foram utilizadas placas de imunoensaios, com 96 poços (Costar 3590). As placas foram sensibilizadas com PT (Sigma-Aldrich) 1 µg/mL, em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, incubadas por 12 h a 4 °C. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com Tampão de Lavagem (solução salina tamponada com fosfato (PBS) /Tween 20 0,1%) e bloqueadas com leite desnatado em pó (Molico®) 10% em PBS/soro-albumina bovina (BSA) 1%, seguidas de incubação por 1 h a 37 °C. Após nova lavagem, os soros foram diluídos de forma seriada a partir de 1:50 em PBS/BSA 1% e incubados por 2 h a 37 °C. Após nova lavagem, foi utilizado como anticorpo revelador da reação um soro conjugado de cabra anti-Human IgG (*Whole molecule*) peroxidase (Sigma-Aldrich), diluição 1:10000; em seguida as placas foram novamente incubadas por 1 h a 37 °C. Após nova lavagem, a reação foi revelada por adição de substrato TMB, seguida de incubação por 15 min à temperatura ambiente, sob abrigo da luz e interrompida com adição de ácido sulfúrico 4 M/L. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Multiscan EX - Uniscience), a DO<sub>450</sub> nm.

#### 3.1.2.2 Quantificação de IgG anti-Bpp

Para a avaliação de IgG anti-Bpp os procedimentos foram semelhantes aos descritos no item 3.1.2.1. As placas foram sensibilizadas com células inativadas de *B. parapertussis* (Bpp) (10<sup>10</sup> células/mL), em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6.

### 3.1.2.3 Quantificação de IgM anti-PT

Para avaliação de IgM anti-PT, os procedimentos foram semelhantes aos descritos no item 3.1.2.1, usando anticorpo revelador da reação um soro conjugado de cabra anti-human IgM ( $\mu$ -chain specific) peroxidase (Sigma-Aldrich) com diluição de 1:10000.

### 3.1.2.4 Quantificação de IgM anti-Bpp

Para avaliação de IgM anti-BPP, os procedimentos foram semelhantes aos descritos no item 3.1.2.1, usando anticorpo revelador da reação um soro conjugado de cabra anti-human IgM ( $\mu$ -chain specific) peroxidase (Sigma-Aldrich) com diluição de 1:10000.

## 3.1.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM AMOSTRAS DE SANGUE DE VOLUNTÁRIOS

### 3.1.3.1 Avaliação de citocinas th1/th2/th17 em amostras de sangue de voluntários

As 1500 amostras de sangue foram individualmente colhidas em tubo de coleta contendo heparina (BD Vacutainer®). Os tubos foram suavemente homogeneizados e 250  $\mu$ L de sangue de cada amostra foi adicionado individualmente em criotubos estéreis de 2 mL (Corning®), contendo 400  $\mu$ L de meio RPMI (Sigma-Aldrich) estéril e 250  $\mu$ L de estímulo previamente preparado com:

- (i) Vacina pertussis celular tradicional –  $10^8$  células /mL (wP);
- (ii) Vacina pertussis celular com baixo teor de LOS –  $10^8$  células /mL (Plow);
- (iii) Células de *B. parapertussis* –  $10^8$  células /mL - inativadas por formol (Bpp).
- (iv) Como controle negativo de células não estimuladas, foi utilizado o meio de cultivo e o controle da viabilidade celular foi feito por estimulação mitótica com concanavalina A (10  $\mu$ g/poço).

Após a adição do sangue, os criotubos foram homogeneizados suavemente e incubados a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> por 48 h. No momento da coleta foram adicionados 100  $\mu$ L de Triton X-100 a 5% e as preparações agitadas em *vortex* para promover a

lise das células. As amostras foram então armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso. No dia da análise, as amostras foram descongeladas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e centrifugadas a 4000 rpm  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 7 min. Para a análise de citocinas foi utilizado o Kit CBA (BD Biosciences, San Jose, Califórnia) Th1/Th2/Th17 Humano, que permite a detecção simultânea de sete populações de *beads* com distintas intensidades de fluorescência, revestidas com anticorpos de captura específicos para IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Th1); IL4, IL6, IL10 (Th2); IL17 (Th17) por amostra, em citometria de fluxo.

- I. **Etapa: Preparação das beads de captura:** Foi feito um *pool* com as 7 *beads* de captura em tubo falcon de 15 mL, e após agitação em *vortex*, foram centrifugadas a  $200 \times g$  por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em tampão *serum enhancement* (solução proteica tamponada usada para diluir as *beads* de captura), seguido de incubação a temperatura ambiente por 30 min, sob abrigo da luz, quando foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  das *beads* de captura, em placas 96 poços de cultivo de fundo cônico (Costar ref: 3894).
- II. **Etapa: Curva Padrão:** Os sete padrões de citocinas liofilizadas foram reconstituídos com tampão diluente e diluídas de forma seriada na placa de cultura contendo as *beads de captura*, formando um imunocomplexo do tipo sanduíche.
- III. **Etapa: Preparo das amostras teste:** Alíquotas das amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 7 min. Em seguida, 30  $\mu\text{L}$  por poço foram distribuídos na placa de cultura contendo as *beads de captura*. Após a preparação da curva padrão e adição das amostras, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de Ficoeritrina (PE) em todos os poços. Após incubação por 3 h ao abrigo de luz, foi adicionado tampão de lavagem, seguido de centrifugação a  $200 \times g$  por 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspensos em 200  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem. A leitura foi feita no equipamento BD FACSCanto II™. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas através do software FCAP Array (BD). A quantificação de citocinas foi expressa em pg/mL.

#### 3.1.4 SOROPREVALÊNCIA

Para os estudos de soroprevalência foi utilizada metodologia de padronização sorológica através da determinação de um valor de corte (*cut-off*). Essa metodologia permite avaliar a tendência epidemiológica, pode ser utilizada como ferramenta



diagnóstica para infecção por pertussis. Através dessa metodologia, os títulos de anticorpos IgG anti-PT, dosados por ELISA foram convertidos em UI/mL através da construção de curva dose-resposta, em escala logarítmica, utilizando soro padrão *Pertussis Antiserum (human) 1st IS-WHO international Standard* (NIBSC 06/140). A interpretação dos resultados foi feita de acordo com “*The Immunological Basis for Immunization Series, modulo 4: Pertussis*” ORGANIZATION (2017), ECDC (2012) e Fraj e colaboradores (2019). (i) Concentrações de IgG anti-PT > 125 UI/mL foram interpretadas como indicativas de infecção recente ou ativa por pertussis caso o voluntário não tenha sido vacinado nos últimos 12 meses; (ii) concentrações entre 40-125 UI/mL como indicativas de recente contato com pertussis nos últimos 12 meses; (iii) concentrações < 40 UI/mL foram consideradas soronegativas (FRAJ; SMAOUI; ZGHAL; SASSI *et al.*, 2019; FRAJ; ZGHAL; HSAIRI; KECHRID *et al.*, 2019; GUIISO; BERBERS; FRY; HE *et al.*, 2011)

### **3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM MODELO MURINO**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), com protocolo nº 3469110820

Camundongos saudáveis, fêmeas da linhagem BALB/c entre 5 e 7 semanas de idade foram adquiridos do biotério do Instituto Butantan, mantidos em gaiolas separadas em um laboratório de biossegurança e alimentados com ração comercial e água, sob controle de temperatura.

Foram conduzidos dois ensaios independentes, o primeiro para avaliação da resposta humoral e memória imunológica e o segundo para avaliação da resposta imune pós-infecção e proteção.

#### **3.2.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL E MEMÓRIA IMUNOLÓGICA**

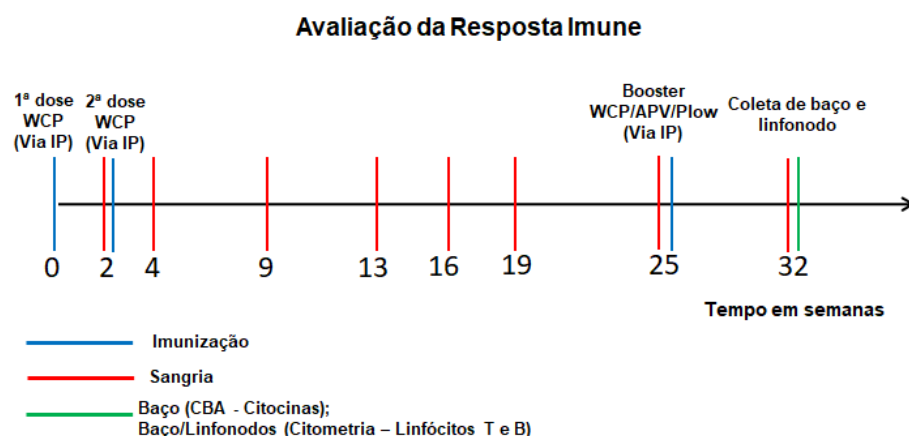
##### **3.2.1.1 Esquema de imunização**

Os camundongos foram randomizados em 5 grupos de 5 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c. Foram imunizados com diferentes formulações vacinais por via intraperitoneal (200 µL/dose) (Quadro 1):

**Quadro 1:** Esquema de formulações vacinais

Grupos	Imunização primária		Imunização heteróloga	Doses
	1ª dose	2ª dose	Reforço (booster)	
1	Salina	Salina	Salina	200 µL/dose
2	WCP	WCP	Sem <i>booster</i>	Uso: 5,6 (UO) em 200 µL/dose
3	WCP	WCP	WCP	5,6 (UO) em 200 µL/dose
4	WCP	WCP	APV	5,6 (UO) em 200 µL/dose (WCP) + ½ dose humana em 200 µL/dose (APV)
5	WCP	WCP	Plow	5,6 (UO) em 200 µL/dose

O esquema de imunização foi feito conforme protocolo preconizado por MAHON e colaboradores, com algumas modificações (MAHON; BRADY; MILLS, 2000). Todos os grupos foram imunizados com a 1ª dose da vacina WCP no dia 0, com exceção do controle que recebeu salina. Após 2 semanas, antes da 2ª dose, foi realizada a primeira sangria (volume de 50 µL por animal), por via retro orbital. Após a imunização primária, equivalente a 1ª e 2ª dose, foram realizadas outras cinco sangrias sucessivas (4ª, 9ª, 13ª, 16ª e 19ª semanas) para o acompanhamento da cinética de produção de anticorpos IgG anti-PT (Figura 7). Na 25ª semana, após uma sétima sangria, foi feito um *booster* heterólogo: O grupo 3 foi imunizado com WCP, grupo 4 com a APV e o grupo 5 com a Plow. Na 32ª semana, após uma oitava sangria, todos os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésico (300 mg/kg de cloridrato de cetamina + 30 mg/kg de xilazina) por via intraperitoneal. (Figura 7).

**Figura 7:** Esquema de imunização, sangria, coleta de baço e linfonodo para avaliação da resposta imune.

Os soros obtidos das diferentes sangrias, realizadas conforme o delineamento proposto (Figura 7A), foram analisados individualmente por ensaio de ELISA, para avaliar a cinética de produção de IgG anti-PT após imunização primária com a WCP e, posteriormente, para análise da resposta imune humoral através da quantificação de anticorpos IgG Total, IgG1 e IgG2a contra *B. pertussis* (5 µg/mL) e PT (1 µg/mL).

### 3.2.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE IgG ANTI-PT PARA PADRONIZAÇÃO DA DOSE DE REFORÇO

Para a avaliação de IgG anti-PT os procedimentos foram semelhantes aos descritos no item 3.1.2.1. Para o ELISA, foram utilizadas placas de 96 poços (Costar®). A sensibilização (*coating*) foi feita com PT (1 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato. Para a curva padrão, o anticorpo IgG Total foi adicionado aos poços ao mesmo tempo que o *coating* da proteína. Foram feitas diluições seriadas em tampão carbonato-bicarbonato: Anticorpo IgG Total – diluição inicial (2 µg/mL). Um pool de soros de cada grupo, definido conforme esquema de imunização (Quadro 1) foram diluídos em PBS/BSA 1% com diluições seriadas iniciando a partir de 1:10. Foi utilizado como anticorpo revelador da reação um soro conjugado de rabbit anti-goat HRP (marcado com peroxidase), 1:20.000, diluído em PBS/BSA 1%. A reação foi revelada por adição de substrato tetrametilbenzidina (TMB), seguida de incubação por 15 min à temperatura ambiente, sob abrigo da luz, e interrompida com adição de ácido sulfúrico 4 M/L. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Multiskan EX - Uniscience), a DO 450 nm.

### 3.2.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

#### 3.2.3.1 Avaliação de citocinas em cultura de células do baço

Após a eutanásia, os baços foram processados individualmente em meio RPMI (Invitrogen). A porção contendo as células foi centrifugada a 280 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. As hemácias presentes no pellet celular foram lisadas por incubação com 1 mL de água destilada estéril durante 10 s, seguida por adição de 10 mL de RPMI (Invitrogen) e nova centrifugação. O pellet celular foi então

ressuspendido em 1 mL de RPMI (Invitrogen), e a viabilidade celular analisada por contagem em câmara de Newbauer utilizando-se azul de tripan. A cultura celular foi realizada em placas de 96 poços (*Corning-Costar*) de fundo U, utilizando  $1 \times 10^6$  células/poço em 100  $\mu$ L de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (Sigma) - RPMI complemento. Foram feitas triplicatas: Cultura celular 1 – estímulo com *B. pertussis* ( $10^8$  UFC/mL); Cultura celular 2 - estímulo com PT (1  $\mu$ g/mL); Cultura celular 3 – sem estímulo. Foi utilizada concanavalina A (Con A; Sigma, Alemanha) (5 $\mu$ g/mL) como meio inespecífico de mitose celular, ou apenas o meio como um controle negativo. As culturas foram incubadas por 72 h a 37 °C em uma incubadora umidificada de 5% de CO<sub>2</sub> e os sobrenadantes foram armazenados a -80 °C para as medidas de citocina relacionadas à resposta Th1/Th2 e Th17 por Kit CBA (BD Bioscience) de acordo com instruções do fabricante. Os dados foram adquiridos em FACS Canto II (BD) e analisados no Software FCAP 3.0.

### **3.2.3.2 Imunofenotipagem de linfócitos T CD4 e T CD8 em células de baço e linfonodos por Citometria de Fluxo**

Após a eutanásia, os baços e linfonodos foram individualmente removidos de forma asséptica, colocados em Potters contendo 2 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB e macerados delicadamente. As células desprendidas foram recolhidas em tubos de 15 mL e centrifugadas (280 x g, por 10 minutos a 4 °C). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de tampão de lise dos eritrócitos (BD Facs Lysing solution, BD Biosciences), deixando agir por 1 min. Após a lise, o volume foi completado para 10 mL com RPMI e foi submetido a centrifugação novamente (280 x g, 10 min, 4 °C). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1 mL de RPMI suplementado com 10% de SFB. A contagem de células foi realizada através da coloração com Trypan, foi verificada a viabilidade, em seguida foi adicionado  $1 \times 10^6$  células/poço em placa de 96 poços para o procedimento de marcação de células com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos.

Foram utilizados anticorpos monoclonais conjugados com fluoresceína (BD Biosciences) capazes de identificar os antígenos de superfície celular da linhagem linfoide T CD3, T CD4, CD8 e populações de linfócitos T efetores, memória central e células Naïve (Tabela 2). O CD3 foi utilizado como marcador comum. Para o

procedimento de marcação de células, a placa foi lavada com tampão PBS contendo 0,5% de SFB e 2 mM EDTA (tampão Macs), foi adicionado 100-200  $\mu\text{L}$ /poço e submeteu-se a centrifugação 280 x g, 10 min, 4 °C. Depois da lavagem, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se o mix  $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD4}/\alpha\text{CD8}$  (100  $\mu\text{L}$  de tampão Macs + 0,5  $\mu\text{L}$  de anticorpo/poço). As células foram ressuspensas e a placa foi colocada por 30 min na geladeira. Em seguida, as células foram submetidas a centrifugação 280 x g, por 10 min. Após uma nova incubação (30 min a 4 °C), duas lavagens foram realizadas com 100  $\mu\text{L}$  e depois com 150  $\mu\text{L}$  de PBS/0,1% de BSA por centrifugação (350 X g, 5 minutos, 20 °C). Em seguida, as células foram fixadas com 100 $\mu\text{L}$  de paraformaldeído (PFA, Sigma-Aldrich) a 1% por 15 min. Mais duas lavagens foram realizadas com a solução PBS /0,1% BSA (350 X g, 5 minutos, 20 °C). Após as lavagens, as células foram ressuspensas em 150  $\mu\text{L}$  de solução PBS /0,1% de BSA e transferidas para tubos próprios para leitura em citômetro de fluxo. As leituras foram realizadas em até 24h após a marcação no citômetro de fluxo FACSCantoll (BD Bioscience). Os dados obtidos foram analisados no programa FlowJo versão 7.5.5 (*TreeStar*, Estados Unidos).

**Tabela 2.** Descrição dos anticorpos monoclonais para fenotipagem dos linfócitos T.

Anticorpo	Laboratório	Código	Clone
Anti - CD3 - APC-Cy7-A	BD Biosciences	560590	17A2
Anti - CD4-PerCP	BD Biosciences	553854	H129.19
Anti - CD8-PECy7	BD Biosciences	552877	53-6.7
Anti - CD44-APC	BD Biosciences	559250	IM7
Anti - CD62L-FITC	BD Biosciences	553150	LECAM-1

### 3.2.3.3 Imunofenotipagem de linfócitos B em células de baço e linfonodos por Citometria de Fluxo

A imunofenotipagem de linfócitos B em células de baço e linfonodos foi realizada conforme protocolo descrito no item 3.2.2.2. Para o procedimento de marcação de células com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, foram utilizados anticorpos monoclonais conjugados com fluoresceína (BD Biosciences) capazes de identificar os antígenos de superfície celular da linhagem linfóide B, célula B de memória e MHC-II (Tabela 3).

**Tabela 3.** Descrição dos anticorpos monoclonais para fenotipagem dos linfócitos B.

Anticorpo	Laboratório	Código	Clone
Anti- B220-FITC	BD Biosciences	553088	RA3-6B2
Anti - CD19-BV421	BD Biosciences	562701	1D3
Anti - CD27-PerCP	BD Biosciences	563603	LG.3A10
Anti - MHCII-PE	BD Biosciences	557000	M5/114.15.2

### 3.2.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

#### 3.2.4.1 Detecção de anticorpos IgG Total, IgG1 e IgG2a.

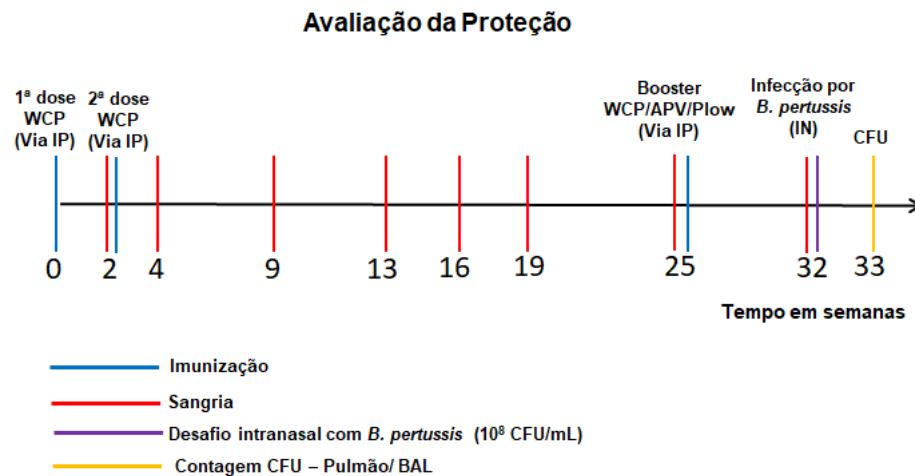
Para a avaliação de IgG anti-PT os procedimentos foram semelhantes aos descritos no item 3.1.2.1. Para o ELISA, foram utilizadas placas de 96 poços (Costar®). A sensibilização (*coating*) foi feita com lisado de *B. pertussis* (5 µg/mL) ou PT (1 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato. Para a curva padrão, os anticorpos IgG padrão (IgG Total, IgG1 e IgG2a) foram adicionados aos poços ao mesmo tempo que o *coating* da proteína. Foram feitas diluições seriadas em tampão carbonato-bicarbonato: Anticorpo IgG Total – diluição inicial (2 µg/mL); Anticorpo IgG1 - diluição inicial (1 µg/mL); Anticorpo IgG2a: diluição inicial (1 µg/mL). Os soros de cada camundongo foram diluídos em PBS/BSA 1% com diluições seriadas iniciando a partir de 1:10. Foi utilizado como anticorpo revelador da reação um soro conjugado de rabbit anti-goat HRP (marcado com peroxidase), 1:20.000, diluído em PBS/BSA 1%. A reação foi revelada conforme item 3.2.2.

### 3.2.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E PROTEÇÃO PÓS-INFECÇÃO

#### 3.2.5.1 Ensaio de infecção com cepa de *Bordetella pertussis*

Foi feita a repetição do protocolo de imunização conforme item 3.2.1.1 e esquema conforme a Figura 8. Na 32ª semana, após a imunização primária, ou 7 semanas após o reforço heterólogo tardio, todos os animais foram previamente submetidos a anestesia (Xilazina 10 mg/Kg e cloridrato de cetamina 100 mg/Kg) para instilação por via intranasal com *B. pertussis* – ATCC 18323 (10<sup>8</sup> UFC/mL) com 40 µL de volume. Após a infecção intranasal, os animais foram observados por um período

de 1 semana. Na 33ª semana, os animais infectados foram eutanasiados por dose letal de anestésico por via intraperitoneal (Xilazina 30 mg/Kg e cloridrato de cetamina 300 mg/Kg) (Figura 8).



**Figura 8:** Esquema de imunização, sangria, infecção intranasal, lavado broncoalveolar (LBA) e coleta de pulmão para avaliação de proteção.

### 3.2.5.2 Lavado broncoalveolar (LBA) e contagem diferencial de leucócitos

Após a eutanásia, a traqueia de cada animal foi exposta, canulada, e com o uso de uma seringa, foram injetados 0,5 mL de PBS gelado no espaço broncoalveolar. Após aspiração do lavado broncoalveolar (LBA) mais 1 mL de PBS foi injetado e aspirado por no mínimo 3 vezes. Em seguida, o LBA foi centrifugado a  $5000 \times g$ ,  $4^\circ C$  por 15 min para obtenção das células para contagem diferencial de leucócitos. Para a contagem diferencial, 200  $\mu L$  da suspensão de células ( $4 \times 10^4$  células) do LBA foram centrifugados a  $27 \times g$  por 4 min na citocentrífuga (StatSpin Cytofuge, Beckman Coulter) para obtenção das lâminas. Após secarem, foi realizada a coloração com um kit de corantes para coloração diferencial rápida “INSTANT PROV” (Interlab).

### **3.2.5.3 Avaliação de citocinas em cultura de células do LBA**

Células obtidas do LBA, pós desafio intranasal, foram centrifugadas a 280 x g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes foram utilizados para a medida de citocinas relacionadas à resposta Th1/Th2/Th17 por Kit CBA (BD Bioscience) de acordo com instruções do fabricante. Os dados foram adquiridos em FACS Canto II (BD) e analisados no Software FCAP 3.0.

### **3.2.5.4 Contagem de bactérias no LBA por unidades formadoras de colônias (UFC).**

Após a obtenção do LBA conforme protocolo descrito no item 3.2.5.2, foram feitas diluições seriadas do homogenato, sendo posteriormente plaqueadas em meio de cultura agar sangue Bordet-Gengou e mantidas a 37 °C. Após 7 dias, foi obtida a contagem da UFCs bacteriana.

### **3.2.5.5 Contagem de bactérias no pulmão por UFC.**

Após a eutanásia, o pulmão de cada animal foi removido assepticamente e colocado em Potter contendo 2 mL de tampão PBS estéril. Em seguida foram macerados e homogeneizados para determinar a carga bacteriana por UFC. A determinação da UFC foi realizada pelo método de diluições seriadas do homogenato que posteriormente foram plaqueadas em meio de cultura agar sangue Bordet-Gengou e mantidas a 37 °C. Após 7 dias, foi obtida a contagem das UFCs bacteriana.

## **4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os dados em ensaios humanos foram estatisticamente analisados através da linguagem R (TEAM, 2013), e software GraphPad Prism 6.02 (GraphPad, San Diego, CA, EUA), considerando o valor  $p < 0,05$  indicativo de significância estatística. O teste estatístico não paramétrico Kruskal - Wallis (KRUSKAL; WALLIS, 1952) foi aplicado nos resultados das análises sorológicas entre os diferentes grupos etários, bem como nas análises de resposta imune celular. Foi aplicado Teste de Regressão Logística



Multivariada (CHAN, 2004) para teste de probabilidade de prevalência de anticorpos anti-PT positivos ( $> 40$  UI/mL) em diferentes variáveis demográficas (idade, gênero, fumo, tosse prolongada, doença crônica, contato com criança e se já teve coqueluche). As avaliações estatísticas dos dados referentes aos ensaios em modelo murino foram realizadas por testes estatísticos *Two-way ANOVA* ou teste *Student's t*, através do *software* GraphPad Prism 6.02 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO SORO-EPIDEMIOLÓGICA EM AMOSTRAS DE SOROS HUMANO.

Um total de 1500 amostras de sangue de voluntários, provenientes do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP), foram incluídas no estudo. Entre o total de amostras, 764 (50,9%) eram de mulheres e 736 (49,1%) de homens, todos com idades entre 5 e 76 anos, previamente imunizados ou não contra pertussis. Todas as amostras foram coletadas no período de 2015 a 2019 e agrupadas em 6 diferentes faixas etárias (5-9; 10-14; 15-19; 20-39; 40-59;  $\geq$  60 anos) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Distribuição por faixa etária/gênero de amostras de sangue de voluntários coletadas entre 2015-2019 – HU/USP – São Paulo.

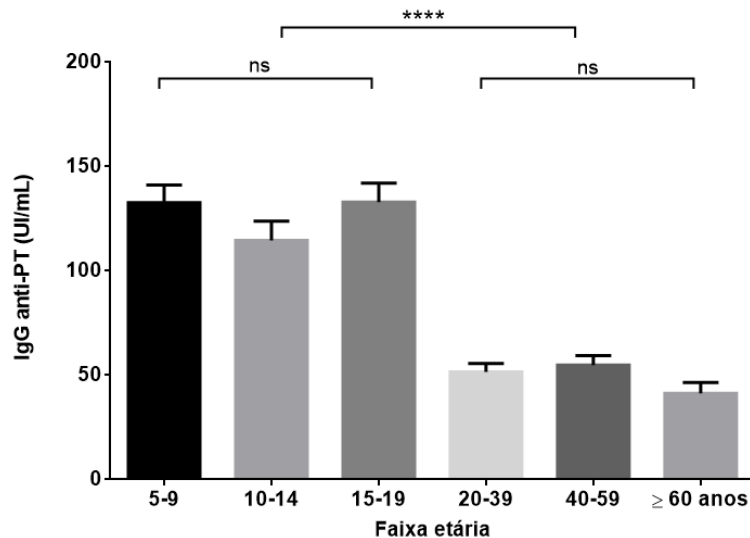
Faixa Etária	Gênero		N° voluntários
	F	M	
5 – 9	69	90	159
10 – 14	61	68	129
15 – 19	56	38	94
20 – 39	223	202	425
40 – 59	246	219	465
$\geq$ 60	109	119	228
<b>Totais</b>	<b>764</b>	<b>736</b>	<b>1500</b>

Quanto ao status vacinal, não foi possível verificar a carteira de vacinação de todos os voluntários, no entanto os pais ou responsáveis, referente às faixas etárias de 5-9, 10-14 e 15-19 anos, ao preencherem o questionário sobre status vacinal e de saúde (Anexo III), por unanimidade afirmaram que todas as vacinas previstas no calendário vacinal estavam em dia, incluindo a DTP. Na faixa etária de 20-39 anos, 91% (386/425) afirmaram que tomaram todas as doses, 8% (35/425) a vacinação foi parcial e somente 0,94% (4/425) afirmaram não ter tomado a vacina DTP. Entre o grupo de 40-59 anos 71% (331/465) afirmaram ter tomado todas as doses, 27% (127/465) não souberam responder e somente 1,5% (7/464) disseram não ter tomado a vacina. Entre os idosos ( $\geq$  60 anos) 64% (146/228) afirmaram ter tomado todas as doses, 34,2% (78/228) não souberam responder e 1,8% (4/228) não tomaram a vacina

DTP. Entre todos os indivíduos que afirmaram não ter tomado nenhuma dose da vacina contra coqueluche, 4 afirmaram nunca ter tomado qualquer tipo de vacina, alegando questões ideológicas.

### 5.1.1 DOSAGENS DE IgG E IgM ANTI-PT

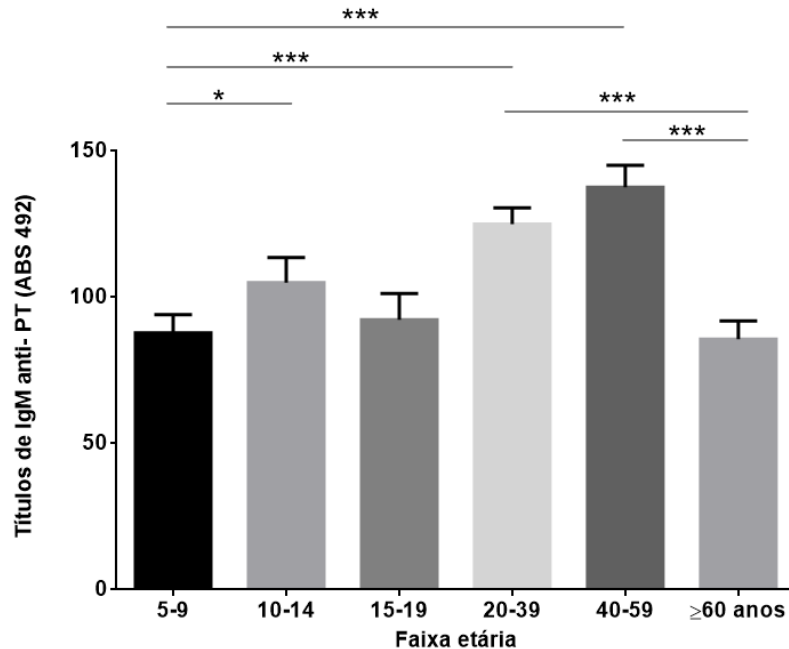
Os 1500 soros de voluntários, agrupados em 6 diferentes faixas etárias, foram analisados por teste ELISA para obtenção de dosagens de IgG e IgM anti-PT. Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis de anticorpos IgG anti-PT (UI/mL) entre os grupos referentes às faixas etárias de 5-9, 10-14 e 15-19 anos, no entanto esses grupos apresentaram maiores níveis de anticorpos estatisticamente significativos ( $p < 0,0001$ ) quando comparados aos adultos e idosos (20-39, 40-59 e  $\geq 60$  anos) (Figura 9).



**Figura 9: Medianas da concentração de anticorpos IgG anti-PT (UI/mL) em soro de voluntários distribuídos por diferentes faixas etárias.** A análise estatística foi feita por teste não paramétrico - Kruskal-Wallis. ns indica não significância estatística entre os grupos. As barras indicam o erro padrão da média. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) entre os grupos indicados.

Em relação aos anticorpos IgM anti-PT, os resultados mostraram títulos médios significativamente maiores nas faixas etárias de 10-14 ( $p=0,0167$ ), 20-39 ( $p < 0,0001$ ) e 40-59 anos ( $p < 0,0001$ ) quando comparados às crianças de 5-9 anos. Os soros da população adulta (20-39 e 40-59 anos) também apresentaram maiores títulos de IgM

anti-PT estatisticamente significativos ( $p < 0,001$ ) em relação aos idosos ( $\geq 60$  anos) (Figura 10).



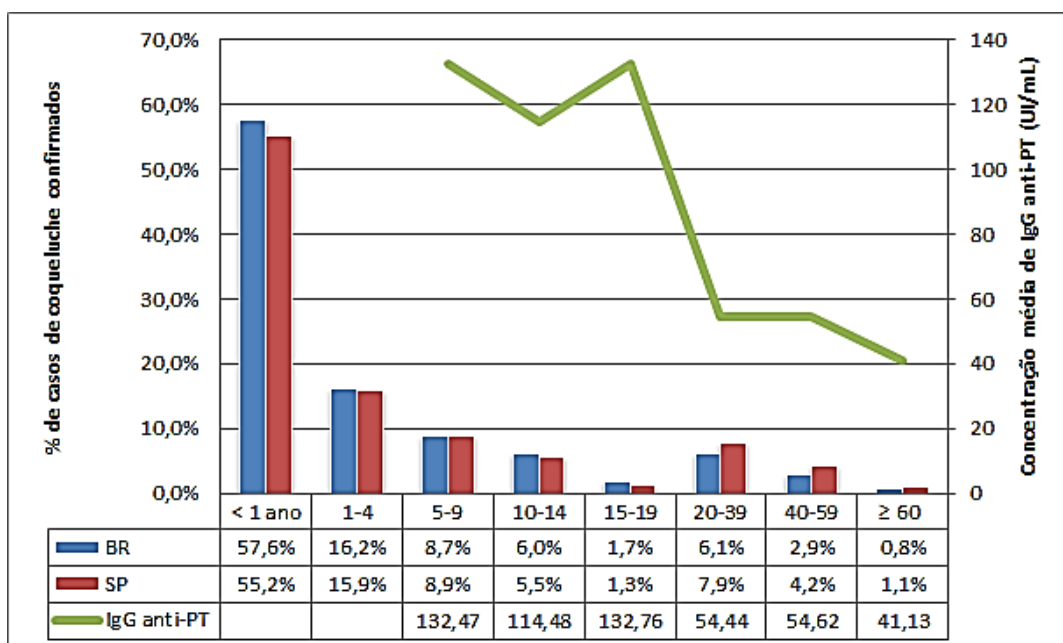
**Figura 10: Média de títulos de anticorpos IgM anti-PT (ABS 492) em soro de voluntários distribuídos por diferentes faixas etárias.** A análise estatística foi feita por teste não paramétrico - Kruskal-Wallis. As barras indicam o erro padrão da média. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) entre os grupos indicados.

### 5.1.2 RELAÇÃO ENTRE CASOS CONFIRMADOS DE COQUELUCHE E NÍVEIS DE ANTICORPOS IgG ANTI-PT EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS

Realizamos um cruzamento de dados entre os resultados de concentrações de IgG anti-PT (UI/mL) obtidos neste estudo (Figura 11) com dados epidemiológicos de porcentagem de casos confirmados de coqueluche disponibilizados no SINAN/DATASUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021) no período de 2015 a 2019.

Um fator limitante deste estudo foi a ausência de coleta de amostras de soro de voluntários abaixo dos 4 anos devido a Unidade Hospitalar não ser de referência ao público infantil desta faixa etária, portanto as análises sorológicas foram conduzidas a partir de voluntários acima dos 5 anos de idade. De acordo com dados do SINAN/DATASUS, neste período, 57,6% das notificações confirmadas de casos de coqueluche foram em crianças menores de 1 ano de idade, seguida de uma acentuada queda de notificações confirmadas a partir da faixa etária de 1-4 anos e de forma mais

pronunciada, no grupo de 15-19 anos. De acordo com os resultados obtidos a partir das análises sorológicas, foi observada uma maior concentração de anticorpos IgG anti-PT nesta população (5-9, 10-14 e 15-19 anos) o que pode ser um fator que explique a queda de casos notificados. Entre a população adulta (20-39 anos), observamos um aumento dos casos notificados em nível nacional e no Estado de São Paulo, 6,1% e 7,9%, respectivamente, em relação a adolescentes (15-19 anos), contrastando com a queda acentuada de anticorpos IgG anti-PT (Figura 11) observada também entre as faixas etárias de 40-59 anos e idosos  $\geq 60$  de anos.



