

Vacinas de BCG Recombinante-DTP

Waldely Oliveira Dias

PbD pela Escola Paulista de Medicina –
Pesquisadora do Instituto Butantan –
Centro de Biotecnologia.

Rogério Pietro Mazzantini

Centro de Biotecnologia - Instituto
Butantan
Mestrando do Curso Interunidades em
Biotecnologia.

Eliane Namie Miyaji

PbD pela Universidade de São Paulo, Pós-
Doutoranda no Instituto Butantan –
Centro de Biotecnologia.

Ivan Pereira Nascimento

Doutorando do Departamento de
Bioquímica - Instituto de Química – USP.
Centro de Biotecnologia, Instituto
Butantan.

Denise Silvina Piccini Quintas Horton

PbD pela Escola Paulista de Medicina –
Pesquisadora do Instituto Butantan

Luciana Cezar de Cerqueira Leite

PbD pela Universidade de São Paulo –
Pesquisadora do Instituto Butantan
lcleite@quim.iq.usp.br

Resposta imune e proteção induzida por vacinas de BCG recombinante-DTP

Fotos cedidas pelos autores

A imunoprofilaxia, ou vacinação, é a medida mais eficiente e menos onerosa na prevenção de doenças infecciosas. A erradicação da varíola e o sucesso com a tríplice (DTP - difteria, tétano e pertussis, ou tosse comprida) e com a Sabin são provas contundentes da importância desses programas de vacinação. No entanto, fatores culturais, sociais e econômicos dificultam a realização de diversas campanhas de vacinação, especialmente em países em desenvolvimento, onde os sistemas de saúde são por vezes deficitários. Essa conjuntura levou a comunidade científica a um esforço para desenvolver vacinas multivalentes. Em especial, procuram-se veículos vivos de apresentação de antígenos, uma vez que a expressão contínua do imunógeno poderia eliminar a necessidade de várias doses de reforço para se alcançar uma proteção máxima, o que é o caso de várias vacinas atualmente em uso. Veículos que têm sido particularmente investigados são: Vacínia, Salmonella atenuada, ou BCG (Bacilo Calmette-Guerin, vacina contra a tuberculose), com resultados empolgantes (1).

O Bacilo de Calmette-Guerin, BCG

Albert Calmette e Camille Guerin, trabalhando no Instituto Pasteur, de Lille, no início do século, atenuaram uma cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* ao longo de 13 anos com 215 passagens sucessivas. A imunização com essa cepa foi então testada em diversas espécies de animais experimentais para demonstrar que, além de

não ocorrer reversão para a virulência, também conferia resistência a um desafio subsequente com *M.bovis* virulento ou *M.tuberculosis*. Essa cepa, hoje conhecida como Bacilo de Calmette-Guerin, ou BCG, foi utilizada oralmente, pela primeira vez, em 1921, e sua aplicação generalizada foi recomendada pela Liga das Nações, em 1927.

Hoje o BCG é a vacina mais utilizada no mundo, tendo já sido administrada a 3 bilhões de indivíduos, com uma frequência baixíssima de efeitos adversos sérios. Isso torna o BCG um bom candidato a veículo para apresentação de antígenos heterólogos, tendo em vista a possível validação de uma vacina recombinante baseada em BCG. Uma vacina multivalente, que utilize BCG como veículo vivo, apresentaria vários outros fatores vantajosos, como: I) o BCG é a única vacina recomendada pela WHO (Organização Mundial da Saúde) para ser administrada ao nascimento; II) requer apenas uma imunização para conferir imunidade celular duradoura, pois o BCG pode permanecer no organismo por anos (dependendo do indivíduo) - a apresentação contínua dos antígenos eliminaria a necessidade de programas de vacinação sequenciais, que é o caso de diversas vacinas em uso atualmente; III) seu processo de produção é de baixo custo, sendo vendida atualmente a apenas 55 centavos de dólar; IV) o BCG é um dos mais efetivos adjuvantes conhecidos para indução de imunidade celular em animais e humanos; e V) estudos recentes têm reanalisado a possibilidade de uma vacinação oral com BCG, de-

monstrando a indução de respostas humorais e celulares, inclusive em tecidos mucosos. Todas essas vantagens favorecem o uso da cepa viva atenuada de BCG como veículo multivacinal para a indução de imunidade humoral e celular contra diversos patógenos (2, 3).

