

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO



Trabalho Acadêmico

**Vacina Recombinante contra Leptospirose:
construção, expressão e caracterização de rLTBLipL32**

André Alex Grassmann

Pelotas, 2008

ANDRÉ ALEX GRASSMANN

**Vacina Recombinante contra Leptospirose:
construção, expressão e caracterização de rLTBLipL32**

Trabalho Acadêmico apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas –
Bacharelado da Universidade
Federal de Pelotas como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin
Co-orientador: Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição

Pelotas, 2008

Banca examinadora:

Dr^a Fabiana Kömmling Seixas

Dr Éverton Fagonde da Silva

MSc Daiane Drawanz Hartwig

Dr Odir Antônio Dellagostin (orientador)

Dedicatória

A meus pais Jair e Adelina, minhas irmãs Andréa e Adriana e a todos os animais de laboratório sacrificados para o avanço da Ciência.

Agradecimentos

A Universidade Federal de Pelotas e ao Instituto de Biologia pela oportunidade de realizar um curso de graduação de qualidade e conviver em ambiente universitário.

Ao meu orientador, Odir Antônio Dellagostin, pela orientação e experiência, por acreditar no meu trabalho e pelos ensinamentos únicos que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Ao professor Fabrício Rochedo Conceição pela orientação, amizade e cobrança, por acreditar na minha capacidade de realizar este trabalho e pelos ensinamentos.

Aos meus pais, Jair e Adelina, por toda a minha vida, em especial pela dedicação em meus ideais, pela educação, pela formação moral, pela liberdade, pelo carinho, atenção e pelo apoio incondicional.

Ao minhas irmãs Andréa e Adriana, minhas sobrinhas Andressa, Larissa e Talita, e ao restante de minha família pelo companheirismo, pela confiança e por todos os momentos “mágicos” e inesquecíveis.

A minha namorada e amiga Naillê por todo o amor, carinho e apoio e pelos ótimos momentos vividos juntos.

Aos “colegas-orientadores” Fabiana, Éverton e Andréa pela amizade, pela descontração e acima de tudo pela confiança, cobrança e ensinamentos.

Aos amigos e colegas do Centro de Biotecnologia pela boa convivência agradável, incentivo e amizade.

Aos colegas e amigos da biologia, em especial ao Michel, Lucas, Vanessa, André e Mateus por todos os momentos vividos.

Aos demais que passaram por minha vida e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao Cnpq pela concessão de bolsa de iniciação científica.

Muito Obrigado!

*Muito pálidas, pela comparação, são as pretensões das
superstições e pseudociências; como é importante para nós nos
dedicarmos a entender a ciência, este esforço caracteristicamente humano*
Carl Sagan

RESUMO

Grassmann, André Alex. **Vacina Recombinante contra Leptospirose: construção, expressão e caracterização de rLTBLipL32**. 2008. 46f. Monografia (Graduação) – Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose, doença causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, é a mais difundida zoonose do mundo. Estima-se a ocorrência de cerca de 500.000 casos de leptospirose em todo o mundo, anualmente. Em 5 a 15% das infecções clínicas a doença progride para a forma grave, com taxas de letalidade entre 5 e 40%. As vacinas comerciais disponíveis – bacterinas – estimulam imunidade restrita a poucos sorovares. Devido ao grande número de sorovares patogênicos é desejável o desenvolvimento de uma vacina de amplo espectro contra a leptospirose. A LipL32 é a principal proteína de membrana externa, e é conservada entre as leptospirosas patogênicas e ausente nas não-patogênicas, sendo um candidato promissor ao desenvolvimento de uma vacina recombinante de subunidade. Vacinas recombinantes dependem de adjuvantes imunológicos para potencializar sua imunogenicidade. A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) é um forte adjuvante imunológico e estimula uma ampla e duradoura resposta sistêmica com secreção de anticorpos contra antígenos co-administrados ou fusionados. O objetivo deste trabalho foi construir, expressar e caracterizar uma quimera recombinante composta pela fusão da LTB com LipL32, visando o desenvolvimento de vacina contra leptospirose. O gene *lipL32* foi amplificado por PCR e inserido no vetor de expressão em *E. coli* pAE-*ltb*, originando o vetor pAE-*ltblipL32*. O vetor recombinante foi inserido na cepa de expressão *E. coli* BL21 Star™ (DE3). Quando a cultura atingiu a fase log, a expressão da quimera foi induzida com IPTG. A proteína foi lavada com PBS-Triton X-100, solubilizada com *N-Lauroyl-Sarcosine* e dialisada. A quimera purificada foi avaliada em SDS-PAGE e *Western blot* (WB) com soro policlonal de coelho anti-LTB, anticorpo policlonal (MAb) anti-LipL32 e MAb anti-6xhis. A quimera rLTBLipL32 foi eficientemente construída e expressa em *E. coli*, apresentando aproximadamente 41 kDa. No WB, todos os soros reconheceram a quimera, sugerindo que a fusão não alterou significativamente a conformação das proteínas. A imunogenicidade da quimera será avaliada em modelo animal, assim como o seu potencial protetor através de desafio com uma cepa patogênica de *Leptospira*.

Palavras chave: Leptospirose. Vacina recombinante de subunidade. LTB. LipL32. LTBLipL32.

ABSTRACT

Grassmann, André Alex. **Vacina Recombinante contra Leptospirose: construção, expressão e caracterização de rLTBLipL32.** 2008. 46f. Monografia (Graduação) – Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis, a disease caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*, is the most widespread zoonosis in the world. It is estimated that 500,000 cases of severe leptospirosis occur annually. Five to fifteen percent of all clinical cases evolve to the severe form of the disease, with death occurring in 5 to 40% of the severe cases. Commercially available vaccines - whole cell bacterins - stimulate immunity restricted to a few serovars. Thus, the development of large spectrum vaccines against leptospirosis is desired. LipL32 is the major outer membrane protein in leptospires and it is conserved among pathogenic and absent in non-pathogenic leptospires, making it a promising candidate for subunit vaccine development. Recombinant vaccines depend on immunological adjuvants to increase their immunogenicity. The B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB) is a strong immunological adjuvant and stimulates a broad and lasting systemic immune response with antibody secretion against co-administrated or coupled antigens. The aim of this work was to construct, express and characterize a recombinant chimera composed by the fusion of LTB and LipL32 proteins, to be tested as a vaccine candidate against leptospirosis. The *lipL32* gene was amplified by PCR and inserted on the *E. coli* expression vector pAE-*ltb*, resulting in pAE-*ltblipL32*. This recombinant vector was introduced in the *E. coli* BL21 Star™ (DE3) expression strain. When the culture reached the log phase, recombinant chimera expression was induced with IPTG. The protein was washed with PBS-Triton X-100, solubilized with N-Lauroyl-Sarcosine and dialyzed. The purified chimera was evaluated by SDS-PAGE and Western blot (WB). WB analysis was carried out, with rabbit polyclonal serum anti-LTB, monoclonal antibody (MAb) anti-LipL32 and MAb anti-6xhis. The rLTBLipL32 was efficiently constructed and expressed in *E. coli*, showing about 41 kDa. In WB, all the serum recognized the chimera, suggesting that the fusion did not significantly alter the original protein conformation. The immunogenicity of the chimera will be evaluated in animal models revealing its protective potential, through challenge with a pathogenic strain of *Leptospira*.

Key words: Leptospirosis. Subunit recombinant vaccine. LTB. LipL32. LTBLipL32.

Lista de Figuras

Figura 1	Processo de clonagem de <i>lipL32</i> no vetor pAE- <i>tb</i>	29
Figura 2	Estratégias utilizadas para obtenção e confirmação de clones recombinantes de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas com pAE- <i>ltb lipL32</i>	30
Figura 3	Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% com extrato das células após indução de expressão em larga escala da quimera rLTBLipL32.....	31
Figura 4	<i>Western Blot</i> da quimera com anticorpos específicos para cada subunidade.....	32

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Revisão.....	11
1.1.1 Microbiologia.....	11
1.1.2 Patogênese.....	12
1.1.3 Manifestações clínicas.....	13
1.1.4 Epidemiologia.....	14
1.1.5 Controle e tratamento.....	15
1.1.6 Vacinas contra a leptospirose.....	15
1.1.7 LipL32.....	17
1.1.8 LTB.....	18
1.2 Objetivo.....	20
1.2.1 Objetivo geral.....	20
1.2.2 Objetivos específicos.....	20
2 ARTIGO.....	21
2.1 Resumo.....	21
2.2 Abstract.....	22
2.3 Introdução.....	23
2.4 Materiais e métodos.....	24
2.4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo.....	24
2.4.2 Desenho dos <i>primers</i> e amplificação do gene <i>lipL32</i> por PCR.....	25
2.4.3 Clonagem de <i>lipL32</i> no vetor pAE- <i>ltb</i>	25
2.4.5 Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	26
2.4.6 Seleção e confirmação de clones recombinantes.....	26
2.4.7 Expressão heteróloga de rLTBLipL32.....	27
2.4.8 Purificação da proteína recombinante.....	27
2.4.9 Caracterização de rLTBLipL32 por <i>Western blot</i>	28
2.5 Resultados.....	28
2.5.1 Amplificação de <i>lipL32</i> e clonagem no pAE- <i>ltb</i>	28
2.5.2 Obtenção de clones recombinantes.....	29

2.5.3 Expressão e purificação de rLTBLipL32.....	30
2.5.4 Caracterização de rLTBLipL32 por <i>Western blot</i>	31
2.6 Discussão.....	32
3 CONCLUSÕES.....	37

1 INTRODUÇÃO

Este Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Ciências Biológicas-Bacharelado está apresentado na forma de um artigo científico, proporcionando uma divulgação objetiva e rápida dos resultados obtidos. O artigo trata da construção, expressão e caracterização antigênica de uma quimera recombinante composta pela subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) e da lipoproteína de membrana externa de leptospiros patogênicos (LipL32). Pretende-se, futuramente, submeter este artigo a um periódico da área de microbiologia/vacinologia. A monografia de conclusão de curso apresenta inicialmente uma revisão que aborda os principais aspectos da leptospirose, contextualizando o artigo científico.

1.1 Revisão

1.1.1 Microbiologia

O gênero *Leptospira* pertence à ordem Spirochaetales, e à família Leptospiraceae que ainda inclui o gênero *Leptonema*. Atualmente o gênero *Leptospira* está dividido em 18 espécies, sendo 9 patogênicas, incluindo *Leptospira interrogans*. Cerca de 260 sorovares e 29 sorogrupos já foram descritos (FAINE et al., 1999; BARTHI et al., 2003).

As leptospiros são bactérias com motilidade, aeróbios obrigatórios, finas e com dobramento em espiral, medindo cerca de 0,25µm x 6-25µm em tamanho, com diâmetro de 0,45µm. Possuem dois filamentos axiais (flagelos periplasmáticos) com inserção polar, alocados no espaço periplasmático. (HAAKE, 2000a; FAINE et al., 1999). O genoma das leptospiros é composto por dois cromossomos circulares, um com 4279kb e outro, menor, com 350kb e não há registros de plasmídeos (REN et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004a; NASCIMENTO et al., 2004b; PICARDEAU et al., 2008).

A leptospira apresenta uma estrutura de dupla membrana, na qual a membrana citoplasmática e a parede celular de peptidoglicano estão muito

associadas, revestidas por uma membrana externa contendo lipopolissacarídeo (LPS) e várias lipoproteínas (proteínas de membrana externa). A diversidade de sorovares de leptospiros resulta da heterogeneidade estrutural dos carboidratos componentes do LPS (ZUERNER et al., 2000; LEVETT, 2001; McBRIDE et al., 2005).