Fonte: Ministério da Saúde

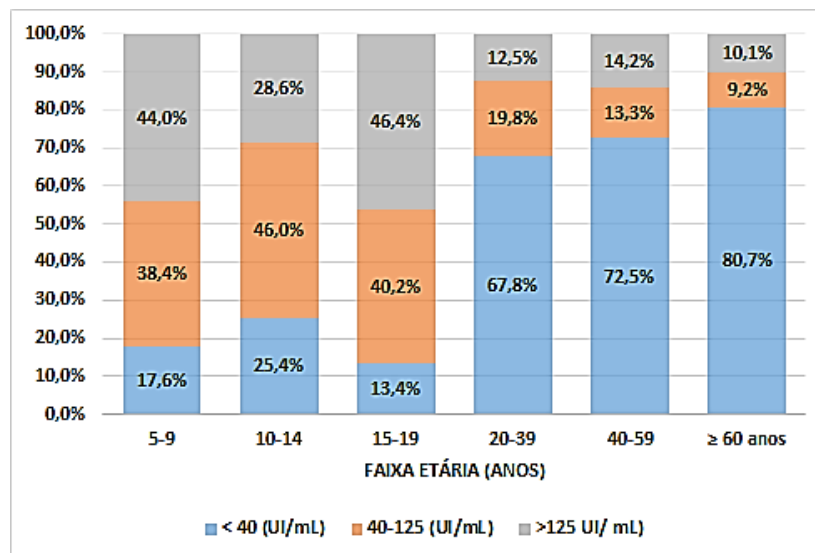
**Figura 11:** Cruzamento de dados entre concentrações de IgG anti-PT (UI/mL) das análises obtidas a partir de soros da população do presente estudo com porcentagem de casos confirmados de coqueluche no período de 2015 a 2019 por faixa etária (SINAN/DATASUS).

### 5.1.3 ANÁLISE SOBRE A CORRELAÇÃO POSITIVA IgG ANTI-PT ASSOCIADAS A DIFERENTES VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS.

No total de soros analisados, 41,2% (618/1500) apresentaram níveis de anticorpos IgG anti-PT acima de 40 UI/mL, sendo considerados soropositivos devido a exposição recente por pertussis, conforme ponto de corte de quantificação de IgG anti-PT preconizado por Fraj *et al.*, (2019) e ECDC (2012). Entre os soropositivos, 21,6% (325/1500) foram classificados como compatíveis ao indicativo de contato recente nos últimos 12 meses, pois apresentaram níveis de IgG anti-PT entre 40-125

UI/mL, enquanto que 19,5% (293/1500) apresentam forte indicativo de infecção recente ou ativa por pertussis por conta dos altos níveis de anticorpos IgG anti-PT quantificados acima de 125 UI/mL. Os níveis de IgG anti-PT < 40 UI/mL foram determinados como soronegativos por conta da exposição recente a *B. pertussis* ser menos provável.

A análise de acordo com as faixas etárias mostrou que 44% (70/159) das crianças de 5-9 anos, 28,6% (37/129) dos adolescentes de 10-14 anos e 46,4% (44/94) de 15-19 anos apresentaram maiores percentuais de soros com forte indicativo de infecção recente por pertussis (IgG anti-PT > 125 UI/mL) quando comparados aos percentuais de adultos de 20-39 anos 12,5% (53/425) e 40-59 anos 14,2% (66/465) e idosos com 60 anos ou mais 10,1% (23/228) (Figura 12).



**Figura 12: Distribuição temporal de soroprevalência por pertussis entre diferentes faixas etárias.** Concentração de IgG anti-PT > 125 UI/mL: forte indicativo de infecção recente ou ativa para pertussis; IgG anti-PT entre 40-125 UI/mL: indicativo de contato com pertussis nos últimos 12 meses; IgG anti-PT < 40 UI/mL foram considerados soronegativos.

Uma análise de regressão logística multivariada mostrou que adultos de 20-39 anos (OD = 0,134; IC 95% = 0,080-0,223;  $p < 0,001$ ) e 40-59 anos (OD = 0,084; IC 95% = 0,050-0,142);  $p < 0,001$ ), bem como idosos  $\geq 60$  anos (OD = 0,052; IC 95% = 0,028-0,099;  $p < 0,001$ ), apresentaram uma correlação negativa ( $p < 0,001$ ) associada a prevalência de IgG anti-PT como indicativo de contato recente por pertussis nos últimos 12 meses ou por possível infecção por pertussis (Tabela 5).

**Tabela 5:** Análise de Regressão logística multivariada associada a prevalência positiva (> 40 UI/mL) de anticorpos IgG anti-PT com indicativo de contato com recente por pertussis nos últimos 12 meses ou com possível infecção recente em diferentes faixas etárias.

IgG Anti-PT <sup>a</sup>	Faixa Etária	Prevalência	OD	IC 95%	p
<b>40-125 UI/mL</b>		<b>n/ n total (%)</b>			
	5-9 <sup>b</sup>	(61/159) 38,4	Ref.	Ref.	Ref.
	10-14	(60/129) 46,0	0,861	(0,463-1,600)	0,635
	15-19	(37/94) 40,2	1,306	(0,602-2,834)	0,499
	20-39	(84/425) 19,8	0,134	(0,080-0,223)	< 0,001
	40-59	(62/465) 13,3	0,084	(0,050-0,142)	< 0,001
	= 60	(21/228) 9,2	0,052	(0,028-0,099)	< 0,001
<b>&gt; 125 UI/mL</b>					
	5-9 <sup>b</sup>	(70/159) 44,0	Ref.	Ref.	Ref.
	10-14	(37/129) 28,6	0,463	(0,243-0,881)	0,019
	15-19	(44/94) 46,4	1,354	(0,634-2,890)	0,434
	20-39	(53/425) 12,5	0,074	(0,043-0,125)	< 0,001
	40-59	(66/465) 14,2	0,078	(0,047-0,131)	< 0,001
	= 60	(23/228) 10,1	0,050	(0,027-0,093)	< 0,001

a - A categoria de referência foi IgG anti-PT < 40 UI/mL

b - Parâmetro de referência escolhido

OD -ODDS ratio

IC – Intervalo de confiança

p < 0,05

N – Número de voluntários

Observamos uma correlação estatisticamente significativa entre o gênero masculino e a soroprevalência positiva para IgG anti-PT (> 40 UI/mL) quando comparados com mulheres (OR = 0,730; IC 95% = 0,585-0,909; p = 0,005). Outras variáveis demográficas como tabagistas [OR = 2,924; IC 95% = 1,888-4,528; (p < 0,001), ex tabagistas [OR = 3,173; IC 95% = 2,260-4,456; (p < 0,001)] e indivíduos que relataram possuírem doenças crônicas [OR = 1,749; IC 95% = 1,395-2,192 (p < 0,001)] também apresentaram uma correlação positiva estatisticamente significativa para prevalência positiva de anticorpos IgG anti-PT (Tabela 6).

**Tabela 6:** Análise de Regressão Logística multivariada para variáveis demográficas associadas ao indicativo de soroprevalência positiva para IgG anti-PT.

		IgG Anti-PT <sup>a</sup>			> 40 UI/mL	
Variáveis demográficas		N	%	OD	IC (95%)	p
Gênero	F	764	50,90	0,730	(0,585-0,909)	0,005
	M <sup>b</sup>	736	49,10	Ref.	-	-
Vacina	Sim	1245	83,00	2,275	(0,763-6,781)	0,140
	Não sabe	240	16,00	2,969	(0,970-9,086)	0,057
	Não <sup>b</sup>	15	1,00	Ref.	-	-
Tosse prolongada	Sim, há mais de 6 meses	42	2,80	1,636	(0,814-3,288)	0,167
	Sim, até 6 meses	171	11,40	1,297	(0,909-1,850)	0,152
	Não <sup>b</sup>	1287	85,80	Ref.	-	-
Tabagismo	Sim	129	8,60	2,924	(1,888-4,528)	< 0,001
	Ex tabagista	261	17,40	3,173	(2,260-4,456)	< 0,001
	Não <sup>b</sup>	1110	74,00	Ref.	-	-
Doenças Crônicas	Sim	644	42,90	1,749	(1,395-2,192)	< 0,001
	Não <sup>b</sup>	856	57,10	Ref.	-	-
Contato com crianças	Sim	826	55,10	0,719	(0,577-0,896)	0,003
	Não <sup>b</sup>	674	44,90	Ref.	-	-
Já teve coqueluche?	Sim	96	6,40	1,224	(0,754-1,985)	0,413
	Não <sup>b</sup>	1404	93,60	Ref.	-	-

a - A categoria de referência foi IgG anti-PT < 40 UI/mL

b - Parâmetro de referência escolhido

OD -ODDS ratio

IC – Intervalo de confiança

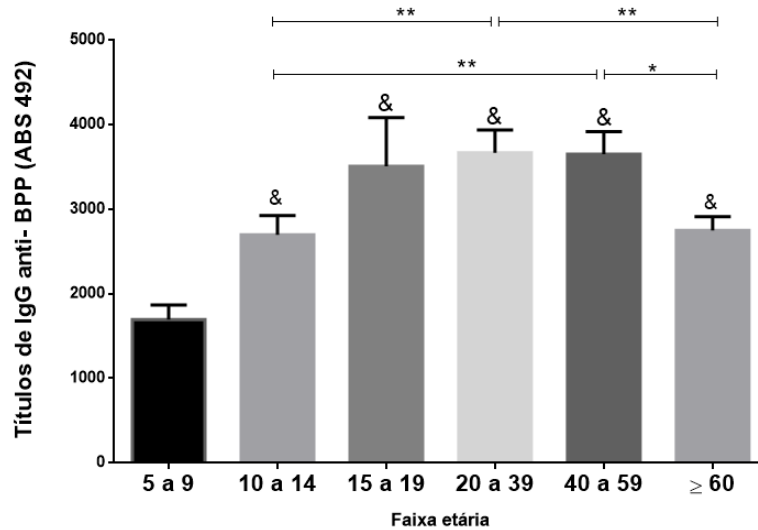
P-valor < 0,05

#### 5.1.4 DOSAGENS DE IgG E IgM ANTI-PARAPERTUSSIS (ANTI-BPP)

Os 1500 soros de voluntários também foram dosados para títulos de IgG e IgM anti-*B. parapertussis* (anti-Bpp). As análises mostraram que os soros de todas as faixas etárias apresentaram altos títulos de IgG anti-Bpp. Adolescentes (10-14 e 15-19 anos), adultos (20-39 e 40-59 anos) e idosos (com 60 anos ou mais) apresentaram altos títulos de IgG anti- Bpp estatisticamente superiores ( $p < 0,0001$ ) em relação às crianças de 5-9 anos, faixa etária recém vacinada com a ultima dose de reforço da vacina DTP. Soros de adultos de 20-39 anos e 40-59 anos também apresentaram títulos de IgG anti-Bpp significativamente superiores ( $p < 0,01$ ) quando comparados

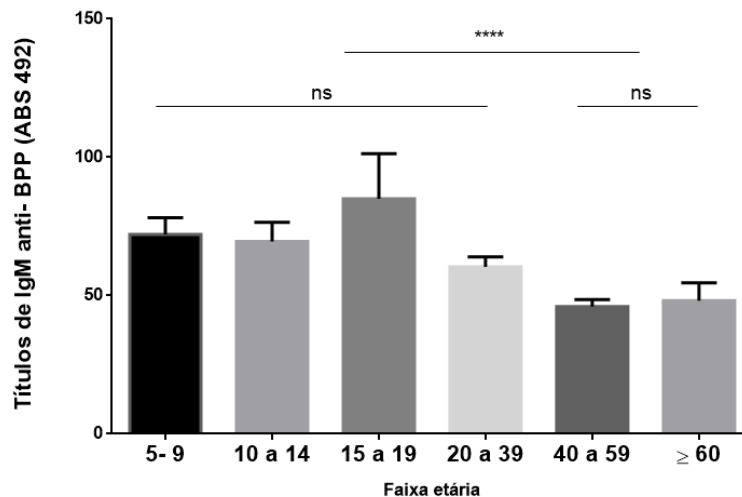


as dosagens sorológicas de adolescentes de 10-14 anos e idosos com 60 anos ou mais (Figura 13).



**Figura 13: Avaliação de títulos de IgG anti-Bpp entre diferentes faixas etárias.** A análise estatística foi feita por teste não paramétrico - Kruskal-Wallis. & indica significância estatística em relação a faixa etária de 5-9 anos. As barras indicam o erro padrão da média. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ) entre os grupos indicados.

Não foram observadas diferenças significativas na quantificação dos títulos de IgM anti-Bpp entre soros de crianças, adolescentes e adultos jovens (5-9, 10-14, 15-19 e 20-39 anos), entretanto os resultados mostraram que tais grupos etários apresentaram títulos de anticorpos IgM anti-Bpp estatisticamente superiores ( $p < 0,0001$ ) quando comparados às faixas etárias de 40-59 anos e idosos de 60 anos ou mais (Figura 14).

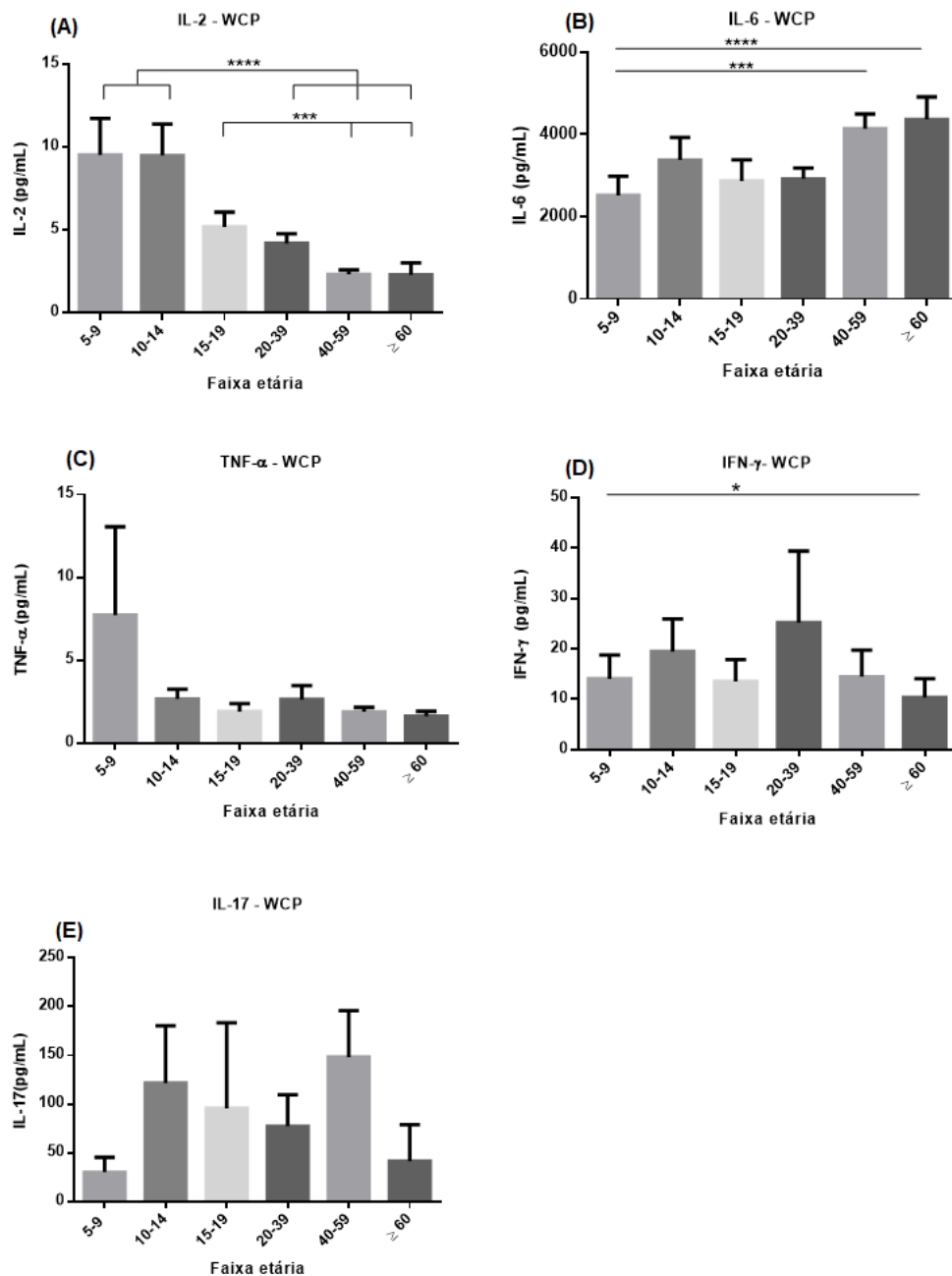


**Figura 14: Avaliação de títulos de IgM anti-Bpp entre diferentes faixas etárias.** A análise estatística foi feita por teste não paramétrico - Kruskal-Wallis. ns indica não significância estatística entre os grupos. As barras indicam o erro padrão da média. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) entre os grupos indicados.

#### 5.1.5 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR A PARTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE DE VOLUNTÁRIOS

As concentrações de citocinas nos sobrenadantes de cultivo de células de sangue total de amostras de voluntários foram analisadas para comparar os perfis de resposta de faixas etárias recém imunizadas com a vacina WCP (crianças de 5-9 anos) com faixas etárias cuja a resposta imune esteja associada à exposição a pertussis circulante. As citocinas analisadas foram IL-6 pró-inflamatória, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, pertencentes ao perfil de resposta Th1, IL-4 que contribue para o perfil de resposta Th2, IL-10 anti-inflamatória, além de citocina IL-17 secretada por células Th17. O estímulo com a WCP em células do sangue total de crianças de 5-9 anos e adolescentes de 10-14 anos, induziu a maior produção de citocina IL-2 estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) em relação aos grupos etários de 20-39, 40-59 e 60 anos ou mais. Maiores níveis de citocina IL-2, estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), também foram observadas em sobrenadantes de células de adolescentes de 15-19 anos e adultos de 20-39 quando comparados às faixas etárias de 40-59 e 60 anos ou mais (Figura 15 A). Células de crianças (5-9 anos) também responderam com uma maior produção de TNF- $\alpha$ , embora não significava, em relação às demais faixas etárias (Figura 15 C), além da produção de níveis de IFN- $\gamma$ , significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em relação aos idosos com 60 anos ou mais (Figura 15 D). É possível

observar que células de adolescentes (10-14 e 15-19 anos) e adultos (20-39 e 40-59 anos) produziram maiores níveis de citocina IL-17 em relação a crianças e idosos, embora a análise não tenha sido significativa (Figura 15 E). Maiores níveis estatisticamente significativos de IL-6 ( $p < 0,0001$ ) foram observadas em sobrenadantes de células do sangue total de adultos 40-59 anos e idosos com 60 anos ou mais em relação às crianças (5-9 anos). Não foram observadas diferenças estatísticas na secreção de citocinas IL-4 e IL-10 após estímulo com WCP entre os grupos.

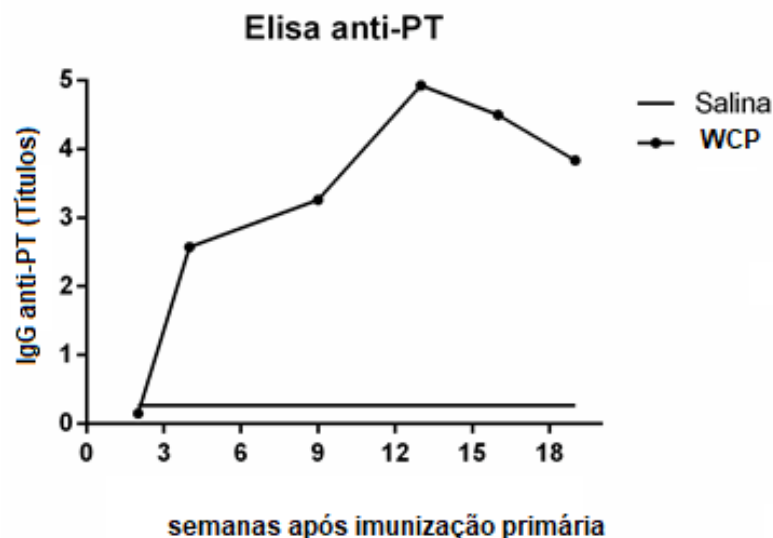


**Figura 15: Indução de citocinas Th1/Th2/Th17 em células do sangue total de voluntários de diferentes faixas etárias, em resposta ao estímulo com vacina WCP.** Amostras de sangue de voluntários de diferentes faixas etárias foram estimuladas *in vitro* com vacina WCP ( $10^8$  células/mL). Como controle (-) foram utilizadas células não estimuladas, incubadas somente com meio de cultivo e o controle da viabilidade celular foi feito por estimulação mitótica com concanavalina A ( $10 \mu\text{g}/\text{poço}$ ). Após 72 horas os sobrenadantes foram coletados para medir as concentrações de citocinas (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17A) por citometria de fluxo (CBA). A análise estatística foi feita por teste não paramétrico - Kruskal-Wallis. As barras indicam o erro padrão da média. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) entre os grupos indicados.

## 5.2 RESPOSTA IMUNE E PROTETORA APÓS IMUNIZAÇÃO DE REFORÇO EM MODELO MURINO

### 5.2.1 ANÁLISE DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-PT ANTES DA IMUNIZAÇÃO DE REFORÇO.

Camundongos BALB/c (n=5 animais/grupo -) receberam duas doses de WCP por via *i.p* e um grupo recebeu salina. Após essa imunização primária, foram feitas sucessivas sangrias (2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup> semanas), os soros foram separados e avaliados por ensaio de Elisa para acompanhar a cinética de produção de anticorpos IgG anti-PT. Os resultados mostraram que ocorreu um aumento progressivo dos títulos de IgG anti-PT até a 13<sup>a</sup> semana após a imunização primária. Após esse período observamos o início de um decaimento dos títulos de anticorpos (Figura 16). Com a diminuição da resposta imune induzida pela imunização primária, definimos um protocolo de reforço (*booster*) a partir da 25<sup>a</sup> semana para avaliarmos da resposta imune e protetora induzida após a imunização de reforço, utilizando diferentes componentes vacinais (WCP, APV, Plow) além de um grupo sem reforço e um grupo salina.

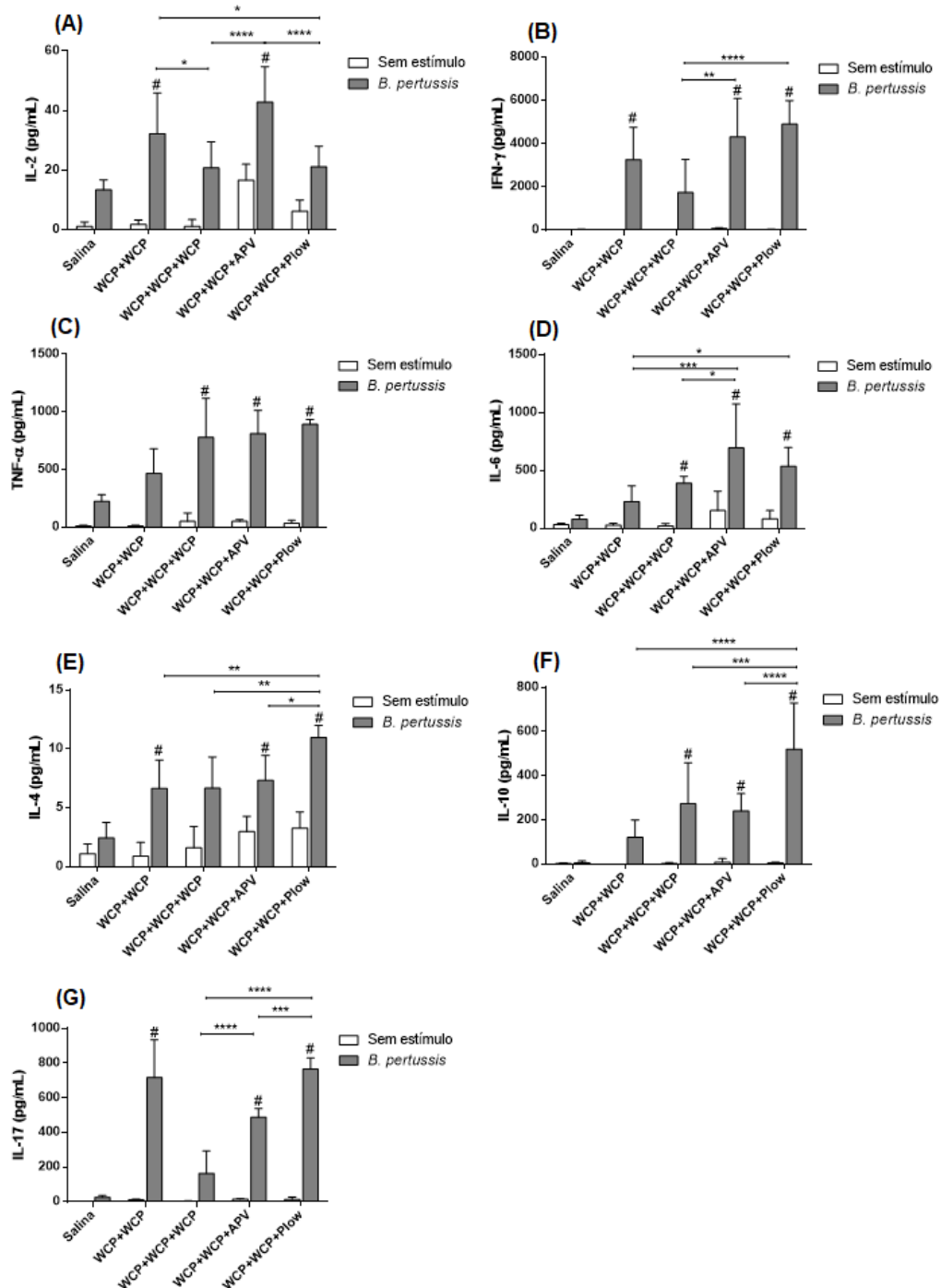


**Figura 16:** Cinética da síntese de anticorpos IgG anti-PT após imunização primária com a vacina WCP por via *i.p*. Camundongos BALB/C (n=5 animais/grupo) receberam a imunização primária com WCP por via *i.p* e um grupo recebeu salina. Após sucessivas sangrias (2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup> semanas), os soros avaliados por Elisa para avaliar a cinética da síntese de anticorpos IgG anti-PT para padronização da imunização de reforço.

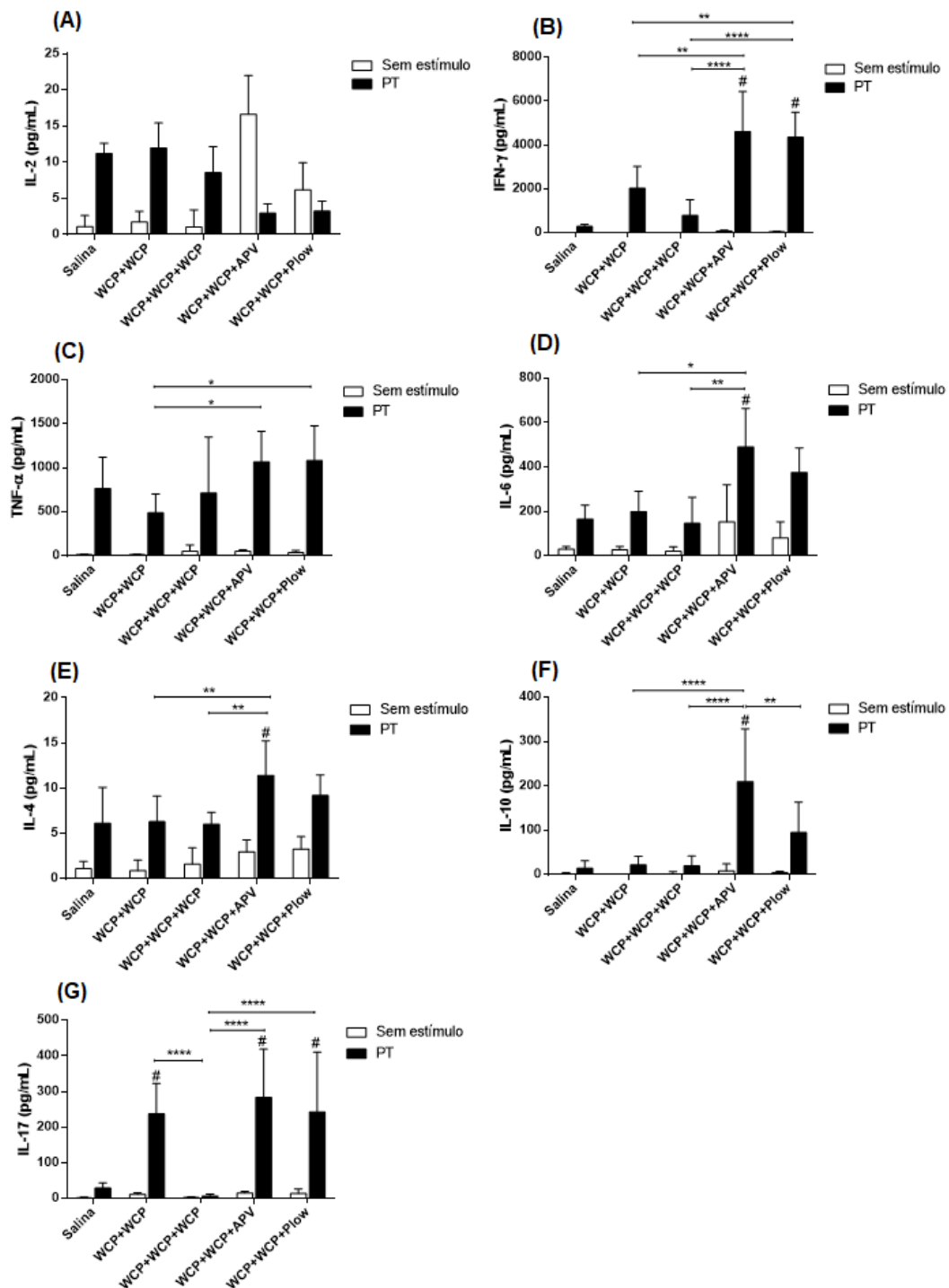
## 5.2.2 RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR REFORÇO VACINAL 7 SEMANAS APÓS A IMUNIZAÇÃO.

### 5.2.2.1 Avaliação de citocinas em cultura de células do baço

Avaliamos a produção de citocinas Th1/Th2/Th17 em células do baço, induzidas 7 semanas após imunização de reforço por via intraperitoneal (*i. p.*) com as vacinas WCP, APV ou Plow, além do grupo sem reforço e salina. As células foram estimuladas com *B. pertussis* ( $10^6$  CFU/mL) (Figura 17), com PT (1 µg/mL) (Figura 18) (ambas inativadas por calor) ou mantidas sem estímulo. Verificamos que o estímulo com *B. pertussis* (Figura 17), induziu células de animais que receberam o reforço com a APV a produção estatisticamente maior ( $p < 0,05$ ) de citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-17 (Figura 17 ABDG), quando comparada aos animais que receberam reforço com WCP. Também foram observados níveis estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) de IL-6 no grupo APV em relação ao grupo sem reforço. Células de animais imunizados com a Plow induziram a produção significativamente maior ( $p < 0,05$ ) de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e IL-17 (Figura 17 BEFG) em relação ao grupo WCP. Níveis de citocinas IL-6, IL-4 e IL-10 (Figura 17 DEF) também foram estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo sem reforço. Células animais que receberam reforço com APV estimuladas com PT (Figura 18) induziram produção de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17 estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ) ao grupo que recebeu WCP. IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  também foram estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ) no grupo APV quando comparadas ao grupo sem reforço (Figura 18 BDEFG). O estímulo com a PT em células de animais imunizados com a Plow, induziu a produção de IFN- $\gamma$  e IL-17 estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ) em relação aos que receberam o reforço com WCP (Figura 18 BG). Células de animais imunizados com a Plow também apresentaram níveis significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em relação ao grupo s/reforço (Figura 18 BC). Células não estimuladas de animais imunizados e com reforço com a APV ou Plow, induziram a produção de citocinas IL-2, IL-4 e IL-6, em níveis maiores, embora não significativos em comparação com os demais grupos.



**Figura 17: Produção de citocinas nos esplenócitos de animais que receberam 2 doses de WCP e diferentes reforços – Estímulo com *B. pertussis*.** Camundongos BALB/c (n=5 animais/grupo) receberam a imunização primária com WCP por via i.p e um grupo recebeu salina. Na 25ª semana, os animais foram imunizados com uma dose de reforço: o grupo 2 não recebeu o reforço (WCP+WCP), o grupo 3 recebeu um reforço com a WCP (WCP+WCP+WCP), o grupo 4 com a APV (WCP+WCP+APV) e o grupo 5 com a vacina P10w (WCP+WCP+P10w). 7 semanas após o reforço foi feita a coleta de baço. Células estimuladas com *B. pertussis* ( $10^6$  CFU/mL) inativada por calor ou s/estímulo foram cultivadas por 72 horas e a produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo (CBA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) entre os grupos indicados (*two-way ANOVA*). # indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo salina.

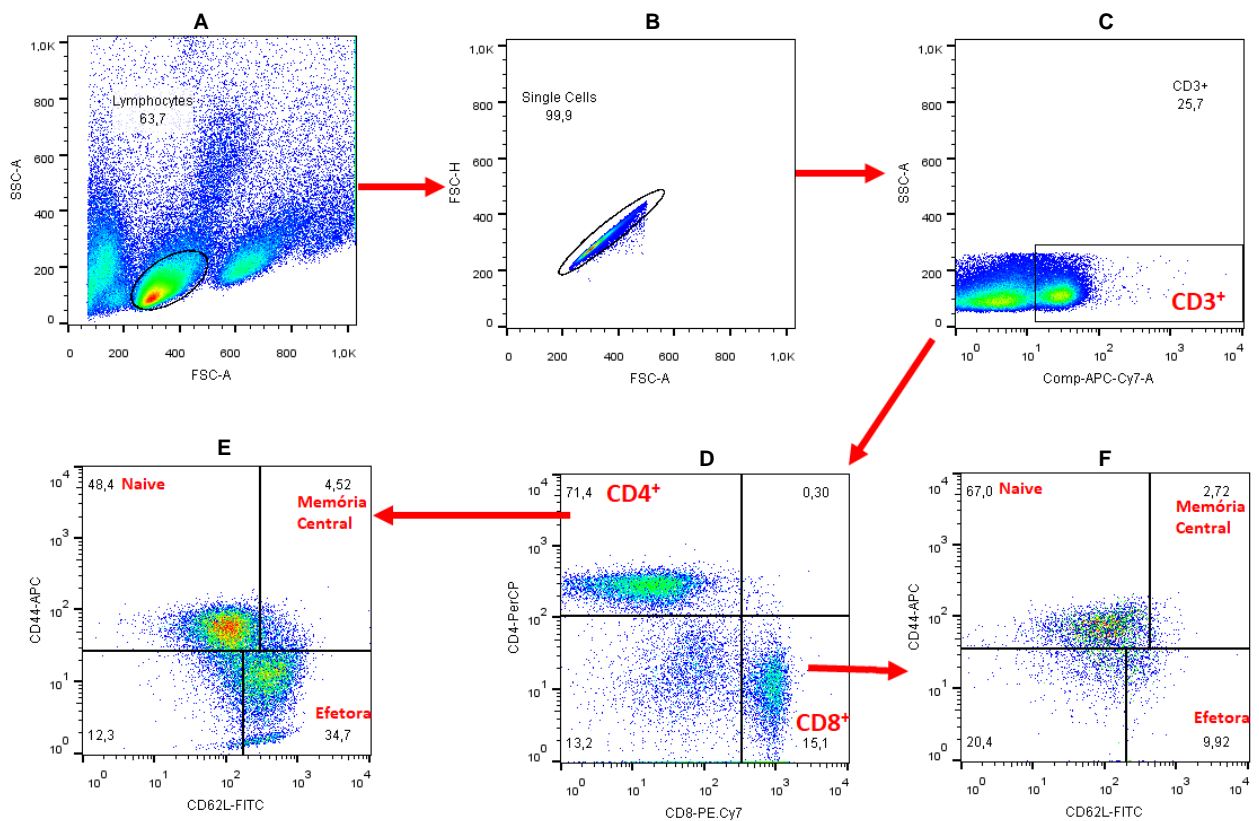


**Figura 18: Produção de citocinas nos esplenócitos de animais que receberam 2 doses de WCP e diferentes reforços – estímulo com Toxina Pertussis.** Camundongos BALB/c (n=5 animais/grupo) receberam a imunização primária com WCP por via i.p e um grupo recebeu salina. Na 25ª semana, os animais foram imunizados com uma dose de reforço: o grupo 2 não recebeu o reforço (WCP+WCP), o grupo 3 recebeu um reforço com a WCP (WCP+WCP+WCP), o grupo 4 com a APV (WCP+WCP+APV) e o grupo 5 com a vacina Plow (WCP+WCP+Plow). 7 semanas após o reforço foi feita a coleta de baço. Células estimuladas com PT (1 $\mu$ g/mL) inativada por calor e s/estímulo foram cultivadas por 72 horas e a produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001) entre os grupos indicados (two-way ANOVA). A # indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo salina.