BCG recombinante

Micobactérias como *M.tuberculosis* ou BCG infectam macrófagos e podem sobreviver por longos períodos no seu interior, estimulando continuamente o sistema imune. Vários estudos têm demonstrado que BCG recombinante expressando proteínas heterólogas pode induzir os 3 tipos de resposta imune necessários para proteção contra vários patógenos: I) produção de anticorpos IgG por células B; II) proliferação de linfócitos T e produção de linfocinas, inclusive interferon-gama (IFN- γ); III) e produção de linfócitos T-citotóxicos, com restrição por classe I do complexo principal de histocompatibilidade (Figura 1). Antígenos de diversos patógenos virais, bacterianos e de parasitas, como HIV, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium tetani*, *Borrelia burgdorferi*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, etc, foram expressos em BCG recombinante, induzindo respostas humorais e/ou celulares e, em alguns casos, levando à proteção contra um desafio com o patógeno (2,3).

A Vacina Tríplice - DTP

A vacina tríplice - DTP convencional mostrou-se extremamente eficien-

te no controle de infecções por difteria, tétano e pertussis (tosse comprida), quando a vacinação completa é alcançada. Essa vacina é constituída de anatoxina diftérica e anatoxina tetânica (as respectivas toxinas detoxificadas por tratamento químico) e por células inteiras de *Bordetella pertussis*, quimicamente inativadas. Um inconveniente na tecnologia utilizada na produção da vacina triplíce é a necessidade de manipulação de grandes quantidades de material tóxico na preparação de cada um dos componentes. Embora essa vacina seja muito eficiente, algumas vezes tem sido relacionada a efeitos colaterais indesejáveis. Além disso, é necessária a aplicação de diversas doses para se alcançar a proteção máxima, o que pode levar a uma cobertura reduzida, especialmente em países em desenvolvimento. Assim, a cobertura mundial para vacinação com DTP, que estava estacionada há anos em 80%, em 1998 caiu para 74%, sendo a baixa cobertura concentrada nos países em desenvolvimento. Isso significa que 1 em cada 4 crianças no mundo não está coberta contra esses patógenos, resultando em uma mortalidade anual de quase 1 milhão de crianças (4). Portanto, existe um esforço para a aplicação de novas tecnologias para o desenvolvimento de vacinas contra tétano, difteria e pertussis, buscando-se alternativas para redução do número de doses necessárias. A utilização de vetores vivos de apresentação de antígenos poderia ser, neste caso, extremamente vantajoso.

BCG recombinante - DTP

O objetivo deste trabalho consiste em desenvolver uma vacina multivalente, utilizando BCG como veículo vivo para apresentação de antígenos de difteria, tétano e pertussis. Utilizamos os seguintes antígenos: I) para a fração diftérica, o CRM 197, toxina diftérica, com uma mutação que elimina sua atividade tóxica, mas mantém a sua imunogenicidade (gentilmente cedido pelo Dr. Rino Rappuoli, Biocine, Itália); II) para a fração tetânica, o fragmento C da toxina tetânica (FC), que se tem mostrado atóxico e imunogênico (clonado pela Dra. Ana Lucia T.O. Nascimento, Instituto Butantan);

e III) para a fração pertussis, o gene da Subunidade 1 da toxina pertussis (S1PT), com 2 mutações que a tornam atóxica, porém mantendo sua imunogenicidade (PT-9K/129G) (fornecido pelo Dr. Rino Rappuoli).

No desenvolvimento de uma vacina de BCG recombinante, a expressão da proteína heteróloga pode ser conseguida através de um vetor de expressão extracromossomal ou a partir de um vetor integrativo, sendo que o primeiro, em geral, leva a maiores níveis de expressão e o segundo, a expressão mais estável. Os vetores de expressão extracromossomais têm sido mais utilizados, sendo vetores-ponte com origem para replicação em mico-

utilizados são os promotores das proteínas de choque térmico, hsp60 e hsp70. Mais recentemente, outros promotores têm sido utilizados para a expressão de proteínas heterólogas, como o promotor pAN, isolado de *M.paratuberculosis*; os promotores dos antígenos de 18kDa, 19kDa e 85^A, de *M.tuberculosis*, e o promotor mutado da β -lactamase de *M.fortuitum*, pBlaF*. Outro fator importante na resposta imune induzida é a localização do antígeno heterólogo. A fusão com seqüências sinais de exportação de diferentes proteínas de micobactéria pode levar à exportação dos antígenos e, conseqüentemente, à alteração na resposta imune induzida (2,3).