Através de técnicas específicas, foram identificadas diversas proteínas expostas na superfície, como a porina OMPL1, LipL45, LipL41, LipL32, LipL21 e LipL48. As proteínas LipL32 e LipL21 são expressas em todas as leptospiros patogênicas (HAAKE, 2000a, 2000b, HAAKE; MATSUNAGA, 2002; CULLEN et al., 2002, 2005). As proteínas Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like proteins*), que possuem repetidos domínios semelhantes aos encontrados em outros microrganismos, são considerados fatores de virulência e estão presentes na superfície de leptospiros patogênicas e ausentes em saprófitas (KOIZUMI; WATANABE, 2004; McBRIDE et al., 2005). Ristow et al. (2007) identificou o primeiro fator de virulência em leptospira patogênica, a proteína de superfície de membrana chamada Loa22 é expressa na superfície de leptospira, e provavelmente está envolvida na patogênese da leptospirose.

1.1.2 Patogênese

A infecção em humanos resulta do contato direto ou indireto com a urina de animais infectados, através de água, solo ou alimentos contaminados. A leptospira pode penetrar no organismo através da pele íntegra (quando imersa em água) ou lesada, e através das mucosas (LEVETT, 2001; BARTHI et al., 2003; BHARADWAJ et al., 2004).

Após superar mecanismos de defesa não-específicos, as leptospiros se multiplicam no sangue, na linfa, no fluido cérebro espinhal e em todos os tecidos, constituindo a fase aguda da doença que cursa com leptospiremia (FAINE et al., 1999). Na lesão primária as leptospiros danificam pequenos vasos sanguíneos, ocorrendo o rompimento dos capilares e migração das bactérias para os espaços extravasculares. As lesões preliminares são atribuídas à ação mecânica dos microrganismos dentro da parede dos vasos sanguíneos e são seguidas por hemorragias (BAROCCHI et al., 2002).

Quanto aos mecanismos específicos de patogênese, a motilidade, a habilidade de se locomover em meio viscoso, parece ter um papel importante, pois está envolvida no processo de infecção inicial e disseminação do organismo a partir de seu sítio de entrada até os órgãos finais, como fígado, rins, pulmão e cérebro (BHARTI et al., 2003).

A leptospirose é mantida pela persistente colonização de túbulos renais proximais, portanto os animais infectados podem permanecer assintomáticos e albergar a *Leptospira* por tempo indefinido. Os humanos não são importantes transmissores, embora raramente possam excretar leptospiros na urina (LEVETT, 2001).

Em relação à imunidade do hospedeiro, estão envolvidas a humoral com produção de anticorpos, principalmente anti-lipopolissacarídeos, e a participação da imunidade mediada por células (DORIGATTI et al., 2005). Apesar de a imunidade celular ser direcionada principalmente contra patógenos intracelulares, muitos estudos demonstraram este tipo de resposta contra *Leptospira*, um organismo extracelular. Acredita-se no envolvimento de respostas Th1, caracterizadas por produção de IFN- γ por células CD4+ e γ dT (NAIMAN et al., 2001; BALDWIN et al., 2002; KLIMPEL et al., 2003). A produção de interleucinas (principalmente IL-6) e fator de necrose tumoral já tiveram sua participação relacionada na resposta imune celular contra leptospiros (DORIGATTI et al., 2005).

Elevados graus de leptospiremia na fase aguda, podem acarretar títulos de aglutinação moderados, sugerindo o envolvimento da resposta celular na patogênese. (TRUCCOLO et al., 2001).

1.1.3 Manifestações clínicas

A infecção produz um grande espectro de manifestações clínicas. A fase inicial da doença, forma anictérica, é caracterizada por febre, calafrios, dor de cabeça e severas mialgias. Em 5 a 15 % das infecções clínicas a doença progride para severas complicações multissistêmicas, tais como icterícia, falha renal e manifestações hemorrágicas, com taxas de mortalidade entre 5 e 40 % (FAINE et al., 1999; MAROTTO et al., 1999; LEVETT, 2001; BARTHI et al., 2003; RICALDI; VINETZ, 2006).

A apresentação clínica da forma anictérica é bifásica, com fase aguda ou séptica permanecendo em média 7 dias e após este período é acompanhada da fase imune, caracterizada pela produção de anticorpos e o aparecimento de leptospiras na urina. A maioria das complicações ocorre na fase imune da doença, associada à localização das leptospiras nos tecidos (FAINE et al., 1999; RICALDI; VINETZ, 2006).

Originalmente descrita pelo alemão Adolf Weil, em 1886, a tríade febre, icterícia e esplenomegalia causada por leptospira é chamada de Doença de Weil. Porém, o termo doença de Weil descrito usualmente se refere à icterícia, insuficiência renal e hemorragia (mais comum pulmonar). Além destes sintomas, a doença de Weil pode estar acompanhada de miocardite e choque (BARTHI et al., 2003; SEGURA et al., 2005; SPICHLER et al., 2005). De uma forma geral, os sinais e sintomas mais comuns da leptospirose incluem febre, calafrios, mialgia (principalmente em região lombar e panturrilhas) sufusão conjuntival, anorexia, vômitos e prostração (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

1.1.4 Epidemiologia

A epidemiologia da doença está associada ao contato humano com roedores infectados, geralmente em instalações rurais ou em centros urbanos pobres e superpovoados. Em países desenvolvidos, a leptospirose está associada com atividades recreativas, enquanto que em países em desenvolvimento as estações chuvosas e enchentes, associadas ao precário saneamento, provocam epidemias com mortalidade em grandes centros urbanos (LEVETT, 2001; BARTHI et al., 2003; RICALDI; VINETZ, 2006). A leptospirose é mais incidente em locais de clima tropical ou subtropical, devido ao aumento da sobrevivência das leptospiras em ambientes de clima quente e úmido (VINETZ, 2001; BARTHI et al., 2003).

Grandes surtos de leptospirose ocorreram durante a última década na Nicarágua, Índia e Brasil, sendo reconhecida como uma importante doença infecciosa emergente ou reemergente (TREVEJO et al., 1995; KO et al., 1999; BHARADWAJ et al., 2002, 2004). Devido ao grande espectro de espécies animais que servem como reservatório, a leptospirose é considerada a doença zoonótica mais generalizada (HARTSKEERL, 2006).

Estima-se a ocorrência de cerca de 500.000 casos de leptospirose severa por ano, em todo o mundo (HARTSKEERL, 2006). Porém acredita-se que estes números estejam fortemente subestimados, uma vez que a vigilância sanitária e a notificação de leptospirose não são satisfatórias nos países onde as condições climáticas, ecológicas e sócio-culturais são favoráveis às altas incidências da doença. Assim, leptospirose é uma doença grosseiramente negligenciada (HOTEZ et al., 2008). A dificuldade de diagnóstico contribui para este quadro, uma vez que a leptospirose possui uma grande variedade de manifestações clínicas e é facilmente confundida com outras doenças infecciosas que apresentam síndromes febris indiferenciadas, tais como a malária, dengue, influenza, febres virais hemorrágicas (VINETZ, 2001; HARTSKEERL, 2006).

1.1.5 Controle e tratamento

Poucas são as medidas profiláticas tomadas para evitar a disseminação da leptospirose. O controle depende principalmente de medidas higiênico-sanitárias básicas, como a redução das populações de animais carreadores de leptospirosas (principalmente roedores domiciliares), limpeza e desinfecção de residências, além de quintais e locais de trabalho, e a drenagem de coleções de água (McBRIDE et al., 2005; HOUPIKIAN et al., 2002).

Durante a infecção, o tratamento contra a leptospirose se dá pela administração de antibióticos e, em seres humanos, está restrito a penicilina, ampicilina, amoxicilina, oxitetraciclina e doxiciclina. O efeito dos antibióticos é mais evidente na supressão da leptospirúria e a antibioticoterapia com penicilina e doxiciclina, reduz a duração e a gravidade dos sintomas, mas a sua influência na mortalidade é controversa (LEVETT, 2001).

1.1.6 Vacinas contra a leptospirose

Os prejuízos econômicos e à saúde pública causados pela leptospirose justificam o uso de vacinas contra leptospira em populações animais e humanas. Apesar dos esforços de muitos grupos de pesquisa em todo o mundo, atualmente

não há vacinas para uma eficiente prevenção de leptospirose em humanos (McBRIDE et al., 2005; KOIZUMI; WATANABE, 2005; THONGBOONKERD, 2008).

As vacinas atualmente disponíveis são bacterinas (célula inteira morta) e direcionam a resposta imune principalmente contra o LPS. Estas bacterinas não fornecem proteção cruzada contra os diferentes sorovares de leptospirosas patogênicas (McBRIDE et al., 2005; KOIZUMI; WATANABE, 2005; PETERSEN et al., 2001; BHARTI et al., 2003; GAMBERINI et al., 2005). Desta forma, o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra leptospirose, com imunoproteção cruzada contra diferentes sorovares, permanece um desafio, e por isso, os esforços para o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra leptospirose estão focadas em proteínas de membrana externa (BRANGER et al., 2001; CULLEN et al., 2005; HAAKE et al., 1999; HAAKE et al., 2000b; MATSUNAGA et al., 2002; PALANIAPPAN et al., 2002).

A imunização com OMPL1 e LipL41 recombinantes forneceram proteção sinérgica contra o desafio letal em hamsters. Porém, nenhuma proteção foi observada quando estas foram administradas individualmente (HAAKE et al., 1999). Mais recentemente, formas recombinantes de outras prováveis proteínas de membrana externa de leptospirosas, tais como Lp1454, Lp1118 e Mcell, mostraram-se imunoprotetoras, individualmente e sinergeticamente, contra a infecção em hamsters (CHANG et al., 2007) .

Nos últimos anos, surgiram fortes evidências de que as proteínas LigA e LigB seriam fortes candidatos à vacina contra a leptospirose, pois em estudos realizados em modelos de hamsters, estas proteínas forneceram imunoproteção (KOIZUMI; WATANABE, 2004; PALANIAPPAN et al., 2006; SILVA et al., 2007). Porém, a importância de LigB para a patogenicidade de leptospirosas foi questionada em um estudo recente (CRODA et al., 2008), onde o gene *ligB* foi deletado do genoma de uma cepa patogênica de leptospirosas, e esta conservou suas características letais.

1.1.7 LipL32

A lipoproteína de membrana externa LipL32 (também chamada de *hemolysis-associated protein 1*, Hap1), que possui um papel importante na infecção leptospiral, é o mais promissor candidato para uma vacina recombinante de subunidade contra leptospirose. O interesse em LipL32 como uma vacina deriva do achado que proteínas do extrato bruto de leptospirosas, com tamanho em torno de 31-34kDa, proporcionam proteção cruzada em gerbils (SONRIER et al., 2000). Segundo análises do perfil protéico, LipL32 é a proteína mais abundante da membrana externa de *Leptospira* (ZUERNER et al., 1991; HAAKE et al., 2000a). Além disso, a sequência de nucleotídeos que codifica LipL32, assim como sua expressão é altamente conservada entre leptospirosas patogênicas e ausente na membrana externa de não-patogênicas (HAAKE et al., 2000b). A LipL32 demonstrou-se com expressão aumentada quando comparado tecido hepático de cobaia com infecção aguda e leptospira cultivada “in vitro”, indicando que pode haver influência na patogênese da doença (NALLY et al., 2007).

A chave para a antigenicidade de LipL32 está no seu alto nível de expressão em leptospirosas patogênicas e nas modificações lipídicas no aminoácido terminal cisteína (HAAKE et al., 2000a). Como outras lipoproteínas bacterianas, LipL32 é um estimulador potente da imunidade inata por CD14 e TLR2 (WERTS et al., 2001). LipL32 é expressa durante a infecção no hospedeiro sendo altamente antigênica (HAAKE et al., 2000b). Mais de 95 % dos pacientes com leptospirose produzem anticorpos contra LipL32 durante a infecção (GUERREIRO et al., 2001). Análises imunohistoquímicas de rins de hamsters infectados com *Leptospira kirschneri* demonstraram intensa reatividade com anticorpos anti-LipL32 (BARNETT et al., 1999). Por estes motivos, LipL32 foi alvo de diversos estudos para o desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos e eficientes (FERNANDES et al., 2006; FLANNERY et al., 2001; DEY et al., 2004; TAHILIANI et al., 2005; BOONYOD et al., 2005).