### 5.2.2.2 Estratégia de fenotipagem de Linfócitos T CD4 e T CD8.

Realizamos a fenotipagem dos linfócitos T para identificar e estimar a frequência (%) dos linfócitos T CD4 e T CD8 de células do baço e linfonodo de camundongos BALB/c extraídas 7 semanas após imunização de reforço com diferentes formulações vacinais (WCP, APV, Plow), grupo sem reforço e grupo salina. Utilizamos um protocolo policromático de marcação através da estratégia de *gates* sequenciais somada a expressão antigênica de marcadores de superfície celular, envolvendo a combinação de cinco anticorpos monoclonais: Anti-CD3 - APC-Cy7-A, Anti -CD4-PerCP, Anti-CD8-PECy7, Anti-CD44-APC e Anti-CD62L-FITC (Tabela 2). Além disso, com base na expressão de CD44/CD62L dentro das populações de linfócitos T CD4 e T CD8, caracterizamos fenotipicamente as subpopulações de células T *Naïve* (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>), células relacionadas a memória central (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) e T Efetoras (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) (Figura 19). A análise foi feita por citometria de fluxo (FACSCantoll (BD Bioscience)).

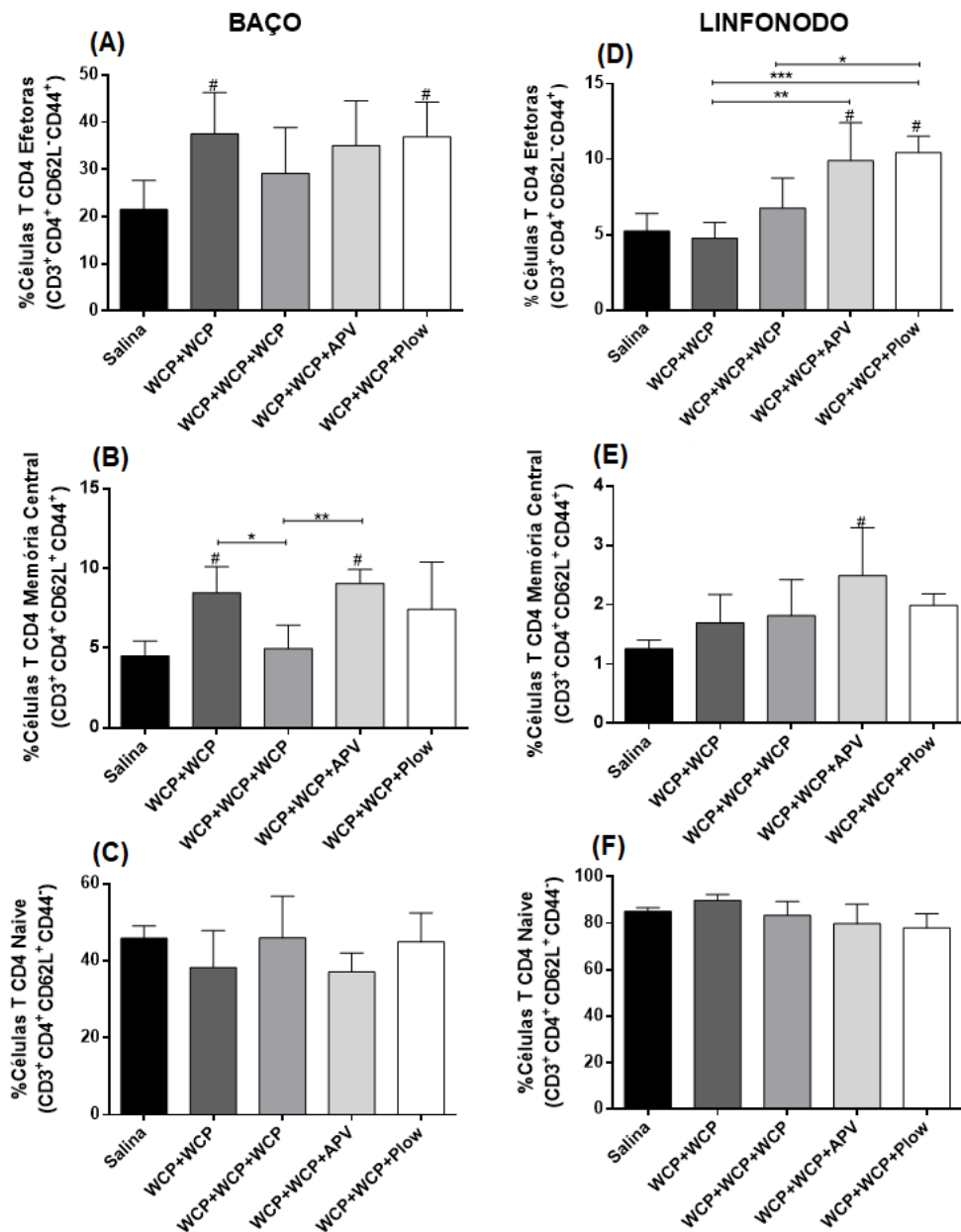


**Figura 19: Estratégia de definição da janela de identificação (*gate*) para a análise da população de linfócitos T CD4 e T CD8 e subpopulações de Células T de Memória, T Efetoras e T Naïve.** As células extraídas do baço e linfonodo inguinal foram fenotipadas através de citometria de fluxo. **(A)** Os linfócitos totais foram identificados a partir da seleção de células por tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), sendo delineado um *gate* para a população. **(B)** Janela de aquisição na região dos linfócitos totais. **(C)** Janela de aquisição na região das células CD3<sup>+</sup>. **(D)** Janela de aquisição, com quadrantes para determinação LTCD4 e LTCD8 determinada pela dupla positividade dos marcadores CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. **(E)** A partir do quadrante com células T CD4<sup>+</sup>, foi feita uma nova janela de aquisição, usando marcadores positivos para CD62/CD44, para caracterizar as subpopulações de células relacionadas a memória central (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>), T Naïve (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) e T Efetoras (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>), através da diferença de intensidade de fluorescência. **(F)** A mesma estratégia foi utilizada no *gate* E a partir do quadrante para linfócitos T CD8.

#### 5.2.2.2.1 Análise fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4 Efetores, células de Memória Central e Naïve.

Na 7<sup>a</sup> semana após os grupos de animais terem recebidos a imunização de reforço com diferentes formulações vacinais (WCP, APV, Plow), além de um grupo sem reforço e um grupo salina, os baços e linfonodos foram coletados e analisados fenotipicamente quanto à frequência (%) na expressão de marcadores de Memória Central (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>), células T CD4 Efetoras (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) e linfócitos T CD4 Naïve (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) (Figura 20). (i) Linfócitos T CD4 Efetores - baço: Os animais que receberam o reforço com a Plow e o grupo

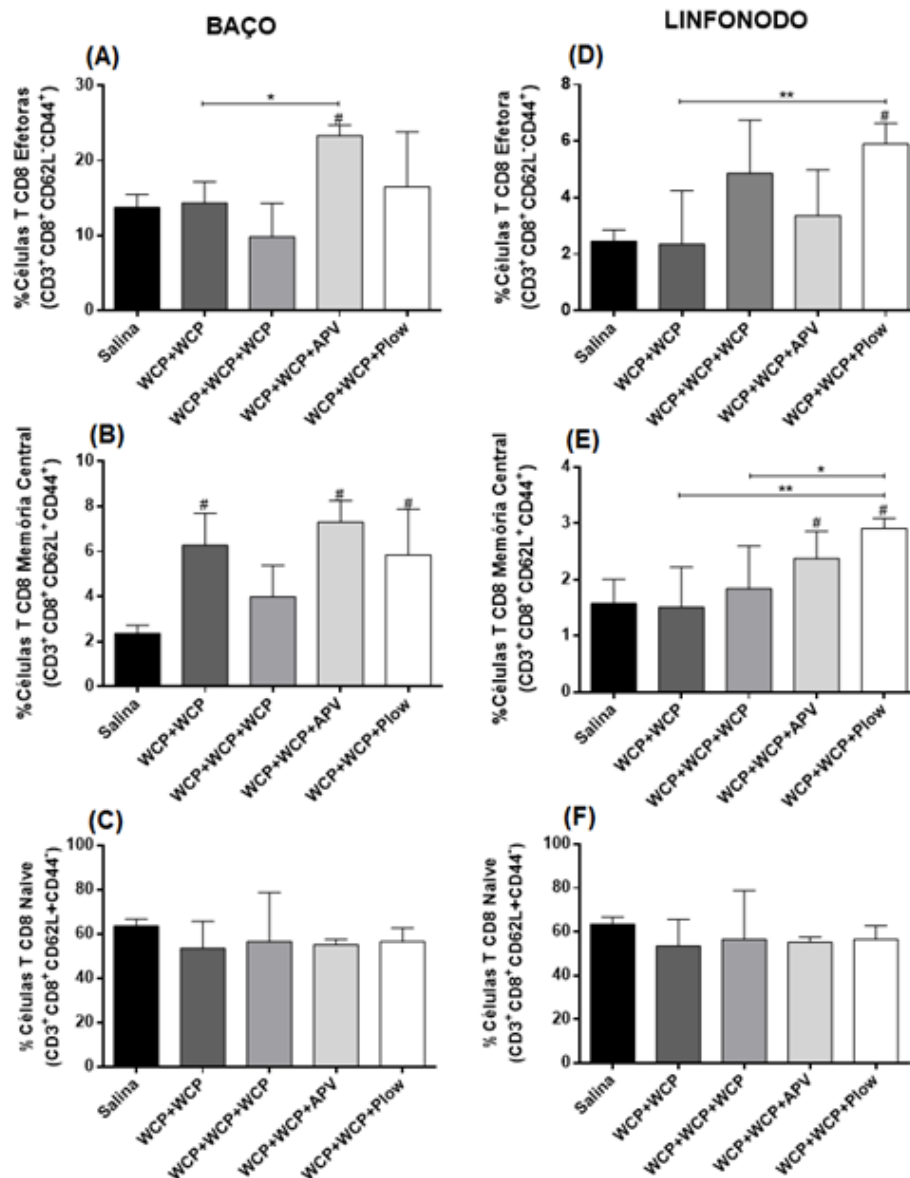
sem reforço apresentaram frequência de células T CD4 Efetoras, estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo salina, entre os demais grupos não houve diferença significativa (Figura 20 A). (ii) Linfócitos T CD4 de Memória Central - baço: Animais que receberam o reforço com APV ou o grupo sem reforço apresentaram frequência de células T CD4 de memória Central estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo WCP e salina (Figura 20 B). (iii) Linfócitos T CD4 Efetores - linfonodo: Animais imunizados com APV ou Plow apresentaram uma frequência significativamente maior ( $p < 0,05$ ) de linfócitos T CD4 efetores quando comparada aos grupos sem reforço e salina (Figura 20 D). Também observamos uma maior frequência de linfócitos T CD4 efetores no grupo Plow em relação aos animais imunizados com a WCP. (iv) Linfócitos T CD4 de Memória Central - linfonodo: Os animais imunizados com a APV apresentaram uma maior frequência de linfócitos TCD4 de memória central, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo salina, porém não significativa em relação aos demais grupos de estudo (Figura 20 E). (v) Linfócitos T CD4 Naïve: Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos de estudo quanto a frequência de células T CD4 Naïve de baço ou linfonodo (Figura 20 CF).



**Figura 20: Avaliação fenotípica da frequência (%) de subpopulações de linfócitos T CD4 Naive, T CD4 de memória Central e T CD4 efetores em células do baço e linfonodo de animais 7 semanas após imunização de reforço.** Camundongos BALB/C (n=5 animais/grupo) receberam a imunização primária com WCP por via i.p e um grupo recebeu salina. Na 25ª semana, os animais foram imunizados com uma dose de reforço: o grupo 2 não recebeu o reforço (WCP+WCP), o grupo 3 recebeu um reforço com a WCP (WCP+WCP+WCP), o grupo 4 com a APV (WCP+WCP+APV) e o grupo 5 com a vacina Plow (WCP+WCP+Plow). Na 7ª semana após o reforço foi feita a coleta de baço e linfonodos para avaliação fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4 Naive, T CD4 de memória Central e T CD4 efetores. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\* p < 0,001) entre os grupos indicados (*two-way ANOVA*). A # indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo salina.

#### 5.2.2.2.2 Análise fenotípica de subpopulações de linfócito T CD8 Naïve, de memória Central e efetores.

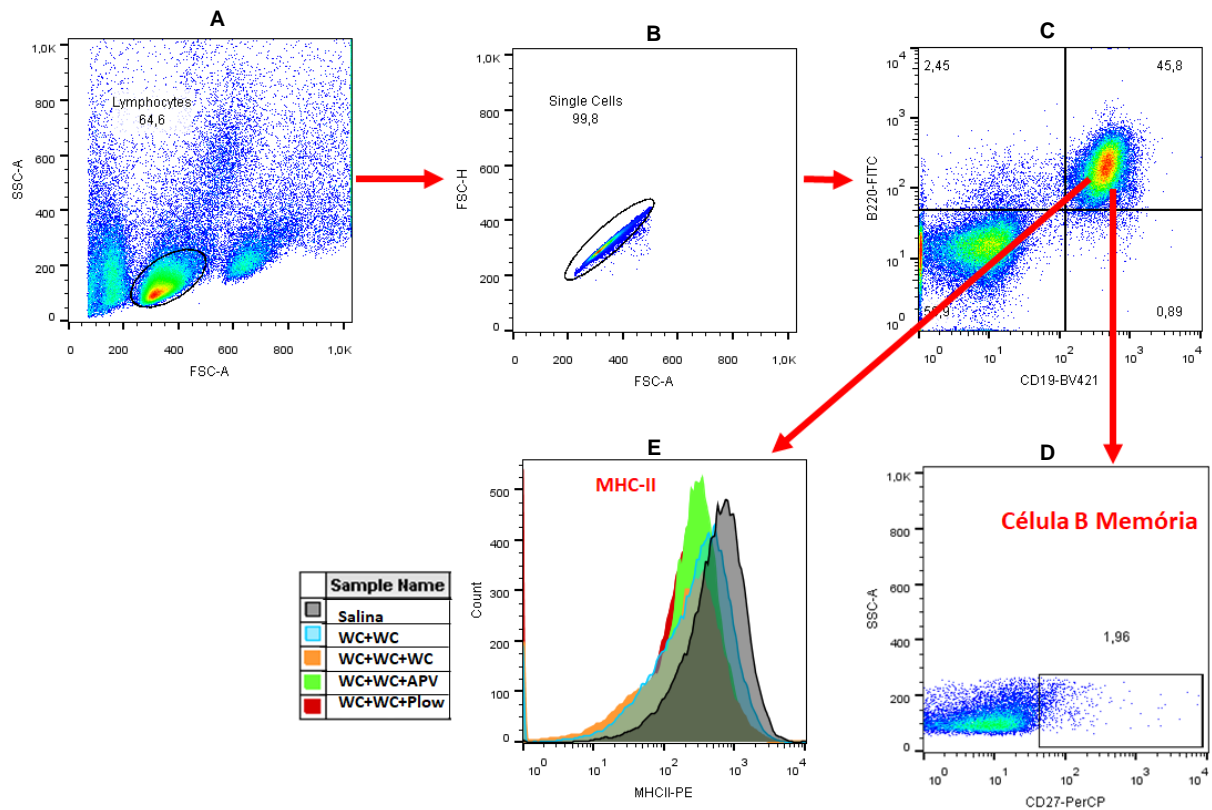
Na 7<sup>a</sup> semana após a imunização de reforço com diferentes formulações vacinais (WCP, APV, Plow) além do grupo sem reforço e grupo salina, os linfonodos e baços dos animais foram coletados e analisados fenotipicamente quanto à frequência (%) na expressão de marcadores de linfócitos T CD8 Efetores (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) Memória Central (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) e T CD8 Naïve (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) (Figura 21). (i) Linfócitos T CD8 Efetores - baço: Animais imunizados com a APV apresentaram uma frequência de linfócitos T CD8 efetores estatisticamente maior ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo salina (Figura 21 A). Entre os demais grupos de estudo não houve frequência significativa. (ii) Linfócitos T CD8 de Memória Central – baço: A frequência de células T CD8 de memória foi estatisticamente maior ( $p < 0,05$ ) nos grupos sem reforço, APV e Plow quando comparados ao grupo salina, porém não foi observada diferenças estatísticas entre os demais grupos (Figura 21 B). (iii) Linfócitos T CD8 Efetores e de Memória Central – linfonodos: Animais que receberam o reforço com a Plow apresentaram linfócitos T CD8 efetores e de Memória central estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo sem reforço (Figura 21 DE). O grupo Plow também apresentou frequência de linfócitos de Memória central significativamente maiores em relação ao grupo WCP. (iv) Linfócitos T CD4 Naïve – baço/linfonodo: Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos de estudo quanto a frequência de células T CD8 Naïve de baço ou linfonodo (Figura 21 CF).



**Figura 21: Avaliação fenotípica da frequência (%) de subpopulações de Linfócitos T CD8 Naïve, T CD8 de memória Central e T CD8 efetores em células do baço e linfonodo de animais 7 semanas após imunização de reforço.** Camundongos BALB/C (n=5 animais/grupo) receberam a imunização primária com WCP por via i.p e um grupo recebeu salina. Na 25ª semana, os animais foram imunizados com uma dose de reforço: o grupo 2 não recebeu o reforço (WCP+WCP), o grupo 3 recebeu um reforço com a WCP (WCP+WCP+WCP), o grupo 4 com a APV (WCP+WCP+APV) e o grupo 5 com a vacina P1ow (WCP+WCP+P1ow). 7 semanas após o reforço foi feita a coleta de baço e linfonodos para avaliação fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD8 Naïve, T CD8 de memória Central e T CD8 efetores. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001) entre os grupos indicados (*two-way ANOVA*). A # indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo salina.

### 5.2.2.3 Estratégia de fenotipagem de linfócitos B

Foi utilizada a estratégia de fenotipagem para identificar e estimar a frequência (%) dos linfócitos B em células do baço e linfonodo de camundongos BALB/c extraídas na 7<sup>a</sup> semana após imunização de reforço com diferentes formulações vacinais (WCP, APV, Plow), além do grupo sem reforço e grupo salina. Foi utilizado um protocolo policromático de marcação através da estratégia de *gates* sequenciais somada a expressão antigênica de marcadores de superfície celular, envolvendo a combinação de quatro anticorpos monoclonais: anti-CD19-BV421, anti-CD27-PerCp, anti-MHCII-Pe (Tabela 3). Com base na expressão positiva de CD19/B220 dentro da população de linfócitos B foi caracterizado fenotipicamente a subpopulação de células B de memória (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) e expressão do MHC-II quanto a intensidade média de fluorescência (MIF), demonstrado em gráficos do tipo histograma em escala logarítmica (Figura 22). A análise foi feita por citometria de fluxo (FACSCantoll (BD Bioscience)).



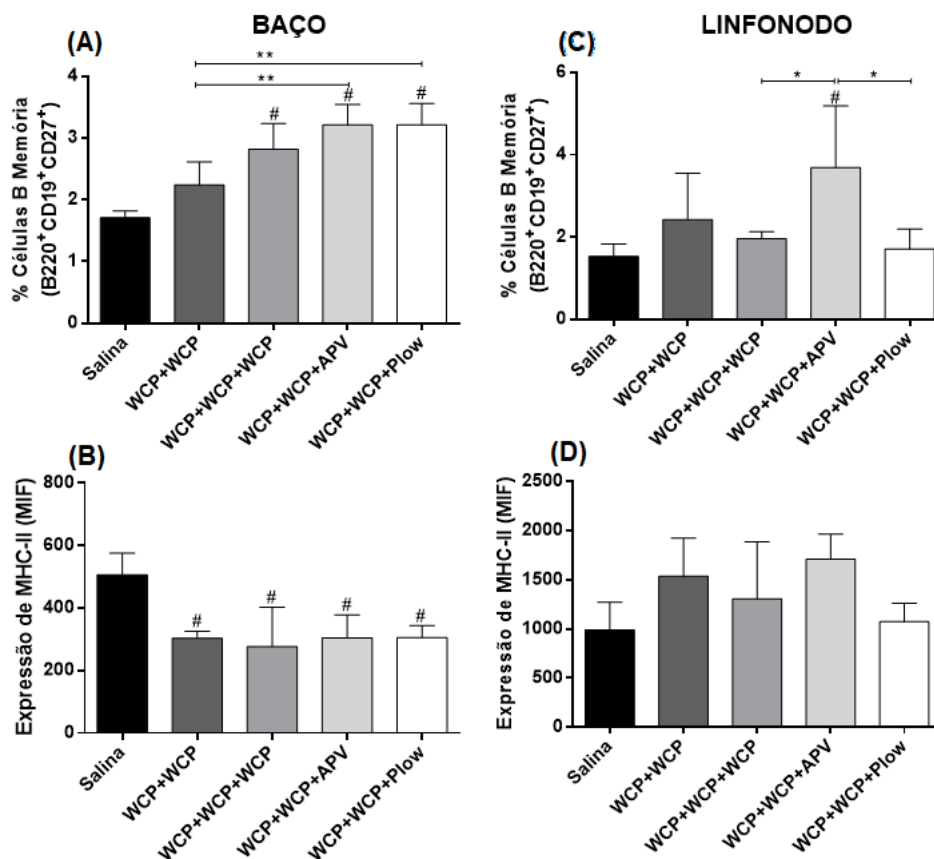
**Figura 22: Estratégia de definição da janela de identificação (*gate*) para a análise da população de linfócitos B, subpopulação de Linfócitos B de memória e expressão de MHC-II por intensidade média de fluorescência (IMF).** As células extraídas do baço e linfonodo inguinal foram avaliadas através de citometria de fluxo. **(A).** Os linfócitos totais foram identificados a partir da seleção de células por tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), sendo delineado um *gate* para a população. **(B)** Janela de aquisição na região dos linfócitos totais. **(C)** Nova janela de aquisição na região dos linfócitos B, identificados pela expressão positiva de CD19/B220. **(D)** Janela de aquisição obtida a partir do *gate* C, identificada quanto a expressão células B de memória (B220+CD19+CD27+). **(E)** Janela de aquisição, obtida a partir do *gate* C, identificada quanto a expressão do MHC-II, através do marcador MHC-II-PE quanto a intensidade média de fluorescência (MIF), demonstrado em gráficos do tipo histograma em escala logarítmica.

#### 5.2.2.3.1 Análise fenotípica de linfócitos B de memória e expressão de MHC-II.

Na 7ª semana após a imunização de reforço com (WCP, APV ou Plow), sem reforço e salina, os baços e linfonodos foram coletados e analisados fenotipicamente quanto à frequência (%) na expressão de marcadores de linfócitos B de memória (CD19+B220+CD27+) e MHC-II (MIF) (Figura 23). (i) Linfócitos B de memória - baço: Todos os grupos imunizados com o reforço vacinal apresentaram uma maior frequência de Linfócitos B de memória, significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo salina (Figura 23 A). Os grupos imunizados com a APV ou Plow apresentaram frequência de Linfócitos B de memória estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo que não recebeu o reforço (Figura 23 A). (ii) MHC-II – baço: A expressão do



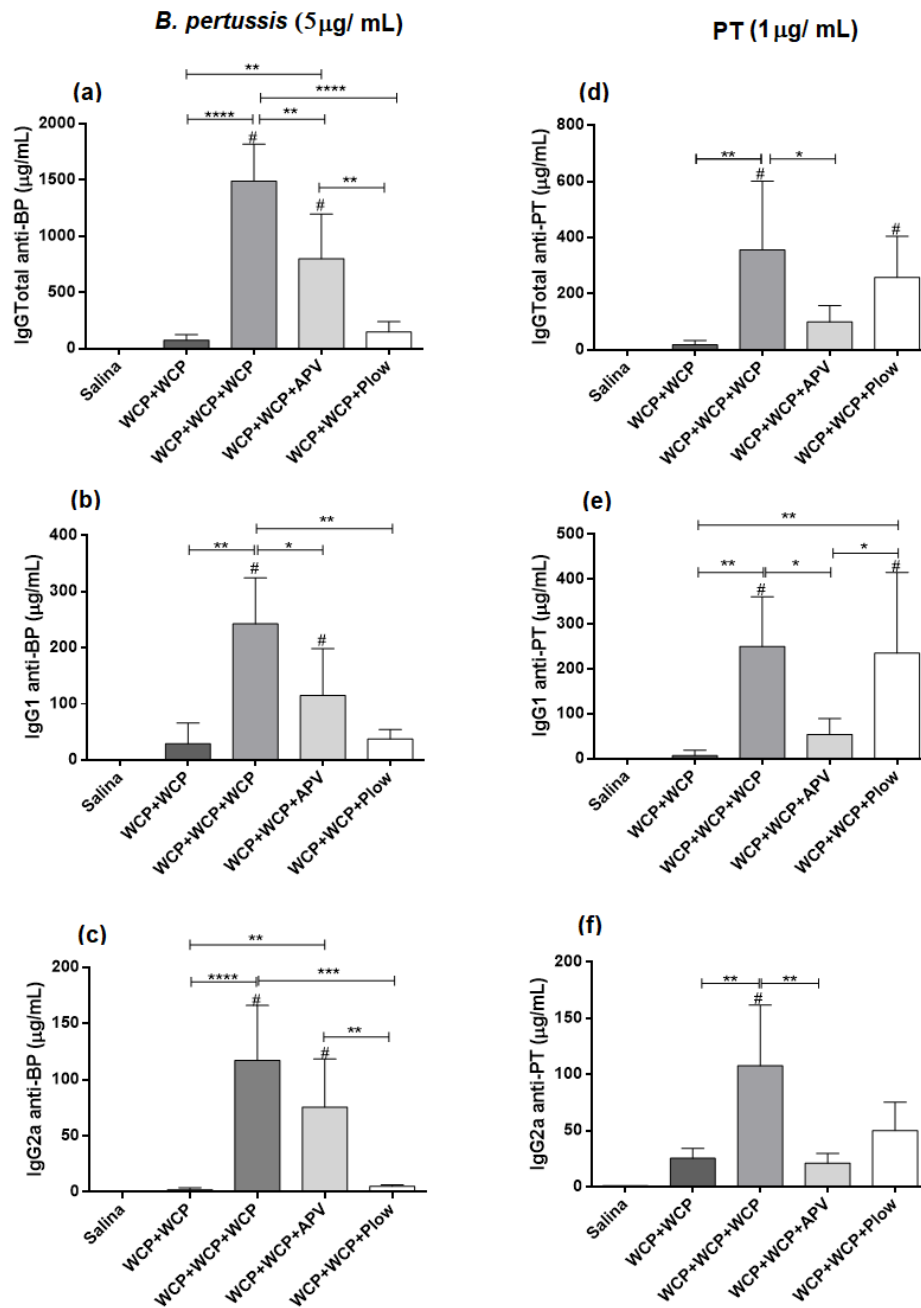
marcador MHC-II em células dos baços foram estatisticamente inferiores ( $p < 0,05$ ) em todos os animais imunizados quando comparados ao grupo salina (Figura 23 B). (iii) Linfócitos B de memória - linfonodo: Animais imunizados com a APV apresentaram uma maior frequência (%) de linfócitos B de memória, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos grupos imunizados com a WCP, Plow e grupo salina (Figura 23 C). (iv) MHC-II – linfonodo: Quanto a expressão de MHC-II, todos os animais imunizados apresentaram uma frequência maior desse marcador quando comparado ao grupo salina embora não apresentaram diferença significativa entre os grupos de estudo (Figura 23 D).



**Figura 23: Avaliação de subpopulação de Linfócito B de memória e expressão do MHC-II em células do baço e linfonodo de animais 7 semanas após imunização de reforço.** Camundongos BALB/c ( $n=5$  animais/grupo) receberam a imunização primária com WCP por via i.p e um grupo recebeu salina. Na 25<sup>a</sup> semana, os animais foram imunizados com uma dose de reforço: o grupo 2 não recebeu o reforço (WCP+WCP), o grupo 3 recebeu um reforço com a WCP (WCP+WCP+WCP), o grupo 4 com a APV (WCP+WCP+APV) e o grupo 5 com a vacina Plow (WCP+WCP+Plow). Na 7<sup>a</sup> semana após o reforço foi feita a coleta de baço e linfonodos para avaliação fenotípica de subpopulações de Linfócitos B de memória e expressão do MHC-II. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ) entre os grupos indicados (*two-way ANOVA*). A # indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo salina.

#### 5.2.2.4 Avaliação de IgG Total, IgG1 e IgG2a anti- *B. pertussis* ou anti-PT

Numa inferência à resposta imune do perfil Th1/IgG2a e Th2/IgG1 (HUBER et al, 2006), foram avaliados IgG total e as subclasses de anticorpos IgG1 e IgG2a anti- *B. pertussis* ou anti-PT nos grupos de animais imunizados com WCP e com dose reforço (WCP, APV ou Plow), sem reforço e salina. Os soros foram obtidos após a imunização primária, antes e após o reforço (*booster*) e antes da coleta de baço e linfonodo conforme esquema de imunização (Figura 7). O reforço com a vacina WCP induziu aumento dos níveis séricos de IgG total, IgG1 e IgG2a anti- *B. pertussis* ou anti-PT (Figura 24 ABDEF) estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo sem reforço ou em animais imunizados com a APV ou Plow, induzindo uma resposta humoral robusta e balanceada em relação aos isotipos IgG2a/IgG1, respectivamente utilizados como marcadores de resposta Th1 e Th2. Já o reforço com a vacina APV induziu maiores níveis significativos ( $p < 0,01$ ) de IgG total e IgG2a anti- *B. pertussis* quando comparado ao grupo que recebeu o reforço com a Plow (Figura 24 AC). Entretanto, o grupo Plow induziu níveis estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ) de IgG1 anti-PT quando comparados aos grupos APV ou sem reforço (Figura 24 E).

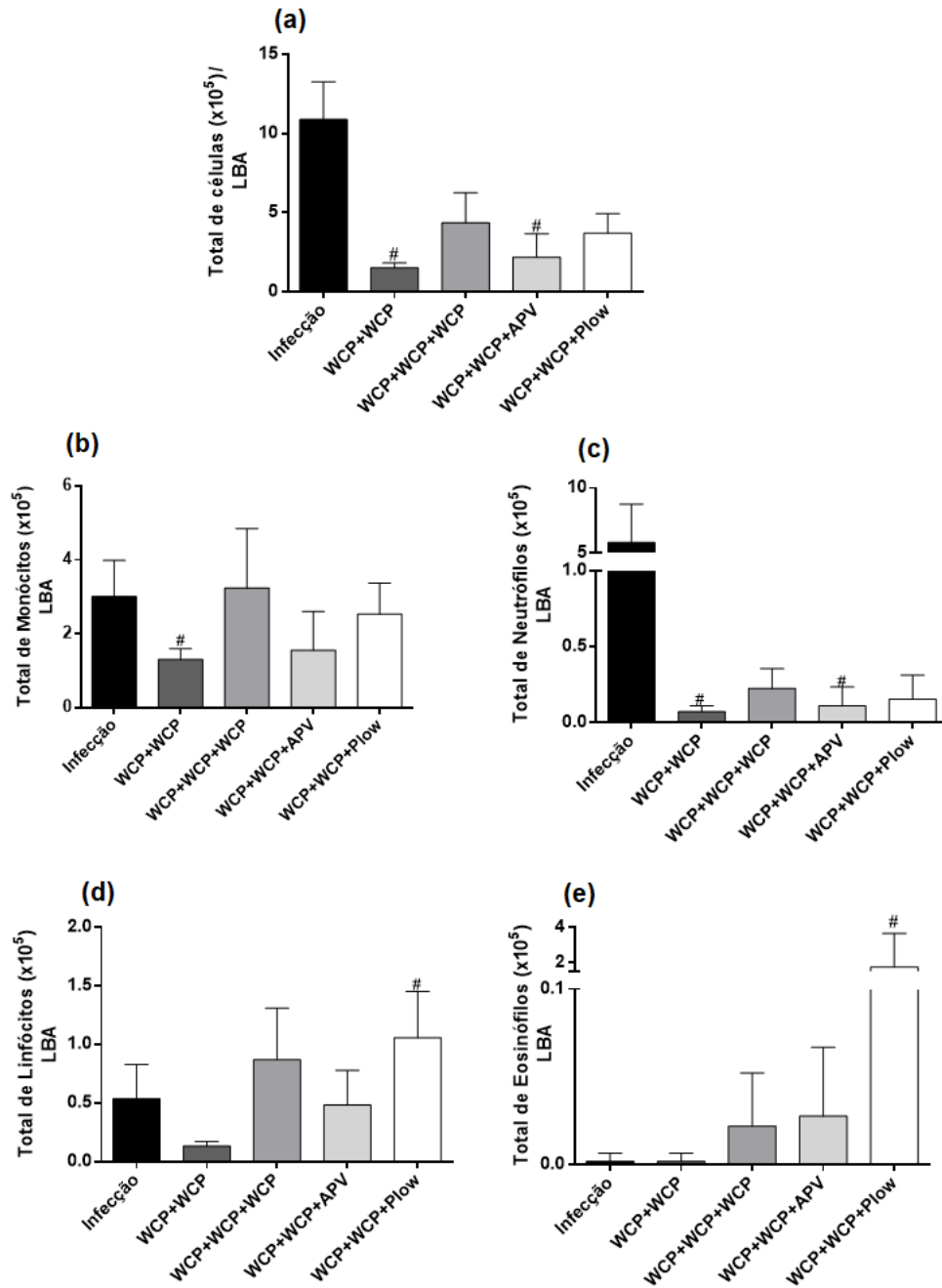


**Figura 24: IgG Total, IgG1 e IgG2a.** Camundongos BALB/c (n=5 animais/grupo) receberam a imunização primária com WCP por via i.p e um grupo recebeu salina. Na 25ª semana, os animais foram imunizados com uma dose de reforço: o grupo 2 não recebeu o reforço (WCP+WCP), o grupo 3 recebeu um reforço com a WCP (WCP+WCP+WCP), o grupo 4 com a APV (WCP+WCP+APV) e o grupo 5 com a vacina Plow (WCP+WCP+Plow). Na 7ª semana após o reforço foi feita a coleta de baço e linfonodos para avaliação da resposta imune. Os soros obtidos após a imunização primária, antes e após o reforço (*booster*) e antes da coleta de baço e linfonodo foram dosados quanto a indução de IgG1 e IgG2a por ensaio de ELISA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\* p < 0,001) entre os grupos indicados (*two-way ANOVA*). A # indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo salina.