Nós utilizamos vetores de expressão que contêm o promotor pBlaF*, que levou a elevada expressão de antígenos de outros patógenos, com ou sem a seqüência sinal de exportação da β -lactamase (ssBlam) (gentilmente cedidos pela Dra. Brigitte Gicquel, Instituto Pasteur, Paris), que os direcionaria à exportação. Assim, o vetor pJEM17 leva à expressão do gene nativo e o vetor pLA71 coloca o gene em fusão com ssBlam (Figura 2).

Abordagem Experimental

A Figura 3 ilustra a abordagem experimental utilizada. Os genes dos antígenos heterólogos de tétano, difteria e pertussis, respectivamente, FC, CRM197 e S1PT, foram amplificados por PCR a partir de plasmídeos contendo os genes e clonados nos vetores de expressão em micobactéria contendo o promotor pBlaF*, pJEM17 e pLA71, sem fusão e com fusão com a seqüência sinal da β -lactamase, respectivamente. BCG eletrocompetentes foram transformados por eletroporação e plaqueados em meio sólido para crescimento de micobactéria contendo kanamicina (o plasmídeo contém o gene de resistência a este antibiótico) para seleção dos transformantes.

Colônias de BCG recombinante resistentes à kanamicina, portanto contendo os vetores, foram cultivadas em meio líquido, também contendo kanamicina. Uma parte foi utilizada para preparação de extratos protéicos por sonicação e extração com detergente SDS e outra parte foi utilizada para

Tabela 1: Sobrevivência de camundongos imunizados com rBCG-S1PT contra desafio com *B. pertussis* virulenta^a

Grupo	Sobrevivência
Salina	1/10
rBCG-S1PT	8/10
DTP	9/10

^a Grupos de 10 camundongos imunizados 2 semanas antes com 10⁶ CFU/0,5 ml of rBCG-S1PT, ou o controle negativo recebendo 0,5 ml de salina e o controle positivo recebendo 0,4 ml de DTP, foram submetidos a desafio intracerebral com uma dose letal de cepa virulenta de *B. pertussis*. A sobrevivência foi monitorada por 17 dias.

bactéria e em *Escherichia coli*, onde é realizada toda a manipulação genética dos vetores. Os vetores de expressão devem ter um marcador de seleção para isolar os transformantes, onde se usa em geral um gene de resistência a antibiótico. O gene que tem sido mais usado é o gene Tn903, que confere resistência a kanamicina, uma vez que as micobactérias são naturalmente resistentes a antibióticos β -lactâmicos (3).

O nível de expressão e localização dos antígenos são fatores importantes para o nível de resposta imune induzida. São os promotores que regem o nível de expressão. Os promotores micobacterianos que têm sido mais

Resultados: Expressão dos Antígenos Heterólogos em rBCG

Os vetores de expressão de micobactéria contendo os antígenos de tétano, difteria e pertussis foram eletroporados em BCG e as colônias resistentes à kanamicina, selecionadas e cultivadas para a preparação de extratos protéicos e lotes de vacinas. Os extratos protéicos foram analisados por Western blot.

Os extratos protéicos de clones de BCG recombinante (rBCG) transformados com os vetores contendo o gene FC, sem ou com fusão com ssBlam, respectivamente, rBCG-JFC e rBCG-LAFC, mostraram expressão da proteína heteróloga por Western blot revelado com antissoro anti-anatoxina tetânica, com os respectivos pesos moleculares esperados: rBCG-JFC apresentou uma banda de ~ 51 kDa e rBCG-LAFC de ~ 55 kDa (incluindo 4kDa da ssBlam). No entanto, os experimentos de localização do antígeno heterólogo no BCG mostraram que, em ambas as construções, o FC se encontrava no citosol, indicando que, nesse caso, a fusão com ssBlam não resultou em exportação do antígeno.

Clones de rBCG transformados com os vetores de expressão contendo o antígeno de difteria CRM197 mostraram expressão da proteína em Western blot quando revelado com antissoro anti-anatoxina diftérica (6). O clone de rBCG-JCRM197 apresentou a banda de peso molecular esperado a ~50 kDa. Já o clone de rBCG-LA-CRM197 apresentou uma banda de mesmo peso molecular, indicando que a fusão com ssBlam não foi estável. O interessante é que, em ambas as construções, o antígeno se localizou na fração de membrana, mesmo sem a seqüência sinal de exportação, sugerindo uma afinidade própria da proteína pela membrana celular.