A vacinação com LipL32 mediada por adenovirus ou vacina de DNA induziu produção de anticorpos, com imunidade e proteção-cruzada parcial, porém não houve proteção quando apresentada como proteína recombinante (BRANGER et al., 2001, 2005). Camundongos vacinados com LipL32 recombinante, BCG recombinante (rBCG) expressando LipL32 e vacina de DNA (codificando o gene

lipL32) induziram resposta imune específica, através da produção de anticorpos anti-LipL32, que por sua vez reconheceram a proteína nativa, na parede de leptospira, e inibiram seu crescimento *in vitro* (SEIXAS et al., 2007a). Em um experimento realizado em hamsters, rBCG expressando LipL32 conferiu imunidade protetora frente ao desafio com cepa patogênica de leptospira. Além disso, os animais sobreviventes não apresentaram nenhum sinal clínico ou histopatológico da doença e a tentativa de isolamento de leptospira de rins foi negativa (SEIXAS et al., 2007b).

1.1.8 LTB

As vacinas de subunidade são construídas de forma a incluir apenas os antígenos requeridos para a imunização protetora, sendo considerados mais seguros que vacinas vivas atenuadas ou bacterinas (BURNETTE, 1991). Porém, a pureza destes antígenos de subunidade e a ausência de componentes imunomodulatórios e auto-adjuvantes, associados com as vacinas atenuadas e bacterinas, normalmente resultam numa imunogenicidade mais fraca. Formulação de antígenos vacinais com potentes adjuvantes imunológicos é uma estratégia para aumentar a performance de vacinas de subunidade (GUPTA et al., 1993).

Produtos microbianos foram avaliados como moduladores para ativar a imunidade adaptativa, dentre eles, uma nova classe de imunoadjuvantes vem ganhando destaque na produção de vacinas recombinantes de subunidade. Esta classe é representada pelas enterotoxinas termolábeis de *Vibrio cholerae* (CT) e *Escherichia coli* (LT), que exibem mais de 80 % de identidade (SIMMONS et al., 2001a). A toxina LT é formada por uma única molécula de subunidade A (LTA), de 27kDa, com atividade ADP ribosiltransferase, ligada a um pentâmero de subunidade B (LTB), com 11,6 kDa cada, altamente estável, com função de ligação ao receptor gangliosídeo GM1, de células de mamíferos. A ligação de LTB com o gangliosídeo GM1 permite que a subunidade A (tóxica) entre na célula (SIXMA; et al., 1991; SPANGLER, 1992).

O uso de LT como adjuvante não é recomendado, em função da toxicidade da subunidade A, já a subunidade B, por não apresentar esta toxicidade, pode ser utilizada como adjuvante (DE HAAN et al., 1998). Um estudo com CTB e LTB recombinante demonstrou o potencial imunomodulador destas proteínas, e LTB

apresentou efeito adjuvante de mucosa mais potente que CTB (MILLAR et al., 2001). A ligação de LTB ao gangliosídeo GM1 é necessária, porém não suficiente, para a função adjuvante da LTB (DE HAAN et al., 1998; NASHAR et al., 1996a).

As subunidades atóxicas CTB e LTB são potentes adjuvantes de mucosa e estimulam uma forte resposta sistêmica e secretória de anticorpos (IgAs) contra antígenos coadministrados ou acoplados (VERWEIJ et al., 1998). Diversos antígenos podem ser conjugados a LTB através de fusão genética (produzindo quimeras protéicas) ou por conjugação química. LTB recombinante (rLTB), fusionada com antígenos recombinantes, representa uma nova alternativa no desenvolvimento de vacinas contra patógenos que invadem o hospedeiro através das mucosas (SCHODER; WILL, 1989; GREEN et al., 1996; DE HAAN et al., 1998; WELTZIN et al., 2000; RICHARDS et al., 2001; FINGERUT et al., 2006; PITCOVSKI et al., 2006).

Em um experimento realizado com camundongos a LTB apresentou atividade adjuvante para as glicoproteínas de herpes vírus do tipo 1, induzindo um alto grau de proteção contra infecção ocular com o vírus vivo (RICHARDS et al., 2001). Em outro estudo, LTB foi coadministrada, como adjuvante de mucosa, com o antígeno urease de *Helicobacter pylori*, para induzir imunidade protetora contra infecção *in vitro* de camundongos com *Helicobacter felis* e *Helicobacter pylori* (WELTZIN et al., 2000).

Estudos têm apontado a LTB como um adjuvante completo, capaz de induzir resposta imune celular, incluindo células T citotóxicas (SIMMONS et al., 2001b) e humoral, estimulando resposta sistêmica e secretória de anticorpos contra antígenos co-administrados ou fusionados (GREEN et al., 1996; VERWEIJ et al., 1998; WELTZIN et al., 2000; FINGERUT et al., 2006; CONCEIÇÃO et al., 2006; PITCOVSKI et al., 2006; da SILVA RAMOS ROCHA et al., 2008).

Em geral, o processamento de antígenos exógenos induz a apresentação dos peptídeos por MHC classe II (HARDING et al., 1996), porém, a LTB mostra-se capaz de dirigir a apresentação destes antígenos para a rota de antígenos endógenos, ou seja, através da via de apresentação MHC classe I, podendo ser reconhecidas por células T citotóxicas (DE HAAN et al., 2002). A LTB também ativa a diferenciação seletiva de linfócitos (WILLIAMS et al., 2000), influencia na maturação e ativação de células dendríticas (PETROVSKA et al., 2003; PITCOVSKI et al., 2006) e aumenta a apresentação de antígenos via MHC II (NASHAR et al.,

2001; BONE et al., 2002). Acredita-se que estas sejam as bases de seu efeito imunoestimulatório (FINGERUT et al., 2006).

A imunogenicidade de uma vacina recombinante de subunidade contendo LTB fusionada a R1 (rLTBR1), um antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*, foi avaliada em camundongos. LTB potencializou a resposta imune tanto humoral quanto celular, com grande produção sistêmica de anticorpos anti-R1 (CONCEIÇÃO et al., 2006). Em um estudo mais recente, LTBR1 administrada através de vacinação com rBCG expressando esta quimera, estimulou altos índices de IgA contra o antígeno micoplasmal e induziu resposta imune do tipo celular, comprovando o efeito imunomodulador de LTB (da SILVA RAMOS ROCHA et al., 2008).

Testes realizados em voluntários humanos comprovaram a segurança do uso de LTB utilizando as vias transcutânea, nasal e oral (HASHIGUCCI et al., 1996; KOTLOFF et al., 2001; HAGIWAR et al., 2001; GÜEREÑA-BURGUEÑO et al., 2002).

1.2 Objetivo

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi a obtenção de um antígeno vacinal eficaz contra a leptospirose, utilizando a LTB como adjuvante imunológico.

1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar a fusão dos genes *lipL32* e *ltb* e a clonagem no vetor pAE de expressão em *E. coli*;
- Obter de clones recombinantes da cepa *E. coli* TOP10 transformada com pAE-*ltb**lipL32*;
- Realizar a expressão heteróloga de rLTBLipL32 em *E. coli* BL21 Star™ (DE3) e purificar a quimera recombinante;
- Caracterizar, mediante *Western blot* com anticorpos específicos, as subunidades LTB e LipL32;

2 ARTIGO

Vacinas Recombinantes contra Leptospirose: construção, expressão e caracterização de rLTBLipL32

GRASSMANN, André A*; FELIX, Samuel R; SEIXAS, Fabiana K; SILVA, Éverton F; FAGUNDES, Michel Q; CONCEIÇÃO, Fabricio R; DELLAGOSTIN, Odir A.

Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia - Cenbiot –
UFPel – Universidade Federal de Pelotas

* Autor para correspondência

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas. CP 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil, Fone: +55 53 32757350. E-mail: grassmann.aa@gmail.com

2.1 Resumo

A leptospirose é uma zoonose de importância global causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Devido ao grande número de sorovares patogênicos é desejável o desenvolvimento de uma vacina de amplo espectro contra a leptospirose. A LipL32 é a principal proteína de membrana externa, sendo conservada entre as leptospiras patogênicas e ausente nas não-patogênicas. Neste trabalho construímos uma quimera recombinante composta pela LipL32 fusionada à subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB), um potente adjuvante molecular que estimula uma forte resposta imune contra antígenos coadministrados ou fusionados. O gene *lipL32* foi amplificado por PCR e inserido no vetor de expressão pAE-*ltb*, originando o vetor pAE-*ltblipL32*. A proteína recombinante rLTBLipL32 foi expressa em *E. coli* BL21 Star™ (DE3), purificada e analisada em *Western blot* (WB) com soro policlonal de coelho anti-LTB, anticorpo monoclonal (MAb) anti-LipL32 e MAb anti-6xhis. A quimera rLTBLipL32 foi eficientemente construída e expressa em *E. coli*, apresentando aproximadamente 41 kDa. No WB, todos os soros reconheceram a quimera, sugerindo que a fusão não alterou significativamente a conformação das proteínas.

Palavras chave: leptospirose; vacina recombinante de subunidade; LTB; LipL32; LTBLipL32;

2.2 Abstract

Leptospirosis is a globally important zoonosis caused by pathogenic spirochetes of the *Leptospira* genus. As a result of the great amount of pathogenic *Leptospira* serovars, large spectrum vaccine development is desired. LipL32 is the main leptospira outer membrane protein, it's conserved in pathogenic and absent in non pathogenic leptospiras, making it a good vaccine candidate. We have built a recombinant chimera, composed by LipL32 fused with the subunit B of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB), a potent immunological adjuvant that stimulates broad and lasting systemic immune response with antibody secretion against coadministered or coupled antigens. The *lipL32* gene was amplified by PCR and inserted on the *E. coli* expression vector pAE-*ltb*, resulting in pAE-*ltblipL32*. This recombinant vector was introduced in the *E. coli* BL21 Star™ (DE3) expression strain, the recombinant rLTBLipL32 protein was purified and analyzed by Western Blot (WB) with rabbit policlonal serum anti-LTB, monoclonal antibody (MAb) anti-LipL32 and MAb anti-6xhis. The chimera rLTBLipL32 was efficiently built and expressed in *E. coli*, presenting approximately 41kD. The WB analysis showed that all serums recognized the chimera, suggesting tat the fusion did not alter the original folding of the proteins.

2.3 Introdução

A leptospirose é uma zoonose de importância global causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. É considerada uma doença emergente que afeta humanos e diversas espécies de animais domésticos e silvestres (McBRIDE et al., 2005; BARTHI et al., 2003). Está associada ao contato humano com roedores infectados, geralmente em instalações rurais ou em centros urbanos pobres e superpovoados, especialmente nos trópicos (LEVETT, 2001; BARTHI et al., 2003; RICALDI; VINETZ, 2006). Estima-se a ocorrência de cerca de 500.000 casos de leptospirose severa por ano, em todo o mundo (HARTSKEERL,

2006). Em 5 a 15 % das infecções clínicas a doença progride para severas complicações multissistêmicas, tais como icterícia, falha renal e manifestações hemorrágicas, com taxas de fatalidade entre 5 e 40 % (FAINE et al., 1999; MAROTTO et al., 1999; LEVETT, 2001; BARTHI et al., 2003; RICALDI; VINETZ, 2006). As vacinas atualmente disponíveis são bacterinas (célula inteira e morta) e direcionam a resposta imune contra o LPS (McBRIDE et al., 2005). Existem cerca de 260 sorovares identificados de leptospiros patogênicas, e esta diferença antigênica é atribuída principalmente ao LPS. Desta forma, as bacterinas não fornecem proteção cruzada contra os diferentes sorovares que podem causar a leptospirose (McBRIDE et al., 2005; KOIZUMI; WATANABE, 2005; PETERSEN et al., 2001; BHARTI et al., 2003; GAMBERINI et al., 2005).