### 5.2.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA VACINAÇÃO DE REFORÇO APÓS DESAFIO INTRANASAL.

#### 5.2.3.1 Recrutamento de Leucócitos

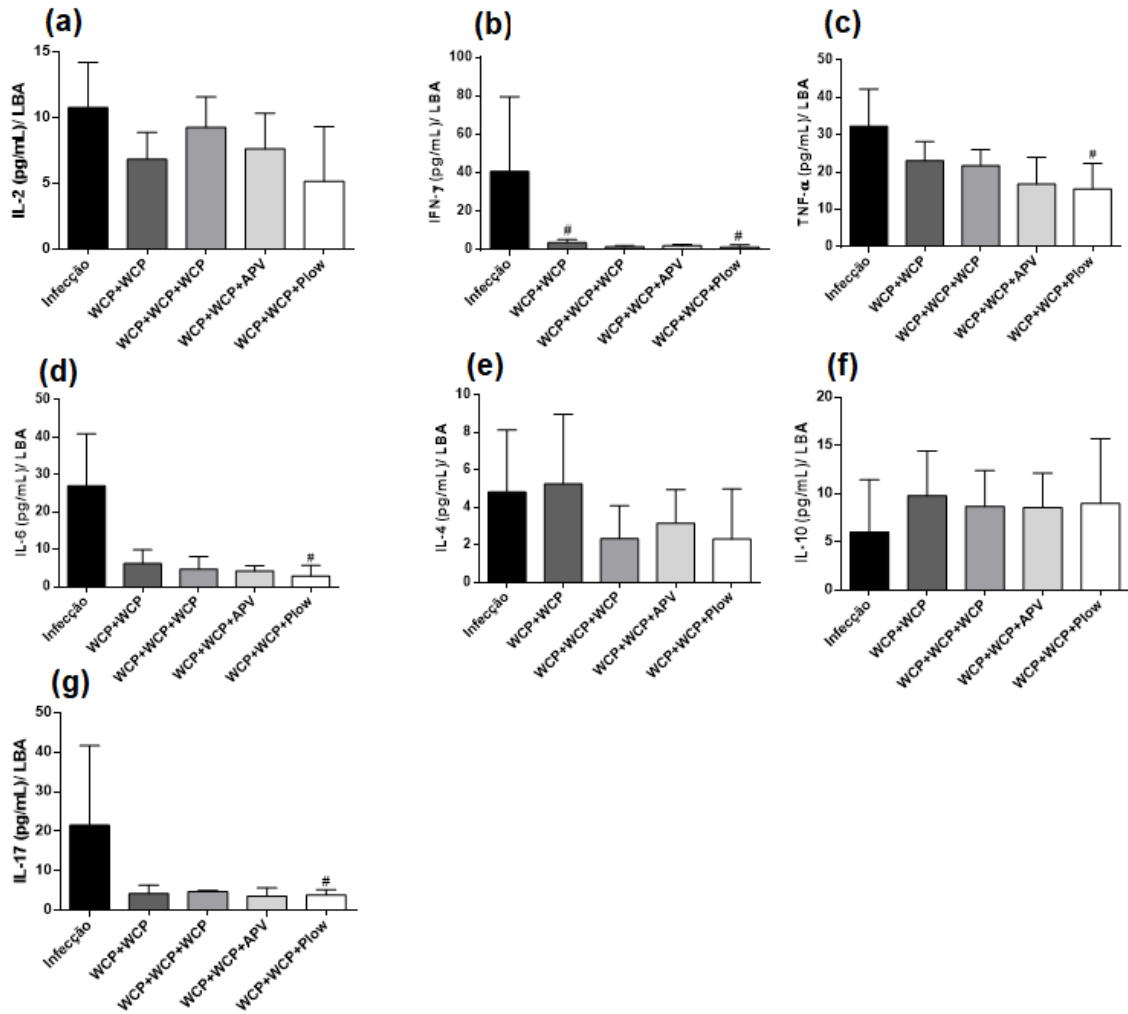
Avaliamos o perfil de células recrutadas obtidas no LBA 7 dias após a infecção intranasal (*i.n*) com *B. pertussis* ( $10^8$  células/mL). Os resultados mostraram uma diminuição de células totais e neutrófilos em todos os grupos imunizados quando comparados ao grupo salina, sendo estatisticamente menores ( $p < 0,05$ ) nos animais que não receberam o reforço ou animais imunizados com a APV (Figura 25 AC). O grupo de animais com ausência de reforço também apresentou número de monócitos estatisticamente menores ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo salina (Figura 25 B). Foi verificado um aumento significativo no número de linfócitos e eosinófilos ( $p < 0,05$ ) nos animais que receberam o reforço com a vacina Plow em relação ao grupo salina (Figura 25 DE).



**Figura 25: Recrutamento de células ao LBA 7 dias após infecção intranasal com *B. pertussis* em grupos de camundongos após reforço vacinal.** Camundongos BALB/c ( $n=5$  animais/grupo) receberam a imunização primária com WCP por via i.p e um grupo recebeu salina. Na 25ª semana, os animais foram imunizados com uma dose de reforço: o grupo 2 não recebeu o reforço (WCP+WCP), o grupo 3 recebeu um reforço com a WCP (WCP+WCP+WCP), o grupo 4 com a APV (WCP+WCP+APV) e o grupo 5 com a vacina Plow (WCP+WCP+Plow). Na 7ª semana após o reforço, os animais foram infectados (i. n) com *B. pertussis*. No 7º dia após a infecção, foi realizado o LBA e os pulmões foram coletados. Foi realizada a contagem diferencial das células do LBA (células totais, monócitos, neutrófilos e linfócitos) e análise de citocinas por KIT CBA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) entre os grupos indicados (two-way ANOVA). A # indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo salina.

### 5.2.3.2 Produção de citocinas Th1/Th2/Th17

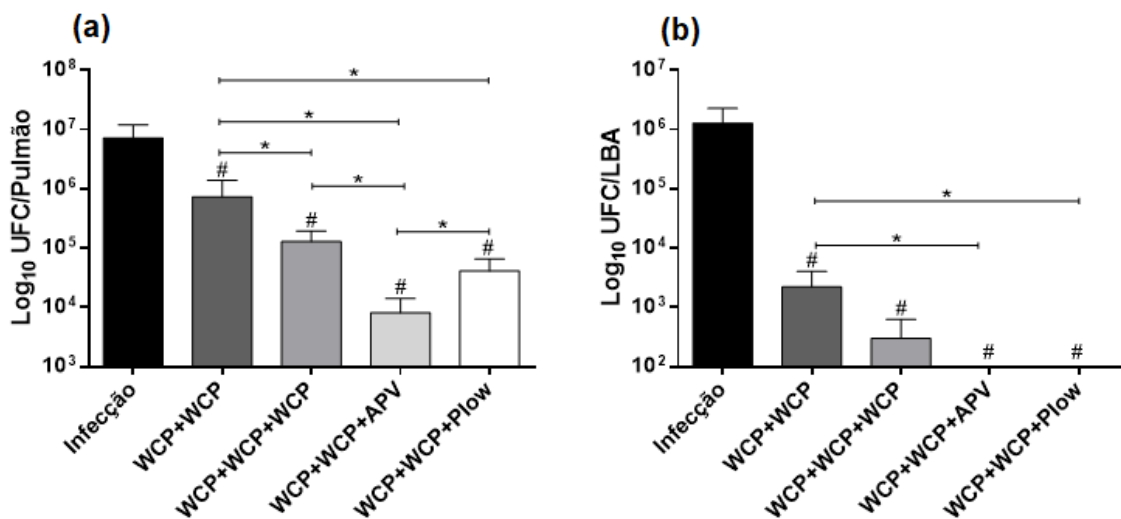
Foi avaliada a produção de citocinas em sobrenadantes de células obtidas do LBA 7 dias após a infecção intranasal com *B. pertussis*. Não foi observada diferença significativa nos níveis de citocinas presentes em sobrenadantes de células dos grupos imunizados (Figura 26). Foi verificado que os animais que receberam o reforço com a vacina Plow apresentaram concentrações estatisticamente menores ( $p < 0,05$ ) de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17 quando comparamos com o grupo Salina. Os animais que não receberam o reforço apresentaram níveis estatisticamente menores ( $p < 0,05$ ) de IFN- $\gamma$  em relação ao grupo salina (Figura 26 B). Células de todos os grupos de animais imunizados induziram produção de maiores níveis de IL-10 em relação ao grupo salina, embora não significativos (Figura 26 F).



**Figura 26: Produção de citocinas no LBA 7 dias após infecção intranasal com *B. pertussis* em grupos de camundongos após reforço vacinal.** Camundongos BALB/c (n=5 animais/grupo) receberam a imunização primária com WCP por via i.p e um grupo recebeu salina. Na 25ª semana, os animais foram imunizados com uma dose de reforço: o grupo 2 não recebeu o reforço (WCP+WCP), o grupo 3 recebeu um reforço com a WCP (WCP+WCP+WCP), o grupo 4 com a APV (WCP+WCP+APV) e o grupo 5 com a vacina Plow (WCP+WCP+Plow). Na 7ª semana após o reforço, os animais foram infectados por via *i.n.* com *B. pertussis*. No 7º dia após a infecção, foi realizado o LBA e os pulmões foram coletados. As células do LBA foram coletadas, 7 dias após a infecção. Os sobrenadantes celulares do LBA foram analisados quanto a produção de citocinas por Kit CBA (Th1/Th2/Th17) (BD biosciences) e analisada por citometria de fluxo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\* p < 0,001) entre os grupos indicados (*two-way ANOVA*). A # indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo salina.

### 5.2.3.3 Proteção induzida pelo reforço vacinal em animais BALB/c após infecção intranasal com *B. pertussis*.

Foi avaliada a eficácia protetora em relação ao reforço vacinal em grupos de animais imunizados com WCP, APV ou Plow em relação aos grupos que não receberam o reforço e salina. Foi observada uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da carga bacteriana (UFC) nos pulmões e LBA de todos os animais imunizados em relação ao grupo salina (Figura 27 AB). No pulmão, o grupo de animais sem o reforço tiveram carga bacteriana estatisticamente superior ( $p < 0,05$ ) em relação a todos os grupos que receberam a imunização de reforço (Figura 27 A). A proteção foi mais evidente nos grupos que receberam o reforço com a vacina Plow e APV, este último com uma carga bacteriana estatisticamente reduzida ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os demais grupos. No LBA observou-se uma tendência semelhante, animais imunizados com Plow e APV tiveram 100% de proteção, sendo estatisticamente significativa em relação ao grupo sem imunização de reforço (Figura 27 B).



**Figura 27: Proteção dos animais induzida por reforço vacinal tardio após infecção intranasal por *B. pertussis*.** Camundongos BALB/c ( $n=5$  animais/grupo) receberam a imunização primária com WCP por via i.p e um grupo recebeu salina. Na 25<sup>a</sup> semana, os animais foram imunizados com uma dose de reforço: o grupo 2 não recebeu o reforço (WCP+WCP), o grupo 3 recebeu um reforço com a WCP (WCP+WCP+WCP), o grupo 4 com a APV (WCP+WCP+APV) e o grupo 5 com a vacina Plow (WCP+WCP+Plow). Na 7<sup>a</sup> semana após o reforço, os animais foram infectados por via intranasal com *B. pertussis*. No 7<sup>o</sup> dia após a infecção, foi realizado o LBA e os pulmões foram coletados. Os homogenatos do LBA e pulmões foram plaqueados para avaliação do número de UFC. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ( $*p < 0,05$ ) entre os grupos indicados (*two-way ANOVA*). # indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo salina.



## 6 DISCUSSÃO

Este estudo foi conduzido em duas etapas.

Na primeira etapa, foi feito um estudo epidemiológico sobre o estado imunológico de voluntários de ambos os gêneros, de diferentes faixas etárias, vacinados ou não contra pertussis, a partir de amostras de sangue obtidos no Hospital Universitário do Estado de São Paulo, com o objetivo de obter informações sobre a circulação de *B. pertussis* e *B. parapertussis* na população.

Não há indícios de estudo soroepidemiológico sobre coqueluche de base populacional que tenha sido realizado recentemente no Brasil, portanto, os resultados apresentados, ainda que sejam de um estudo transversal regional, podem ser utilizados para se estimar de forma mais realista a incidência da doença no país, bem como contribuir ao entendimento real da cadeia de transmissão e seu impacto, dando suporte para rever as estratégias de vacinação e a necessidade de implantação de doses de reforço.

Em uma segunda etapa, como complemento ao estudo soroepidemiológico, foi realizado em modelo experimental murino um estudo de imunização primária, reforço e desafio respiratório, para avaliar a memória imunológica à vacinação com a WCP após o declínio dos níveis de anticorpos promovidos pela vacina, e consequente proteção persistente contra *B. pertussis*. Além disto, se investigou a hipótese de um reforço com vacinas WCP, APV ou Plow induzir uma resposta imune protetora mais significativa em relação a ausência do reforço.

O intuito deste estudo foi contribuir para a melhor caracterização do perfil populacional em relação à resposta imunológica à coqueluche para futura tomada de decisão sobre a possível introdução da Vacina Plow em estudo de campo.

### **6.1 ANÁLISE DO PERFIL SOROLÓGICO DA POPULAÇÃO EM RELAÇÃO A BORDETELLA PERTUSSIS**

O estudo soroepidemiológico da primeira etapa partiu de uma análise presuntiva de exposição ou infecção por pertussis, através do perfil de anticorpos em soro de voluntários coletados no período de 2015 a 2019, com base na prevalência de altos níveis de IgM anti-PT, anticorpo relacionado a infecção primária, detectado

entre 5-10 dias após o início da doença e IgG anti-PT, que surge após 2-3 semanas do início da infecção, podendo ser detectado por vários anos. O anticorpo IgG anti-PT, cujos títulos diminuem rapidamente após a imunização (GIULIANO; MASTRANTONIO; GIAMMANCO; PISCITELLI *et al.*, 1998) vem sendo utilizado como marcador de infecções recentes (DE MELKER (DE MELKER; SCHELLEKENS; NEPPELENBROEK; MOOI *et al.*, 2000) também tem demonstrado por diversos estudos, que foi pouco influenciado pela exposição precedente à vacina, particularmente em coortes nas quais a exposição à vacina não era recente (GIAMMANCO; NARDONE; PEBODY; KAFATOS *et al.*, 2008).

No total da população avaliada, 41,2% (618/1500) dos soros analisados apresentaram prevalência positiva para anticorpos IgG anti-PT (> 40 UI/mL). Entre os soropositivos, 21,6% (325/1500) foram classificados como compatíveis ao indicativo de contato com pertussis nos últimos 12 meses (IgG anti-PT entre 40-125 UI/mL), enquanto que 19,5% (293/1500) apresentaram forte indicativo de infecção recente ou ativa por pertussis (IgG anti-PT  $\geq$  125 UI/mL)(FRAJ; ZGHAL; HSAIRI; KECHRID *et al.*, 2019); ORGANIZATION, 2017; EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2012).

O resultado da análise sorológica foi comparado com o percentual de casos confirmados de coqueluche notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (SINAN/DATASUS), registrados no mesmo período no Brasil (Figura 11).

Entre 2015-2019, período em que as amostras foram coletadas, foram notificados um total de 9765 casos de coqueluche no Brasil, sendo 1888 casos registrados no Estado de São Paulo. A análise comparativa entre os percentuais de casos registrados no país e no Estado de São Paulo, nas diferentes faixas etárias, mostrou que ocorreu o mesmo perfil de prevalência de coqueluche em nível nacional e estadual (Figura 11). No Brasil e no Estado de São Paulo o maior percentual de notificação de coqueluche foi entre crianças menores de um ano de idade, com 57,6% (5622/9765) e 55,2% (1042/1888) casos, respectivamente. Este dado pode ser explicado devido à janela imunológica, período que o organismo leva, a partir de uma infecção ou vacinação, para produzir uma resposta imunológica protetora. Crianças menores de 1 ano de idade ainda não foram imunizadas com todas as doses da vacina celular DTP, portanto no intervalo entre uma dose e outra, a criança pode ser

acometida por uma infecção por pertussis e, portanto, são mais susceptíveis a adquirir a doença, a desenvolver complicações e até mesmo evoluir para o óbito (MEDEIROS; CAVALCANTE; SOUZA; FERREIRA, 2017; RIBEIRO; MENDES, 2019). Do total de óbitos registrados no país, 94,4% (85/90) ocorreram em crianças com menos de um ano de idade (SAÚDE, 2020), dados que reforçam a importância de elaborar estratégias de prevenção e controle para o fortalecimento da vigilância epidemiológica e manutenção de elevadas coberturas vacinais para os menores de 1 ano com a vacina Pentavalente (DTP+Hib+HB).

Foi possível verificar que as amostras de soros da população de 5-9 anos apresentaram altos níveis de IgG anti-PT estatisticamente significativos ( $p < 0,001$ ) em relação a adultos (20-39 e 40-59 anos) e idosos ( $\geq 60$  anos), porém não significativos quando comparados com adolescentes (10-14 e 15-19 anos). Essa faixa etária apresentou elevada prevalência de anticorpos positivos para pertussis; 38,4% dos soros apresentaram níveis de IgG anti-PT entre 40-125 UI/mL, o que caracteriza indicativo de contato com pertussis nos últimos 12 meses, enquanto que 44% dos soros apresentaram níveis de anticorpos acima de 125 UI/mL, com forte indicativo de infecção recente ou ativa por pertussis.

Apesar de nessa faixa etária tais indicativos sorológicos sugerirem possível infecção recente por pertussis, é preciso ter cautela na interpretação da análise sorológica de IgG anti-PT em crianças, tendo em vista a imunização recente (DE MELKER; VERSTEEGH; CONYN-VAN SPAENDONCK; ELVERS *et al.*, 2000). No Brasil, a criança pode ser imunizada com a última dose de reforço da vacina DTP até os 6 anos de idade (PNI/DATASUS) e a imunização, tanto com APV ou WCP, induz pico de resposta de IgG anti-PT de 4-6 semanas após a vacinação, com proporção mais elevada de títulos em crianças imunizadas com a APV. Somente nos dois ou três anos após a última imunização, níveis elevados de IgG anti-PT podem ser considerados como forte indicativo de infecção recente por pertussis (GIAMMANCO; CHIARINI; MAPLE; ANDREWS *et al.*, 2003; PEBODY; GAY; GIAMMANCO; BARON *et al.*, 2005); Nas análises de anticorpos IgM anti-PT, os títulos médios foram significativamente menores entre crianças de 5-9 anos, quando comparados com soros de adolescentes de 10-14 e de adultos de 20-39 e 40-59 anos. Níveis de IgM estatisticamente baixos em crianças pode ser devido a imunização recente. Anticorpos IgM gerados pela vacinação se ligam à bactéria, desencadeiam a ativação

da via clássica do complemento, promovendo a opsonização e fagocitose pelos macrófagos (CAPOLUNGI; ROSADO; SINIBALDI; ARANBURU *et al.*, 2013).

Também há evidências de que crianças que foram vacinadas e que posteriormente adoecem por coqueluche podem apresentar aumento significativo de anticorpos IgM porque a infecção fornece um estímulo antigênico mais forte do que a vacinação (MACAULAY, 1981; RUUSKANEN; VILJANEN; SALMI; LEHTONEN *et al.*, 1980). Portanto, a imunização recente dificulta a primeira infecção pela bactéria, o que justifica os níveis significativamente baixos de IgM, mas na adolescência a imunidade vacinal é substituída pela imunidade natural, o que explica o aumento dos níveis desse anticorpo a partir da faixa etária de 10-14 anos.

É importante ressaltar que a imunidade protetora contra coqueluche não pode ser avaliada somente a partir da análise de níveis altos de anticorpos, pois está relacionada não somente à imunidade humoral, mas também à celular e de mucosa, quesitos importantes para a avaliação em longo prazo da proteção induzida pelas vacinas (CARVALHO; PEREIRA, 2006; EDELMAN; HE; MAKINEN; HAANPERA *et al.*, 2004; PICHICHERO; RENNELS; EDWARDS; BLATTER *et al.*, 2005).

Segundo alguns autores, a imunidade vacinal diminui com o tempo e crianças vacinadas são protegidas contra infecções por pertussis por um período de cinco a dez anos após sua última vacinação (KILGORE; SALIM; ZERVOS; SCHMITT, 2016; MACHADO; PASSOS, 2019; SCHWARTZ; KWONG; DEEKS; CAMPITELLI *et al.*, 2016). Portanto, a presença de altos níveis de anticorpos IgG, e níveis significativamente inferiores de IgM, associados com a queda do número de casos notificados na faixa de 5-9 anos, fortalece o indicativo da existência da imunidade induzida pela vacina nessa fase.

Ainda segundo dados coletados pelo SINAN/DATASUS, adolescentes e adultos apresentaram uma tendência acentuada de queda referente à porcentagem de casos notificados de coqueluche, e idosos acima de 60 anos registraram os menores índices, com 0,8% (75/9765) de casos em nível nacional, tendência também mostrada no Estado de São Paulo, com 1,1% (20/1888) dos casos nessa faixa etária (Figura 11).

Apesar de haver uma acentuada queda do número de casos de coqueluche confirmados na faixa de 10-14 anos, é no grupo de 15-19 anos que a queda ocorre de forma mais acentuada (SINAN/DATASUS), apresentando o segundo menor índice de

casos confirmados de coqueluche (SINAN/DATASUS). A baixa porcentagem de casos nessas faixas etárias contrasta com alguns estudos descritos na literatura, cujos resultados sugerem que a queda da imunidade induzida pela vacina tem levado a mudanças no perfil epidemiológico da doença, com aumento da incidência de coqueluche em adolescentes e adultos (FEDELE; STEFANELLI, 2017; MOOI; VAN DER MAAS; DE MELKER, 2014; WENDELBOE; HUDGENS; POOLE; VAN RIE, 2007). Isso pôde ser explicado pelos resultados sorológicos das amostras de soro dessa população, pois se verificou uma maior concentração de anticorpos IgG anti-PT.

Levando-se em consideração que a faixa etária de 15-19 anos foi imunizada com a última dose da vacina DTP há pelo menos dez anos, e que no Brasil não há um plano de imunização de reforço nessa parcela da população, é evidente que os níveis elevados de IgG anti-PT estejam associados à alta reexposição ao patógeno circulante devido à diminuição da imunidade vacinal, tornando esses adolescentes possíveis reservatórios para *B. pertussis* e uma fonte de infecção para os recém-nascidos com calendário vacinal incompleto.

Nas análises sorológicas dessa faixa etária, 46,0% apresentaram IgG anti-PT com indicativo de contato com pertussis nos últimos 12 meses e 28,6% apresentaram anticorpos com forte indicativo de Infecção recente ou ativa (Figura 12).

Resultados semelhantes foram encontrados em diversos países com alta cobertura vacinal. Alta prevalência de IgG anti-PT em adolescentes de 10-14 e 15-19 anos foi observada em um estudo transversal em Israel (RENDI-WAGNER; TOBIAS; MOERMAN; GOREN *et al.*, 2010). Um estudo com adolescentes na Índia, Tailândia, Taiwan, Coréia, China, Sri Lanka e Japão mostrou, entre 2013 e 2016, que um a cada vinte indivíduos tinha evidência sorológica para infecção recente, independentemente de histórico de vacinação (SON; THAMLIKITKUL; CHOKEPHAIBULKIT; PERERA *et al.*, 2019).

Um outro estudo utilizando um modelo matemático previsor mostrou que a perda da imunidade vacinal/natural associada a altas taxas de reforço imunológico, devido à alta circulação do patógeno, evidencia os efeitos na cinética da resposta imune das células B e T primadas. A estimulação antigênica *in vivo* demonstrou que as células T primadas são mais eficientes na resposta imune às células apresentadoras de antígeno do que as células não estimuladas (RUSH;

MILLINGTON; HUTCHISON; BRYSON *et al.*, 2009). Isso sugere que uma breve exposição a uma pequena quantidade de antígeno pode reestimular a imunidade contra *B. pertussis*, estendendo sua eficácia sem causar infecção sintomática ou transmissível. Portanto, a alta reexposição torna adolescentes imunes e menos suscetíveis à infecção sintomática, o que pode justificar os poucos casos notificados. Ou seja, a análise sorológica dialogou diretamente com os dados do SINAN/DATASUS, inclusive justificando por que ocorre um menor índice de casos de coqueluche em adolescentes.

Por outro lado, a baixa reexposição leva indivíduos que ainda estão imunes a voltar à classe de suscetíveis devido à perda relativamente rápida da imunidade, o que explica a origem da recorrência de surtos epidêmicos (LAVINE; KING; BJØRNSTAD, 2011).

Quando foram analisados os dados referentes à porcentagem de ocorrência de coqueluche, associados à soroprevalência de IgG anti-PT, em adultos de 20-39 anos, observou-se um leve aumento do percentual de casos confirmados, tanto em nível nacional (6,1%) quanto no Estado de São Paulo (7,9%), principalmente quando comparado com percentuais de casos entre adolescentes de 15-19 anos, num total de 1,7% e 1,3%, respectivamente. Também foi observada uma acentuada queda dos níveis de anticorpos IgG anti-PT, significativamente menores ( $p < 0,0001$ ) quando comparados com crianças de 5-9 anos (faixa etária com imunização recente) e adolescentes (10-14 e 15-19 anos).

Portanto, os baixos níveis de IgG anti-PT associados a níveis significativamente maiores de IgM anti-PT em adultos reforçam a evidência da diminuição da imunidade natural adquirida por reexposição por *B. pertussis*, tornando-os indivíduos suscetíveis, o que justifica o aumento de casos. É possível que a incidência de casos possa ser superior, tendo em vista que há uma maior subnotificação conforme ocorre um aumento das faixas etárias (CRABBE; SAAVEDRA-CAMPOS; VERLANDER; LEONARD *et al.*, 2017).

A detecção de casos de coqueluche em adolescentes e adultos se torna mais complexa devido ao fato dessa população não apresentar a sintomatologia clássica ocasionada pela imunidade residual, o que dificulta o diagnóstico e a consequente notificação dos casos, resultando em subnotificação e subdiagnóstico, justificando a

baixa incidência de casos nessas faixas etárias (MEDEIROS; CAVALCANTE; SOUZA; FERREIRA, 2017; TREVIZAN; COUTINHO, 2008).

Essa situação reflete uma baixa sensibilidade da rede de serviços de saúde no diagnóstico da doença nessas faixas etárias, ocasionada pela dificuldade de acesso aos recursos de apoio diagnóstico por meio de laboratórios, insumos e treinamento dos profissionais de saúde (MEDEIROS; CAVALCANTE; SOUZA; FERREIRA, 2017; TREVIZAN; COUTINHO, 2008). Assim, muitos casos podem não ter sido relatados às autoridades, o que significa que os números registrados nos bancos de dados oficiais (SINAN/DATASUS) podem subestimar a real extensão do problema (CRABBE; SAAVEDRA-CAMPOS; VERLANDER; LEONARD *et al.*, 2017; HEIL; TER WAARBEEK; HOEBE; JACOBS *et al.*, 2017). Além disso, deficiências nesses bancos de dados também promovem subnotificação de doenças, internações e óbitos, como já foi levantado em estudos anteriores (MAIA; FRIAS; ASSUNÇÃO; VIDAL *et al.*, 2019; TIAGO; PICOLI; GRAEFF; CUNHA *et al.*, 2017). A existência de áreas e municípios sem acesso a computadores é outro fator que também pode afetar as notificações e, portanto, apresentar diferenças artificiais na incidência da doença (DE BARROS; NUNES; ABREU; FURTADO *et al.*, 2020).

Nas amostras de soros de adultos de 20-39, 19,8% apresentaram níveis de IgG anti-PT relacionados com contato com pertussis nos últimos 12 meses e 12,5% com indicativo de infecção recente.

Segundo dados obtidos do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos – SINASC (SINASC/DATASUS), mulheres na faixa etária de 20-39 anos foram responsáveis por 80,6% dos nascimentos de bebês ocorridos no Brasil no período de 2015-2019. Um estudo de revisão demonstrou que a maioria das fontes identificadas de infecção infantil por coqueluche eram domiciliares, sendo 55% (IC 95%: 52%-58%) pelos pais, com mães aproximadamente duas vezes mais prováveis de serem a fonte que os pais, os irmãos em 16-43%, e os avós em 5% dos casos (WILEY; ZUO; MACARTNEY; MCINTYRE, 2013).

Uma coorte anual realizada em 2011, avaliou custo-efetividade da introdução da imunização materna universal com DTPa no PNI em comparação com a prática atual (sem vacinação materna contra coqueluche). Concluíram que a imunização materna, com eficácia da vacina de 78% e custo da vacina de US \$ 12,39 por dose,

evitaria 661 casos e 24 mortes infantis de coqueluche (SARTORI; DE SOÁREZ; FERNANDES; GRYNINGER *et al.*, 2016).

O aumento da incidência de casos coqueluche ocorrida a partir de 2012 e diante o surto da doença registrado em 2014, levaram à implementação da vacinação de reforço com a DTPa para gestantes, realizada no PNI, sendo importante para a redução significativa dos casos das doenças para as quais ela oferece proteção (COSTA; DOS SANTOS; LOPES; BORGES *et al.*). Na Argentina, um estudo concluiu que em mães vacinadas com a DTPa durante a gestação, 92% dos recém-nascidos apresentaram anticorpos IgG positivos contra pertussis (BOSCH; FERNÁNDEZ; POLAK; MUSANTE *et al.*, 2017). Apesar da importância da vacinação de reforço em gestantes, desde 2016 o Sistema de Informações do PNI (SI-PNI) tem registrado declínio em relação às coberturas vacinais dessa população (Figura 4) (PACHECO; FRANÇA; ELIDIO; DOMINGUES *et al.*, 2019)). Em 2020, a cobertura vacinal com a DTPa em gestantes atingiu os menores índices dos últimos três anos (45%). Uma possível explicação se deve à pandemia de Covid-19 que o Brasil vem enfrentando desde março desse ano. As medidas de distanciamento social para se evitar a transmissão do vírus Sars-COV-2 têm afastado as gestantes da procura por vacinas nos Sistemas de Saúde (SATO, 2020). Tais medidas certamente irão gerar um impacto nos próximos anos sobre novas epidemias de doenças imunopreveníveis, incluindo a coqueluche.

Em relação às faixas etárias mais avançadas, os dados colhidos pela plataforma SINAN/DATASUS mostram uma diminuição da porcentagem de casos notificados de coqueluche. Igualmente, observou-se a diminuição dos níveis de anticorpos IgG anti-PT nas amostras de soros analisadas neste estudo. Entretanto, os soros de voluntários adultos de 40-59 anos e de idosos com 60 anos ou mais apresentaram índices relativamente altos de prevalência de IgG anti-PT, com forte indicativo de infecção recente, na proporção de 14,2% e 10,1%, respectivamente.

Tais resultados reforçam ainda mais a evidência da alta circulação da bactéria nos diferentes estratos populacionais associada a uma possível subnotificação de casos. Particularmente é um dado preocupante na população acima dos 60 anos, tendo em vista que o declínio da resposta imunológica em decorrência da imunossenescência a torna mais suscetível a infecções e ao agravamento da doença,



levando, conseqüentemente, ao aumento do risco de hospitalização (KARKI; MCINTYRE; NEWALL; MACINTYRE *et al.*, 2015).

A imunossenescência se torna mais evidente a partir dos 50 anos quando, em consequência da involução do timo, a produção de células T imaturas diminui para menos de 10% da produção original, ocasionando a redução da diversidade de receptores dessas células, com um risco crescente de novos antígenos não serem reconhecidos com a idade, além de também ocorrer o declínio no número de células B (VAN TWILLERT, 2017).

Em relação ao gênero, nossos resultados mostraram que soro de mulheres tiveram probabilidade significativamente menores de apresentarem prevalência positiva para anticorpos IgG anti-PT (> 40 UI/mL) quando comparado com homens. Alguns estudos de soroprevalência corroboram com esse achado (CONDE-GLEZ; LAZCANO-PONCE; ROJAS; DEANTONIO *et al.*, 2014; LEE; HAN; BAE; KIM *et al.*, 2014). O fato é que não está claro se existe uma ligação verdadeira entre coqueluche e gênero, pois apenas as análises realizadas não seriam suficientes para garantir essa relação. De qualquer forma, se houver, a causa ainda é desconhecida.

Já em relação ao tabagismo, verificou-se no presente estudo correlações significativas de soropositividade de IgG anti-PT entre indivíduos tabagistas comparados aos não tabagistas. Isso ocorre porque a exposição ao cigarro aumenta a suscetibilidade às infecções virais e bacterianas, devido à diminuição da atividade dos cílios e células fagocíticas, com aumento da ligação e colonização bacteriana nas células epiteliais do trato respiratório (EL AHMER; ESSERY; SAADI; RAZA *et al.*, 1999), aumentando, assim, o risco de infecção por coqueluche.

Soros de indivíduos que relataram possuírem doenças crônicas também apresentaram correlações significativas para soropositividade de IgG anti-PT quando comparados com indivíduos com ausência dessas doenças ( $p < 0,001$ ). É sabido que a infecção por pertussis induz fortes mecanismos imunomoduladores que desempenham um papel importante na fisiopatologia da doença. Portanto, a presença de doenças crônicas associadas à coqueluche podem exacerbar a comorbidade e resultar em aumento das necessidades de cuidados à saúde. Vários estudos têm mostrado que a infecção por coqueluche em pessoas com asma ou Doença Pulmonar Obstrutiva crônica (DPOC) levam à diminuição da capacidade respiratória e a mais exacerbações de tais doenças, como no aumento do uso de broncodilatador e no

aumento das hospitalizações, resultando em custos mais elevados em saúde (CAPILI; HETTINGER; RIGELMAN-HEDBERG; FINK *et al.*, 2012; MBAYEI; FAULKNER; MINER; EDGE *et al.*, 2019; MEYER; FAULKNER; MINER; EDGE *et al.*, 2016).

Esses resultados evidenciam a magnitude da carga de disseminação da infecção por coqueluche na comunidade e reforçam a importância de aprimorar os conhecimentos sobre a epidemiologia da doença, bem como buscar estratégias de vacinação que levem em consideração mudanças na imunidade relacionadas à idade, mas também na população com comorbidades, com objetivo de reduzir a circulação de *B. pertussis* e garantir a proteção dos indivíduos em risco.

## **6.2 ANÁLISE DO PERFIL SOROLÓGICO DA POPULAÇÃO EM RELAÇÃO A BORDETELLA PARAPERTUSSIS**

Os 1500 soros também foram avaliados quanto a presença de anticorpos IgM anti-Bpp e IgG anti-Bpp. Embora a infecção por *B. parapertussis* tenha menor incidência em relação a *B. pertussis* e seja geralmente acompanhada de sintomas mais leves, crianças e indivíduos imunocomprometidos acometidos por esse patógeno podem apresentar sintomas típicos da doença, incluindo tosse prolongada, paroxismos e vômitos pós tosse (CHERRY; SEATON, 2012).

A detecção de *B. parapertussis* em pacientes com coqueluche é relativamente frequente em diferentes países da Europa (CHERRY, 2012; CHERRY; SEATON, 2012) e também nos EUA. Neste último, o maior número de infecções por *B. parapertussis* foi registrado durante um surto em Wisconsin entre outubro de 2011 e dezembro de 2012, com 6% (443 casos) das amostras positivas, indicando que a exposição a esse patógeno também é endêmica (KOEPEKE; BARTHOLOMEW; EICKHOFF; AYELE *et al.*, 2015), inclusive com relatos de casos de *B. pertussis* e *B. parapertussis* resistentes a antibióticos (LI; DENG; MA; ZHOU *et al.*, 2019; LIU; WANG; ZHANG; LI *et al.*, 2018).

Já em países da América Latina, foram detectadas infecções por *B. parapertussis* (ESPITIA CERPA; GARRIDO ORTEGA, 2018; LAVAYÉN; ZOTTA; CEPEDA; LARA *et al.*, 2017; NOGUERA; JARAMILLO; ZABALA; VILLACÍS, 2021), mas não há relatórios oficiais disponíveis sobre as taxas de incidência. Assim, um estudo soropidemiológico contra *B. parapertussis* além de evidenciar a alta circulação desse

patógeno, também pode fornecer subsídios para futuros estudos sobre a efetividade cruzada de vacinas já disponíveis contra pertussis.