No caso de rBCG-S1PT (contendo a subunidade S1 da toxina pertussis mutada), realizamos apenas a construção em fusão com ssBlam, pois relatos da literatura haviam indicado uma dificuldade de expressá-la sem fusão em outros sistemas. O Western blot revelado com anticorpo anti-PT mostrou uma banda de ~30kDa, pouco acima da banda de S1 da toxina

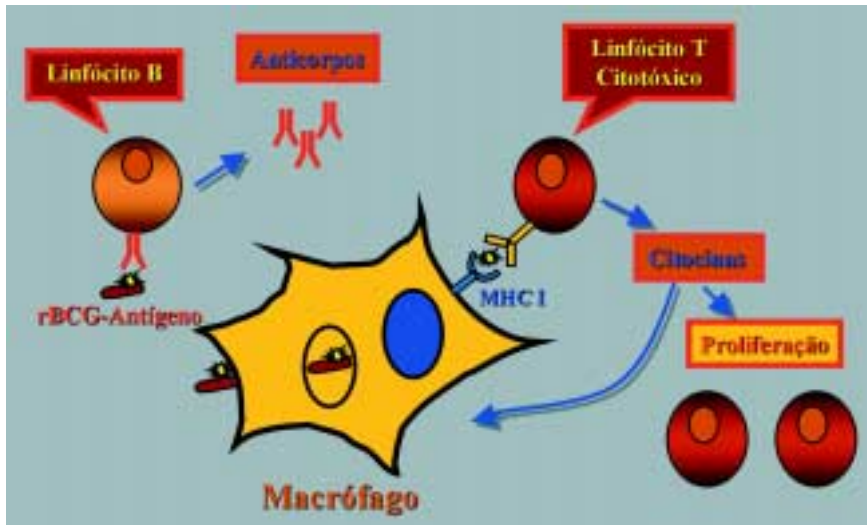


Figura 1. Resposta imune induzida por BCG recombinante

preparações vacinais congeladas em glicerol a -80°C. Os extratos protéicos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e por Western blot (reação com anticorpos específicos), para verificação da expressão dos antígenos heterólogos. Na revelação dos Western blots, foram utilizados anticorpos específicos: I) soro policlonal anti-anatoxina tetânica e II) anti-anatoxina diftérica produzido em cavalos no Instituto Butantan, e III) anticorpos monoclonais anti-toxina pertussis (cedidos pelo Dr. Yuji Sato, NIH, do Japão). A localização dos antígenos foi verificada por extração diferencial com detergente Triton X-114, em que se separam as frações de citosol (aquosa), membrana celular (detergente) e parede celular (insolúvel) (5).

Preparações vacinais de clones de BCG recombinante que expressaram os antígenos heterólogos foram, então, administrados intraperitonealmente em grupos de 5 a 10 camundongos Balb/c, NIH, ou Swiss, a uma dose de 10⁶ unidades formadoras de colônia (CFUs) em 0,5 mL de salina apirogênica (Figura 3). Foram também administrados: salina, BCG e BCG contendo os vetores vazios, como grupos controles negativos e DTP, como controle positivo. Os camundongos foram sangrados por via retro-orbital a cada 30 dias por até 6 meses. A indução de resposta imune humoral foi avaliada por ELISA, onde se verificou a presença de anticorpos homólogos específicos contra os antígenos nos

soros dos camundongos imunizados. Para as preparações de BCG-S1PT, avaliou-se também a indução de resposta imune celular específica contra toxina pertussis (PT), dosando-se a liberação de IL-4 e IFN- γ por linfócitos esplênicos isolados dos camundongos imunizados, após estímulo com toxina pertussis detoxificada (dPT).