Frente a esta situação, o desenvolvimento de uma vacina de amplo espectro, com imunoproteção cruzada contra diferentes sorovares de leptospira, permanece um desafio. A proteína de membrana externa LipL32 (também chamada de *hemolysis-associated protein 1* - Hap1), que possui um papel importante na infecção leptospiral, é o mais promissor candidato para uma vacina com estas características. LipL32 é expressa durante a infecção no hospedeiro sendo altamente antigênica (HAAKE et al., 2000b), e mais de 95 % dos pacientes com leptospirose produzem anticorpos contra LipL32 durante a infecção (GUERREIRO et al., 2001). A seqüência de nucleotídeos que codifica LipL32, assim como sua expressão é altamente conservada entre leptospiros patogênicas e ausente nas não-patogênicas. Estudos recentes demonstraram o potencial protetor parcial de LipL32, quando apresentada ao sistema imune mediada por adenovírus e vacina de DNA em modelos de gerbils para leptospirose (BRANGER et al., 2001, 2005) ou por vacinação com rBCG em modelos de hamster (SEIXAS et al., 2007b). Porém, LipL32 não teve efeito protetor quando avaliada como vacina recombinante de subunidade (BRANGER et al., 2005).

As vacinas recombinantes, apesar de serem mais seguras do que as vacinas convencionais são menos imunogênicas. Assim, adjuvantes são componentes essenciais para aperfeiçoar a eficiência destas vacinas (DZIERZBICKA; KOLODZIEJCZYK, 2006). A subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB) foi avaliada como adjuvante molecular, sendo esta subunidade não-tóxica caracterizada como um potente adjuvante parenteral e de mucosa, que estimula uma potente resposta imune contra antígenos coadministrados ou fusionados (DE HAAN

et al., 1998; CONCEIÇÃO et al., 2006; WELTZIN et al., 2000; da SILVA RAMOS ROCHA et al., 2008). LTB possui a capacidade de entrar nas células de mamíferos e ativar eventos de sinalização celular que modulam as funções de células do sistema imune (WILLIAMS et al., 2000). Assim, permite a diferenciação seletiva de populações de linfócitos (WILLIAMS et al., 2000), conduz à ativação de marcadores em células B (MHC II, B7, CD40, CD25 e ICAM-1) (NASHAR et al., 1997), ativa células apresentadoras de antígenos, têm ação de co-estimulação de células T CD4+ (YAMAMOTO et al., 1997), induz a ativação e maturação de células dendríticas derivadas de macrófagos (PITCOVSKI et al., 2006). A ligação de LTB ao gangliosídeo GM1 é necessária, porém não suficiente, para a função adjuvante da LTB. (DE HAAN et al., 1998; NASHAR et al., 1996a). Em camundongos, a LTB apresentou atividade adjuvante para antígenos de subunidade que induziram resposta imune protetora contra *Streptococcus* do grupo A (DALE et al., 1995). A atividade adjuvante de LTB também foi demonstrada quando em combinação com antígenos de herpes vírus tipo 1 (RICHARDS et al., 2001), e em outro trabalho, com um antígeno de *Helicobacter pylori* (WELTZIN et al., 2001), e em ambos houve proteção frente a desafios com o patógeno respectivo.

Neste trabalho, nós construímos um vetor de expressão contendo a fusão das seqüências codificadoras *ltb* e *lipL32*. Este vetor recombinante, chamado pAE/*ltb-lipL32*, foi utilizado para transformar a cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3) Star, que se mostrou hábil a expressar a quimera protéica recombinante rLTB-LipL32. *Western blot* realizados sugere que rLTB-LipL32 manteve epitopos das proteínas originais (LTB e LipL32), representando uma nova alternativa para vacina contra a leptospirose.

2.4 Materiais e Métodos

2.4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

As cepas utilizadas foram *Escherichia coli* BL21 StarTM (DE3) (Invitrogen) e *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Estas cepas foram cultivadas a 37 °C em meio Luria-Bertani (LB) sob agitação de 200rpm ou acrescido de 1,5 % de ágar-ágar, e quando necessário, suplementado com 100 µg/mL de ampicilina.

2.4.2 Desenho dos *primers* e amplificação do gene *lipL32* por PCR

Os *primers* para a amplificação de *lipL32* e fusão dos genes *lipL32* e *Itb* foram desenhados a partir de seqüências depositadas no GenBank, com o auxílio do *software* VectorNTI 9.1 (Invitrogen). Para clonar o gene *lipL32* no vetor pAE-*Itb* foram construídos dois *primers*, “Lip32LTB_pAE_for” (5’-GGGGTACCGGCGGCGGTGGTCTGCCAAGCCT-3’) e “LippAER” (5’-GGAATTCTTACTTAGTCGCGTCAGAAGC-3’). O *primer* Lip32LTB_pAE_for apresenta sítio para a enzima de restrição *KpnI* e o *primer* LippAER para a enzima *EcoRI* (nucleotídeos destacados com o sublinhado). O *primer* Lip32LTB_pAE_for possui três códons que codificam para o aminoácido glicina e um para o aminoácido triptofano, que fazem um *linker* entre as proteínas fusionadas, visando facilitar o dobramento molecular correto das subunidades protéicas da quimera. O gene *lipL32* foi amplificado pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando o plasmídeo pAE-*lipL32* (coleção de vetores do Centro de Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas) e os *primers* Lip32LTB_pAE_for e LippAER. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L, contendo 2,5 μ L de tampão 10x, 0,5 μ L de dNTP 10mM, 150 μ g de cada *primer*, 0,5 μ L (1 unidade) de *Taq*TM DNA polimerase (Invitrogen), 1 μ L de MgSO₄ a 50mM, 18 μ L de água Milli-Q e 20 μ g de DNA molde. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Perkin-Elmer 2400 usando 35 ciclos de desnaturação (95 °C), anelamento (50 °C) e extensão (72 °C), com 1min cada em cada temperatura. O produto da reação de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8 % contendo brometo de etídeo e purificado da solução usando *GFX*TM PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

2.4.3 Clonagem de *lipL32* no vetor pAE-*Itb*

Todos os procedimentos de clonagem foram conduzidos de acordo com Sambrook & Russell (2001), com algumas modificações. O produto de PCR e o vetor de expressão em *E. coli* contendo o gene *Itb* (pAE-*Itb*) foram digeridos com as enzimas de restrição *KpnI* e *EcoRI*. A reação foi realizada a 37 °C durante 3h. A

eficiência de cada digestão foi checada em eletroforese em gel de agarose 0,8 %. O produto de cada digestão foi purificado com *GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Após digestão de pAE-*ltb* com *KpnI* e *EcoRI* foi realizada a remoção do fosfato 5' pela enzima fosfatase alcalina (CIP) (Boehringer Mannheim). Concentrações equimolares de DNA plasmideal (pAE-*ltb*) e do inserto (*lipL32*) foram utilizadas para a reação de ligação, com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), realizada a 16 °C por 2h.

2.4.5 Transformação de *E. coli* por choque térmico

Uma colônia isolada de *E. coli* TOP10, crescida em agar-LB, foi adicionada a 100 µL de solução de CaCl₂ 100mM estéril e 1 µL do produto da reação de ligação. Após homogeneização houve incubação em gelo por 15min, com mudança brusca de temperatura para 42 °C por 1min, e em seguida nova mudança rápida, com incubação em gelo por mais 2min. Após a transformação, as células recombinantes foram cultivadas em placa com LB sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina.

2.4.6 Seleção e confirmação de clones recombinantes

Selecionaram-se aleatoriamente colônias bacterianas isoladas que cresceram nas placas, submetendo-as a um processo de triagem por extração rápida de DNA com fenol-clorofórmio, pelo método microprep (JOUGLARD et al., 2002). Os clones caracterizados como recombinantes nesta triagem foram cultivados em meio LB suplementado com 100 µg/µL de ampicilina. Neste cultivo, realizou-se uma extração do DNA plasmideal pelo kit comercial *GFX™ Micro Plasmid Prep Kit* (GE Healthcare). O DNA resultante desta extração foi submetido à digestão com dois conjuntos de enzimas de restrição (*BamHI* + *EcoRI* e *XhoI* + *HindIII*) para checar a presença do inserto.

2.4.7 Expressão heteróloga de rLTBLipL32

A cepa de expressão *E. coli* BL21 Star™ (DE3) foi transformada por choque térmico com o vetor de expressão pAE-*ltbLipL32*, como descrito anteriormente. Um clone recombinante foi utilizado para inocular 25mL de LB contendo 100µg/mL de ampicilina e cultivado *overnight*. Esta cultura foi utilizada para inocular 500mL de LB com 100µg/mL de ampicilina, que foi incubado a 37 °C até a fase log de crescimento (absorbância em DO₆₀₀ de 0,6 a 0,8). Neste momento, a expressão da rLTBLipL32 foi induzida com 0,6mM de IPTG (*isopropylthio-β-D-galactoside*) por 3h. Após este período, coletou-se uma alíquota de 1mL da cultura, que foi utilizada em uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15 %, com o intuito de confirmar a expressão heteróloga da proteína recombinante. O restante da cultura foi fracionada em tubos de 250mL, centrifugada a 7000rpm por 15min, e os *pellet* armazenados a -20 °C.

2.4.8 Purificação da proteína recombinante

Para a purificação da proteína recombinante, o *pellet* de células foi ressuspendido em solução tampão de fosfato (PBS) contendo 0,05 % de Triton X-100, pH 7,4, incubado por 1 hora a 4 °C com 1mg/mL de lisozima e, em seguida sonificado. Após centrifugação a 10000rpm por 30min, o *pellet* resultante foi novamente ressuspendido com PBS-Triton X-100 e centrifugado em seguida, nas mesmas condições. Ao total foram realizadas 4 lavagens do *pellet* de células com PBS- Triton X-100. O *pellet* resultante destas lavagens foi ressuspendido em tampão de solubilização (NaH₂PO₄ 50mM; NaCl 300mM; imidazole 15mM; 0,2 % de *N-Lauroyl-Sarcosine*; pH 8,0), incubado por 24h a 4 °C, e centrifugado novamente a 10000rpm por 30min. Uma alíquota do sobrenadante final foi analisado em SDS-PAGE 15 % para avaliação da pureza. O sobrenadante da última centrifugação, contendo rLTB-LipL32 em satisfatório grau de pureza, foi dialisado contra tampão NaCl-Tris (NaCl 200mM; Tris-HCl 100mM; pH 8,0) a 4 °C, durante 18h, para remoção do agente desnaturante (*N-Lauroyl-Sarcosine*). A proteína dialisada foi então alíquotada e armazenada com 10 % de glicerol, a -20 °C.

2.4.9 Caracterização de rLTBLipL32 por *Western blot*

A quimera purificada foi submetida à SDS-PAGE 15 %, para visualização da massa molecular aproximada. A caracterização foi realizada por *Western blot* com anticorpo monoclonal (MAb) anti-LipL32 (produzido no Cenbiot – UFPel), anticorpo policlonal de coelho anti-toxina colérica (utilizado pela alta homologia entre CT e LT, e por conveniência aqui chamado anti-LTB) (Sigma) e MAb anti-6XHis (Sigma). Três SDS-PAGE 15 % foram realizadas com as proteínas recombinantes rLTBLipL32, rLTB e rLipL32 e controles negativos e positivos (rR1-LipL32, rLTB-P42 e extrato bruto de *E. coli* BL21 Star™ (DE3)). Estas proteínas foram eletrotransferidas para 3 membranas de nitrocelulose *Hybond™ ECL™* (Amersham Biosciences) (uma para cada anticorpo). As membranas foram bloqueadas com PBS-T (0,05 % de Tween 20) acrescido de 5 % de leite em pó desnatado. Posteriormente, foram incubadas separadamente, 1h a temperatura ambiente, com MAb anti-LipL32 1:1500, anticorpo policlonal anti-LTB 1:3000 e MAb anti-6xHis 1:10000. Após três lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas com soro anti-imunoglobulina de coelho conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:3000 (para anti-LTB) ou com soro anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:4000 (para os demais anticorpos). Após 5 lavagens, as reações foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂. *BenchMark™ Pre-stained* (Invitrogen) foi usado como marcador padrão de massa molecular.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Amplificação de *lipL32* e clonagem no pAE-*ltb*

A amplificação por PCR da seqüência codificadora *lipL32* gerou um fragmento com cerca de 750 pb, condizente com o esperado (Figura 1 - A). Após a amplificação de *lipL32*, o produto de PCR e o plasmídeo pAE-*ltb* foram eficientemente digeridos pelas enzimas de restrição *KpnI* e *EcoRI*. Quando o plasmídeo foi digerido por enzimas de restrição ele passou da conformação circular clássica para uma linear, apresentando migração mais lenta na eletroforese do que o mesmo plasmídeo circular (Figura 1 - B). Após a purificação do vetor e inserto e da desfosforilação do vetor, foi realizada a reação de ligação, a qual resultou na fusão

de *ltb* com *lipL32* em um vetor recombinante denominado pAE-*ltb**lipL32* (Figura 1 - C).