As análises sorológicas também mostraram que os soros de todas as faixas etárias apresentaram altos títulos de IgG anti-Bpp, sendo estatisticamente superiores ( $p < 0,0001$ ) em adolescentes (10-14 e 15-19 anos), adultos (20-39 e 40-59 anos) e idosos ( $\geq 60$  anos) quando comparados aos soros de crianças de 5-9 anos. Uma possível explicação para níveis de IgG anti-Bpp inferiores em crianças pode ser devido ao último reforço com a vacina DTP, dada entre 5-6 anos de idade, promovendo proteção cruzada em relação à infecção por parapertussis. Já na adolescência, o aumento dos níveis de IgG anti-Bpp ocorre por conta da exposição à bactéria circulante, com aumento significativo de anticorpos.

Há poucos estudos sobre a eficácia das vacinas celular ou acelular na proteção cruzada contra parapertussis e a discussão sobre o tema ainda é controversa. Ensaio conduzidos na Itália e na Suécia não encontraram eficácia substancial na proteção cruzada para parapertussis (BERGFORS; TROLLFORS; TARANGER; LAGERGÅRD *et al.*, 1999; MASTRANTONIO; STEFANELLI; GIULIANO; ROJAS *et al.*, 1998). Por outro lado, um estudo realizado nos EUA entre crianças de 2 meses a 10 anos de idade, no período de 2011 a 2016, encontrou até 82% na eficácia da DTPa na proteção contra parapertussis (LIKO; ROBISON; CIESLAK, 2017). Segundo Heininger e colaboradores (1999), uma explicação para a melhor efetividade da vacina DTPa na proteção cruzada contra parapertussis pode ser devido à maior quantidade de antígenos de FHA como componente vacinal e à indução proporcionalmente maior de resposta de anticorpo anti-FHA, que pode levar a uma proteção mais eficaz contra parapertussis (HEININGER; STEHR; CHRISTENSON; CHERRY, 1999). Atualmente os estudos para o desenvolvimento de candidatos vacinais contra coqueluche, também tem buscado conferir proteção cruzada contra *B. parapertussis* (ALVAREZ HAYES; OVIEDO; VALDEZ; LABORDE *et al.*, 2017; LIN; APOSTOLOVIC; JAHNMATZ; LIANG *et al.*, 2020).

Não foram observadas diferenças estatísticas nos títulos de IgM anti-Bpp em soros de crianças, adolescentes e adultos jovens (5-9, 10-14, 15-19 e 20-39 anos), entretanto entre esses grupos os níveis de anticorpos foram significativamente maiores quando comparados a adultos (40-59 anos) e idosos com 60 anos ou mais. Uma possível explicação para entender a diminuição na concentração de IgM nesta

população pode ser devido a diminuição da produção de novos anticorpos devido a imunossenescência, sendo isto decorrente de uma capacidade proliferativa diminuída das células B (TARGONSKI; JACOBSON; POLAND, 2007; VAN TWILLERT, 2017).

De fato, este estudo evidenciou a alta circulação de *B. parapertussis* na população, devido aos altos níveis de anticorpos detectados. Portanto, melhorar a qualidade no diagnóstico diferencial entre espécies de *Bordetella*, bem como a informação dos casos notificados de coqueluche, são medidas necessárias para se entender o perfil epidemiológico da doença.

### **6.3 PERFIL DE CITOCINAS INDUZIDAS PELO ESTÍMULO COM WCP**

Neste estudo também foi avaliada a persistência da imunidade celular de longo prazo através da análise de concentrações de citocinas induzidas por estímulo com WCP em células de sangue total de amostras de voluntários de diferentes faixas etárias.

Os perfis de citocinas referentes às respostas imunes de células T foram comparados entre as faixas etárias recém imunizadas com a vacina WCP (crianças de 5-9 anos) e outras cuja resposta imune provavelmente esteja associada à reexposição por *B. pertussis* circulante. Os resultados mostraram que o estímulo com a WCP em células do sangue total de crianças de 5-9 anos e adolescentes de 10-14 anos induziu maior produção de citocinas IL-2 estatisticamente significativa e de TNF- $\alpha$ , não significativa, em relação à população acima de 20 anos. Como demonstrado por vários estudos, tais citocinas estão associadas a um perfil de resposta imune do tipo Th1 e juntamente com IFN- $\gamma$  são consideradas contribuintes essenciais para a imunidade protetora específica de *B. pertussis* de longa duração (HIGGS; HIGGINS; ROSS; MILLS, 2012; MILLS, 2001; SHARMA; PICHICHERO, 2012), sendo detectadas após a infecção ou vacinação com WCP (DA SILVA ANTUNES; BABOR; CARPENTER; KHALIL *et al.*, 2018).

Como já mencionado, sabe-se que há um rápido decaimento dos níveis de anticorpos IgG anti-PT após a vacinação ou infecção (DALBY; PETERSEN; HARBOE; KROGFELT, 2010; EDELMAN; HE; MAKINEN; HAANPERA *et al.*, 2004; HENDRIKX; SCHURE; ÖZTÜRK; DE ROND *et al.*, 2011), entretanto ainda não se sabe ao certo quanto tempo persiste a imunidade celular fornecida pelas vacinas ou infecção natural

por *B. pertussis*. He e colaboradores (1994) demonstraram que as crianças finlandesas se tornaram suscetíveis à infecção por *B. pertussis* após o ingresso na escola, sugerindo que a memória imunológica não persiste por mais de cinco anos após a última imunização ocorrida (HE; VILJANEN; NIKKARI; LYYTIKAINEN *et al.*, 1994). Em outro estudo, nenhuma resposta celular específica a PT e FHA foi observada em adultos que receberam uma última dose da vacina APV seis anos antes de serem testados (HE; MINH; EDELMAN; VILJANEN *et al.*, 1998), sugerindo que a resposta imune celular induzida pela imunização contra *B. pertussis* começa a diminuir e pode até se tornar indetectável após esses seis anos. Diante desses dados, é possível sugerir que os maiores níveis de citocinas IL-2 e TNF- $\alpha$  produzidas a partir do estímulo com WCP, observadas em amostras de sangue de crianças de 5-9, somando-se à detecção de altos níveis de anticorpos IgG anti-PT e à queda do número de casos notificados nesta faixa etária (SINAN/DATASUS), reforçam a evidência da imunidade induzida pela vacina nessa faixa etária. Em relação às amostras de adolescentes de 10-14 anos, a presença de tais citocinas em níveis estatisticamente maiores em relação às faixas etárias superiores e os altos níveis de IgG anti-PT podem estar relacionados a um resquício de memória imune celular do tipo Th1 induzida pelo último reforço vacinal com a vacina celular DTP, ocorrido entre 4-6 anos de idade (PNI/DATASUS). Entretanto, são necessários mais estudos observacionais de coorte que forneçam estimativas mais detalhadas sobre a memória imunológica de células T CD4 de *B. pertussis*, em função da vacinação com a WCP, de forma que corroborem com nossas evidências.

Também foram observados altos níveis de citocina IL-6 em adultos de 40-59 anos e idosos com 60 anos ou mais em comparação com crianças de 5-9 anos. A IL-6 é uma citocina característica de processos inflamatórios, sendo importante na produção de anticorpos durante a infecção por *B. pertussis* ou respostas imunes induzidas pela vacinação. A IL-6 é produzida como parte da fase aguda da resposta inflamatória e é capaz de induzir o recrutamento de leucócitos e a produção de outras citocinas ligadas às células T (ZHANG; GOEL; GOODFIELD; MUSE *et al.*, 2011). Sabendo-se que nas faixas etárias superiores não há mais evidências de imunidade vacinal, a detecção dos níveis de IL-6, de atividade pró-inflamatória, pode estar relacionada a uma resposta inflamatória para a eliminação da *B. pertussis*, dados que justificam a alta prevalência de IgG anti-PT como indicativo de infecção ou exposição

recente por pertussis (> 125 UI/mL) de 14,2% e 10,1% para faixa etária de 40-59 anos e 60 anos ou mais, respectivamente.

Dessa forma, reforça-se a importância de desenvolver políticas de vigilância e estratégias de prevenção contra *B. pertussis* em adultos acima de 40 anos, principalmente os idosos, cuja morbidade associada à coqueluche ainda é subestimada. Além disso, faz-se necessário buscar novas evidências da segurança e da imunogenicidade a longo prazo sobre as vacinas APVs, ou novos candidatos vacinais, de forma a considerar possíveis protocolos de imunização em que se contemple esse grupo populacional.

#### **6.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PROTETORA APÓS REFORÇO VACINAL EM MODELO EXPERIMENTAL.**

Diversos estudos mostraram que a imunidade promovida pelas vacinas diminui com o tempo, resultando em populações desprotegidas e potenciais reservatórios para disseminação da infecção por *B. pertussis*. Esse fenômeno tem sido observado em diversos países, especialmente naqueles com alta cobertura vacinal infantil, ocasionando mudanças no perfil de idade de incidência de casos de coqueluche, que passou de bebês e crianças em idade pré-escolar para adolescentes e adultos (CORNIA; HERSH; LIPSKY; NEWMAN *et al.*, 2010; ESPOSITO; PRINCIPI, 2016; MACINA; EVANS, 2021). Por conta disso, países como EUA, Austrália, Canadá, França e Alemanha têm repensado suas estratégias de vacinação, incluindo recomendações de doses de reforços com a vacina acelular em adolescentes e adultos a partir dos 9 anos de idade (HELLENBRAND; BEIER; JENSEN; LITTMANN *et al.*, 2009; MILLER; AHMED; LU; EULER *et al.*, 2010; PICHICHERO; RENNELS; EDWARDS; BLATTER *et al.*, 2005).

Como já mencionado, é provável que esse fenômeno esteja ocorrendo também no Brasil, tendo em vista os altos níveis de anticorpos IgG anti-PT quantificados em soro de adolescentes participantes deste estudo, possivelmente associados à alta reexposição ou infecção natural recente por pertussis. Por outro lado, a queda acentuada de anticorpos detectada em soros de adultos a partir dos 20 anos sugere a rápida perda da imunidade promovida pela exposição à bactéria circulante, tornando-os mais suscetíveis à doença.

Estudos recentes mostraram que, além da curta duração, a proteção conferida pelas vacinas acelulares não impede a colonização por *B. pertussis* e a transmissão da mesma pelo vacinado. Enquanto a infecção natural e a imunização com vacinas celulares resultam em resposta Th1 e Th17, mais efetiva e importante no controle e eliminação da bactéria (BARBIC; LEEF; BURNS; SHAHIN, 1997; RYAN; MCCARTHY; RAPPUOLI; MAHON *et al.*, 1998). A imunização com vacinas acelulares resulta em resposta majoritariamente Th2, que, embora efetiva na proteção do indivíduo vacinado, pode não conter a disseminação da bactéria (HIGGS; HIGGINS; ROSS; MILLS, 2012; RYAN; MCCARTHY; RAPPUOLI; MAHON *et al.*, 1998), dados que explicam o aumento de casos de coqueluche em países desenvolvidos e com alta cobertura vacinal nos últimos anos (LAPIDOT; GILL, 2016). Portanto, são necessárias pesquisas para o desenvolvimento de novas vacinas, mais seguras para adolescentes ou adultos e que sejam capazes de promover uma resposta imune mais direcionada para Th1 e Th17 no vacinado.

Diante desses dados, o Instituto Butantan vem investindo em uma nova vacina celular contra coqueluche, a Pertussis *Low* (Plow). Comparativamente à vacina pertussis tradicional, a Plow foi avaliada em relação à imunogenicidade, segurança e potência e se mostrou tão eficaz quanto a vacina DTP 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 até 95% do LPS, diminuindo sua toxicidade sem alterar a potência e estabilidade da Plow (DIAS; VAN DER ARK; SAKAUCHI; KUBRUSLY *et al.*, 2013). Avaliada em ensaio de campo em recém-nascidos, apresentou resultados similares ao da vacina celular tradicional (ZORZETO; HIGASHI; DA SILVA; DE FARIA CARNIEL *et al.*, 2009). É importante ressaltar que a produção dessa vacina não alterou o custo da vacina DTP tradicional, permitindo seu uso em países em desenvolvimento. Assim, diante da busca por melhores resultados epidemiológicos e econômicos que visem à diminuição de casos de coqueluche, a vacina Plow pode ser uma alternativa de baixo custo, em substituição à vacina acelular, na imunização de reforço tardia entre adolescentes ou adultos jovens, contribuindo na garantia da proteção indireta a outras faixas etárias, principalmente entre os menores de um ano.

Dessa forma, foi proposto um modelo experimental de desafio respiratório para avaliar a memória imunológica à vacinação com a WCP na proteção persistente contra *B. pertussis*, após o declínio dos níveis de anticorpos promovidos pela vacina. Além disso, avaliou-se a hipótese de um reforço tardio, com vacinas WCP, APV ou Plow, induzir uma resposta imune protetora mais significativa em relação à ausência do reforço.

As razões para o declínio da imunidade mediada pela vacina contra *B. pertussis* em humanos ainda não estão bem compreendidas. Já o papel dos anticorpos na proteção é bem conhecido, com evidências mostrando uma correlação inversa entre os níveis de anticorpos séricos e a incidência de coqueluche grave (HENDRIKX; ÖZTÜRK; DE ROND; VEENHOVEN *et al.*, 2011; SMITS; POTTIER; SMET; DIRIX *et al.*, 2013). Entretanto, a persistência dos níveis detectáveis de anticorpos é relativamente curta e, portanto, não pode explicar a proteção de longo prazo. Diante disso, estudos com imunização passiva ou ativa em modelos murinos sugeriram que a memória imunológica é mais significativa na proteção do que a indução de respostas mediadas por anticorpos e implica que as crianças vacinadas ainda podem estar protegidas contra coqueluche mesmo após o desaparecimento de IgG sérica específica contra antígenos de *B. pertussis* (MAHON; BRADY; MILLS, 2000). O modelo murino proposto neste estudo parte dessas compreensões.

Inicialmente, foram definidos 5 grupos de camundongos BALB/c, 4 grupos receberam duas doses da vacina WCP, com intervalo de 15 dias entre as doses, e um grupo controle recebeu somente salina. Após sangrias sucessivas, os soros dos animais imunizados foram avaliados quanto à cinética dos níveis de anticorpos IgG anti-PT. Os resultados obtidos mostraram um aumento progressivo dos níveis de IgG anti-PT até a 13ª semana após a imunização com WCP, quando iniciou-se um decaimento desses anticorpos. Para avaliação da memória imunológica e da proteção, na 25ª semana após a primeira dose da WCP, três grupos de animais receberam uma dose de reforço com WCP, APV ou Plow, um grupo não recebeu reforço, e o grupo controle recebeu somente salina.

Na 7ª semana após receberem o reforço, os animais foram eutanasiados e células do baço analisadas quanto à resposta imune celular. Os resultados mostraram que células do baço dos animais estimuladas com *B. pertussis* ou PT e que receberam um reforço com APV ou Plow apresentaram aumento significativo de citocinas de



resposta celular do tipo Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17A), além de citocina pró-inflamatória IL-6 e secreção de IL-10 anti-inflamatória, em relação aos animais imunizados com WCP, e produção significativa de citocinas de perfil celular Th1/Th2 em relação aos animais que não receberam imunização de reforço.

Dados da literatura sugerem que o perfil de resposta imune celular observado em camundongos imunizados com a vacina WCP ou expostos a *B. pertussis* está relacionado a uma resposta mista do tipo Th1/Th17 (ROSS; SUTTON; HIGGINS; ALLEN *et al.*, 2013) ativada principalmente pelo LPS com produção de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-17, induzindo células B a produzirem anticorpos de subclasse IgG2a (MILLS, 2001), responsáveis pela opsonização e fixação do complemento associada a uma maior proteção (DIAVATOPOULOS; EDWARDS, 2017; MILLS; RYAN; RYAN; MAHON, 1998). Em contraste, a imunização com a vacina APV induz uma resposta imune celular polarizada para um perfil Th2 com produção de altos níveis de anticorpo IgG1, subclasse que pode ser mais importante na neutralização de toxinas e na inibição da aderência bacteriana em células epiteliais ciliadas no trato respiratório (HIGGS; HIGGINS; ROSS; MILLS, 2012; VAN DER LEE; SANDERS; BERBERS; BUISMAN, 2018). No entanto, alguns estudos em humanos têm sugerido diferenças nos efeitos de longa duração, na polarização de resposta imune e proliferação das células T, após reforços com a vacina APV entre indivíduos cuja imunização primária originalmente foi feita com a APV em comparação com a WCP (VAN DER LEE; SANDERS; BERBERS; BUISMAN, 2018). Em seus estudos, Da Silva Antunes e colaboradores (2018) mostraram que a imunização da infância com WCP, mas não com APV, foi associada a um maior número de células T CD4 específicas de *B. pertussis* após o reforço com APV, sugerindo que a expansão de células T de memória em resposta à estimulação antigênica difere em função da imunização primária na infância (DA SILVA ANTUNES; BABOR; CARPENTER; KHALIL *et al.*, 2018).

Este presente estudo apresentou resultados que indicam que a resposta imune celular promovida pela imunização de reforço permaneceu polarizada em função da imunização primária com WCP, tendo em vista que o reforço com as vacinas APV e Plow induziu um perfil de resposta do tipo Th1, Th2 e Th17, porém mais polarizado para Th1, devido a produção de altos níveis de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-17, revelando o efeito modulador da imunização inicial com vacinas celulares.

Por sua vez, a semelhança no tipo de resposta imune induzida pelo reforço com a Plow em relação à WCP se deve ao fato de que, apesar da extração química remover mais de 95% do LPS da membrana exterior da *B. pertussis*, a estrutura ultramicroscópica da bactéria se mantém preservada (DIAS; VAN DER ARK; SAKAUCHI; KUBRUSLY *et al.*, 2013). Além disso, em ensaios clínicos, a Plow combinada com os toxoide tetânico e diftérico (DTPlow) demonstrou induzir respostas imunes humorais e celulares semelhantes às da WCP tradicional e provavelmente igual ou superior às da vacina acelular DTPa (ZORZETO; HIGASHI; DA SILVA; DE FARIA CARNIEL *et al.*, 2009).

Em relação à resposta imune humoral, nos animais que não receberam o reforço, os anticorpos IgG séricos totais e as subclasses decaíram a níveis basais, concordando com o que é apontado na literatura (MAHON (MAHON; BRADY; MILLS, 2000). Já o reforço com a vacina WCP, induziu um aumento significativo de anticorpos IgG totais, além de uma resposta balanceada das subclasses de IgG2a e IgG1, respectivamente utilizadas como marcadores de resposta celular do tipo Th1 e Th2, quando comparado aos demais grupos de animais do estudo. Já o reforço com a vacina APV induziu maiores níveis de IgG total e IgG2a anti-*B. pertussis*, indicando uma resposta celular do tipo Th1, em relação aos animais que receberam o reforço com a Plow e ao grupo que não recebeu reforço. Esses dados condizem com a descoberta de que a distribuição da subclasse de IgG contra *B. pertussis* é ditada com base na polarização distinta de linfócitos T *helper* (Th) mediada pelo tipo de vacina inicial, sendo demonstrado em outros estudos envolvendo humanos (DA SILVA ANTUNES; BABOR; CARPENTER; KHALIL *et al.*, 2018; GIAMMANCO; CHIARINI; MAPLE; ANDREWS *et al.*, 2003; VAN DER LEE; SANDERS; BERBERS; BUISMAN, 2018).

Van der Lee e colaboradores (2018) mostraram que a imunização primária com WCP na infância, seguida de vacinações de reforço com APV aos 4 e 9 anos de idade, induziram uma proporção de anticorpos de subclasse de IgG4, correspondente a uma resposta celular de perfil Th2, inferior em comparação com crianças cuja imunização primária foi feita com APV. Os autores sugeriram que os perfis de resposta imune de memória em pré-adolescentes são determinados pelas vacinas WCP ou APV administradas na infância, mostrando uma resposta benéfica dominada por Th1 após

a imunização primária com WCP (VAN DER LEE; SANDERS; BERBERS; BUISMAN, 2018).

A resposta imune dependente de células T CD4 para *B. pertussis* está associada à produção de citocinas IL-2/IFN- $\gamma$  e indução de resposta Th1, sendo considerada essencial para a imunidade protetora específica e de longa duração contra coqueluche (LEEF; ELKINS; BARBIC; SHAHIN, 2000; SHARMA; PICHICHERO, 2012). Dessa forma, também foram analisadas, por fenotipagem, diferentes subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 em células do baço e linfonodo dos grupos de animais do presente estudo. De forma geral, os animais que receberam um reforço com a vacina APV ou Plow apresentaram níveis superiores de linfócitos T CD4 e CD8 efetores e de memória central em relação ao grupo que não recebeu o reforço ou ao grupo que recebeu um reforço com a WCP.

As células T podem ser classificadas de acordo com o estágio de diferenciação em Linfócitos T naive, memória central ou memória efetora. Linfócitos T efetores desempenham uma função protetora imediata e secretam IL-2 e IFN- $\gamma$ , enquanto os linfócitos T de memória central, presentes em tecidos linfoides, nas barreiras mucosas e na circulação, são responsáveis pela imunidade prolongada, sendo atribuída a eles a capacidade de autorrenovação, proliferação e diferenciação em linfócitos T efetores. Smits e colaboradores (2013) avaliaram a memória residual de linfócitos T em uma coorte de pré-adolescentes que receberam um reforço com a APV, cuja imunização primária da infância foi feita com vacina WCP ou APV. Os autores mostraram que pré-adolescentes que receberam a imunização primária com a WCP apresentaram maior proliferação de linfócitos T CD4 e CD8, em resposta à estimulação com PT ou FHA específicas de *B. pertussis*. A fenotipagem das células respondentes mostrou maior proporção de linfócitos T de memória efetora em pré-adolescentes cuja imunização de infância foi realizada com WCP (SMITS; POTTIER; SMET; DIRIX *et al.*, 2013), com resultados semelhantes mostrados em outros estudos (SHERIDAN; WARE; GRIMWOOD; LAMBERT, 2012).

Neste estudo, também foi realizada a fenotipagem de linfócitos B em células do baço e linfonodos. As células do baço dos grupos que receberam o reforço com a APV ou Plow apresentaram frequência de Linfócitos B de memória estatisticamente maiores em relação ao grupo que não recebeu o reforço. Em contrapartida, em células do linfonodo, a vacina APV também induziu maior frequência de linfócitos B de

memória em relação aos grupos que receberam reforço com a WCP ou Plow. Tais resultados condizem com estudos em humanos, que mostraram um aumento dos níveis de linfócitos B de memória específicos de *B. pertussis* detectados em crianças após o reforço com APV, quando os níveis de IgG anti-PT, anterior ao reforço, estavam baixos (HENDRIKX; ÖZTÜRK; DE ROND; VEENHOVEN *et al.*, 2011; SASAKI; JAIMES; HOLMES; DEKKER *et al.*, 2007). Os Linfócitos B são células originadas na medula óssea, que amadurecem nos tecidos linfoides secundários e são ativadas no baço ou nos linfonodos quando as imunoglobulinas da sua superfície se ligam a um antígeno. Nesse ponto, diferenciam-se em células secretoras de anticorpos (células plasmáticas) ou em células B de memória, identificada pelo marcador CD27 (BERNASCONI; TRAGGIAI; LANZAVECCHIA, 2002; RIVAS; BROCARDO; KOKRON; RIZZO *et al.*, 2010). Em condições de estado estacionário, os linfócitos B de memória não secretam anticorpos, mas após um novo estímulo antigênico, essas células podem responder rapidamente, proliferar e se diferenciar em células secretoras de anticorpos, resultando em uma correlação entre linfócitos B de memória e no aumento dos níveis de anticorpos de curto prazo (HENDRIKX; ÖZTÜRK; DE ROND; VEENHOVEN *et al.*, 2011). Concordando com esses estudos, os resultados da fenotipagem demonstraram que um reforço vacinal estimulou uma maior proliferação de anticorpos séricos, principalmente nos animais que receberam reforço com APV ou Plow.

Também foi avaliada a imunidade protetora após o reforço vacinal através de um ensaio de infecção intranasal. Na 7ª semana após reforço, todos os animais foram infectados com *B. pertussis*, e sete dias após a infecção foram eutanasiados para a análise do perfil de resposta celular local, através do influxo celular e colonização determinada pelo número de UFCs nos LBAs e pulmões. Foi observado um predomínio de leucócitos totais e de neutrófilos no grupo salina em relação a todos os demais grupos, sendo estatisticamente maiores nos animais que não receberam o reforço ou naqueles cujo reforço foi feito com a APV. Em contrapartida, o reforço com a Plow induziu um aumento no número de linfócitos e eosinófilos em relação a todos os demais grupos, com diferença estatística em relação ao grupo salina.

Os neutrófilos são a população dominante entre os granulócitos e desempenham um papel principal na defesa do hospedeiro, removendo os patógenos por meio da fagocitose. Inicialmente, o recrutamento de neutrófilos para os pulmões

após a infecção é bloqueado pela ação da PT (CARBONETTI, 2015). Mas, em seguida, as subseqüentes interações hospedeiro-patógeno iniciam o recrutamento de neutrófilos, com pico de 10 a 14 dias após a inoculação em camundongos. As células Th17 são conhecidas por induzirem o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção, via IL-17A. Em camundongos *Knockout* para IL-17A, o recrutamento de neutrófilos e a eliminação de *B. pertussis* foram prejudicados, em comparação com camundongos do tipo selvagem (ROSS; SUTTON; HIGGINS; ALLEN *et al.*, 2013).

Os sobrenadantes celulares do LBA dos animais do grupo controle também apresentaram concentrações maiores de citocinas IL-6 pró-inflamatória, além de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-17 em relação a todos os animais vacinados, sendo estatisticamente superiores aos que receberam reforço com Plow. Os níveis inferiores de citocinas observados nos animais vacinados, especialmente os que receberam reforço com a Plow, podem estar relacionados ao rápido controle da infecção mediada pela presença de anticorpos séricos e linfócitos T CD4 e CD8 induzida pela memória imunológica adquirida pela vacinação.

Estudos demonstraram que a eliminação bacteriana dos pulmões após a exposição a um aerossol de *B. pertussis* em camundongos imunizados com WCP ou APV se correlaciona com a eficácia da vacina em crianças (MILLS, 2001), o que justifica a importância dos resultados gerados a partir do nosso modelo de proteção. Além disso, já está bem estabelecido que a infecção respiratória ou imunização de camundongos com WCP seletivamente induz a proliferação de células Th1 e a secreção de IFN- $\gamma$  (BARNARD; MAHON; WATKINS; REDHEAD *et al.*, 1996; MILLS, 2001), dados que sustentam nossos achados, tendo em vista que o grupo salina apresentou níveis maiores de citocinas relacionadas ao perfil de resposta Th1/Th17 quando comparado aos demais grupos.

Além disso, foi observada uma redução significativa da carga bacteriana (UFC) nos pulmões e LBA de todos os animais vacinados em relação ao grupo salina. No pulmão, os animais sem o reforço vacinal tiveram carga bacteriana estatisticamente superior em relação a todos os grupos que receberam um reforço. A proteção foi mais evidente nos grupos que receberam o reforço com a Plow ou APV, sendo que o grupo APV teve uma carga bacteriana estatisticamente reduzida quando comparado com os demais grupos. No LBA observou-se uma tendência semelhante, uma vez que

animais imunizados com Plow ou APV apresentaram carga bacteriana zerada 7 dias após a infecção. Esses resultados indicam o efeito benéfico na resposta imune protetora nos animais que receberam um reforço com as vacinas APV ou Plow.

Estudos em humanos têm sugerido que o perfil de resposta imune Th1 ou Th2 é ditado de acordo com a imunização da infância com WCP ou APV, dados que também são sugeridos em modelo de camundongos, indicando afetar a qualidade da resposta imune protetora nesses animais. A eliminação completa de bactérias geralmente ocorre após 14 dias em camundongos imunizados com APV, entretanto, animais anteriormente expostos à *B. pertussis* ou imunizados com WCP eliminaram as bactérias entre 5-7 dias após o desafio (MILLS; BARNARD; WATKINS; REDHEAD, 1993; MILLS, 2001). Em nossos resultados, observamos que a eliminação completa de bactérias no LBA ocorreu após 7 dias da infecção em animais que receberam o reforço com APV ou PLow, dados que novamente reforçam a importância da imunização primária com WCP. Um outro dado importante mostrou que os animais que não receberam o reforço tiveram carga bacteriana estatisticamente superior aos que receberam um reforço tanto nos LBAs quanto nos pulmões, evidenciando a importância do reforço na efetividade da resposta imune protetora.

Em suma, esses resultados mostraram que a memória imunológica à vacinação com a WCP não foi duradoura, tendo em vista que animais que não receberam o reforço apresentaram baixas frequências de linfócitos T CD4, CD8 e células B, não protegendo os animais do influxo de bactérias nos pulmões e LBA após o ensaio de infecção intranasal. Entretanto, a imunização com WCP associada a um reforço com as vacinas APV ou Plow foi capaz de induzir um amplo espectro de mecanismos efetores de proteção associados ao controle da infecção por *B. pertussis*. No geral, os animais que receberam o reforço com APV ou Plow apresentaram uma resposta imune mediada por linfócitos T CD4, CD8 e células B superiores em relação aos animais que não receberam o reforço vacinal, além do grupo salina. Da mesma forma, nossos dados sugerem que a resposta protetora promovida pela imunização de reforço é mediada pelo tipo de vacina inicial, tendo em vista que o reforço com a vacina APV induziu uma resposta balanceada de perfil Th1, Th2 e Th17.

Devido à impossibilidade do uso da WCP como reforço tardio, por conta das reações adversas desde a primeira administração, a vacina APV pode ser uma opção para imunização de reforço em adolescentes ou adultos jovens em razão da sua baixa

reatogenicidade, porém, os elevados custos de produção limitam seu uso, especialmente em países emergentes como o Brasil (ZORZETO; HIGASHI; DA SILVA; DE FARIA CARNIEL *et al.*, 2009). Portanto, futuramente a vacina Plow pode ser uma alternativa na vacinação de reforço dessas faixas etárias superiores no país (DE OLIVEIRA DIAS; PRESTES; CUNEGUNDES; SILVA *et al.*, 2017), tendo em vista a sua baixa reatogenicidade, com um custo na produção semelhante ao da vacina pertussis celular tradicional (DIAS; VAN DER ARK; SAKAUCHI; KUBRUSLY *et al.*, 2013) e com uma potencial capacidade de indução da resposta imune protetora direcionada para um perfil Th1 e Th17, conhecidamente mais efetiva e prolongada no combate às infecções por *B. pertussis* em relação à resposta Th2.

## 7 CONCLUSÕES

- Em uma primeira etapa do estudo, foram detectados altos níveis de anticorpos IgG anti-PT em soros de crianças de 5-9 anos, bem como altos níveis de citocinas de perfil Th1 (quando as amostras de sangue foram estimuladas com WCP), em comparação com adultos de 20-39, 40-59 anos e idosos com 60 anos ou mais, resultados que reforçam a evidência da imunidade induzida pela vacina celular DTP nessa faixa etária.
- Um perfil sorológico e de resposta celular semelhante aos das crianças de 5-9 anos foi observado em amostras de sangue de adolescentes de 10-14 anos, resultados que podem estar associados a um resquício da memória imunológica induzida pelo último reforço vacinal com a vacina celular DTP, ocorrido entre 4-6 anos de idade.
- Na faixa etária de 15-19 anos, observou-se maiores níveis de IgG anti-PT em comparação com as demais faixas etárias, sugerindo que os elevados níveis de anticorpos possam estar associados à alta reexposição à bactéria circulante e, por consequência, à aquisição de uma imunidade natural, uma vez que, de acordo com a literatura, é bem provável que a imunidade vacinal já tenha sido perdida.
- Entre os voluntários de 20-39 anos, foram observados baixos níveis de IgG anti-PT, em relação às crianças e adolescentes, dados que evidenciam a diminuição da imunidade natural por reexposição, tornando-os indivíduos suscetíveis ao contágio, o que pode justificar o aumento de casos notificados, isso sem considerar as possíveis subnotificações por conta dos sintomas mais leves da doença. Além de suscetíveis, esse público também pode ser um dos maiores transmissores para crianças.
- Foram detectadas alta prevalência de IgG anti-PT como indicativo de infecção ou exposição recente por pertussis de 14,2% e 10,1% para as faixas etárias de 40-59 anos e 60 anos ou mais, respectivamente. As amostras de sangue desses voluntários, apresentaram, após estímulo com WCP, altos níveis de IL-6, de atividade pró-inflamatória, que podem estar relacionados a uma resposta inflamatória para a eliminação da *B. pertussis*, justificando os resultados da análise sorológica.
- Entre as variáveis demográficas analisadas, homens, tabagistas e voluntários com alguma doença crônica apresentaram maiores prevalências de anticorpos IgG anti-



PT (> 40 UI/mL), quando comparados às mulheres, aos não tabagistas e às pessoas com ausência de doenças crônicas, respectivamente. Tais resultados, além de indicarem exposição recente por *B. pertussis* nos últimos 12 meses, também associam esse público a fatores de risco para infecção por coqueluche.

- As análises sorológicas também mostraram que crianças de 5-9 anos apresentaram níveis de IgG anti-Bpp estatisticamente inferiores quando comparado às demais faixas etárias, sugerindo uma possível proteção cruzada da vacina DTP à infecção por *B. parapertussis*.
- As análises de resposta celular e sorológicas evidenciaram a alta circulação de *B. pertussis* e *B. parapertussis* na população, principalmente entre os adolescentes e adultos jovens, grupos etários que, por apresentarem sintomas inespecíficos, dificultam o diagnóstico adequado. Essas características, os tornam potenciais transmissores do patógeno para indivíduos mais susceptíveis, principalmente recém-nascidos ainda não completamente imunizados. Portanto, é evidente a necessidade de protocolos de imunização de reforço em que se contemple esse grupo populacional.
- Em uma segunda etapa, foi demonstrado, através de um modelo animal murino, que a memória imunológica à vacinação com a WCP não foi duradoura, tendo em vista que animais que não receberam o reforço apresentaram baixas frequências de linfócitos T CD4, CD8 e de células B, não os protegendo do influxo de bactérias nos pulmões e no LBA, após o ensaio de infecção intranasal.
- Os animais que receberam o reforço com APV ou Plow apresentaram uma superior resposta imune mediada por linfócitos T CD4 e CD8 e de células B em relação aos animais que não receberam o reforço vacinal, além do grupo salina, com eliminação completa da bactéria no LBA e níveis estatisticamente inferiores de bactérias nos pulmões.
- A vacina Plow, futuramente, pode ser uma alternativa na vacinação de reforço para o público com maior potencial de transmissibilidade da bactéria, adolescentes e/ou adultos jovens no país, tendo em vista a sua baixa reatogenicidade, com um custo na produção bem inferior ao da APV e semelhante ao da WCP tradicional, além de uma potencial capacidade de indução da resposta imune protetora direcionada para um perfil Th1 e Th17, conhecidamente mais efetiva e prolongada no combate às infecções por *B. pertussis* em relação à resposta Th2.

## REFERÊNCIAS \*

AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE. **Resolução nº 306 de 7 de dezembro de 2004**. Diário Oficial da União, Seção 1, nº49, 10 de dezembro de 2004.

ALVAREZ HAYES, J.; OVIEDO, J. M.; VALDEZ, H.; LABORDE, J. M. *et al.* A recombinant iron transport protein from *Bordetella pertussis* confers protection against *Bordetella parapertussis*. **Microbiology and immunology**, 61, n. 10, p. 407-415, 2017.

ANDERSON, E. L.; BELSHE, R. B.; BARTRAM, J. Differences in reactogenicity and antigenicity of acellular and standard pertussis vaccines combined with diphtheria and tetanus in infants. **Journal of Infectious Diseases**, 157, n. 4, p. 731-737, 1988.