Camundongos imunizados com as diferentes vacinas de BCG recombinante expressando os antígenos de difteria, tétano e pertussis, foram então submetidos a ensaios para verificação do nível de proteção induzida. A proteção contra tétano é verificada pela capacidade do soro de camundongos vacinados em neutralizar a toxina tetânica ativa. O ensaio pode ser *in vivo*, onde a toxina tetânica é administrada aos camundongos vacinados, ou *in vitro* onde a toxina é misturada com o antissoro e o complexo administrado em camundongos não vacinados. Verifica-se a sobrevivência dos animais por 4 dias. A proteção contra difteria é avaliada pela capacidade de soroneutralização da toxina diftérica *in vitro*, verificando a toxicidade da mistura toxina-antissoro aplicada sobre culturas de células de mamífero (Células Vero). A sobrevivência das células é avaliada após 3 dias. A proteção contra pertussis é avaliada pela sobrevivência dos camundongos imunizados após desafio intracerebral com cepa virulenta de *Bordetella pertussis*, seguida por 14 dias.

pertussis (de 26,2 kDa). O S1PT recombinante localizou-se na fração de parede celular (Figura 4, 2 e 3), indicando ter havido uma tentativa de exportação do antígeno que não chegou a se completar (7).

Resposta Imune e Proteção induzida pelas vacinas de rBCG em camundongos

Camundongos Balb/c ou NIH foram imunizados com as preparações vacinais de rBCG-JFC, rBCG-LAFC, rBCG-JCRM197 ou rBCG-LACRM197, ou diferentes combinações desses. Um reforço foi realizado nas mesmas condições após 2 meses e meio. A formação de anticorpos anti-anatoxina tetânica ou diftérica foi avaliada mensalmente nos soros dos camundongos vacinados, durante 6 meses, por ELISA. Imunização com rBCG expressando FC em ambas as construções induziu a formação de anticorpos anti-anatoxina tetânica, mostrando, então, uma elevação dos títulos séricos após o reforço. A expressão de FC, com e sem fusão, com ssBlam mostrou-se equivalente, porém a resposta humoral foi mais elevada sem a fusão, indicando ser a expressão do gene nativo mais adequada. A imunização de camundongos com rBCG expressando CRM197 também induziu à formação de anticorpos anti-anatoxina diftérica, que foi aumentada após o reforço (6). Também, nesse caso, a construção sem fusão com ssBlam induziu a um nível maior de anticorpos anti-anatoxina diftérica. Quando os camundongos foram imunizados com uma mistura de rBCG expressando FC e rBCG expressando CRM197, ambos sem fusão, a resposta imune induzida contra cada um foi aumentada, evidenciando um efeito adjuvante de rBCG-FC sobre a resposta contra difteria e a recíproca, de rBCG-CRM197 contra o tétano. O soro obtido dos camundongos imunizados com a mistura de rBCG-FC e rBCG-CRM197 apresentou um padrão de isotipos de imunoglobulina preponderantemente IgG1, semelhante ao obtido com as vacinas convencionais compostas pelas respectivas anatoxinas. Esse mesmo soro foi capaz de neutralizar a atividade da toxina tetânica *in vitro* e *in vivo*. O mesmo soro foi também

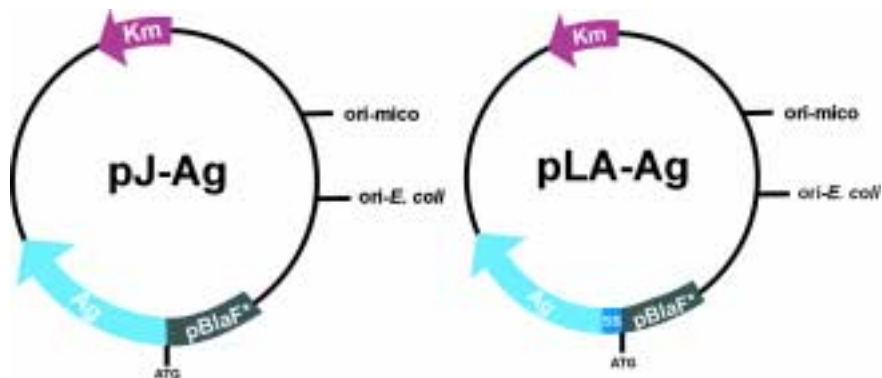


Figura 2. Vetores de expressão de antígenos heterólogos em micobactéria. Os vetores pJ-Ag e pLA-Ag contêm origem de replicação em *E.coli* (*ori-E.coli*) e origem de replicação em micobactéria (*ori-mico*), o gene de resistência à kanamicina (Km), e o promotor mutado da β-lactamase de *M.fortuitum*, pBlaF*. pJ-Ag expressa o gene do antígeno nativo e pLA-Ag expressa o gene em fusão, com a seqüência sinal da β-lactamase (ssBlam) (ss). Ag pode ser FC, CRM197 ou S1PT

capaz de neutralizar a atividade da toxina diftérica *in vitro* sobre células Vero.