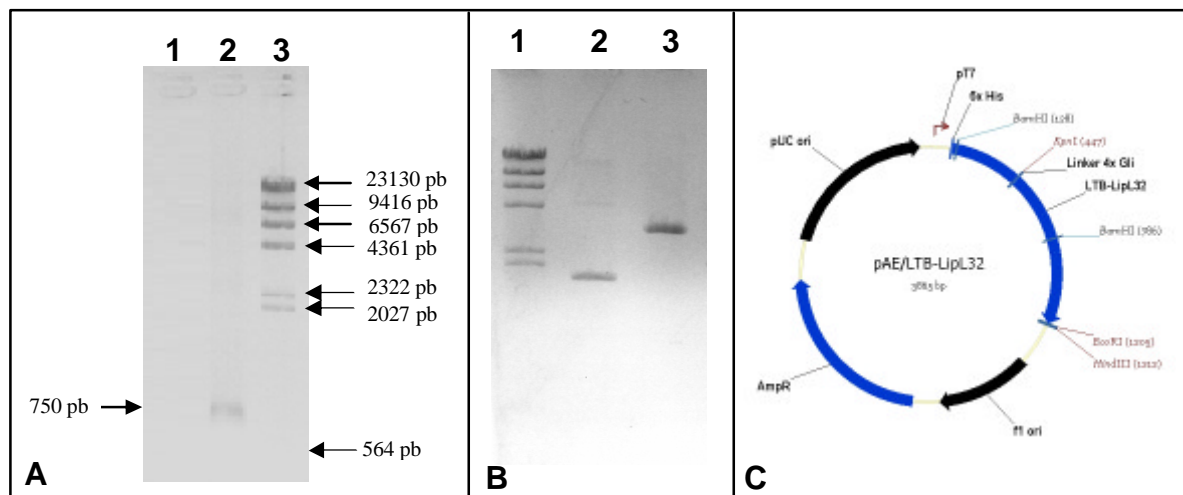


Figura 1. Processo de clonagem de *lipL32* no vetor pAE-*ltb*. **A-** Eletroforese em gel da agarose 0,8 % apresentando o resultado da amplificação e purificação do gene *lipL32*. **1)** controle negativo da reação de PCR (água); **2)** amplificação do gene *lipL32*, com aproximadamente 750 pb; **3)** marcador de peso molecular *HindIII* (Invitrogen). **B-** Eletroforese em gel de agarose 0,8 % com o resultado das digestões do vetor pAE-*ltb* com as enzimas de restrição *KpnI* e *EcoRI*. **1)** marcador peso molecular *HindIII* (Invitrogen); **2)** vetor pAE-*ltb* não digerido; **3)** vetor pAE-*ltb* digerido com ambas as enzimas de restrição. **C-** Mapa esquemático do vetor recombinante pAE-*ltb**lipL32*, obtido através do *software* VectorNTI 9.1.

2.5.2 Obtenção de clones recombinantes

O vetor pAE-*ltb**lipL32* foi utilizado para transformar por choque térmico células de *E. coli* TOP 10, que foram cultivadas em agar-LB com 100 µg/mL de ampicilina. Várias colônias transformantes cresceram no cultivo em meio sólido. Algumas destas foram aleatoriamente selecionadas e submetidas ao método de triagem miniprep. A eletroforese em gel de agarose 0,8 % indicou alguns destes clones como possíveis recombinantes, por apresentarem um tamanho maior de banda (em número de pares de bases), supostamente devido à presença do inserto (*lipL32*). Alguns destes clones com plasmídeos de migração mais lenta (Figura 2 - A) foram selecionados para extração e caracterização enzimática de DNA plasmideal. O padrão esperado de bandas de DNA na eletroforese em gel de agarose 0,8 % gerado pela caracterização enzimática de pAE-*ltb**lipL32* pelas enzimas testadas foi observado em apenas dois clones. Estes clones, nominados pAE-*ltb**lipL32* “2” e pAE-*ltb**lipL32* “26”, foram considerados clones recombinantes (Figura 2 - B).

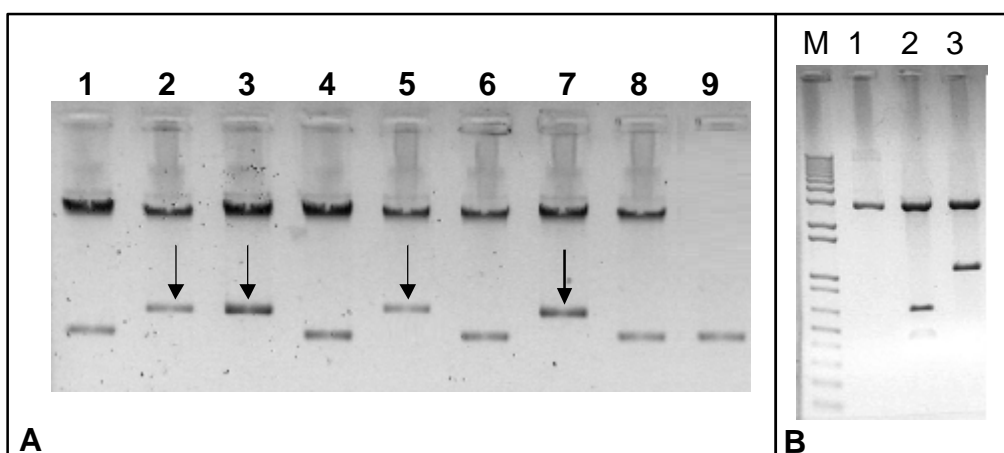


Figura 2. Estratégias utilizadas para obtenção e confirmação de clones recombinantes de *E. coli* TOP10 transformadas com pAE-*ltb*L32. **A-** Eletroforese em gel de agarose 0,8 % apresentando a extração rápida de DNA de colônia realizada para identificar clones recombinantes. **1 ao 8)** extração de DNA total de colônias cultivadas após transformação com o produto da ligação; **9)** vetor pAE-*ltb* purificado, utilizado como controle. Os plasmídeos indicados com a seta são prováveis clones recombinantes. **B-** Eletroforese em gel de agarose 0,8 % evidenciando a digestão com enzimas de restrição de um dos clones selecionados no *screening* que apresentou o padrão de bandas esperado. **M)** Marcador *DNA Ladder Plus 100pb* (Invitrogen); **1)** vetor pAE-*ltb*L32 não digerido; **2)** vetor pAE-*ltb*L32 digerido por *Bam*HI e *Eco*R1 (3 bandas - 2788, 658 e 419pb); **3)** vetor pAE-*ltb*L32 digerido por *Xho*I e *Hind*III (2 bandas - 2775 e 1090pb).

2.5.3 Expressão e purificação de rLTBLipL32

E. coli BL21 Star™ (DE3) transformada com o vetor de expressão pAE-*ltb*L32 expressou uma proteína recombinante de aproximadamente 41kDa. A massa molecular estimada para a rLTBLipL32 pelo *software* VectorNTI 9.1 (Invitrogen) foi de 40,7kDa (Figura 3). A produção de rLTBLipL32 foi de aproximadamente 0,6g por litro de meio.

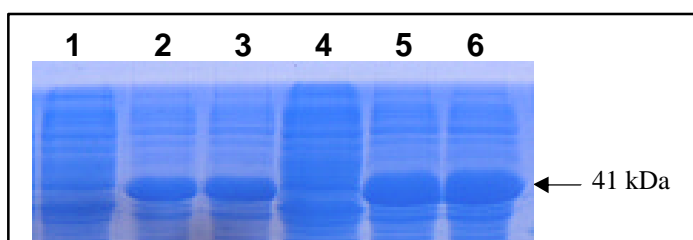


Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % com extrato das células após indução de expressão em larga escala (500mL) da quimera rLTBLipL32. **1 e 4** – extrato da cepa *E. coli* BL21 Star 3h após a fase log de crescimento (controle negativo); **2, 3, 5 e 6** – extrato de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) após expressão em larga escala da proteína rLTBLipL32.

As quatro sucessivas lavagens do *pellet* de células com PBS-Triton X-100 removeu a grande maioria das proteínas de *E. coli*, enquanto a quimera recombinante permaneceu no *pellet*, indicando que foi expressa na forma insolúvel (corpos de inclusão). A solubilização destes corpos de inclusão foi realizada com tampão contendo 0,2 % de *N-Lauroylsarcosine*. Após centrifugação, o sobrenadante foi analisado em SDS-PAGE, onde se observou satisfatório grau de pureza da quimera não havendo necessidade de purificação por cromatografia de afinidade. Este sobrenadante contendo rLTBLipL32 foi então dialisado contra tampão NaCl-Tris, alíquotado e estocado a -20 °C.

2.5.4 Caracterização de rLTBLipL32 por *Western blot*

A antigenicidade da quimera foi avaliada mediante *Western blot* com anticorpos específicos para as subunidades LTB e LipL32 (Figura 4). O *Western blot* realizado com anticorpo policlonal anti-LTB (Figura 4 – A) teve reação positiva específica com todas as proteínas que possuem LTB em sua molécula (rLTB, rLTB-LipL32 e rLTB-P42). Da mesma forma, aquele realizado com MAb anti-LipL32 (Figura 4 – B) reagiu positivamente apenas com as proteínas que possuem LipL32 (rLipL32, rLTB-LipL32 e rR1-LipL32). O WB realizado com MAb anti-6xhis (Figura 4 – C) reconheceu todas as proteínas, uma vez que as mesmas foram produzidas fusionadas à uma cauda de 6 histidinas. A massa molecular de todas as proteínas observadas seguiu o esperado. Nenhum anticorpo reconheceu o extrato de *E. coli* BL21 Star™ (DE3). Estes resultados sugerem que a fusão das proteínas e da cauda

de histidina não alterou significativamente a conformação destas proteínas, permitindo que anticorpos gerados contra cada uma delas individualmente reconhecessem também a químera.