ANDREASEN, Charlotte; CARBONETTI, Nicholas H. Role of neutrophils in response to *Bordetella pertussis* infection in mice. **Infection and immunity**, v. 77, n. 3, p. 1182-1188, 2009.

AOYAMA, T.; MURASE, Y.; KATO, T.; IWATA, T. Efficacy of an acellular pertussis vaccine in Japan. **The Journal of pediatrics**, 107, n. 2, p. 180-183, 1985.

BARAFF, L. J.; MANCLARK, C. R.; CHERRY, J. D.; CHRISTENSON, P. *et al.* Analyses of adverse reactions to diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine by vaccine lot, endotoxin content, pertussis vaccine potency and percentage of mouse weight gain. **The Pediatric infectious disease journal**, 8, n. 8, p. 502-507, 1989.

BARBIC, J.; LEEF, M. F.; BURNS, D. L.; SHAHIN, R. D. Role of gamma interferon in natural clearance of *Bordetella pertussis* infection. **Infection and Immunity**, 65, n. 12, p. 4904-4908, 1997.

BARKOFF, A.-M.; GRÖNDAHL-YLI-HANNUKSELA, K.; HE, Q. Seroprevalence studies of pertussis: what have we learned from different immunized populations. **Pathogens and disease**, 73, n. 7, 2015.

BARKOFF, A.-M.; MERTSOLA, J.; PIERARD, D.; DALBY, T. *et al.* Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates: evidence of increased circulation in Europe, 1998 to 2015. **Eurosurveillance**, 24, n. 7, p. 1700832, 2019.

BARNARD, A.; MAHON, B. P.; WATKINS, J.; REDHEAD, K. *et al.* Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to *Bordetella pertussis* : variables in the in vivo priming and in vitro cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 or Th0. **Immunology**, 87, n. 3, p. 372-380, 1996.

BAUGHMAN, A. L.; BISGARD, K. M.; EDWARDS, K. M.; GURIS, D. *et al.* Establishment of diagnostic cutoff points for levels of serum antibodies to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and fimbriae in adolescents and adults in the United States. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, 11, n. 6, p. 1045-1053, 2004.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)**, 57, n. 1, p. 289-300, 1995.

BERGFORS, E.; TROLLFORS, B.; TARANGER, J.; LAGERGÅRD, T. *et al.* Parapertussis and pertussis: differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. **International journal of infectious diseases**, 3, n. 3, p. 140-146, 1999.

---

\* De acordo com:  
Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023 2002.

BERNASCONI, N. L.; TRAGGIAI, E.; LANZAVECCHIA, A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. **Science**, 298, n. 5601, p. 2199-2202, 2002.

BOCK, A.; GROSS, R. The BvgAS two-component system of *Bordetella* spp.: a versatile modulator of virulence gene expression. **International journal of medical microbiology**, 291, n. 2, p. 119-130, 2001.

BONITA, R.; BEAGLEHOLE, R.; KJELLSTRÖM, T. **Epidemiologia básica**. OPS, 2008. 9275316295.

BORDET, J.; GENGOU, O., 1909, **L'endotoxine coquelucheuse**. 415.

BOSCH, J. J.; FERNÁNDEZ, H.; POLAK, F. P.; MUSANTE, G. *et al.* Seroprevalencia contra *Bordetella pertussis* en embarazadas vacunadas y no vacunadas y neonatos en un hospital universitario de la provincia de Buenos Aires. **Arch. argent. pediatr**, p. 311-315, 2017.

BOUCHEZ, V.; BRUN, D.; DORE, G.; NJAMKEPO, E. *et al.* *Bordetella parapertussis* isolates not expressing pertactin circulating in France. **Clinical microbiology and infection**, 17, n. 5, p. 675-682, 2011.

BOUCHEZ, V.; GUISO, N. *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, vaccines and cycles of whooping cough. **Pathog Dis**, 73, n. 7, Oct 2015.

CAPILI, C. R.; HETTINGER, A.; RIGELMAN-HEDBERG, N.; FINK, L. *et al.* Increased risk of pertussis in patients with asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 129, n. 4, p. 957-963, 2012.

CAPOLUNGI, F.; ROSADO, M. M.; SINIBALDI, M.; ARANBURU, A. *et al.* Why do we need IgM memory B cells? **Immunology letters**, 152, n. 2, p. 114-120, 2013.

CAPOLUNGI, Federica *et al.* Why do we need IgM memory B cells? **Immunology letters**, v. 152, n. 2, p. 114-120, 2013.

CARBONETTI, N. H. Contribution of pertussis toxin to the pathogenesis of pertussis disease. **Pathogens and disease**, 73, n. 8, 2015.

CARBONETTI, N. H.; ARTAMONOVA, G. V.; VAN ROOIJEN, N.; AYALA, V. I. Pertussis toxin targets airway macrophages to promote *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. **Infection and immunity**, 75, n. 4, p. 1713-1720, 2007.

CAROFF, M.; KARIBIAN, D.; CAVAILLON, J.-M.; HAEFFNER-CAVAILLON, N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. **Microbes and infection**, 4, n. 9, p. 915-926, 2002.

CARVALHO, A. P. D.; PEREIRA, E. M. C. Acellular pertussis vaccine for adolescents. **Jornal de pediatria**, 82, n. 3, p. s15-s24, 2006.

CATTANEO, L. A.; REED, G. W.; HAASE, D. H.; WILLS, M. J. *et al.* The seroepidemiology of *Bordetella pertussis* infections: a study of persons' ages 1–65 years. **Journal of Infectious Diseases**, 173, n. 5, p. 1256-1259, 1996.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. – DISPONÍVEL EM: [http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/coqueluche/dados/coqueluche\\_dados.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/coqueluche/dados/coqueluche_dados.pdf). ACESSO EM: 25/07/2020.

CHAN, Y. Biostatistics 202: logistic regression analysis. **Singapore medical journal**, 45, n. 4, p. 149-153, 2004.

CHEN, Q.; DECKER, K. B.; BOUCHER, P. E.; HINTON, D. *et al.* Novel architectural features of *Bordetella pertussis* fimbrial subunit promoters and their activation by the gloLBA virulence regulator BvgA. **Molecular microbiology**, 77, n. 5, p. 1326-1340, 2010.

CHERRY, J. D. The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of *Bordetella pertussis* infection. **Pediatrics**, 115, n. 5, p. 1422-1427, 2005.

CHERRY, J. D. Why do pertussis vaccines fail? **Pediatrics**, 129, n. 5, p. 968-970, 2012.

CHERRY, J. D.; GRIMPREL, E.; GUIISO, N.; HEININGER, U. *et al.* Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives. **The Pediatric infectious disease journal**, 24, n. 5, p. S25-S34, 2005.

CHERRY, J. D.; SEATON, B. L. Patterns of *Bordetella parapertussis* respiratory illnesses: 2008–2010. **Clinical infectious diseases**, 54, n. 4, p. 534-537, 2012.

CONDE-GLEZ, C.; LAZCANO-PONCE, E.; ROJAS, R.; DEANTONIO, R. *et al.* Seroprevalence of *Bordetella pertussis* in the Mexican population: a cross-sectional study. **Epidemiology & Infection**, 142, n. 4, p. 706-713, 2014.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. **Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012**. Diário Oficial da União, Seção 1, nº 12, p. 59, 13 de junho de 2013.

CONTROL, C. F. D.; PREVENTION; PROGRAM, N. I.; PREVENTION). **Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases**. Department of Health & Human Services, Public Health Service, Centers for ..., 2005.

CORNIA, P. B.; HERSH, A. L.; LIPSKY, B. A.; NEWMAN, T. B. *et al.* Does this coughing adolescent or adult patient have pertussis? **JAMA**, 304, n. 8, p. 890-896, 2010.

COSTA, T. R. M.; DOS SANTOS, A. F.; LOPES, M. S.; BORGES, M. V. R. *et al.* ANÁLISE DA COBERTURA VACINAL DE DTPA EM GESTANTES NO PERÍODO DE 2013 A 2018: UMA OBSERVAÇÃO A NÍVEL REGIONAL. **ANÁLISE DA COBERTURA VACINAL DE DTPA EM GESTANTES NO PERÍODO DE 2013 A 2018: UMA OBSERVAÇÃO A NÍVEL REGIONAL**, p. 1-388–416.

CRABBE, H.; SAAVEDRA-CAMPOS, M.; VERLANDER, N. Q.; LEONARD, A. *et al.* Are pertussis cases reported too late for public health interventions? Retrospective analysis of cases in London and South East England, 2010 to 2015. **Eurosurveillance**, 22, n. 29, p. 30577, 2017.

CROWCROFT, N.; BOOY, R.; HARRISON, T.; SPICER, L. *et al.* Severe and unrecognised: pertussis in UK infants. **Archives of disease in childhood**, 88, n. 9, p. 802-806, 2003.

DA SILVA ANTUNES, R.; BABOR, M.; CARPENTER, C.; KHALIL, N. *et al.* Th1/Th17 polarization persists following whole-cell pertussis vaccination despite repeated acellular boosters. **The Journal of clinical investigation**, 128, n. 9, p. 3853-3865, 2018.

DALBY, T.; PETERSEN, J. W.; HARBOE, Z. B.; KROGFELT, K. A. Antibody responses to pertussis toxin display different kinetics after clinical *Bordetella pertussis* infection than after vaccination with an acellular pertussis vaccine. **Journal of medical microbiology**, 59, n. 9, p. 1029-1036, 2010.

DE ARAÚJO, T. M. S.; DE ARAÚJO, T. M. S.; BARBOSA, K. L. Mecanismos efetores da resposta imune na infecção por *Bordetella pertussis*. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, 23, n. 2, 2019.

DE BARROS, E. N. C.; NUNES, A. A.; ABREU, A. D. J. L. D.; FURTADO, B. E. *et al.* Pertussis epidemiological pattern and disease burden in Brazil: an analysis of national public health surveillance data. **Human vaccines & immunotherapeutics**, 16, n. 1, p. 61-69, 2020.

DE GREEFF, S. C.; TEUNIS, P.; DE MELKER, H. E.; MOOI, F. R. *et al.* Two-component cluster analysis of a large serodiagnostic database for specificity of increases of IgG antibodies against pertussis toxin in paired serum samples and of absolute values in single serum samples. **Clinical and Vaccine Immunology**, 19, n. 9, p. 1452-1456, 2012.

DE MELKER, H. E.; SCHELLEKENS, J.; NEPELENBROEK, S.; MOOI, F. *et al.* Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data. **Emerging infectious diseases**, 6, n. 4, p. 348, 2000.

DE MELKER, H.; VERSTEEGH, F.; CONYN-VAN SPAENDONCK, M.; ELVERS, L. *et al.* Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. **Journal of clinical microbiology**, 38, n. 2, p. 800-806, 2000.

DE OLIVEIRA DIAS, W.; PRESTES, A. F. R.; CUNEGUNDES, P. S.; SILVA, E. P. *et al.* Immunization against pertussis: An almost solved problem or a headache in public health. **Vaccines**, p. 149, 2017.

DE OLIVEIRA, R. B.; SILVA, E. G. L.; MEDEIROS, M. I.; LOPES, S. F. *et al.* Diagnóstico laboratorial da coqueluche: frequência do isolamento de *Bordetella pertussis* de amostras clínicas, por meio da técnica de cultura realizada nos laboratórios regionais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 66, n. 2, p. 194-200, 2007.

DECKER, K. B.; JAMES, T. D.; STIBITZ, S.; HINTON, D. M. The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the glLBA transcription factor BvgA. **Microbiology**, 158, n. Pt 7, p. 1665, 2012.

DIAS, W.; VAN DER ARK, A. A.; SAKAUCHI, M. A.; KUBRUSLY, F. S. *et al.* An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. **Human vaccines & immunotherapeutics**, 9, n. 2, p. 339-348, 2013.

DIAVATOPOULOS, D. A.; CUMMINGS, C. A.; SCHOULS, L. M.; BRINIG, M. M. *et al.* *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. **PLoS Pathog**, 1, n. 4, p. e45, 2005.

DIAVATOPOULOS, D. A.; EDWARDS, K. M. What is wrong with pertussis vaccine immunity? Why immunological memory to pertussis is failing. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 9, n. 12, p. a029553, 2017.

DIERIG, A.; BECKMANN, C.; HEININGER, U. Antibiotic treatment of pertussis: are 7 days really sufficient? **The Pediatric infectious disease journal**, 34, n. 4, p. 444-445, 2015.

DORJI, D.; MOOI, F.; YANTORNO, O.; DEORA, R. *et al.* *Bordetella pertussis* virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance. **Medical microbiology and immunology**, 207, n. 1, p. 3-26, 2018.

EBY, J. C.; GRAY, M. C.; WARFEL, J. M.; PADDOCK, C. D. *et al.* Quantification of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* in vitro and during respiratory infection. **Infection and immunity**, 81, n. 5, p. 1390-1398, 2013.

EDELMAN, K. J.; HE, Q.; MAKINEN, J. P.; HAANPERA, M. S. *et al.* Pertussis-specific cell-mediated and humoral immunity in adolescents 3 years after booster immunization with acellular pertussis vaccine. **Clinical infectious diseases**, 39, n. 2, p. 179-185, 2004.

EL AHMER, O. R.; ESSERY, S. D.; SAADI, A. T.; RAZA, M. W. *et al.* The effect of cigarette smoke on adherence of respiratory pathogens to buccal epithelial cells. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 23, n. 1, p. 27-36, 1999.

ELAHI, S.; THOMPSON, D. R.; STROM, S.; O'CONNOR, B. *et al.* Infection with *Bordetella parapertussis* but not *Bordetella pertussis* causes pertussis-like disease in older pigs. **The Journal of infectious diseases**, 198, n. 3, p. 384-392, 2008.

ESPITIA CERPA, M. A.; GARRIDO ORTEGA, G. G. Comportamiento clínico epidemiológico de la tos ferina en el departamento de Sucre, 2012–2017. Universidad Cooperativa de Colombia, Posgrado, Especialización en ... 2018.

ESPOSITO, S.; PRINCIPI, N. Immunization against pertussis in adolescents and adults. **Clinical Microbiology and Infection**, 22, p. S89-S95, 2016.

EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, (2012). **Guidance and protocol for the serological diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis***. Disponível em: <https://thl.fi/documents/533963/1449651/Pertussis+toksiini+IgG-ELISA.pdf/9e963f9b-4322-4bdf-a32c-0f358c0d96d6>. Acesso em: 12/02/2021

FEDELE, G.; STEFANELLI, P. Pertussis in infants and the resurgence of a vaccine preventable disease: what to do? **Annali dell'Istituto superiore di sanita**, 53, n. 2, p. 100-103, 2017.

FLAK, T. A.; GOLDMAN, W. E. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. **Cellular microbiology**, 1, n. 1, p. 51-60, 1999.

FLAK, T. A.; HEISS, L. N.; ENGLE, J. T.; GOLDMAN, W. E. Synergistic epithelial responses to endotoxin and a naturally occurring muramyl peptide. **Infection and immunity**, 68, n. 3, p. 1235-1242, 2000.

FORSYTH, K. D.; VON KONIG, C.-H. W.; TAN, T.; CARO, J. *et al.* Prevention of pertussis: recommendations derived from the second GloLBA Pertussis Initiative roundtable meeting. **Vaccine**, 25, n. 14, p. 2634-2642, 2007.

FRAJ, I. B.; SMAOUI, H.; ZGHAL, M.; SASSI, O. *et al.* Seroprevalence of pertussis among healthcare workers: A cross-sectional study from Tunisia. **Vaccine**, 37, n. 1, p. 109-112, 2019.

FRAJ, I. B.; ZGHAL, M.; HSAIRI, M.; KECHRID, A. *et al.* Seroprevalence of *Bordetella pertussis* toxin antibodies in children and adolescents in Tunis, Tunisia. **Epidemiology & Infection**, 147, 2019.

FREITAS, A. C.; OKANO, V.; PEREIRA, J. C. R. Pertussis booster vaccine for adolescents and young adults in São Paulo, Brazil. **Revista de saude publica**, 45, p. 1162-1171, 2011.

GEURTSSEN, J.; DZIECIATKOWSKA, M.; STEEGHS, L.; HAMSTRA, H.-J. *et al.* Identification of a novel lipopolysaccharide core biosynthesis gene cluster in *Bordetella pertussis*, and influence of core structure and lipid A glucosamine substitution on endotoxic activity. **Infection and immunity**, 77, n. 7, p. 2602-2611, 2009.

GIAMMANCO, A.; CHIARINI, A.; MAPLE, P.; ANDREWS, N. *et al.* European Sero-Epidemiology Network: standardisation of the assay results for pertussis. **Vaccine**, 22, n. 1, p. 112-120, 2003.

GIAMMANCO, A.; NARDONE, A.; PEBODY, R.; KAFATOS, G. *et al.* European Sero-Epidemiology Network 2: standardisation of immunoassay results for pertussis requires homogeneity in the antigenic preparations. **Vaccine**, 26, n. 35, p. 4486-4493, 2008.

GIAMMANCO, A.; TAORMINA, S.; CHIARINI, A.; DARDANONI, G. *et al.* Analogous IgG subclass response to pertussis toxin in vaccinated children, healthy or affected by whooping cough. **Vaccine**, 21, n. 17-18, p. 1924-1931, 2003.

GIULIANO, M.; MASTRANTONIO, P.; GIAMMANCO, A.; PISCITELLI, A. *et al.* Antibody responses and persistence in the two years after immunization with two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. **The Journal of pediatrics**, 132, n. 6, p. 983-988, 1998.

GRANSTRÖM, G.; WRETLIND, B.; SALENSTEDT, C.; GRANSTRÖM, M. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. **Journal of clinical microbiology**, 26, n. 9, p. 1818-1823, 1988.

GUIISO, N. Pertussis vaccination and whooping cough: and now what? **Expert Rev Vaccines**, 13, n. 10, p. 1163-1165, Oct 2014.

GUIISO, N.; BERBERS, G.; FRY, N. K.; HE, Q. *et al.* What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, 30, n. 3, p. 307-312, 2011.

GUIISO, N.; GRIMPREL, E.; ANJAK, I.; BEGUE, P. Western blot analysis of antibody responses of young infants to pertussis infection. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 12, n. 8, p. 596-600, 1993.

HALASA, N. B.; BARR, F. E.; JOHNSON, J. E.; EDWARDS, K. M. Fatal pulmonary hypertension associated with pertussis in infants: does extracorporeal membrane oxygenation have a role? **Pediatrics**, 112, n. 6, p. 1274-1278, 2003.

HALE, Christine et al. Mucosal immunisation of murine neonates using whole cell and acellular Pertussis vaccines. **Vaccine**, v. 22, n. 27-28, p. 3595-3602, 2004.

HE, Q.; MERTSOLA, J. Factors contributing to pertussis resurgence. 2008.

HE, Q.; MINH, N. N. T.; EDELMAN, K.; VILJANEN, M. K. *et al.* Cytokine mRNA expression and proliferative responses induced by pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and pertactin of *Bordetella pertussis* in the peripheral blood mononuclear cells of infected and immunized schoolchildren and adults. **Infection and immunity**, 66, n. 8, p. 3796-3801, 1998.

HE, Q.; VILJANEN, M. K.; NIKKARI, S.; LYYTIKAINEN, R. *et al.* Outcomes of *Bordetella pertussis* infection in different age groups of an immunized population. **Journal of Infectious Diseases**, 170, n. 4, p. 873-877, 1994.

HEIL, J.; TER WAARBEEK, H. L.; HOEBE, C. J.; JACOBS, P. H. *et al.* Pertussis surveillance and control: exploring variations and delays in testing, laboratory diagnostics and public health service notifications, the Netherlands, 2010 to 2013. **Eurosurveillance**, 22, n. 28, p. 30571, 2017.

HEININGER, U.; STEHR, K.; CHRISTENSON, P.; CHERRY, J. D. Evidence of efficacy of the Lederle/Takeda acellular pertussis component diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine but not the Lederle whole-cell component diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine against *Bordetella parapertussis* infection. **Clinical infectious diseases**, 28, n. 3, p. 602-604, 1999.

HELLENBRAND, W.; BEIER, D.; JENSEN, E.; LITTMANN, M. *et al.* The epidemiology of pertussis in Germany: past and present. **BMC Infectious Diseases**, 9, n. 1, p. 1-11, 2009.

HENDRIKX, L. H.; ÖZTÜRK, K.; DE ROND, L. G.; VEENHOVEN, R. H. *et al.* Identifying long-term memory B-cells in vaccinated children despite waning antibody levels specific for *Bordetella pertussis* proteins. **Vaccine**, 29, n. 7, p. 1431-1437, 2011.

HENDRIKX, L. H.; SCHURE, R.-M.; ÖZTÜRK, K.; DE ROND, L. G. *et al.* Different IgG-subclass distributions after whole-cell and acellular pertussis infant primary vaccinations in healthy and pertussis infected children. **Vaccine**, 29, n. 40, p. 6874-6880, 2011.

HEWLETT, E.; KIM, K.-J.; LEE, S.; GRAY, M. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: current concepts and problems in the study of toxin functions. **International journal of medical microbiology**, 290, n. 4-5, p. 333-335, 2000.

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

INSTITUT PASTEUR. **Coqueluche**. Disponível em: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/coqueluche>. Acesso em: 24/07/2019.

JOHNSON, D. I.; BECK. **Bacterial pathogens and their virulence factors**. Springer, 2018. 3319676512.

JONES, T. C.; GASSER, M.; ERB, P.; OECHSLIN, H. Cough and fear of sleep: early clinical signs of *Bordetella pertussis* in an adult. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 8, n. 4, p. 324-327, 2004.

KARALIUS, V. P.; RUCINSKI, S. L.; MANDREKAR, J. N.; PATEL, R. *Bordetella parapertussis* outbreak in Southeastern Minnesota and the United States, 2014. **Medicine**, 96, n. 20, 2017.

KARKI, S.; MCINTYRE, P.; NEWALL, A. T.; MACINTYRE, C. R. *et al.* Risk factors for pertussis hospitalizations in Australians aged 45 years and over: A population based nested case–control study. **Vaccine**, 33, n. 42, p. 5647-5653, 2015.

KILGORE, P. E.; SALIM, A. M.; ZERVOS, M. J.; SCHMITT, H.-J. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. **Clinical microbiology reviews**, 29, n. 3, p. 449-486, 2016.

KIRCHNER, H.; KLEINICKE, C.; DIGEL, W. A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. **Journal of immunological methods**, 48, n. 2, p. 213-219, 1982.

KLEIN, N. P.; BARTLETT, J.; ROWHANI-RAHBAR, A.; FIREMAN, B. *et al.* Waning protection after fifth dose of acellular pertussis vaccine in children. **New England Journal of Medicine**, 367, n. 11, p. 1012-1019, 2012.

KLINE, J. M.; LEWIS, W. D.; SMITH, E. A.; TRACY, L. R. *et al.* Pertussis: a reemerging infection. **American family physician**, 88, n. 8, p. 507-514, 2013.

KOEPKE, R.; BARTHOLOMEW, M. L.; EICKHOFF, J. C.; AYELE, R. A. *et al.* Widespread *Bordetella parapertussis* infections—Wisconsin, 2011–2012: clinical and epidemiologic features and antibiotic use for treatment and prevention. **Clinical Infectious Diseases**, 61, n. 9, p. 1421-1431, 2015.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**, 47, n. 260, p. 583-621, 1952.

KÜGLER, S.; BÖCKER, K.; HEUSIPP, G.; GREUNE, L. *et al.* Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model. **Cellular microbiology**, 9, n. 3, p. 619-632, 2007.

LAMBERT, Eleonora E.; BUISMAN, Anne-Marie; VAN ELS, Cécile ACM. Superior *B. pertussis* specific CD4+ T-cell immunity imprinted by natural infection. **Pertussis Infection and Vaccines**, p. 81-98, 2019.

LAMBERT, L. C. Pertussis vaccine trials in the 1990s. **The Journal of infectious diseases**, 209, n. suppl\_1, p. S4-S9, 2014.

LAN, R.; OCTAVIA, S. Vaccine-driven selection and the changing molecular epidemiology of *Bordetella pertussis*. In: **Pertussis**: Oxford University Press, 2019. p. 166-181.

LAPIDOT, R.; GILL, C. J. The Pertussis resurgence: putting together the pieces of the puzzle. **Tropical diseases, travel medicine and vaccines**, 2, n. 1, p. 1-10, 2016.

LAVAYÉN, S.; ZOTTA, C.; CEPEDA, M.; LARA, C. *et al.* Infección por *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* en casos con sospecha de coqueluche (2011-2015). Mar del Plata, Argentina. **Revista peruana de medicina experimental y salud pública**, 34, p. 85-92, 2017.

LAVINE, J. S.; KING, A. A.; BJØRNSTAD, O. N. Natural immune boosting in pertussis dynamics and the potential for long-term vaccine failure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108, n. 17, p. 7259-7264, 2011.

LEE, S. Y.; HAN, S. B.; BAE, E. Y.; KIM, J.-H. *et al.* Pertussis seroprevalence in Korean adolescents and adults using anti-pertussis toxin immunoglobulin G. **Journal of Korean medical science**, 29, n. 5, p. 652-656, 2014.

LEEF, M.; ELKINS, K. L.; BARBIC, J.; SHAHIN, R. D. Protective immunity to *Bordetella pertussis* requires both B cells and CD4+ T cells for key functions other than specific antibody production. **The Journal of experimental medicine**, 191, n. 11, p. 1841-1852, 2000.

LEEF, M.; ELKINS, K. L.; BARBIC, J.; SHAHIN, R. D. Protective immunity to *Bordetella pertussis* requires both B cells and CD4+ T cells for key functions other than specific antibody production. **The Journal of experimental medicine**, 191, n. 11, p. 1841-1852, 2000.



- LI, L.; DENG, J.; MA, X.; ZHOU, K. *et al.* High prevalence of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* and ptxP1 genotype, mainland China, 2014–2016. **Emerging infectious diseases**, 25, n. 12, p. 2205, 2019.
- LI, L.; DOUGAN, G.; NOVOTNY, P.; CHARLES, I. P. 70 pertactin, an outer-membrane protein from *Bordetella parapertussis*: cloning, nucleotide sequence and surface expression in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, 5, n. 2, p. 409-417, 1991.
- LIBSTER, R.; EDWARDS, K. M. Re-emergence of pertussis: what are the solutions? **Expert review of vaccines**, 11, n. 11, p. 1331-1346, 2012.
- LIESE, J.; RENNER, C.; STOJANOV, S.; BELOHRADSKY, B. *et al.* Clinical and epidemiological picture of *B. pertussis* and *B. parapertussis* infections after introduction of acellular pertussis vaccines. **Archives of disease in childhood**, 88, n. 8, p. 684-687, 2003.
- LIKO, J.; ROBISON, S. G.; CIESLAK, P. R. Do pertussis vaccines protect against *Bordetella parapertussis*? **Clinical Infectious Diseases**, 64, n. 12, p. 1795-1797, 2017.
- LIN, A.; APOSTOLOVIC, D.; JAHNMATZ, M.; LIANG, F. *et al.* Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 induces a broad antibody response in humans. **The Journal of clinical investigation**, 130, n. 5, p. 2332-2346, 2020.
- LINZ, B.; IVANOV, Y. V.; PRESTON, A.; BRINKAC, L. *et al.* Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species. **BMC genomics**, 17, n. 1, p. 1-17, 2016.
- LIPSITCH, M. Vaccination against colonizing bacteria with multiple serotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94, n. 12, p. 6571-6576, 1997.
- LIU, X.; WANG, Z.; ZHANG, J.; LI, F. *et al.* Pertussis Outbreak in a Primary School in China: Infection and Transmission of the Macrolide-resistant: *Bordetella pertussis* . **The Pediatric infectious disease journal**, 37, n. 6, p. e145-e148, 2018.
- LOCHT, C.; COUTTE, L.; MIELCAREK, N. The ins and outs of pertussis toxin. **The FEBS journal**, 278, n. 23, p. 4668-4682, 2011.
- LOEFFELHOLZ, M. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests. **Journal of clinical microbiology**, 50, n. 7, p. 2186-2190, 2012.
- LONG, G. H.; KARANIKAS, A. T.; HARVILL, E. T.; READ, A. F. *et al.* Acellular pertussis vaccination facilitates *Bordetella parapertussis* infection in a rodent model of bordetellosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 277, n. 1690, p. 2017-2025, 2010.
- LUKER, K. E.; COLLIER, J. L.; KOLODZIEJ, E. W.; MARSHALL, G. R. *et al.* *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 90, n. 6, p. 2365-2369, 1993.
- LUZ, P. M.; CODEÇO, C. T.; WERNECK, G. L. A reemergência da coqueluche em países desenvolvidos: um problema também para o Brasil? **Cadernos de Saúde Pública**, 19, n. 4, p. 1209-1213, 2003.
- MACAULAY, M. E. The IgM and IgG response to *Bordetella pertussis* vaccination and infection. **Journal of medical microbiology**, 14, n. 1, p. 1-7, 1981.
- MACHADO, M. B.; PASSOS, S. D. COQUELUCHE GRAVE NA INFÂNCIA: ATUALIZAÇÃO E CONTROVÉRSIAS-REVISÃO SISTEMÁTICA. **Revista Paulista de Pediatria**, 37, n. 3, p. 351-362, 2019.

MACINA, D.; EVANS, K. E. *Bordetella pertussis* in School-Age Children, Adolescents, and Adults: A Systematic Review of Epidemiology, Burden, and Mortality in Asia. **Infectious diseases and therapy**, p. 1-26, 2021.

MAHON, B. P.; BRADY, M. T.; MILLS, K. H. Protection against *Bordetella pertussis* in Mice in the Absence of Detectable Circulating Antibody: Implications for Long-Term Immunity in Children. **Journal of Infectious Diseases**, 181, n. 6, p. 2087-2091, 2000.

MAIA, D. A. B.; FRIAS, P. G. D.; ASSUNÇÃO, R. S.; VIDAL, S. A. *et al.* Evaluation of the implantation of the notifiable diseases information system in Pernambuco state, Brazil, 2014. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 28, p. e2018187, 2019.

MARTIN, S. W.; PAWLOSKI, L.; WILLIAMS, M.; WEENING, K. *et al.* Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains: evidence for a possible selective advantage. **Clinical Infectious Diseases**, 60, n. 2, p. 223-227, 2015.

MARZOUQI, I.; RICHMOND, P.; FRY, S.; WETHERALL, J. *et al.* Development of improved vaccines against whooping cough: current status. **Human vaccines**, 6, n. 7, p. 543-553, 2010.

MASTRANTONIO, P.; STEFANELLI, P.; GIULIANO, M.; ROJAS, Y. H. *et al.* *Bordetella parapertussis* infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates. **Journal of clinical microbiology**, 36, n. 4, p. 999-1002, 1998.

MATTOO, S.; CHERRY, J. D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. **Clinical microbiology reviews**, 18, n. 2, p. 326-382, 2005.

MBAYEI, S. A.; FAULKNER, A.; MINER, C.; EDGE, K. *et al.* Severe pertussis infections in the United States, 2011–2015. **Clinical Infectious Diseases**, 69, n. 2, p. 218-226, 2019.

MCGUIRK, P.; JOHNSON, P. A.; RYAN, E. J.; MILLS, K. H. Filamentous hemagglutinin and pertussis toxin from *Bordetella pertussis* modulate immune responses to unrelated antigens. **The Journal of infectious diseases**, 182, n. 4, p. 1286-1288, 2000.

MEDEIROS, A. T. N. D.; CAVALCANTE, C. A. A.; SOUZA, N. L. D.; FERREIRA, M. A. F. Reemergência da coqueluche: perfil epidemiológico dos casos confirmados. **Cadernos Saúde Coletiva**, 25, n. 4, p. 453-459, 2017.

MELVIN, J. A.; SCHELLER, E. V.; MILLER, J. F.; COTTER, P. A. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. **Nature Reviews Microbiology**, 12, n. 4, p. 274-288, 2014.

MENDES, P.; CASIMIRO, A. Novas estratégias de prevenção da tosse convulsa. 2011.

MEYER, S.; FAULKNER, A.; MINER, C.; EDGE, K. *et al.*, 2016, **Pertussis infections in hospitalized patients—United States, 2010–2014**. Oxford University Press.

MILLER, B.; AHMED, F.; LU, P.; EULER, G. *et al.* Tetanus and pertussis vaccination coverage among adults aged ≥ 18 years—United States, 1999 and 2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 59, n. 40, p. 1302-1306, 2010.

MILLIGAN, G.; KOSTENIS, E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. **British journal of pharmacology**, 147, n. S1, p. S46-S55, 2006.

MILLS, K. H. Immunity to *Bordetella pertussis*. **Microbes and infection**, 3, n. 8, p. 655-677, 2001.

MILLS, K. H.; RYAN, M.; RYAN, E.; MAHON, B. P. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. **Infection and immunity**, 66, n. 2, p. 594-602, 1998.

MILLS, K.; BARNARD, A.; WATKINS, J.; REDHEAD, K. Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. **Infection and immunity**, 61, n. 2, p. 399-410, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe epidemiológico da coqueluche. Brasil, 2018 a 2019**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/c/coqueluche>. Acesso em: 23/01/2021

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 1.353 de 14 de junho de 2011**. Diário Oficial, Seção 1, nº 113, 14 de junho de 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: **Calendário Nacional de Vacinação**. Disponível em: <https://saude.es.gov.br/Media/sesa/Vacina%C3%A7%C3%A3o/Calendario%20Nacional%20de%20Vacina%C3%A7%C3%A3o%202019%20-%20POP.pdf>. Acesso em: 06/09/2019.

MINK, C. M.; CHERRY, J. D.; CHRISTENSON, P.; LEWIS, K. *et al.* A search for *Bordetella pertussis* infection in university students. **Clinical Infectious Diseases**, 14, n. 2, p. 464-471, 1992.

MOOI, F. R.; BRUISTEN, S.; LINDE, I.; REUBSAET, F. *et al.* Characterization of *Bordetella holmesii* isolates from patients with pertussis-like illness in the Netherlands. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 64, n. 2, p. 289-291, 2012.

MOOI, F. R.; VAN DER MAAS, N. A.; DE MELKER, H. E. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation—two sides of the same coin. **Epidemiology & Infection**, 142, n. 4, p. 685-694, 2014.

MOON, K.; BONOCORA, R. P.; KIM, D. D.; CHEN, Q. *et al.* The BvgAS regulon of *Bordetella pertussis*. **MBio**, 8, n. 5, 2017.

MOSS, W. J.; SCOTT, S. WHO immunological basis for immunization series module xx: measles. **Geneva: Switzerland**, 5, 2009.

MURRAY, E. L.; NIEVES, D.; BRADLEY, J. S.; GARGAS, J. *et al.* Characteristics of severe *Bordetella pertussis* infection among infants  $\leq$  90 days of age admitted to pediatric intensive care units—Southern California, September 2009–June 2011. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, 2, n. 1, p. 1-6, 2013.

NGUYEN, A. W.; WAGNER, E. K.; LABER, J. R.; GOODFIELD, L. L. *et al.* A cocktail of humanized anti-pertussis toxin antibodies limits disease in murine and baboon models of whooping cough. **Science translational medicine**, 7, n. 316, p. 316ra195-316ra195, 2015.

NOGUERA, S. V.; JARAMILLO, K.; ZABALA, A.; VILLACÍS, J. E. *Bordetella pertussis*, a reemerging pathogen in pediatric respiratory infections. A study in Quito, Ecuador. **Revista Argentina de Microbiología**, 53, n. 1, p. 27-33, 2021.

OBARO, S. K. Carriage of pneumococci after pneumococcal vaccination. **Lancet**, 348, p. 271-272, 1996.

OCTAVIA, S.; MAHARJAN, R. P.; SINTCHENKO, V.; STEVENSON, G. *et al.* Insight into evolution of *Bordetella pertussis* from comparative genomic analysis: evidence of vaccine-driven selection. **Molecular biology and evolution**, 28, n. 1, p. 707-715, 2011.