Camundongos Swiss foram imunizados com as preparações vacinais de rBCG-S1PT, e a indução de resposta humoral específica contra PT seguida por ELISA do soro dos camundongos imunizados por até 6 meses. A indução de anticorpos anti-PT foi baixa. A resposta celular foi avaliada por liberação de IL-4 e IFN-γ de linfócitos esplênicos de animais imunizados. Uma elevada liberação de INF-γ pelos linfócitos, após estímulo com dPT, caracterizou uma resposta celular tipo Th1 (7). Esses camundongos foram submetidos a desafio intracerebral com dose letal de cepa virulenta de *B.pertussis*, apresentando uma elevada sobrevivência, comparável à obtida com a vacina tríplice (Tabela I).

Discussão

A expressão dos antígenos de difteria, tétano e pertussis em BCG através dos vetores de expressão em micobactéria contendo o promotor pBlaF* mostrou-se adequada, levando à indução de elevados níveis de anticorpos anti-anatoxina tetânica e diftérica, e de uma resposta celular contra a toxina pertussis. A resposta humoral obtida contra tétano e difteria pela mistura de rBCG-FC e rBCG-CRM197 foi capaz de neutralizar a atividade das respectivas toxinas tetânica e diftérica. Nossos resulta-

dos evidenciaram um efeito adjuvante recíproco de rBCG-FC e rBCG-CRM197. A expressão de FC em rBCG já havia sido descrita utilizando outros vetores, mas a proteção induzida foi parcial. A expressão de CRM197 em veículos vivos de apresentação de antígenos tem se mostrado difícil. Esta é a primeira vez que se obtém a expressão de CRM197 em BCG. A imunização de camundongos com rBCG-S1PT induziu a uma elevada resposta celular específica contra PT, que foi capaz de proteger os animais contra um desafio intracerebral com dose altamente virulenta *B. pertussis*. A expressão em BCG de S1PT em fusão com FC havia sido recentemente descrita, porém a resposta celular induzida foi baixa. Estamos investigando, atualmente, a resposta imune induzida pela administração conjunta de rBCG-FC, rBCG-CRM197 e rBCG-S1PT, com a expectativa de que propriedades adjuvantes dos antígenos combinados possam ainda aumentar a resposta imune induzida contra cada um dos patógenos.

Nossos estudos demonstraram que rBCG expressando os antígenos de DTP induzem resposta imune eficiente e protetora contra tétano, difteria e pertussis. No entanto, uma vez que essas são vacinas vivas, podendo permanecer no organismo por longos períodos, não seria aceitável sua administração em humanos, pela possibilidade de disseminação do gene de