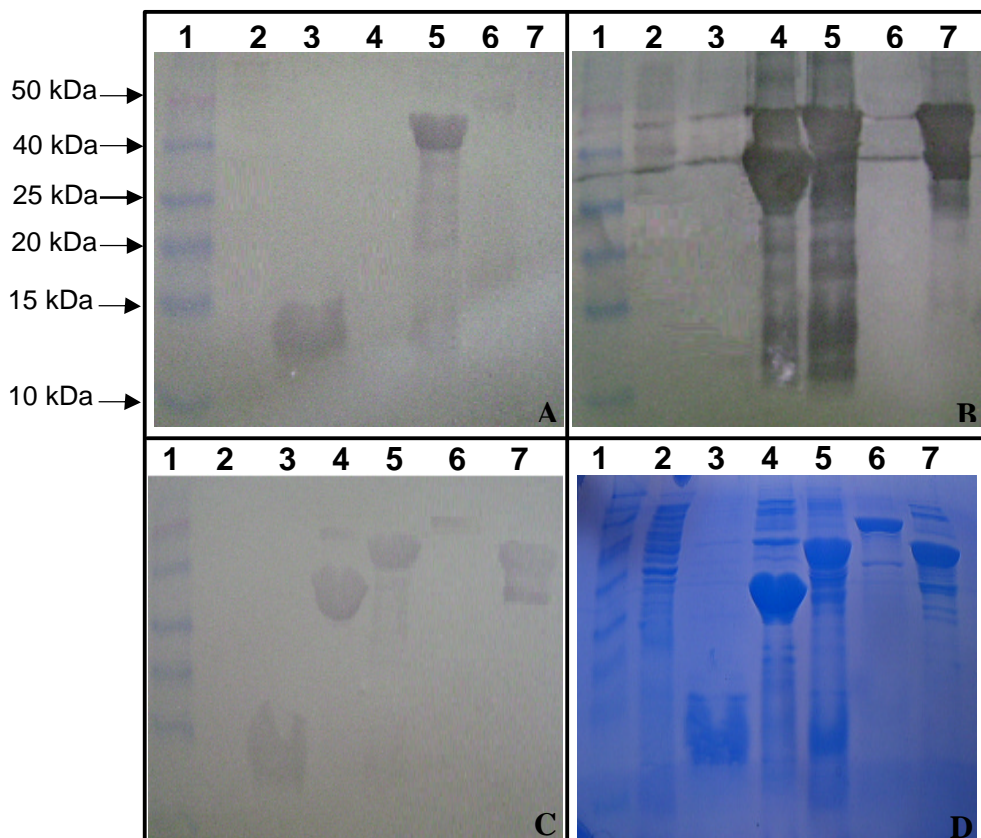


Figura 4. *Western Blot* da químera com anticorpos específicos para cada subunidade. **A-** anti-LTB; **B-** anti-LipL32; **C-** anti-6xhis; **D-** SDS-PAGE corado com *Comassie blue*. Em todos: **1)** Marcador de massa molecular BenchMark™ Pre-stained (Invitrogen); **2)** extrato de *E. coli*; **3)** rLTB; **4)** rLipL32; **5)** rLTBLipL32; **6)** rLTBP42; **7)** rR1-LipL32.

2.6 DISCUSSÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa que afeta humanos e outros animais (LEVETT, 2001; LANGONI et al., 1999). Esta zoonose possui uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo de forma endêmica em todo o mundo, sendo atualmente reconhecida como uma doença emergente (KO et al., 1999; LEVETT, 2001; McBRIDE et al., 2005). É um importante problema de saúde pública mundial devido à alta incidência e elevada taxa de letalidade (FAINE et al., 1999). Muitos animais domésticos e selvagens servem como reservatórios para leptospirosas, que são eliminadas no ambiente pela urina destes animais, sobrevivendo no solo ou na água,

através dos quais humanos podem ser infectados (LEVETT, 2001; BARTHI et al., 2003). O controle é dificultado devido à inexistência de vacinas e testes laboratoriais eficazes na prevenção e diagnóstico da doença (GAMBERINI et al., 2005; McBRIDE et al., 2005). As bacterinas existentes não produzem imunoproteção cruzada contra os numerosos sorovares de leptospira, principalmente porque induzem resposta contra o LPS (McBRIDE et al., 2005; KOIZUMI; WATANABE, 2005; PETERSEN et al., 2001; BARTHI et al., 2003; GAMBERINI et al., 2005). Os prejuízos para a saúde pública e as perdas econômicas causadas por tal zoonose justificam o uso de vacinas contra leptospirose em humanos e animais. Desta forma, o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção da leptospirose se faz necessário (LEVETT, 2001).

Proteínas imunogênicas conservadas, principalmente de membrana externa de leptospira, são alvos promissores para o desenvolvimento de uma vacina com estas características (CULLEN et al., 2002). A LipL32 é a proteína de membrana externa mais abundante, é altamente conservada entre as leptospirosas patogênicas e ausente nas não-patogênicas (CULLEN et al., 2005; ZUERNER et al., 1991; HAAKE et al., 2000a). Mais de 95% dos pacientes com leptospirose produzem anticorpos contra LipL32 durante a infecção (GUERREIRO et al., 2001). Além disso, esta proteína já apresentou proteção parcial contra desafio com cepas patogênicas de leptospira (BRANGER et al., 2001, 2005; SEIXAS et al., 2007b).

No presente estudo nós produzimos a quimera recombinante rLTBLipL32, composta pela lipoproteína de membrana externa LipL32 de *Leptospira interrogans* e a subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli*.

O sistema de expressão heteróloga testado, fazendo uso da cepa *E. coli* BL21 Star™ (DE3) e do vetor pAE, mostrou-se muito eficiente, em relação à quantidade de proteína recombinante obtida. Este sistema de expressão possui características que o tornam interessantes. A cepa em questão carrega uma cópia mutada do gene *rne* (*rne131*) que codifica RNaseE truncada, uma enzima sem a habilidade de degradar mRNA, resultando em aumento de estabilidade deste e conseqüente acréscimo de expressão de proteínas. Esta cepa é B/r e não contém a protease *lon*, tampouco a protease de membrana externa (OmpT). A ausência destas proteases reduz a degradação de proteínas heterólogas expressadas (GRUNBERG-MANAGO et al., 1999; KIDO et al., 1996; LOPEZ et al., 1999). Além disso, o vetor pAE fusiona a

proteína de interesse a uma cauda de 6 aminoácidos histidina, permitindo a purificação por cromatografia de afinidade, bem como a identificação da proteína recombinante em *Western blot* com MAb anti-6xHis.

Considerando que já dispúnhamos do vetor pAE contendo o gene *ltb*, o gene fusionado *ltblipL32* foi obtido usando apenas uma PCR, uma reação de restrição enzimática e outra de ligação. Além disso, a seqüência nucleotídica aparenta ser a mesma dos genes correspondentes, baseando-se nos resultados encontrados na digestão com enzimas de restrição para confirmação dos clones recombinantes. Estas informações indicam que o método usado para a construção dos genes fusionados foi eficiente. Yan et al. (2004) usou três PCRs para obter o gene *ltb-ureB* e também obteve sucesso, porém o método usado para a fusão (*primer linking*) foi mais trabalhoso.

A proteína rLTBLipL32 foi expressa na forma insolúvel, necessitando de um agente desnaturante para a solubilização dos corpos de inclusão do interior da célula. A estratégia mais comumente adotada para este tipo de problema é o uso de solução com 6M ou 8M de uréia, que desnatura completamente a proteína, interrompendo as interações moleculares que proporcionam a estrutura tridimensional. Entretanto, durante a diálise, a uréia é praticamente toda retirada, porém isso necessita um longo período de tempo, para que a proteína possa retornar a conformação estrutural inicial. Assim, mesmo com a retirada da uréia, nas condições extracelulares a proteína pode estar alterada a tal ponto, que não consegue retornar à conformação original, podendo perder determinantes antigênicos fundamentais para a atividade desejada (Sambrook; Russell, 2001).

A quimera recombinante rLTBLipL32, após 4 lavagens com PBS-Triton X-100, foi solubilizada com 0,2 % de *N-Lauroyl-Sarcosine*. Este agente desnaturante é muito menos agressivo à estrutura tridimensional das proteínas, reduzindo muito as chances de uma reconformação incorreta da proteína durante a diálise, que inclusive pode ser mais rápida, como a do presente estudo, realizada em apenas 18 horas. Além disso, o último sobrenadante obtido apresentou a rLTBLipL32 em elevado grau de pureza, dispensando a utilização de métodos de rotina para a purificação de proteínas recombinantes, como a cromatografia por afinidade ou cromatografia líquida de alta performance, que consomem tempo, uma grande quantidade de

reagentes, necessitam de equipamentos específicos, são caros e praticamente inviáveis para uma produção em escala industrial (Sambrook; Russell, 2001).

Os soros testados no *Western blot* reagiram especificadamente com a quimera, não havendo reação com controles negativos. Desta forma, a caracterização antigênica evidenciou a identidade de cada subunidade da quimera, mostrando que a fusão conservou alguns epitopos antigênicos de LTB e de LipL32 e que apesar de expressa em corpos de inclusão, sua conformação pareceu satisfatório.

Produtos microbianos foram avaliados como moduladores para ativar a imunidade adaptativa. Entre eles, a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* é a mais promissora (SIMMONS et al., 2001a). A LTB é uma molécula com propriedades biológicas potenciais, sendo que já foi avaliada como adjuvante de mucosa, transcutâneo ou parenteral (DE HAAN et al., 1998; CONCEIÇÃO et al., 2006; WELTZIN et al., 2000; PITCOVSKI et al., 2006), como imunógeno contra diarreia induzida por *E. coli* enterotoxigênica (LEBENS et al., 1996; RANALLO et al., 2005), imunomodulador para prevenção de doenças autoimunes e alergias (WILLIAMS et al., 2000; TRUITT et al., 1998; CARTER et al., 2006; TAMURA et al., 1997) e imunossupressor em transplantes (TRUITT et al., 1998).

O efeito imunomodulador de LTB foi comprovado em trabalhos recentes, onde induziu ampla resposta imune tanto celular quanto humoral (CONCEIÇÃO et al., 2006; da SILVA RAMOS ROCHA et al., 2008). Em um experimento realizado com camundongos a LTB apresentou atividade adjuvante para as glicoproteínas de herpes vírus do tipo 1, induzindo um alto grau de proteção contra infecção ocular com o vírus vivo (RICHARDS et al., 2001). Em outro estudo, LTB foi coadministrada, como adjuvante de mucosa, com o antígeno urease de *Helicobacter pylori*, para induzir imunidade protetora contra infecção *in vitro* de camundongos com *Helicobacter felis* e *Helicobacter pylori* (WELTZIN et al., 2000). Testes realizados em voluntários humanos comprovaram a segurança do uso de LTB utilizando as vias transcutânea, nasal e oral (HASHIGUCCI et al., 1996; KOTLOFF et al., 2001; HAGIWAR et al., 2001; GÜEREÑA-BURGUEÑO et al., 2002).

Estudos anteriores demonstraram que LipL32 é capaz de induzir resposta imune parcialmente protetora contra desafio letal, quando apresentada ao sistema imune mediada por adenovírus e vacina de DNA (BRANGER et al., 2001, 2005).

Porém, LipL32 não teve efeito protetor quando avaliada como vacina recombinante de subunidade (BRANGER et al. 2005). Talvez isto se deva ao fato de que vetores plasmideais (vacinas de DNA) e adenovírus induzam uma resposta não apenas com ampla produção de anticorpos, mas também uma resposta envolvendo células T citotóxicas (DREW et al., 2000; JUILLARD et al., 1995; MIYAJI et al., 2003).

A LTB é um adjuvante completo, capaz de induzir resposta imune celular, incluindo células T citotóxicas (SIMMONS et al., 2001b) e humoral, estimulando resposta sistêmica e secretória de anticorpos contra antígenos co-administrados ou fusionados (GREEN et al., 1996; VERWEIJ et al., 1998; WELTZIN et al., 2000; FINGERUT et al., 2006; PITCOVSKI et al., 2006; CONCEIÇÃO et al., 2006; da SILVA RAMOS ROCHA et al., 2008). Desta forma, a rLTBLipL32 é uma molécula de interesse para um estudo de imunoproteção contra leptospirose.

Em alguns estudos, LTB foi capaz de induzir resposta contra antígenos coadministrados (DE HAAN et al., 1998; WELTZIN et al., 2000; RICHARDS et al., 2001), mas em outros, uma ligação entre o antígeno e LTB foi necessária para promover imunidade contra o antígeno alvo (PITCOVSKI et al., 2006; SCHODER; WILL, 1989; GREEN et al., 1996; FINGERUT et al., 2006). Por esta razão, a quimera rLTBLipL32 possui uma ligação entre a subunidade LTB e a subunidade LipL32, formado por quatro aminoácidos.