ORGANIZATION, W. H. *et al.* **The immunological basis for immunization series: module 4: Pertussis**. 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259388/9789241513173-eng.pdf> - Acesso em 14/03/2021.

ORGANIZATION, W. H. **Laboratory Manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis* / *Bordetella parapertussis*: update 2014**. World Health Organization. 2014.

- ORGANIZATION, W. H. Pertussis vaccines: WHO position paper—August 2015. **Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire**, 90, n. 35, p. 433-458, 2015.
- PACHECO, F. C.; FRANÇA, G. V.; ELIDIO, G. A.; DOMINGUES, C. M. A. S. *et al.* Trends and spatial distribution of MMR vaccine coverage in Brazil during 2007–2017. **Vaccine**, 37, n. 20, p. 2651-2655, 2019.
- PADDOCK, C. D.; SANDEN, G. N.; CHERRY, J. D.; GAL, A. A. *et al.* Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. **Clinical infectious diseases**, 47, n. 3, p. 328-338, 2008.
- PARKHILL, J.; SEBAIHIA, M.; PRESTON, A.; MURPHY, L. D. *et al.* Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. **Nature genetics**, 35, n. 1, p. 32-40, 2003.
- PARTON, R. Effect of prednisolone on the toxicity of *Bordetella pertussis* for mice. **Journal of medical microbiology**, 19, n. 3, p. 391-400, 1985.
- PAWLOSKI, L.; QUEENAN, A.; CASSIDAY, P.; LYNCH, A. *et al.* Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. **Clinical and Vaccine Immunology**, 21, n. 2, p. 119-125, 2014.
- PEBODY, R.; GAY, N.; GIAMMANCO, A.; BARON, S. *et al.* The seroepidemiology of *Bordetella pertussis* infection in Western Europe. **Epidemiology & Infection**, 133, n. 1, p. 159-171, 2005.
- PICHICHERO, M. E.; RENNELS, M. B.; EDWARDS, K. M.; BLATTER, M. M. *et al.* Combined tetanus, diphtheria, and 5-component pertussis vaccine for use in adolescents and adults. **Jama**, 293, n. 24, p. 3003-3011, 2005.
- PRESTON, A.; MASKELL, D. J. Evolution of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* as Deduced from Comparative Genome Analyses. **Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens**, p. 397-405, 2007.
- PRESTON, A.; PARKHILL, J.; MASKELL, D. J. The bordetellae: lessons from genomics. **Nature Reviews Microbiology**, 2, n. 5, p. 379-390, 2004.
- QUEENAN, A. M.; CASSIDAY, P. K.; EVANGELISTA, A. Pertactin-negative variants of *Bordetella pertussis* in the United States. **The New England journal of medicine**, 368, n. 6, p. 583-584, 2013.
- RENDI-WAGNER, P.; TOBIAS, J.; MOERMAN, L.; GOREN, S. *et al.* The seroepidemiology of *Bordetella pertussis* in Israel—estimate of incidence of infection. **Vaccine**, 28, n. 19, p. 3285-3290, 2010.
- RESTIF, O.; WOLFE, D.; GOEBEL, E.; BJORNSTAD, O. *et al.* Of mice and men: asymmetric interactions between *Bordetella* pathogen species. **Parasitology**, 135, n. 13, p. 1517, 2008.
- RIBEIRO, R. M. M.; MENDES, V. A. Situação epidemiológica da coqueluche no Distrito Federal entre 2007 e 2016. **Revista Bioética**, 27, n. 4, p. 764-771, 2019.
- RIVAS, J. D. J.; BROCARDO, G. A.; KOKRON, C.; RIZZO, L. V. *et al.* Caracterização imunofenotípica de linfócitos B de memória na deficiência de IgA e imunodeficiência comum variável. **Rev. bras. alergologia imunopatol**, p. 23-31, 2010.
- ROSA, João Guimarães. **Grande sertão: veredas**. Editora Companhia das Letras, 2019.
- ROSS, P. J.; SUTTON, C. E.; HIGGINS, S.; ALLEN, A. C. *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 pathogens**, 9, n. 4, p. e1003264, 2013.
- RUSH, C. M.; MILLINGTON, O. R.; HUTCHISON, S.; BRYSON, K. *et al.* Characterization of CD4+ T-cell–dendritic cell interactions during secondary antigen exposure in tolerance and priming. **Immunology**, 128, n. 4, p. 463-471, 2009.

RUUSKANEN, O.; VILJANEN, M. K.; SALMI, T. T.; LEHTONEN, O. P. *et al.* DTP and DTP-inactivated polio vaccines: comparison of adverse reactions and IgG, IgM and IgA antibody responses to DTP. **Acta Pædiatrica**, 69, n. 2, p. 177-182, 1980.

RYAN, M.; MCCARTHY, L.; RAPPUOLI, R.; MAHON, B. P. *et al.* Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. **International immunology**, 10, n. 5, p. 651-662, 1998.

SAFFAR, M.-J.; KHALILIAN, A.-R.; RAFEE, A.-R.; PARSAEI, M. R. *et al.* *Bordetella pertussis* IgG and IgA antibodies seroprevalence among 1–35 y-old population: the role of subclinical pertussis infection. **The Indian Journal of Pediatrics**, 79, n. 3, p. 353-357, 2012.

SANDEN, G.; WEYANT, R. *Bordetella* Moreno-López 1952, 178 AL. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**, p. 662-671, 2005.

SARTORI, A. M. C. *et al.* Cost-effectiveness analysis of universal maternal immunization with tetanus-diphtheria-acellular pertussis (Tdap) vaccine in Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 13, p. 1531-1539, 2016.

SARTORI, A. M. C.; DE SOÁREZ, P. C.; FERNANDES, E. G.; GRYNINGER, L. C. F. *et al.* Cost-effectiveness analysis of universal maternal immunization with tetanus-diphtheria-acellular pertussis (Tdap) vaccine in Brazil. **Vaccine**, 34, n. 13, p. 1531-1539, 2016.

SASAKI, S.; JAIMES, M. C.; HOLMES, T. H.; DEKKER, C. L. *et al.* Comparison of the influenza virus-specific effector and memory B-cell responses to immunization of children and adults with live attenuated or inactivated influenza virus vaccines. **Journal of virology**, 81, n. 1, p. 215-228, 2007.

SATO, A. P. S. Pandemia e coberturas vacinais: desafios para o retorno às escolas. **Revista de Saúde Pública**, 54, p. 115, 2020.

SATO, Ana Paula Sayuri. Pandemia e coberturas vacinais: desafios para o retorno às escolas. **Revista de Saúde Pública**, v. 54, p. 115, 2020.

SATO, H.; SATO, Y. Protective activities in mice of monoclonal antibodies against pertussis toxin. **Infection and immunity**, 58, n. 10, p. 3369-3374, 1990.

SATO, Y.; IZUMIYA, K.; SATO, H.; COWELL, J. *et al.* Role of antibody to leukocytosis-promoting factor hemagglutinin and to filamentous hemagglutinin in immunity to pertussis. **Infection and immunity**, 31, n. 3, p. 1223-1231, 1981.

SATO, Y.; SATO, H. Development of acellular pertussis vaccines. **Biologicals**, 27, n. 2, p. 61-69, 1999.

SCANLON, K.; SKERRY, C.; CARBONETTI, N. Association of pertussis toxin with severe pertussis disease. **Toxins**, 11, n. 7, p. 373, 2019.

SCHAEFFER, L. M.; WEISS, A. A. Pertussis toxin and lipopolysaccharide influence phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human monocytes. **Infection and immunity**, 69, n. 12, p. 7635-7641, 2001.

SHELLER, E. V.; MELVIN, J. A.; SHEETS, A. J.; COTTER, P. A. Cooperative roles for fimbria and filamentous hemagglutinin in *Bordetella* adherence and immune modulation. **MBio**, 6, n. 3, 2015.

SCHWARTZ, K. L.; KWONG, J. C.; DEEKS, S. L.; CAMPITELLI, M. A. *et al.* Effectiveness of pertussis vaccination and duration of immunity. **CMAJ**, 188, n. 16, p. E399-E406, 2016.

SHARMA, S.; PICCHICHERO, M. Functional deficits of pertussis-specific CD4+ T cells in infants compared to adults following DTaP vaccination. **Clinical & Experimental Immunology**, 169, n. 3, p. 281-291, 2012.

SHERIDAN, S. L.; WARE, R. S.; GRIMWOOD, K.; LAMBERT, S. B. Number and order of whole cell pertussis vaccines in infancy and disease protection. **Jama**, 308, n. 5, p. 454-456, 2012.

SINASC/DATASUS – Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>  
Acesso em: 02/05/2021.

SINAN/DATATUS- Disponível em:  
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/coquebr.def> - Acesso em: 02/05/2021

SMITS, K.; POTTIER, G.; SMET, J.; DIRIX, V. *et al.* Different T cell memory in preadolescents after whole-cell or acellular pertussis vaccination. **Vaccine**, 32, n. 1, p. 111-118, 2013.

SON, S.; THAMLIKITKUL, V.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; PERERA, J. *et al.* Prospective multinational serosurveillance study of *Bordetella pertussis* infection among 10-to 18-year-old Asian children and adolescents. **Clinical Microbiology and Infection**, 25, n. 2, p. 250. e251-250. e257, 2019.

SOUZA, Luis Eugenio Portela Fernandes de *et al.* Os desafios atuais da luta pelo direito universal à saúde no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, p. 2783-2792, 2019.

SPANGRUDE, G.; SACCHI, F.; HILL, H.; VAN EPPS, D. *et al.* Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. **The Journal of Immunology**, 135, n. 6, p. 4135-4143, 1985.

TARGONSKI, P. V.; JACOBSON, R. M.; POLAND, G. A. Immunosenescence: role and measurement in influenza vaccine response among the elderly. **Vaccine**, 25, n. 16, p. 3066-3069, 2007.

TEAM, R. C. R: A language and environment for statistical computing. 2013.

TEST LINE CLINICAL DIAGNOSTIC. **Enzyme immunoassays and agglutination components for the diagnosis of pertussis and parapertussis** – Disponível em:  
<http://www.testlinecd.com/file/474/Bordetella.pdf>. Acesso: 09 de junho, 2017.

TIAGO, Z. D. S.; PICOLI, R. P.; GRAEFF, S. V.-B.; CUNHA, R. V. D. *et al.* Underreporting of gestational, congenital and acquired syphilis among indigenous peoples in Mato Grosso do Sul State, Brazil, 2011-2014. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 26, p. 503-512, 2017.

TOUBIANA, J.; AZARNOUSH, S.; BOUCHEZ, V.; LANDIER, A. *et al.*, 2019, ***Bordetella parapertussis* bacteremia: clinical expression and bacterial genomics**. Oxford University Press US. ofz122.

TREVIZAN, S.; COUTINHO, S. E. D. Epidemiological profile of pertussis in Rio Grande do Sul State, Brazil: a study of the correlation between incidence and vaccine coverage. **Cadernos de saúde pública**, 24, n. 1, p. 93-102, 2008.

TROLLFORS, B.; LAGERGÅRD, T.; GUNNARSSON, E.; TARANGER, J. Determination of pertactin IgG antibodies for the diagnosis of pertussis. **Clinical microbiology and infection**, 9, n. 7, p. 585-589, 2003.

TUBIANA, S.; BELCHIOR, E.; GUILLOT, S.; GUIISO, N. *et al.* Monitoring the impact of vaccination on pertussis in infants using an active hospital-based pediatric surveillance network: results from 17 years' experience, 1996–2012, France. **The Pediatric infectious disease journal**, 34, n. 8, p. 814-820, 2015.

VAN DER LEE, S.; SANDERS, E. A.; BERBERS, G. A.; BUISMAN, A.-M. Whole-cell or acellular pertussis vaccination in infancy determines IgG subclass profiles to DTaP booster vaccination. **Vaccine**, 36, n. 2, p. 220-226, 2018.

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

VAN DER ZEE, A.; SCHELLEKENS, J. F.; MOOI, F. R. Laboratory diagnosis of pertussis. **Clinical microbiology reviews**, 28, n. 4, p. 1005-1026, 2015.

VAN TWILLERT, I. **Cellular and humoral immunity after infection with *B. pertussis*: the role of age, antigen and vaccination history**. 2017. -, Utrecht University.

WATANABE, M.; CONNELLY, B.; WEISS, A. A. Characterization of serological responses to pertussis. **Clinical and Vaccine Immunology**, 13, n. 3, p. 341-348, 2006.

WATANABE, M.; NAGAI, M. Reciprocal Protective Immunity against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in a Murine Model of Respiratory Infection. **Infection and immunity**, 69, n. 11, p. 6981-6986, 2001.

WEIGAND, M. R.; WILLIAMS, M. M.; PENG, Y.; KANIA, D. *et al.* Genomic survey of *Bordetella pertussis* diversity, United States, 2000–2013. **Emerging infectious diseases**, 25, n. 4, p. 780, 2019.

WEISS, A. A.; FALKOW, S. Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. **Infection and immunity**, 43, n. 1, p. 263-269, 1984.

WEISS, A.; GOODWIN, M. Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. **Infection and Immunity**, 57, n. 12, p. 3757-3764, 1989.

WENDELBOE, A. M.; HUDGENS, M. G.; POOLE, C.; VAN RIE, A. Estimating the role of casual contact from the community in transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. **Emerging themes in epidemiology**, 4, n. 1, p. 1-7, 2007.

WENDELBOE, A. M.; VAN RIE, A. Diagnosis of pertussis: a historical review and recent developments. **Expert review of molecular diagnostics**, 6, n. 6, p. 857-864, 2006.

WILEY, K.; ZUO, Y.; MACARTNEY, K.; MCINTYRE, P. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. **Vaccine**, 31, n. 4, p. 618-625, 2013.

WILLEMS, R. J.; KAMERBEEK, J.; GEUIJEN, C. A.; TOP, 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**, 16, n. 4, p. 410-416, 1998.

WIRSING VON KÖNIG, C.-H. Pertussis diagnostics: overview and impact of immunization. **Expert review of vaccines**, 13, n. 10, p. 1167-1174, 2014.

WOLF, M. Allison *et al.* Intranasal immunization with acellular pertussis vaccines results in long-term

WORTIS, N.; STREBEL, P. M.; WHARTON, M.; BARDENHEIER, B. *et al.* Pertussis deaths: report of 23 cases in the United States, 1992 and 1993. **Pediatrics**, 97, n. 5, p. 607-612, 1996.

ZHANG, X.; GOEL, T.; GOODFIELD, L. L.; MUSE, S. J. *et al.* Decreased leukocyte accumulation and delayed *Bordetella pertussis* clearance in IL-6<sup>-/-</sup> mice. **The Journal of Immunology**, 186, n. 8, p. 4895-4904, 2011.

ZHANG, X.; RODRÍGUEZ, M. E.; HARVILL, E. T. O Antigen Allows *B. parapertussis* to Evade *B. pertussis* Vaccine–Induced Immunity by Blocking Binding and Functions of Cross-Reactive Antibodies. **PLoS One**, 4, n. 9, p. e6989, 2009.

ZORZETO, T. Q.; HIGASHI, H. G.; DA SILVA, M. T. N.; DE FARIA CARNIEL, E. *et al.* Immunogenicity of a whole-cell pertussis vaccine with low lipopolysaccharide content in infants. **Clinical and Vaccine Immunology**, 16, n. 4, p. 544-550, 2009.

## ANEXO I- Termo de consentimento livre e esclarecido



**INSTITUTO BUTANTAN**  
 Av. Dr. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP  
 Telefone: (55) (011) 2627-9477

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### **DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:**

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Responsável legal: \_\_\_\_\_

Nº do documento de identidade: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_ Feminino      \_\_\_ Masculino      Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

E-mail (opcional): \_\_\_\_\_

**Título:** Avaliação de resposta imune contra *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* em amostras de sangue humano provenientes de indivíduos de diferentes grupos etários.

A coqueluche é uma doença infecciosa do trato respiratório humano altamente transmissível, prevenível através da vacina pertussis, a qual faz parte da vacina tríplice bacteriana, DTP. Nos últimos anos tem sido notada uma reemergência dessa doença em vários países, inclusive no Brasil. As causas prováveis para o aumento na incidência da doença seriam: 1) a diminuição da resposta imune contra *Bordetella pertussis* em adultos e adolescentes que foram vacinados na infância contra a bactéria, tornando-se assim focos de infecção para recém-nascidos não imunizados e crianças menores de 6 meses de idade que ainda não completaram o esquema de vacinação; 2) a infecção por *Bordetella parapertussis*, que induz sintomas mais leves que a infecção causada por *B. pertussis*, e por isso não é diagnosticada corretamente. Neste cenário, estamos estudando a presença de anticorpos para *B. pertussis* e *B. parapertussis*, em diferentes faixas etárias e grupos populacionais do Estado de São Paulo.

Você está sendo convidado a participar deste estudo que envolve a coleta de sangue, a ser avaliado em exames laboratoriais.

O sangue coletado será usado para ver a sua resposta imunológica contra as bactérias *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis*, que provocam a coqueluche (também chamada tosse comprida).

#### **PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

Serão coletadas duas amostras de seu sangue, sendo 8 mililitros em um tubo e 2 mililitros em outro tubo, se você tiver entre 10 e 17 anos, ou 10 mililitros em um tubo e 4 mililitros em outro tubo se você tiver mais de 18 anos, para dosagem de anticorpos (o volume de sangue a ser colhido é o correspondente a uma

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Participante: \_\_\_\_\_

1





## INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP  
 Telefone: (55) (011) 2627-9477

colher de sopa, além do necessário para os exames de rotina solicitado pelo seu médico). O sangue será exclusivamente destinado a este estudo.

### ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Após a avaliação das amostras de sangue, o material que sobrar será descartado conforme a Resolução nº306, de 7 de dezembro de 2004, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

### RISCOS

A sua coleta de sangue será exatamente a mesma, caso você participe ou não deste estudo. A punção venosa para os exames laboratoriais, que já fazem parte de seu tratamento regular, podem resultar em dor no local da punção ou manchas roxas transitórias chamadas de hematomas, que não tem consequência além de um pequeno desconforto.

### BENEFÍCIOS

Sua participação nesta pesquisa nos ajudará a obter resultados que serão extremamente úteis para o conhecimento da circulação das bactérias da tosse comprida e auxiliarão na introdução de novas vacinas contra pertussis em adultos no Brasil, prevenindo a contaminação de crianças que entram em contato com pessoas infectadas, mas não diagnosticadas, assim como diminuirá a presença das formas leves de coqueluche entre os adultos.

### CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo e equipe de pesquisadores envolvidos, localizado a Avenida Prof. Lineu Prestes, 2.565 – Cidade Universitária – CEP 05508-000. Seu nome não será revelado, as informações do questionário serão utilizadas para propósitos científicos ou de publicação.

### CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento pela sua participação no estudo.

### BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades. Se

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Participante: \_\_\_\_\_

2





## APÊNDICE – Artigo publicado

RODRIGUEZ, Dunia et al. In vitro evidence of human immune responsiveness shows the improved potential of a recombinant BCG strain for bladder cancer treatment. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1460, 2019.



# *In vitro* Evidence of Human Immune Responsiveness Shows the Improved Potential of a Recombinant BCG Strain for Bladder Cancer Treatment

Dunia Rodriguez<sup>1</sup>, Cibelly Goulart<sup>1</sup>, Ana C. Pagliarone<sup>1</sup>, Eliane P. Silva<sup>1,2</sup>, Priscila S. Cunegundes<sup>1,2</sup>, Ivan P. Nascimento<sup>1</sup>, Ricardo C. Borra<sup>3</sup>, Waldely O. Dias<sup>1</sup>, Aldo Tagliabue<sup>4</sup>, Diana Boraschi<sup>5\*</sup> and Luciana C. C. Leite<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP-I. Butantan-IPT, São Paulo, Brazil, <sup>3</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil, <sup>4</sup> Institute of Genetic and Biomedical Research, National Research Council, Cagliari, Italy, <sup>5</sup> Institute of Protein Biochemistry, National Research Council, Naples, Italy

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Daniela Bosisio,  
University of Brescia, Italy

### Reviewed by:

Sara Scutera,  
University of Turin, Italy  
Joao Santana Silva,  
University of São Paulo, Brazil

### \*Correspondence:

Diana Boraschi  
d.boraschi@ibp.cnr.it  
Luciana C. C. Leite  
luciana.leite@butantan.gov.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Inflammation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 23 November 2018

**Accepted:** 10 June 2019

**Published:** 26 June 2019

### Citation:

Rodriguez D, Goulart C, Pagliarone AC, Silva EP, Cunegundes PS, Nascimento IP, Borra RC, Dias WO, Tagliabue A, Boraschi D and Leite LCC (2019) *In vitro* Evidence of Human Immune Responsiveness Shows the Improved Potential of a Recombinant BCG Strain for Bladder Cancer Treatment. *Front. Immunol.* 10:1460. doi: 10.3389/fimmu.2019.01460

The live attenuated mycobacterial strain BCG, in use as vaccine against tuberculosis, is considered the gold standard for primary therapy of carcinoma *in situ* of the bladder. Despite its limitations, to date it has not been surpassed by any other treatment. Our group has developed a recombinant BCG strain expressing the detoxified S1 pertussis toxin (rBCG-S1PT) that proved more effective than wild type BCG (WT-BCG) in increasing survival time in an experimental mouse model of bladder cancer, due to the well-known adjuvant properties of pertussis toxin. Here, we investigated the capacity of rBCG-S1PT to stimulate human immune responses, in comparison to WT-BCG, using an *in vitro* stimulation assay based on human whole blood cells that allows for a comprehensive evaluation of leukocyte activation. Blood leukocytes stimulated with rBCG-S1PT produced increased levels of IL-6, IL-8, and IL-10 as compared to WT-BCG, but comparable levels of IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ . Stimulation of blood cells with the recombinant BCG strain also enhanced the expression of CD25 and CD69 on human CD4<sup>+</sup> T cells. PBMC stimulated with rBCG-S1PT induced higher cytotoxicity to MB49 bladder cancer cells than WT-BCG-stimulated PBMC. These results suggest that the rBCG-S1PT strain is able to activate an immune response in human leukocytes that is higher than that induced by WT-BCG for parameters linked to better prognosis in bladder cancer (regulation of immune and early inflammatory responses), while fully comparable to WT-BCG for classical inflammatory parameters. This establishes rBCG-S1PT as a new highly effective candidate as immunotherapeutic agent against bladder cancer.

**Keywords:** recombinant BCG, bladder cancer, human immune cells, immunotherapy, adjuvant, CD4T cells, cytokines

## INTRODUCTION

The Bacille-Calmette-Guérin (BCG) is a live anti-tuberculosis vaccine, which has been administered to more than 3 billion individuals worldwide over 80 years (1–3). BCG is also used as immunotherapeutic treatment of non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC). After over 40 years of use, BCG is still the gold standard for bladder cancer at early stage (4), by decreasing disease

progression and the risk of recurrence (5). As mechanism of anti-tumor activity, BCG instilled into the bladder induces a local inflammatory immune response with influx of granulocytes and mononuclear cells and a potent production of inflammatory and Th1 cytokines, resulting in the activation of a significant anti-tumor response (6, 7). However, BCG immunotherapy has limitations, as ~30% of patients do not respond to BCG, and 50% recur after BCG therapy (8, 9). In an attempt to increase treatment efficacy, different strains of BCG have been used as immunotherapy, as yet without satisfactory results (10, 11).

Several recombinant BCG (rBCG) strains have been constructed as vaccine candidates for more efficient protection against tuberculosis (12) and for new vaccines against viruses, bacteria, and parasites (13, 14). Other rBCG strains have also been constructed, expressing inflammatory or Th1 cytokines such as IL-2, IL-12, IL-18, IFN- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ , as potentially improved immunotherapeutic tools for bladder cancer treatment (15, 16). A rBCG strain expressing IFN- $\gamma$  specifically increased MHC class I molecules in the bladder cancer cell line MB49 *in vitro* and could prolong survival in mice with murine orthotopic bladder cancer as compared to BCG treatment (17). Another rBCG strain, which expresses IFN- $\alpha$ , induced increased production of Th1 cytokines, and enhanced cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) against bladder cancer cell lines *in vitro* (18). Our group has constructed rBCG strains expressing toxin derivatives (19, 20), including the genetically detoxified S1 subunit of Pertussis Toxin-9K/129G (S1PT) (21). The rBCG-S1PT strain was obtained from a BCG Moreau background, the strain used in Brazil for both TB vaccination and bladder cancer immunotherapy (22, 23). Auxotrophic complementation allowed stable *in vivo* expression of the S1PT protein, and the new strain induced a specific cellular immune response that effectively protects neonate mice from *B. pertussis* challenge (24). Based on the well-known adjuvant properties of PT, i.e., its capacity to induce non-specific immune/inflammatory activation, we have evaluated the rBCG-S1PT strain for the immunotherapy of bladder cancer in a murine model, in comparison with wild type BCG (WT-BCG). That study demonstrated that the S1PT-expressing BCG strain decreased more effectively bladder weight and induced a highly significant increase in the survival of mice as compared with WT-BCG (25, 26). As this recombinant BCG strain is being prepared for evaluation in clinical trials as improved treatment of bladder cancer, we are providing here data in support of its improved immunotherapeutic performance by examining its capacity to induce immune activation of human cells *in vitro*.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects and Blood Collection

Thirty-nine healthy adults (19 males and 20 females, aged 20–65 years) were recruited at the Hospital Universitário, Universidade

de São Paulo. Clinical history (obtained in a questionnaire) and blood counts and serological parameters were used to confirm the health conditions of the participants. Thirty-four participants reported vaccination with live BCG at birth, while five were not vaccinated. Ten milliliters of blood were collected into heparinized tubes. The study protocol was approved by the Comitê de Ética/Pesquisa Hospital Universitário/USP (CEP-HU/USP) 728.275.

### BCG Strains

The rBCG-S1PT strains were constructed based on a BCG Moreau background (24). The BCG Moreau strain is one of the early strains (together with BCG Russia and Japan) as identified by genomic studies, while late strains include BCG Pasteur and Danish (27). Several studies suggest that early BCG vaccines may induce superior immune responses to the widely used late strains (27). The strain used here is a complemented auxotrophic recombinant BCG (24). The BCG Moreau strain and rBCG-S1PT were grown in Middlebrook 7H9 medium with albumin dextrose-catalase enrichment at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> using stationary tissue culture flasks. Bacteria were harvested by centrifugation, washed and stored in aliquots at –80°C. Aliquots were thawed and colony forming units (CFU) were determined before use by plating onto Middlebrook 7H10 medium with oleic albumin dextrose-catalase enrichment.

### Whole Blood Assay

Whole blood stimulation (28) was performed by diluting 250  $\mu$ L of fresh heparinized human whole blood (containing an average of  $1.8 \times 10^6$  nucleated cells) in 750  $\mu$ L of RPMI-1640 medium (GIBCO<sup>®</sup>, Life Technologies, Paisley, UK) in the presence of BCG or rBCG-S1PT ( $10^5$  CFU/mL) in 1.5 mL polypropylene tubes. Thus, the multiplicity of infection (MOI) obtained was approximately 0.1. Negative controls did not contain mycobacteria. Positive controls received 2.5 ng/mL LPS (from *E. coli* O55:B5; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO). Tubes were tightly capped, mixed by inversion, and incubated at 37°C for 24 or 48 h. An aliquot of 100  $\mu$ L was taken for cell staining and phenotyping. The remaining cells in 0.9 mL were lysed with 100  $\mu$ L Triton-X (1% final concentration), and samples frozen at –80°C for cytokine measurement.

### Cytokine Measurement

Frozen samples were thawed, centrifuged, and the supernatants assayed for inflammation-related cytokines at 24 h (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$ ) and Th1/Th2/Th17-related cytokines at 48 h (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A) with Cytometric Bead Array kits (CBA; BD Biosciences, San Jose, CA), as per the manufacturer's instructions. The assays' lower limits of detection were between 2.6 and 18.9 pg/mL, depending on the cytokine, and the higher limit was 5,000 pg/mL. All samples were tested undiluted and, if values were above threshold, were diluted and retested. Samples below the lower threshold limit were considered as zero. Testing of some cytokines at both time points demonstrated that the majority/totality of production occurred within the first 24 h (**Supplementary Figure 1**). Values are expressed as pg or ng cytokines/mL of blood.

**Abbreviations:** BCG, *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin; NMIBC, non-muscle invasive bladder cancer; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PT, pertussis toxin; rBCG-S1PT, recombinant BCG expressing the detoxified PT S1 unit; WT-BCG, wild type BCG.

## Cell Phenotypic Analysis

Phenotypic analysis was performed after 48 h. Cells were treated with 2  $\mu$ M EDTA (Sigma Aldrich Inc.) for 10 min and washed with PBS, then incubated for 30 min at room temperature with the following conjugated mAbs: CD3-APC-H7, CD4-PECy-5, CD25-BV510, and CD69-FITC. After incubation, red blood cells were lysed using 2 mL FACS lysing solution, and flow cytometric acquisition was performed with a FACS Canto II after optimization of settings using the cytometer setup and tracking beads. Instrument and reagents were from BD Bioscience. Data were analyzed using FlowJo version 7.6.5. No differences in the proportion of dead cells were evident between treatments and between treatments and controls, by scattering analysis.

## Cytotoxicity Assay

MB49-GFP cells (mouse bladder carcinoma cell line MB49 cells modified to constitutively express green fluorescent protein, GFP) were maintained in RPMI-1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum at 37°C in humidified air with 5% CO<sub>2</sub> (25). The MB49-GFP cells were detached by trypsin treatment, seeded in 96-well flat-bottom microplates at  $3.5 \times 10^4$  cell/well, and incubated for 24 h until confluent. Human PBMC were isolated from heparinized blood samples with standard procedures using Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden). PBMC were mixed with WT-BCG or rBCG-S1PT at MOI 0.1 and immediately added to MB49-GFP cell cultures at the initial PBMC to tumor cell ratios of 12.5:1, 25:1 and 50:1. After an overnight incubation, the plates were washed with sterile PBS twice, the MB49-GFP cells were detached by trypsinization (50  $\mu$ L/well, 4 min), collected by centrifugation, resuspended in 50  $\mu$ L/well of ice-cold RPMI-1640 and counted in a hemacytometer with a fluorescence microscope (Nikon E200).

Percent cytotoxicity (which in this assay measures the sum of cytolytic and cytostatic effects) was expressed by taking as 0 the number of tumor cells in the absence of PBMC and BCG, and 100% the absence of tumor cells. Neither WT-BCG nor rBCG-S1PT at the concentrations used had a direct cytotoxic effect on tumor cells.

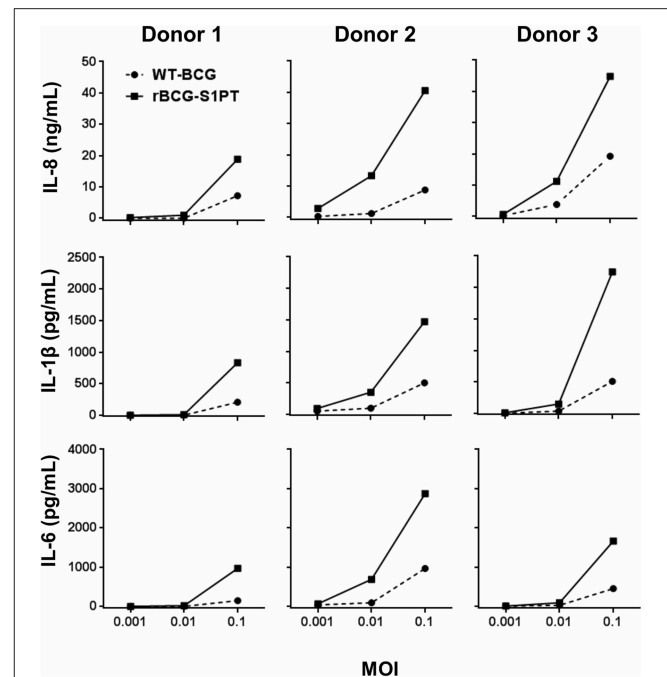
## Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism 6.02 software package (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Analysis on cytokine levels and cell phenotypes were performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) with a Bonferroni's multiple-comparison test, and the cytotoxicity assay using Student's *t*-test. Differences between groups with  $p \leq 0.05$  were considered significant.

## RESULTS

### rBCG-S1PT Induces Cytokine Production in Human Blood Cells

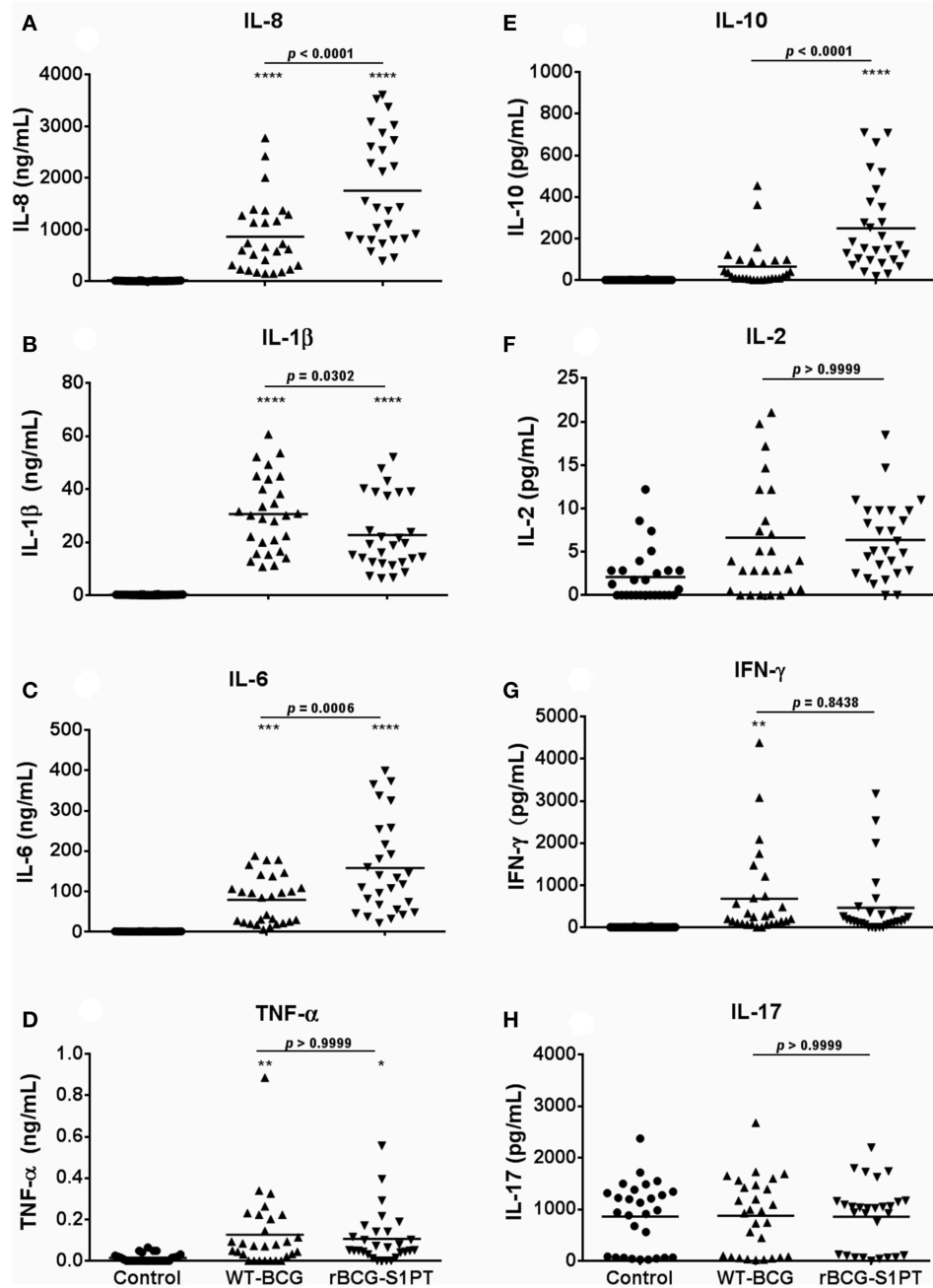
Preliminary experiments were run for selecting the WT-BCG and rBCG-S1PT MOI to use in the study. Based on literature data suggesting a MOI of 0.1 as optimal (29), we set up dose-response experiments with three donors (two vaccinated with



**FIGURE 1** | Dose-response of WT-BCG and rBCG-S1PT in activating cytokine production by human blood cells *in vitro*. Blood cells from three individual donors (Donors 1 and 2 had been vaccinated with BCG, Donor 3 was non-vaccinated) were exposed for 24 h to increasing MOI of WT-BCG or rBCG-S1PT. Cytokines were measured with a CBA assay and expressed as cytokine concentration /mL blood. Spontaneous release by non-stimulated cells was subtracted. This was 0.8–1.6 ng/mL for IL-8, 24–92 pg/mL for IL-1 $\beta$ , and 20–89 pg/mL for IL-6.