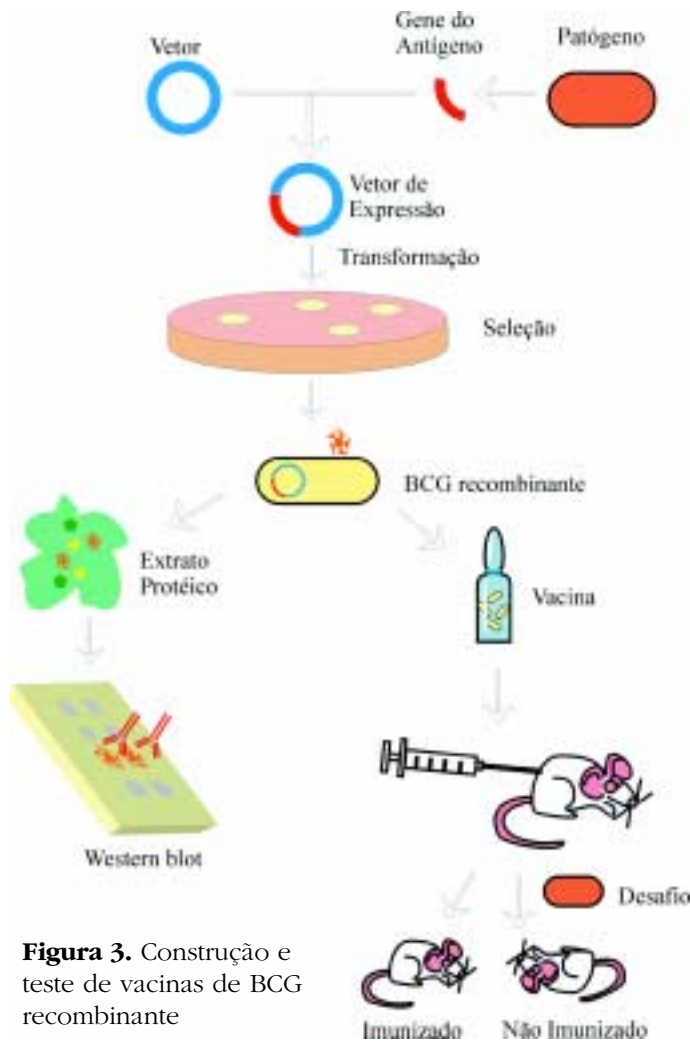


Figura 3. Construção e teste de vacinas de BCG recombinante

resistência a antibiótico para outras bactérias. Recentemente foi descrito um sistema de expressão em BCG, utilizando cepas auxotróficas, desenvolvidas para posterior complementação com um vetor que expresse o gene eliminado, conjuntamente com o antígeno recombinante. Dessa forma, evita-se a seleção com antibiótico e, conseqüentemente, o uso do gene de resistência, produzindo-se uma cepa de rBCG adequada para administração em humanos. Estamos atualmente desenvolvendo esse sistema no laboratório, para posterior verificação da resposta imune induzida pelos antígenos de DTP expressos dessa forma.

Em conjunto, este trabalho representa um fato inédito na expressão dos 3 antígenos de DTP em um mesmo sistema, com indução de resposta imune protetora contra cada um dos patógenos, condição necessária à implementação de qualquer uma das vacinas. Nossos resultados indicam que rBCG-DTP poderia constituir uma vaci-

na de dose única, eficiente e de baixo custo, contra tuberculose, tétano, difteria e pertussis, com claras vantagens para países em desenvolvimento.

Referências:

- 1) Levine, M.M., Lagos, R. 1997 Vaccines and vaccination in a historical perspective, 1-12. In M.M. Levine, G.C. Woodrow, J.B. Kaper, G.S. Cobon (ed.), New generation vaccines, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. NY.
- 2) Gicquel, B. 1995 BCG as a vector for the construction of multivalent recombinant vaccines. *Biologicals* 23, 113-8.
- 3) Fennelly, G.J., W.R. Jacobs Jr., and B.R. Bloom. 1997. The BCG as a recombinant vaccine vector, p. 363-385. In M.M. Levine, G.C. Woodrow, J.B. Kaper, G.S. Cobon (ed.), New generation vaccines, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. NY.
- 4) WHO/V&B/99.17 WHO Vaccine Preventable Diseases Monitoring



Figura 4. Localização da subunidade S1 da toxina pertussis em BCG recombinante analisada por Western blot. Lisado de BCG recombinante foi fracionado por centrifugação e particionado em detergente. As amostras correspondentes a cada fração ou localização foram aplicadas em gel de SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas a um imunoenensaio utilizando um soro policlonal contra a toxina pertussis

System, 1999 Global Summary.

5) Parish, T., P.R. Wheeler. 1998. Preparation of cell-free extracts from mycobacteria, p. 77-89. In, T. Parish and N.G Stoker (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 101: Mycobacteria Protocols, Humana Press, Totowa, NJ.

6) Miyaji, E.N., Mazzantini, R.P., Dias, W.O., Nascimento, A.L.T.O, Marcovistz, R., Matos, D.S., Raw, I., Winter, N., Gicquel, B., Rappuoli, R. and Leite, L.C.C. "Induction of Neutralizing Antibodies Against Diphtheria Toxin by Priming with Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG Expressing CRM₁₉₇, a Mutant Diphtheria Toxin", submetido (2000).

7) Nascimento, I.P., Dias, W.O., Mazzantini, R.P., Miyaji, E.N., Gamberini, M., Quintillo, W., Gebara, V.C., Cardoso, D.F., Ho, P.L., Raw, I. Winter, N., Gicquel, B., Rappuoli, R., Leite, L.C.C. "Recombinant BCG Expressing S1-Pertussis Toxin induces Protection against an Intracerebral Challenge with Live *Bordetella pertussis* in Mice", *Infection Immunity*, 68 (9), 4877-4883 (2000). †