BCG and one non-vaccinated), in which we compared the ability of WT-BCG and rBCG-S1PT to induce cytokine production by using a rapid and very efficient assay on whole blood, which assesses the global response of blood cells to exogenous stimuli (28). Cytokines assessed were the chemokine IL-8 and the inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6. MOI used were 0.1 and below, in an attempt to identify differences between the two BCG types in the perspective of dose reduction in future therapeutic approaches. The results in **Figure 1** show that for both BCG strains the MOI 0.1 was the concentration that stimulated a substantial reaction in all donors. The response to rBCG-S1PT was higher than that to WT-BCG at this MOI and, for Donor 2 (all cytokines) and Donor 3 (IL-8), also at MOI 0.01. Minimal or no reaction was observed at MOI 0.001 for either BCG strain.

Once chosen the MOI, we have tested the human response to BCG strains more extensively, using the same assay on whole blood cells. Since effector cells in a localized tissue inflammation are recruited from blood, assessing human blood cell reaction to BCG is a relevant way to evaluate local immune/inflammatory reactivity. Human blood from healthy donors was exposed *in vitro* to WT-BCG or rBCG-S1PT, and immune reactivity assessed after 24 and 48 h. The results reported in **Figure 2** show that rBCG-S1PT induces a similar cytokine profile as WT-BCG, i.e., significant production of

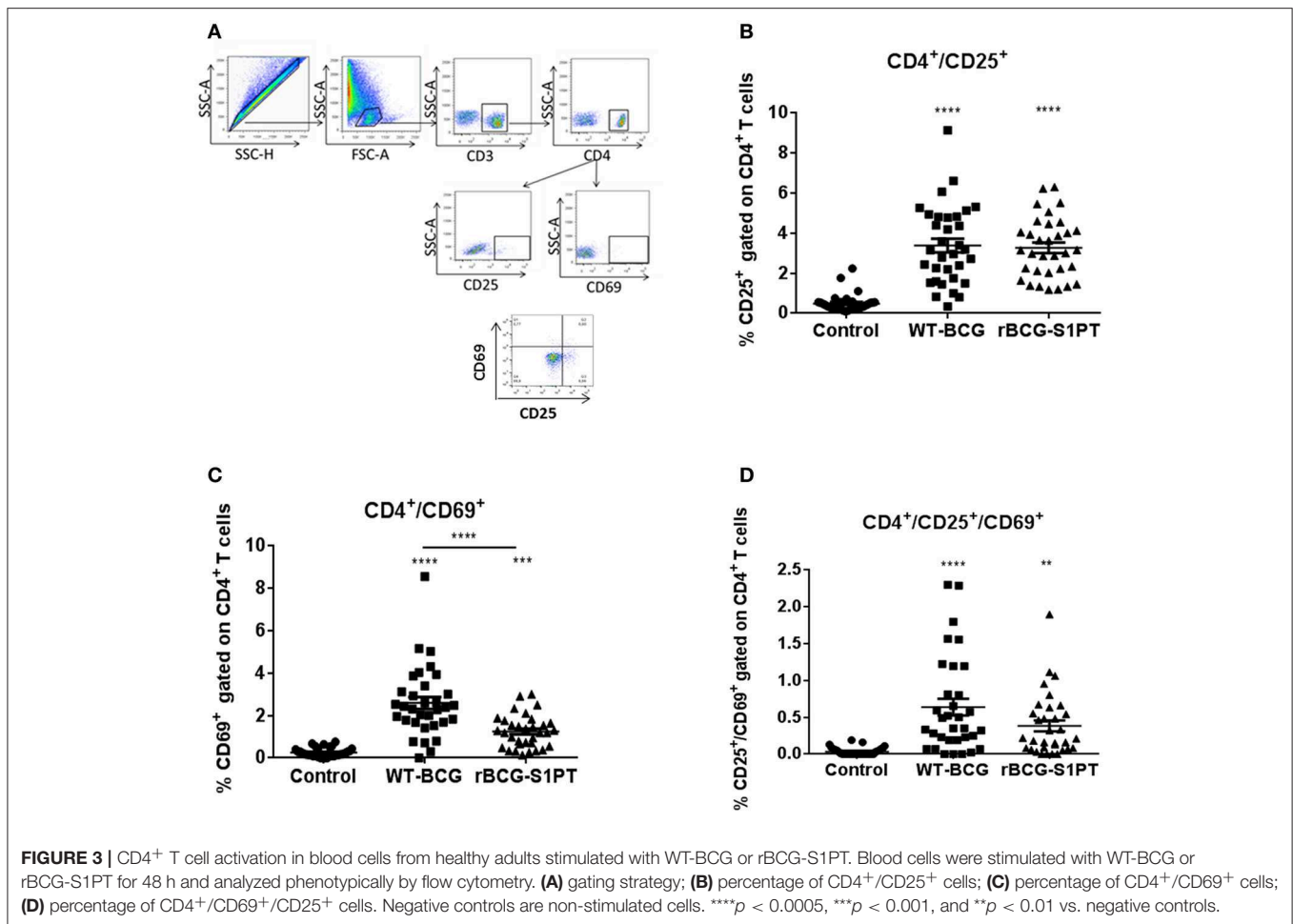


**FIGURE 2 |** Production of cytokines by blood cells from healthy adults stimulated with WT-BCG or rBCG-S1PT. Blood cells were stimulated with WT-BCG or rBCG-S1PT and cytokines were measured with a CBA array. Data at 24 h are reported for the early inflammation-related cytokines IL-8 (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), and TNF- $\alpha$  (D), while results at 48 h are shown for the T-related cytokines IL-10 (E), IL-2 (F), IFN- $\gamma$  (G), and IL-17A (H). Values represent the concentration of cytokines per mL blood. Negative controls are non-stimulated cells. Positive controls (cells stimulated with LPS) were: IL-8,  $133.40 \pm 13.63$  ng/mL; IL-1 $\beta$ ,  $13.45 \pm 1.28$  ng/mL; IL-6,  $80.11 \pm 12.30$  ng/mL; TNF- $\alpha$ ,  $0.16 \pm 0.04$  ng/mL; IL-10,  $95.04 \pm 17.61$  pg/mL; IL-2,  $3.58 \pm 0.83$  pg/mL; IFN- $\gamma$ ,  $798.21 \pm 187.08$  pg/mL; and IL-17,  $1004.74 \pm 143.52$  pg/mL. \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , and \* $p < 0.05$  vs. negative controls. The  $p$  value for the difference between BCG groups is indicated over the bar.

IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, and IL-2. For IFN- $\gamma$ , only production induced by WT-BCG reached statistical significance, while that induced by rBCG-S1PT showed a tendency to increase that was not significant ( $p = 0.06$ ) by ANOVA, although it

was significant by the Student's  $t$  test (not shown). There was no significant production of IL-4 or IL-12 in response to either BCG strain (not shown), while IL-17 was produced constitutively and was not increased upon stimulation with





BCG (**Figure 2H**). Notably, rBCG-S1PT was able to stimulate a significantly higher production of IL-8, IL-6, and IL-10 when compared to WT-BCG (**Figures 2A,C,E**). While production of inflammatory cytokines (IL-8, IL-1 $\beta$ ) was generally examined at 24 h, and that of T-related cytokines (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-17) at 48 h, the production of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-10 was evaluated at both 24 and 48 h (**Supplementary Figure 1**). The cytokine profiles (including differences between recombinant and wild type BCG) were comparable between the two time points, although their level was lower at 48 h. This suggests that for these cytokines the production mainly occurred in the first 24 h.

By examining data in **Figures 1, 2**, a great variability in the individual response to BCG can be observed both in the amount of cytokine produced and reactivity to the different strains. Indeed, the response to BCG varies substantially among donors. As an example, IL-8 production goes from 20 to 4,000 pg/mL blood in response to MOI 0.1 rBCG-S1PT in 24 h. It is also clear that individual donors can be differently sensitive to the enhanced effect of rBCG-S1PT, as for instance in the case of the superior IL-1 $\beta$  induction shown in **Figure 1**, while this effect was not evident when examining a larger cohort (**Figure 2B**). This would suggest the need of

personalized testing for patients undergoing BCG therapy for bladder cancer.

The results shown in **Figure 2** were obtained with blood cells from 34 donors that were vaccinated with BCG at birth. In order to examine whether the differential responsiveness to rBCG-S1PT vs. WT-BCG depended on previous vaccination the response to BCG was assessed in a very limited group of non-vaccinated donors ( $n = 5$ ), for the reason that BCG vaccination is compulsory in Brazil since 1967 and non-vaccinated individuals are rare. The results in **Supplementary Figure 2** show that non-vaccinated donors also respond to rBCG-S1PT with a higher production of IL-8, IL-6, and IL-10, as shown for vaccinated donors. Notably, the absolute activation level is about 5–10-fold lower in non-vaccinated donors (both for BCG strains and for LPS), but the activation induced by rBCG-S1PT reaches a level that is within the same range of the response of vaccinated donors to WT-BCG (IL-8: 200–380 ng/ml with rBCG-S1PT in non-vaccinated donors vs. 50–3,000 ng/ml with WT-BCG in vaccinated donors; IL-6: 0–48 ng/ml with rBCG-S1PT in non-vaccinated vs. 0–190 ng/ml with WT-BCG in vaccinated donors; IL-10: 20–180 pg/ml with rBCG-S1PT in non-vaccinated donors vs. 0–200 pg/ml with WT-BCG in vaccinated donors) (**Supplementary Figure 2**).

## rBCG-S1PT Induces Activation of Human Blood CD4<sup>+</sup> T Cells

To investigate whether rBCG-S1PT is able to activate T cells, we examined the expression of CD25 and CD69 on human blood CD4<sup>+</sup> T cells upon exposure to rBCG-S1PT, in comparison to WT-BCG. **Figure 3A** shows the gating strategy for cytofluorimetric marker detection. Both BCG strains significantly enhanced the expression of CD25 molecules on CD4<sup>+</sup> T cells (**Figure 3B**), implying a comparable capacity to activate CD4<sup>+</sup> T cells. We also evaluated the expression of the early activation marker CD69. Both WT-BCG and rBCG-S1PT could enhance CD69 expression on CD4<sup>+</sup> T cells, although rBCG-S1PT was not as efficient as WT-BCG (**Figure 3C**). When assessing the number of CD4<sup>+</sup> T cells co-expressing CD25 and CD69, both BCG strains efficiently and comparably enhanced the number of activated cells (**Figure 3D**).

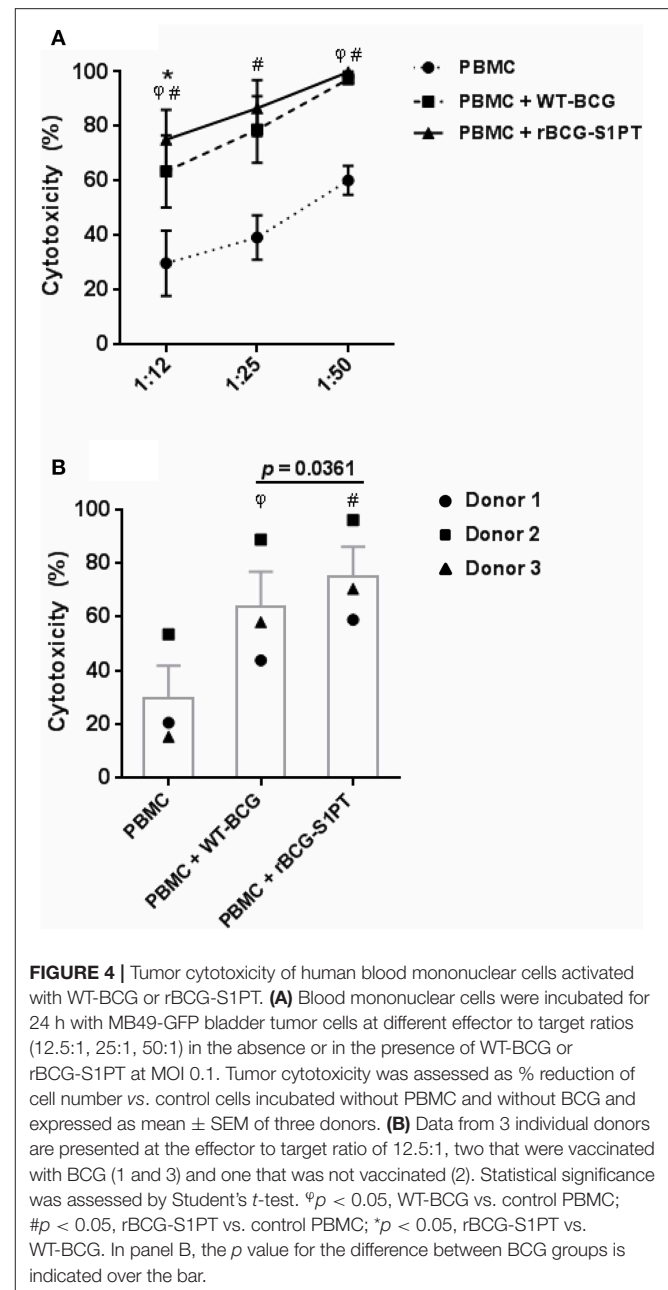
## rBCG-S1PT Stimulation of Human Blood Cells Induces Tumor Cytotoxicity

To investigate whether rBCG-S1PT can activate the anti-tumor activity of human leukocytes, we have set up an *in vitro* assay that measures the global cytotoxic effect, comprising both cytolysis (cell death) and cytostasis (block/decrease of cell proliferation). The assay is based on the assessment of the number of living tumor cells present in culture after incubation with effector leukocytes. To mimic *in vivo* conditions, leukocytes were co-cultured with cells from a bladder cancer cell line in the presence of BCG. In the conditions used, BCG had no direct cytotoxic effect on tumor cells (not shown). As shown in **Figure 4**, PBMC of three different donors showed a measurable spontaneous cytotoxic effect for tumor cells, which was significantly increased by both WT-BCG and rBCG-S1PT (**Figure 4A**). For each donor, the effect of recombinant BCG was higher than that induced by the wild type strain and is particularly evident at the effector to target ratio of 12.5:1 (**Figure 4B**). At higher effector to target ratios (25:1, 50:1) the cytotoxicity was nearly 100% for all donors with both BCG strains (**Figure 4A**).

## DISCUSSION

We provide evidence that rBCG-S1PT is efficient in the activation of human CD4<sup>+</sup> lymphocytes and of innate/inflammatory immune response, the latter being superior to that induced by WT-BCG, likely relying on the potent non-specific adjuvant capacity of the expressed detoxified S1PT (20). Previous data showing the improved performance of rBCG-S1PT in a mouse model of bladder cancer (25, 26) are supported by data in this study, showing a peculiar activation profile induced by the recombinant strain that is suggestive of a more effective initiation and regulation of immune reactivity.

Our results show that stimulation of human blood cells *in vitro* with both rBCG-S1PT and WT-BCG induce the production



**FIGURE 4** | Tumor cytotoxicity of human blood mononuclear cells activated with WT-BCG or rBCG-S1PT. **(A)** Blood mononuclear cells were incubated for 24 h with MB49-GFP bladder tumor cells at different effector to target ratios (12.5:1, 25:1, 50:1) in the absence or in the presence of WT-BCG or rBCG-S1PT at MOI 0.1. Tumor cytotoxicity was assessed as % reduction of cell number vs. control cells incubated without PBMC and without BCG and expressed as mean  $\pm$  SEM of three donors. **(B)** Data from 3 individual donors are presented at the effector to target ratio of 12.5:1, two that were vaccinated with BCG (1 and 3) and one that was not vaccinated (2). Statistical significance was assessed by Student's *t*-test.  $\phi p < 0.05$ , WT-BCG vs. control PBMC;  $\#p < 0.05$ , rBCG-S1PT vs. control PBMC;  $*p < 0.05$ , rBCG-S1PT vs. WT-BCG. In panel B, the *p* value for the difference between BCG groups is indicated over the bar.

of inflammatory cytokines, essential for the induction of non-specific innate immune activation, within 24 h. While levels of the classical inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are enhanced in a comparable fashion by both strains, production of IL-8 and IL-6 is significantly higher in rBCG-S1PT-stimulated cells. Urinary levels of IL-8, IL-6, and also IL-10, are important markers to evaluate the efficacy of BCG instillations in the treatment of NMIBC (30). Urinary IL-8 has been considered a potential prognostic factor for tumor recurrence and progression following BCG therapy (31), while decreased IL-6 serum levels in patients with bladder cancer correlate with the appearance of myeloid-derived suppressor cells and poor prognosis (32). The capacity of PT to induce IL-6 production in mice (33, 34)

may explain the finding that human blood cells produce higher IL-6 levels when stimulated with rBCG-S1PT in comparison to WT-BCG.

In the murine bladder cancer model, treatment with rBCG-S1PT induced an increase in IL-10 mRNA and in the survival time of the animals (25). Here we demonstrated that rBCG-S1PT induces a significantly higher production of IL-10, in parallel to the favorable markers IL-8 and IL-6, as compared to WT-BCG, also in human blood leukocytes. The higher production of IL-10 induced by rBCG-S1PT as compared to WT-BCG reveals a tighter control of the Th1-dependent inflammatory response, which may result in an effective induction of response in the absence of significant inflammatory side effects. Thus, the enhanced IL-10 production should be considered as a mechanism of protection against tissue injury and pathological processes associated with Th1 and inflammatory cytokines (35, 36).

The overproduction of IL-6 and IL-8 in combination with increased IL-10 and stable production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  suggests that rBCG-S1PT establishes an efficient compensatory mechanism to control excessive inflammation.

IFN- $\gamma$  production was induced by both BCG strains in about one third of donors, while all others were unreactive. This is similar to the production of TNF- $\alpha$ , and suggests a significant heterogeneity in individual responsiveness to BCG, relative to these key inflammatory cytokines, which may imply different outcomes in terms of therapeutic efficacy. Other cytokines such as IL-2 and IL-17 were not significantly induced by either BCG strain. IL-17 was measurably produced by non-stimulated blood cells in about two thirds of the donors, and exposure to BCG did not increase its production nor the number of cytokine-producing donors. Also in the case of IL-2, two subpopulations of donors, responders and non-responders, could be identified. It is notable that in the case of IL-2 the vast majority of donors was able to respond to rBCG-S1PT, while only two thirds of donors could respond to WT-BCG. The Th-related cytokines IL-12 and IL-4 were not produced in response to either BCG strain, suggesting that the major effects of BCG are on innate immunity and inflammatory responses, without a significant direct effect on the later stages of adaptive immune response.

Immunological evaluation of patients with NMIBC show that BCG treatment induces predominantly CD4<sup>+</sup> activation (7). Indeed, *in vitro* exposure of human blood cells to BCG strains induces activation of CD4<sup>+</sup> T cells. Our results show that *in vitro* stimulation of blood cells induced an increase in the number of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T cells, which is comparable between WT-BCG and rBCG-S1PT. This is in agreement with previous findings that show induction of CD25 (IL-2R $\alpha$ , a marker of T cell activation) on lymphocytes following infection with mycobacteria *in vivo* and *in vitro* (37, 38). Stimulation of blood cells with rBCG-S1PT or WT-BCG also induced a significant increase in the early activation marker CD69 in CD4<sup>+</sup> T cells, an increase that has been correlated with immune sensitization to mycobacterial antigens (39). In the present study, both WT-BCG and rBCG-S1PT induced CD69 expression on blood CD4<sup>+</sup> T cells. The higher increase induced by WT-BCG suggests a more pronounced early activation. However, fully activated CD4<sup>+</sup> T

cells co-expressing CD25 and CD69 were equally induced by rBCG-S1PT and WT-BCG, implying an essentially similar T cell activation profile.

Enhanced IL-8 and IL-6 production in response to rBCG-S1PT implies improved recruitment and stimulation of blood-derived immune cells. On the other hand, it is notable that there is no significant difference in the induction of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , both endowed with potent inflammatory properties but important for immune stimulation. The stable production of these two factors suggests that, while immune stimulation is maintained at the same level as with WT-BCG, rBCG-S1PT does not increase detrimental inflammatory effects.

It has been shown that BCG-stimulated PBMCs induce death of tumor cell lines through a complex mechanism involving the activation of macrophages and CD4<sup>+</sup> T cells, which leads to the generation of BCG-activated killer cells (BAK cells - CD8<sup>+</sup> T cells) stimulated by IL-2 and IFN- $\gamma$  (40). We investigated the ability of rBCG-S1PT to activate the direct cytotoxic activity of human leukocytes against tumor cells *in vitro*. Notably, while both WT-BCG and rBCG-S1PT significantly increased the cytotoxic capacity of leukocytes, the recombinant strain induced a higher effect on cells from all the tested donors. It will be important to further investigate the relative role of lymphocytes and monocytes (which also get potently activated by BCG *in vitro*; data not shown) in the cytotoxicity against MB49 cells.

Our study was mainly run with blood samples taken from BCG-vaccinated volunteers. It is interesting to note that, in a limited number of non-immunized donors, reactivity to the two BCG strains displayed the same profile as that described here for immunized donors, although the absolute levels of cytokines were lower. Indeed, there are suggestions in the literature that BCG vaccination may improve the efficacy of BCG immunotherapy in bladder cancer therapy, both in experimental models and in human patients (41). A pilot study is currently ongoing to assess the effect of BCG vaccination in bladder cancer patients (42).

Based on the data described here, we can conclude that human blood cells challenged with rBCG-S1PT in a realistic *in vitro* model show an improved immune activation profile in comparison to WT-BCG, in terms of cytokine production and tumor cytotoxicity. This evidence strengthens the results of improved bladder cancer treatment in a mouse model (25) and indicate rBCG-S1PT as an excellent candidate for a more effective immunotherapy of non-muscle-invasive bladder cancer.

## ETHICS STATEMENT

The study protocol was approved by the Comitê de Ética/Pesquisa Hospital Universitário/USP (CEP-HU/USP) 728.275.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

DR, CG, IN, RB, WD, AT, DB, and LL: contributed to the design of the experiments, analyzed, and interpreted data. DR, CG, AP,

ES, PC, and DB: performed the experiments. DR, CG, WD, AT, DB, and LL: wrote the paper.

## FUNDING

This work was supported by BNDES (Grant No 11.2.0322.1), FAPESP (Grant No 17/24832-6), and Fundação Butantan. DB was supported by the Cluster project Medintech (Converging technologies for increasing drug and vaccine safety; CNT01\_00177\_962865) of the Italian Ministry of Education, University and Research (MIUR), by the MIUR Flagship project InterOmics, and by the Italy-Brazil Joint Laboratories initiative of CNR.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Drs. Filumena M. da S. Gomes and Maria Helena Valente from Hospital Universitário, Universidade de São Paulo, Brazil, for providing human blood samples, and Dr. Timothy L. Ratliff from Purdue University College of Veterinary Medicine, Fort Wayne, Indiana, USA for kindly providing the MB49 cells.

## REFERENCES

- Bloom BR, Fine PEM. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis. In: Bloom B, editor. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press (1994). p. 531–57. doi: 10.1128/9781555818357.ch31
- WHO. *BCG Vaccines: WHO Position Paper - February 2018*. Weekly epidemiological record, No 8, 2018, 93, 73–96. Available online at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260306/WER9308.pdf;jsessionid=80E566859F34C3F97621703C82DF433?sequence=1>
- Brennan MJ, Thole J. Tuberculosis vaccines: a strategic blueprint for the next decade. *Tuberculosis*. (2012) 92(Suppl. 1):S6–13. doi: 10.1016/S1472-9792(12)70005-7
- Herr HW, Morales A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J Urol*. (2008) 179:53–6. doi: 10.1016/j.juro.2007.08.122
- Maruf M, Brancato SJ, Agarwal PK. Non-muscle invasive bladder cancer: a primer on immunotherapy. *Cancer Biol Med*. (2016) 13:194–205. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0020
- Pettenati C, Ingersoll MA. Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer. *Nat Rev Urol*. (2018) 15:615–25. doi: 10.1038/s41585-018-0055-4
- Bohle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol*. (2003) 170:964–9. doi: 10.1097/01.ju.0000073852.24341.4a
- Witjes JA, Hendricksen K. Intravesical pharmacotherapy for non-muscle-invasive bladder cancer: a critical analysis of currently available drugs, treatment schedules, and long-term results. *Eur Urol*. (2008) 53:45–52. doi: 10.1016/j.eururo.2007.08.015
- Punnen SP, Chin JL, Jewett MA. Management of bacillus Calmette-Guerin (BCG) refractory superficial bladder cancer: results with intravesical BCG and Interferon combination therapy. *Can J Urol*. (2003) 10:1790–5.
- Sengiku A, Ito M, Miyazaki Y, Sawazaki H, Takahashi T, Ogura K. A prospective comparative study of intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy with the Tokyo or Connaught strain for non-muscle invasive bladder cancer. *J Urol*. (2013) 190:50–4. doi: 10.1016/j.juro.2013.01.084

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01460/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure 1** | Time-dependent production of cytokines by blood cells from healthy adults stimulated with WT-BCG or rBCG-S1PT. Blood cells were stimulated with WT-BCG or rBCG-S1PT and cytokines were measured with a CBA array at 24 and 48 h. Values represent the concentration of cytokines per mL blood. Negative controls are non-stimulated cells. Positive controls (cells stimulated with LPS) were: IL-6, 45.53 ± 8.40 ng/mL; TNF-α, 0.10 ± 0.01 ng/mL; IL-10, 123.56 ± 33.38 pg/mL. \*\*\*\**p* < 0.0005, \*\*\**p* < 0.001, \*\**p* < 0.01, \**p* < 0.05 vs. negative controls.

**Supplementary Figure 2** | Production of cytokines by blood cells from non-vaccinated and BCG-vaccinated healthy adults stimulated with WT-BCG or rBCG-S1PT. Blood cells from non-vaccinated donors (left panels) or donors vaccinated with BCG (right panels, same as in **Figure 2** and

**Supplementary Figure 1**) were stimulated with WT-BCG or rBCG-S1PT for 24 h. Cytokines were measured with a CBA array and expressed as concentration per mL blood. Negative controls are non-stimulated cells. Positive controls (cells stimulated with LPS) were: for non-vaccinated donors, IL-8, 46.86 ± 4.26 ng/mL; IL-6, 36.22 ± 8.10 ng/mL; IL-10, 8.72 ± 0.63 pg/mL; for vaccinated donors, IL-8, 133.40 ± 13.63 ng/mL; IL-6, 80.11 ± 12.30 ng/mL; IL-10, 95.04 ± 17.61 pg/mL; \*\*\*\**p* < 0.0005, \*\*\**p* < 0.001, and \*\**p* < 0.01 vs. negative control or WT-BCG groups.

- Witjes JA, Dalbagni G, Karnes RJ, Shariat S, Joniau S, Palou J, et al. The efficacy of BCG TICE and BCG Connaught in a cohort of 2,099 patients with T1G3 non-muscle-invasive bladder cancer. *Urol Oncol*. (2016) 34:484 e19–25. doi: 10.1016/j.urolonc.2016.05.033
- Nieuwenhuizen NE, Kaufmann SHE. Next-generation vaccines based on bacille Calmette-Guerin. *Front Immunol*. (2018) 9:121. doi: 10.3389/fimmu.2018.00121
- Aldovini A, Young RA. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature*. (1991) 351:479–82. doi: 10.1038/351479a0
- Ohara N, Yamada T. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine*. (2001) 19:4089–98. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00155-4
- Murray PJ, Aldovini A, Young RA. Manipulation and potentiation of antimycobacterial immunity using recombinant bacille Calmette-Guerin strains that secrete cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1996) 93:934–9. doi: 10.1073/pnas.93.2.934
- Wang Y, Yang M, Yu Q, Yu L, Shao S, Wang X. Recombinant bacillus Calmette-Guerin in urothelial bladder cancer immunotherapy: current strategies. *Expert Rev Anticancer Ther*. (2015) 15:85–93. doi: 10.1586/14737140.2015.961430
- Arnold J, de Boer EC, O'Donnell MA, Bohle A, Brandau S. Immunotherapy of experimental bladder cancer with recombinant BCG expressing interferon-gamma. *J Immunother*. (2004) 27:116–23. doi: 10.1097/00002371-200403000-00005
- Liu W, O'Donnell MA, Chen X, Han R, Luo Y. Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) expressing interferon-alpha 2B enhances human mononuclear cell cytotoxicity against bladder cancer cell lines *in vitro*. *Cancer Immunol Immunother*. (2009) 58:1647–55. doi: 10.1007/s00262-009-0673-z
- Mazzantini RP, Miyaji EN, Dias WO, Sakauchi D, Nascimento AL, Raw I, et al. Adjuvant activity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing CRM197 on the immune response induced by BCG expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine*. (2004) 22:740–6. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.08.017
- Nascimento IP, Dias WO, Mazzantini RP, Miyaji EN, Gamberini M, Quintilio W, et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice. *Infect Immun*. (2000) 68:4877–83. doi: 10.1128/IAI.68.9.4877-4883.2000

21. Pizza M, Covacci A, Bartoloni A, Perugini M, Nencioni L, De Magistris MT, et al. Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science*. (1989) 246:497–500. doi: 10.1126/science.2683073
22. Benevolo-de-Andrade TC, Monteiro-Maia R, Cosgrove C, Castello-Branco LR. BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis—review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (2005) 100:459–65. doi: 10.1590/S0074-02762005000500002
23. Hofbauer SL, Shariat SF, Chade DC, Sarkis AS, Ribeiro-Filho LA, Nahas WC, et al. The moreau strain of bacillus Calmette-Guerin (BCG) for high-risk non-muscle invasive bladder cancer: an alternative during worldwide BCG shortage? *Urol Int*. (2016) 96:46–50. doi: 10.1159/000440701
24. Nascimento IP, Dias WO, Quintilio W, Hsu T, Jacobs WR Jr., Leite LC. Construction of an unmarked recombinant BCG expressing a pertussis antigen by auxotrophic complementation: protection against *Bordetella pertussis* challenge in neonates. *Vaccine*. (2009) 27:7346–51. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.09.043
25. Andrade PM, Chade DC, Borra RC, Nascimento IP, Villanova FE, Leite LC, et al. The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen S1PT in the intravesical treatment of bladder cancer. *Urol Oncol*. (2010) 28:520–5. doi: 10.1016/j.urolonc.2008.12.017
26. Chade DC, Borra RC, Nascimento IP, Villanova FE, Leite LC, Andrade E, et al. Immunomodulatory effects of recombinant BCG expressing pertussis toxin on TNF-alpha and IL-10 in a bladder cancer model. *J Exp Clin Cancer Res*. (2008) 27:78. doi: 10.1186/1756-9966-27-78
27. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2007) 104:5596–601. doi: 10.1073/pnas.0700869104
28. Puren AJ, Razeghi P, Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 enhances lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production in human whole blood cultures. *J Infect Dis*. (1998) 178:1830–4. doi: 10.1086/314481
29. Chavez-Galan L, Vesin D, Martinvalet D, Garcia I. Low dose BCG infection as a model for macrophage activation maintaining cell viability. *J Immunol Res*. (2016) 2016:4048235. doi: 10.1155/2016/4048235
30. Klap J, Schmid M, Loughlin KR. Biomarkers in patients treated with BCG: an update. *Can J Urol*. (2014) 21:7335–43.
31. Thalmann GN, Dewald B, Baggiolini M, Studer UE. Interleukin-8 expression in the urine after bacillus Calmette-Guerin therapy: a potential prognostic factor of tumor recurrence and progression. *J Urol*. (1997) 158:1340–4. doi: 10.1016/S0022-5347(01)64210-1
32. Yang G, Shen W, Zhang Y, Liu M, Zhang L, Liu Q, et al. Accumulation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) induced by low levels of IL-6 correlates with poor prognosis in bladder cancer. *Oncotarget*. (2017) 8:38378–88. doi: 10.18632/oncotarget.16386
33. Dumas A, Amiable N, de Rivero Vaccari JP, Chae JJ, Keane RW, Lacroix S, et al. The inflammasome pyrin contributes to pertussis toxin-induced IL-1beta synthesis, neutrophil intravascular crawling, and autoimmune encephalomyelitis. *PLoS Pathog*. (2014) 10:e1004150. doi: 10.1371/journal.ppat.1004150
34. Richard JF, Roy M, Audoy-Remus J, Tremblay P, Vallieres L. Crawling phagocytes recruited in the brain vasculature after pertussis toxin exposure through IL6, ICAM1, and ITGalpHaM. *Brain Pathol*. (2011) 21:661–71. doi: 10.1111/j.1750-3639.2011.00490.x
35. da Silva MV, Figueiredo AA, Machado JR, Castellano LC, Alexandre PB, Oliveira RE, et al. T cell activation and proinflammatory cytokine production in clinically cured tuberculosis are time-dependent and accompanied by upregulation of IL-10. *PLoS ONE*. (2013) 8:e65492. doi: 10.1371/journal.pone.0065492
36. Ponte C, Peres L, Marinho S, Lima J, Siqueira M, Pedro T, et al. *In vitro* T-cell profile induced by BCG Moreau in healthy Brazilian volunteers. *Hum Vaccin Immunother*. (2015) 11:450–7. doi: 10.4161/21645515.2014.970954
37. Storset AK, Berntsen G, Larsen HJ. Kinetics of IL-2 receptor expression on lymphocyte subsets from goats infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* after specific *in vitro* stimulation. *Vet Immunol Immunopathol*. (2000) 77:43–54. doi: 10.1016/S0165-2427(00)00227-0
38. Whist SK, Storset AK, Larsen HJ. The use of interleukin-2 receptor expression as a marker of cell-mediated immunity in goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol*. (2000) 73:207–18. doi: 10.1016/S0165-2427(00)00155-0
39. Avgustin B, Kotnik V, Skoberne M, Malovrh T, Skralovnik-Stern A, Tercej M. CD69 expression on CD4+ T lymphocytes after *in vitro* stimulation with tuberculin is an indicator of immune sensitization against *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Clin Diagn Lab Immunol*. (2005) 12:101–6. doi: 10.1128/CDLI.12.1.101-106.2005
40. Brandau S, Bohle A, Thanhauser A, Ernst M, Mattern T, Ulmer AJ, et al. *In vitro* generation of bacillus Calmette-Guerin-activated killer cells. *Clin Infect Dis*. (2000) 31:S94–100. doi: 10.1086/314068
41. Biot C, Rentsch CA, Gsponer JR, Birkhauser FD, Jusforgues-Saklani H, Lemaitre F, et al. Preexisting BCG-specific T cells improve intravesical immunotherapy for bladder cancer. *Sci Transl Med*. (2012) 4:137ra72. doi: 10.1126/scitranslmed.3003586
42. Nykopp TK, Batista da Costa J, Mannas M, Black PC. Current clinical trials in non-muscle invasive bladder cancer. *Curr Urol Rep*. (2018) 19:101. doi: 10.1007/s11934-018-0852-6

**Conflict of Interest Statement:** LL and IN have a patent application on the use of rBCG-S1PT in bladder cancer treatment.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Rodríguez, Goulart, Pagliarone, Silva, Cunegundes, Nascimento, Borra, Dias, Tagliabue, Boraschi and Leite. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.