Neste estudo nós construímos e expressamos uma molécula recombinante composta pela lipoproteína de leptospiros patogênicas, LipL32, presente em todos os sorovares patogênicos, e LTB, um adjuvante com propriedade não apenas de aumentar a resposta imune, mas de modulá-la, direcionando para ampla imunidade humoral e celular. Desta forma, rLTBLipL32 é uma forte candidata a uma vacina recombinante de subunidade contra leptospirose e será brevemente testada, em modelos de hamsters, sob administrações por diferentes vias (oral, nasal, muscular, subcutânea e intraperitoneal) e doses, seguido por desafio homólogo e heterólogo com cepas patogênicas de *Leptospira spp.*

3 CONCLUSÕES

- As estratégias de clonagem adotadas para a obtenção do plasmídeo recombinante pAE-*ltbLipL32* são eficazes;

- A cepa *E. coli* BL21 Star™ (DE3), nas condições utilizadas, expressa a quimera recombinante rLTBLipL32 em quantidade significativa;

- A quimera solubilizada com 0,2% de *N-Lauroyl-Sarcosine*, após lavagens com PBS-Triton X-100, apresenta elevado grau de pureza;

- A caracterização antigênica por *Western blot* evidencia a identidade das subunidades LTB e LipL32, mostrando que a fusão realizada conserva epitopos antigênicos;

Referências

- BALDWIN, C. L.; SATHIYASEELAN, T.; NAIMAN, B.; WHITE, A. M.; BROWN, R.; BLUMERMAN, S.; et al. Activation of bovine peripheral blood gammadelta T cells for cell division and IFN-gamma production. **Vet Immunol Immunopathol.** 87, 251–9, 2002.
- BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; BOLIN, C. A.; SUMMERS, T. A.; WAGAR, E. A.; CHEVILLE, N. F.; HARTSKEERL, R. A.; HAAKE, D. A. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. **Infection and Immunity**, 67, 853-861, 1999.
- BAROCCHI, M. A.; KO, A. I.; REIS, M. G.; MCDONALD, K. L.; RILEY, L. W. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6926-6932, 2002.
- BHARADWAJ, R. Leptospirosis--a reemerging disease? **Indian J Med Res**, 120(3), 136-8, 2004.
- BHARADWAJ, R.; BAL, A. M.; JOSHI, S. A.; KAGAL, A.; POL, S. S.; GARAD, G.; et al. An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. **Jpn J Infect Dis**, 55(6), 194—6, 2002.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.** 3, 757-771, 2003.
- BONE, H.; ECKHOLDT, S.; WILLIAMS, N.A. Modulation of B lymphocyte signalling by the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **International Immunology**, 14, 647–658, 2002.
- BOONYOD, D.; POOVORAWAN, Y.; BHATTARAKOSOL, P.; CHIRATHAWORN, C. LipL32, an outer membrane protein of *Leptospira*, as an antigen in a dipstick assay for diagnosis of leptospirosis. **Asian Pac J Allergy Immunol**, 23(2-3), 133-41, 2005.
- BRANGER, C.; CHATRENET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F.; AUBERT, A.; BACH, J. M.; ANDRÉ-FONTAINE, G. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infect Immun**, 73(7), 4062-9, 2005.
- BRANGER, C.; SONRIER, C.; CHATRENET, B.; KLONJKOWSKI, B.; RUVOEN-CLOUET, N.; AUBERT, A.; ANDRE-FONTAINE, G.; ELOIT, M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infection and Immunity**, 69, 6831-6838, 2001.
- BURNETTE, W. N. Recombinant subunit vaccines. **Curr Opin Biotechnol.** 2, 882–92, 1991.
- CARTER, J. E.; YU, J.; CHOI, N. W.; HOUGH, J.; HENDERSON, D.; HE, D.; et al. Bacterial and plant enterotoxin B subunit-autoantigen fusion proteins suppress diabetes insulinitis. **Mol Biotechnol**, 32(1), 1-15, 2006.

- CHANG, Y. F.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U.; HE, H.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; YAN, W.; FAISAL, S. M.; PAN, M. J.; CHANG, C. F. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. **Vaccine**, 25(48), 8190-7, 2007.
- CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; DELLAGOSTIN, O. A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, 24, 5734-43, 2006.
- CRODA, J.; FIGUEIRA, C. P.; WUNDER, E. A. JR.; SANTOS, C. S.; REIS, M. G.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. Targeted mutagenesis in pathogenic leptospira: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infect Immun**, [Epub aguardando publicação] 2008.
- CULLEN, P. A.; CORDWELL, S. J.; BULACH, D. M.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* Serovar Lai. **Infection and Immunity**, 70, 5, 2311–2318, 2002.
- CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A.I.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* Spp. **Infection and Immunity**, 73, 4853-4863, 2005.
- da SILVA RAMOS ROCHA, A.; CONCEIÇÃO, F. R.; GRASSMANN, A. A.; LAGRANHA, V. L.; DELLAGOSTIN, O. A. B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvant of humoral immune response in recombinant BCG vaccination. **Can J Microbiol**, 54(8), 677-86, 2008.
- DALE, J. B.; CHIANG, E. C. Intranasal immunization with recombinant group a streptococcal M protein fragment fused to the B subunit of *Escherichia coli* labile toxin protects mice against systemic challenge infections. **Journal Infection Diseases**, 171, 1038-1041, 1995.
- DE HAAN, L.; HEARN, A.R.; RIVETT, A.J.; HIRST, T.R. Enhanced delivery of exogenous peptides into the Class I antigen processing and presentation pathway. **Infection and Immunity**, 70, 3249–58, 2002.
- DE HAAN, L.; VERWEIJ, W. R.; FEIL, I.K.; HOLTROP, M.; HOL, W.G.J.; AGSTERIBBE, E.; WILSCHUT, J. Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. **Immunology**, 94, 424-430, 1998.
- DEY, S.; MOHAN, C. M.; KUMAR, T. M.; RAMADASS, P.; NAINAR, A. M.; NACHIMUTHU, K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. **Vet Microbiol**, 103(1-2), 99-106, 2004.
- DORIGATTI, F.; BRUNIALTI, M. K.; ROMERO, E. C.; KALLAS, E. G.; SALOMÃO, R. *Leptospira interrogans* activation of peripheral blood monocyte glycolipoprotein demonstrated in whole blood by the release of IL-6. **Braz J Med Biol Res**, 38(6), 909-14, 2005.
- DREW, D. R.; LIGHTOWLERS, M.; STRUGNELL, R. A. Humoral immune responses to DNA vaccines expressing secreted, membrane bound and nonsecreted forms of the *Tania ovis* 45W antigen. **Vaccine**, 18, 2522–2532, 2000.

DZIERZBICKA, K.; KOŁODZIEJCZYK, A. M. Adjuvants--essential components of new generation vaccines. **Postepy Biochem**, 52(2), 204-11, 2006

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*, 2nd ed, 1999, 272p.

FERNANDES, C. P.; SEIXAS, F. K.; COUTINHO, M. L.; VASCONCELLOS, F. A.; MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. An immunomagnetic separation-PCR method for detection of pathogenic *Leptospira* in biological fluids. **Hybridoma (Larchmt)**, 27(5), 381-6, 2008.

FINGERUT, E.; GUTTER, B.; GOLDWAY, M.; ELIAHOO, D.; PITCOVSKI, J. B subunit of *E. coli* enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination *Veterinarian Immunology Immunopathology*, v. 112, p. 253–263, 2006.

FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F. P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; DA SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G.; RILEY, L. W.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **J Clin Microbiol**, 39(9), 3303-10, 2001.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. Whole-Genome Analysis of *Leptospira Interrogans* to Identify Potential Vaccine Candidates Against Leptospirosis. **FEMS Microbiological Letters**, 244, 305-313, 2005.

GRUNBERG-MANAGO, M. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. **Annu Rev Genet**, 33, 193-227, 1999.

GREEN, E.A; BOTTING, C.; WEBB, H.M.; HIRSTT, T.R.; RANDALL, R.E. Construction, purification and immunogenicity of antigen-antibody-LTB complexes. **Vaccine**, 14, 10, 949-958, 1996.

GÜEREÑA-BURGUEÑO, F.; HALL, E. R.; TAYLOR, D. N.; CASSELS, F. J.; SCOTT, D. A.; WOLF, M. K.; ROBERTS, Z. Y. J.; NESTEROVA, G. V.; ALVING, C. R.; GLENN, G. M. Safety and Immunogenicity of a Prototype Enterotoxigenic *Escherichia coli* Vaccine Administered Transcutaneously. **Infection and Immunity**, 70, 4, 1874–1880, 2002.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVAO, R. M.; LEVETT, P. N.; KO, A.I.; HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity**, 69, 4958-4968, 2001.

GUPTA, R. K.; RELYVELD, E. H.; LINDBLAD, E. B.; BIZZINI, B.; BEN-EFRAIM, S.; GUPTA, C. K. Adjuvants — a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**. 11, 293–306, 1993.

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**. 146, 1491-1504, 2000a.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, 68, 2276-2285, 2000b.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the Leptospiral Outer Membrane and Description of Three Novel Leptospiral Membrane Proteins. **Infection and Immunity**, 70, 4936-4945, 2002.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and Immunity**, 67, 6572-6582, 1999.

HAGIWAR, Y.; TSUJI, T.; IWASAKI, T.; KADOWAKI, S.; ASANUMA, H.; CHEN, Z.; KOMASE, K.; SUZUKI, Y.; AIZAWA, C.; KURATA, T.; TAMURA, S. Effectiveness and safety of mutant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT H44A) as an adjuvant for nasal influenza vaccine. **Vaccine**, 19, 2071–2079, 2001.

HARDING, C.V. Class II antigen processing: analysis of compartments and functions. **Crit Review Immunology**, 16, 13–29, 1996.

HARTSKEERL, R. A. Leptospirosis: current status and future trends. **Indian J Med Microbiol**, 24(4), 309, 2006.

HASHIGUCCI, K.; OGAWA, H.; ISHIDATE, T.; YAMASHITA, R.; KAMIYAT, H.; WATANABET, K.; HATTORIJ, N.; SATOT, T.; SUZUKIZ, Y.; NAGAMINE, T.; AIZAWAT, C.; TAMURAG, S.; KURATA, T.; OYA, A. Antibody responses in volunteers induced by nasal influenza vaccine combined with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit containing a trace amount of the holotoxin. **Vaccine**, 14, 2, 113-119, 1996.

HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S. K.; PERIAGO, M. R. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Negl Trop Dis**. 2(9), e300, 2008.

HOUPIKIAN, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; BROUQUI, P. Leptospiroses. **Maladies Infectieuses**, 14 p, 8-039-Q-10, 2002.

JOUGLARD, S. D.; MEDEIROS, M. A.; VAZ, E. K.; BASTOS, R. G.; DA CUNHA, C. W.; ARMOA, G. R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. An ultra-Rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, 71, 234, 2002.

JUILLARD, V.; VILLEFROY, P.; GODFRIN, D.; PAVIRANI, A.; VENET, A.; GUILLET, J. G. Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-defective adenovirus recombinant vector. **Eur. J. Immunol**, 25, 3467–3473, 1995.

KIDO, M.; YAMANAKA, K.; MITANI, T.; NIKI, H.; OGURA, T.; HIRAGA, S. RNase e polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a mukB mutation in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol**, 178, 3917-3925, 1996.

KLIMPEL, G. R.; MATTHIAS, M. A.; VINETZ, J. M. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta+ T cells vs TCR alpha beta+ T cells. **J Immunol**. 171, 3, 1447–55, 2003.

KO, A. I.; GALVÃO, R. M.; RIBEIRO DOURADO, C. M.; JOHNSON JR, W. D.; RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, 354(9181), 820—5, 1999.

- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, 22(11-12), 1545-52, 2004.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis Vaccines: Past, Present, and Future. **Journal of Postgraduate Medical**. 51, 210-214, 2005.
- KOTLOFF, K. L.; SZTEIN, M. B.; WASSERMAN, S. S.; LOSONSKY, G. A.; DILORENZO, S. C.; WALKER, R. I. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection. **Infection and Immunity**, 69, 3581–3590, 2001.
- LANGONI, H.; DE SOUZA, L. C.; DA SILVA, A. V.; LUVIZOTTO, M. C.; PAES, A. C.; LUCHEIS, S. B. Prev Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. **Vet Med**, 40(3-4), 271-5, 1999.
- LEBENS, M.; SHAHABI, V.; BACKSTROM, M.; HOUZE, T.; LINDBLAD, M.; HOLMGREN, J. Synthesis of hybrid molecules between heat-labile enterotoxin and cholera toxin B subunits: Potential for use in a broad-spectrum vaccine. **Infect Immun**, 64(6), 2144-50, 1996.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiological Review**, 14, 296-326, 2001.
- LOPEZ, P. J.; MARCHAND, I.; JOYCE, S. A.; DREYFUS, M. The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. **Mol. Microbiol**, 33, 188-199, 1999.
- MAROTTO, P. C.; NASCIMENTO, C. M.; ELUF-NETO, J.; MAROTTO, M. S.; ANDRADE, L.; SZTAJNBOK, J.; SEGURO, A. C. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. **Clin Infect Dis**, 29(6), 1561-3, 1999.
- MATSUNAGA, J.; YOUNG, T. A.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; BOLIN, C. A.; HAAKE, D. A. Novel 45-Kilodalton Leptospiral Protein That Is Processed to a 31-Kilodalton Growth-Phase-Regulated Peripheral Membrane Protein. **Infection and Immunity**, 70, 323-334, 2002.
- McBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion Infectious Disease**. 18, 376-386, 2005.
- MILLAR, D. G.; HIRST, T. R.; SNIDER, D. P. *Escherichia coli* heat labile entero-toxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. **Infection and Immunity**, 69, 3476–3482, 2001.
- MIYAJI, E. N.; DIAS, W. O.; TANIZAKI, M. M.; LEITE, L. C. Protective efficacy of PspA (pneumococcal surface protein A)-based DNA vaccines: contribution of both humoral and cellular immune responses. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**, 37, 53–57, 2003.
- NAIMAN, B. M.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. L. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gamma delta T lymphocytes. **Infect Immun**. 69, 7550–8, 2001.
- NALLY, J. E.; WHITELEGGE, J. P.; BASSILIAN, S.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infect Immun**, 75(2), 766-73, 2007.

NASCIMENTO, A. L. T. O.; KO, A. I.; MARTINS, E. A. L.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F. M.; LEITE, L. C. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I. T.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GOES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S.; HARAKAVA, R.; JERONIMO, S. M. B.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; DE OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J. G.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E. A.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, 186, 2164-2172, 2004a.

NASCIMENTO, A. L. T. O.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E. A.; DIGIAMPIETRI, L. A.; HARSTKEERL, R. A.; HO, P. L.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; HAAKE, D. A.; MARTINS, E. A. L. Genome Features of *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 37, 459-478, 2004b.

NASHAR, T. O.; BETTERIDGE, Z. E.; MITCHELL, R. N. Evidence for a role of ganglioside GM1 in antigen presentation: binding enhances presentation of Escherichia coli enterotoxin B subunit (EtxB) to CD4(+) T cells. **International Immunology**, 13, 541-551, 2001.

NASHAR, T. O.; HIRST, T. R.; WILLIAMS, N. A. Modulation of B-cell activation by the B subunit of Escherichia coli enterotoxin: receptor interaction up-regulates MHC class II, B7, CD40, CD25 and ICAM-1. **Immunology**, 91(4), 572-8, 1997

NASHAR, T. O.; WEBB, H. M.; EAGLESTONE, S.; WILLIAMS, N. A.; HIRST, T. R. Potent immunogenicity of the B subunits of Escherichia coli heat-labile enterotoxin: receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93(1), 226-30, 1996.

NASHAR, T. O.; WILLIAMS, N. A.; HIRST, T. R. Cross-linking of cell surface ganglioside GM1 induces the selective apoptosis of mature CD8+ T lymphocytes. **Int Immunol**, 8(5), 731-6, 1996b. Erratum in: *Int Immunol*. 15(3), 456, 2003.

PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; JUSUF, S. S.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J. F.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; DIVERS, T. J.; SIMPSON, K. W.; MCDONOUGH, P. L.; MOHAMMED, H. O. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, 70, 5924-5930, 2002.

PALANIAPPAN, R. U.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; CHEN, C. S.; PAN, M. J.; MATSUMOTO, M.; CHANG, Y. F. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. **Infect Immun**, 74(3), 1745-50, 2006.

PETERSEN, A. M.; BOYE, K.; BLOM, J.; SCHLICHTING, P.; KROGFELT, K. A. First Isolation of *Leptospira fainei* Serovar Hurstbridge From Two Human Patients With Weil's Syndrome. **Journal of Medical Microbiology**, 50, 96-100, 2001.

- PETROVSKA, L.; LOPES, L.; SIMMONS, C. P.; PIZZA, M.; DOUGAN, G.; CHAIN, B. M. Modulation of dendritic cell endocytosis and antigen processing pathways by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and mutant derivatives. **Vaccine**, 21, 1445–1454, 2003.
- PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS ONE**. v. 3, p. 1607-15, 2008.
- PITCOVSKI, J.; BAZAK, Z.; WASSERMAN, E.; ELIAS, O.; LEVY, A.; PERETZ, T.; FINGERUT, E.; FRANKENBURG, S. Heat labile enterotoxin of *E. coli*: a potential adjuvant for transcutaneous cancer immunotherapy. **Vaccine**, 24, 636-643, 2006.
- RANALLO, R. T.; FONSECA, C. P.; CASSELS, F.; SRINIVASAN, J.; VENKATESAN, M. M. Construction and characterization of bivalent *Shigella flexneri* 2a vaccine strains SC608(pCFAI) and SC608(pCFAI/LTB) that express antigens from Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, 73(1), 258-67, 2005.
- REN, S. X.; GANG, F.; JIANG, X. G.; ZENG, R.; MIAO, Y. G.; XU, H.; ZHANG, Y. X.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L. F.; JIANG, H. Q.; JIA, J.; TU, Y. F.; JIANG, J. X.; GU, W. Y.; ZHANG, Y. Q.; CAI, Z.; SHENG, H. H.; YIN, H. F.; ZHANG, Y.; ZHU, G. F.; WAN, M.; HUANG, H. L.; QIAN, Z.; WANG, S. Y.; MA, W.; YAO, Z. J.; SHEN, Y.; QIANG, B. Q.; XIA, Q. C.; GUO, X. K.; DANCHIN, A.; SAINT GIRONS, I.; SOMERVILLE, R. L.; WEN, Y. M.; SHI, M. H.; CHEN, Z.; XU, J. G.; ZHAO, G. P. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, 422, 888-893, 2003.
- RICALDI, J. N.; VINETZ, J. M. Leptospirosis in the tropics and in travelers. **Curr Infect Dis Rep**, 8(1), 51-8, 2006.
- RICHARDS, C. M.; AMON, A. T.; HIRST, T. R.; HILL, T. J.; WILLIAMS, N. A. Protective immunity to ocular herpes simplex virus type-1 infection in mice using *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Journal of Virology**, v. 75, p. 1664–71, 2001.
- RISTOW, P.; BOURHY, P.; DA CRUZ MCBRIDE, F. W.; FIGUEIRA, C. P.; HUERRE, M.; AVE, P.; GIRONS, I. S.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathog**, 3(7), e97, 2007.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning – A laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, Ed., 2001.
- SCHODER, E.; WILL, H. Construction of a plasmid for expression of foreign epitopes as fusion protein with subunit B of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Infect Immun**, 57, 1347-50, 1989.
- SEGURA, E. R.; GANOZA, C. A.; CAMPOS, K.; RICALDI, J. N.; TORRES, S.; SILVA, H.; CÉSPEDES, M. J.; MATTHIAS, M. A.; SWANCUTT, M. A.; LÓPEZ LIÑÁN, R.; GOTUZZO, E.; GUERRA, H.; GILMAN, R. H.; VINETZ, J. M. Peru-United States Leptospirosis Consortium. Clinical spectrum of pulmonary involvement in

- leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. **Clin Infect Dis**, 40(3), 343-51, 2005.
- SEIXAS, F. K.; DA SILVA, E. F.; HARTWIG, D. D.; CERQUEIRA, G. M.; AMARAL, M.; FAGUNDES, M. Q.; DOSSA, R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, 26(1), 88-95, 2007.
- SEIXAS, F. K.; FERNANDES, C. H.; HARTWIG, D. D.; CONCEIÇÃO, F. R.; ALEIXO, J. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Can J Microbiol**, 53(4), 472-9, 2007.
- SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, 25(33), 6277–86, 2007.
- SIMMONS, C. P.; GHAEM-MAGAMI, M.; PETROVSKA, L.; LOPES, L.; CHAIN, B. M.; WILLIAMS, N.A.; et al. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. **Scand Journal Immunology**, 53, 28–226, 2001a.
- SIMMONS, C. P.; HUSSELL, T.; SPARER, T.; WALZL, G.; OPENSHAW, P.; DOUGAN, G. Mucosal delivery of a respiratory syncytial virus CTL peptide with enterotoxin-based adjuvants elicits protective, immunopathogenic, and immunoregulatory antiviral CD8+ T cell responses. **J Immunol**, 166(2), 1106-13, 2001.
- SIXMA, T.; PRONK, S. E.; KALK, K. H. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. **Nature**, 7, 351–371, 1991.
- SONRIER, C.; BRANGER, C.; MICHEL, V.; RUVOEN-CLOUET, N.; GANIERE, J. P.; ANDRE-FONTAINE, G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. **Vaccine**, 19, 86-94, 2000.
- SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiology Review**, 56, 622–647, 1992.
- SPICHLER, A.; MOOCK, M.; CHAPOLA, E. G.; VINETZ, J. Weil's disease: an unusually fulminant presentation characterized by pulmonary hemorrhage and shock. **Braz J Infect Dis**, 4, 336-40, 2005.
- TAHILIANI, P.; KUMAR, M. M.; CHANDU, D.; KUMAR, A.; NAGARAJ, C.; NANDI, D. Gel purified LipL32: a prospective antigen for detection of leptospirosis. **J Postgrad Med**, 51(3), 164-8, 2005.
- TAMURA, S.; HATORI, E.; TSURUHARA, T.; AIZAWA, C.; KURATA, T. Suppression of delayed type hypersensitivity and IgE antibody responses to ovalbumin by intranasal administration of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit-conjugated ovalbumin. **Vaccine**, 15(2), 225-9, 1997.
- THONGBOONKERD, V. Proteomics in leptospirosis research: towards molecular diagnostics and vaccine development. **Expert Review of Molecular Diagnostic**. v. 8, p. 53-61, 2008.

- TREVEJO, R. T.; RIGAU-PEREZ, J. G.; ASHFORD, D. A.; MCCLURE, E. M.; JARQUIN-GONZALEZ, C.; AMADOR, J. J.; et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua. **J Infect Dis**, 178(5), 1457—63, 1995.
- TRUCCOLO, J.; SERAIS, O.; MERIEN, F.; PEROLAT, P. Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. **FEMS MICROBIOL LETT**, 204(2), 317-21, 2001.
- TRUITT, R. L.; HANKE, C.; RADKE, J.; MUELLER, R.; BARBIERI, J. T. Glycosphingolipids as novel targets for T-cell suppression by the B subunit of recombinant heat-labile enterotoxin. **Infect Immun**, 66(4), 1299-1308, 1998.
- VERWEIJ, W. R.; DE HAAN, L.; HOLTROP, M.; AGSTERIBBE, E.; BRANDS, R.; VAN SCHARRENBURG, G. J. M.; WILSCHUT, J. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. **Vaccine**, 16, 20, 2069-2076, 1998.
- VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 14, 527-538, 2001.
- WELTZIN, R.; GUY, B.; THOMAS, W. D.; GIANNASCA, P. J.; MONATH, T. P. Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection. **Infection and Immunity**, 68, 2775-2782, 2000.
- WERTS, C.; TAPPING, R. I.; MATHISON, J. C.; CHUANG, T. H.; KRAVCHENKO, V.; SAINT GIRONS, I.; HAAKE, D. A.; GODOWSKI, P. J.; HAYASHI, F.; OZINSKY, A.; UNDERHILL, D. M.; KIRSCHNING, C. J.; WAGNER, H.; ADEREM, A.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nature Immunology**, 2, 346-352, 2001.
- WILLIAMS, N.A. Immune modulation by the cholera-like enterotoxin B-subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. **International Journal Medical Microbiology**, 290, 447—453, 2000.
- YAMAMOTO, S., Y.; TAKEDA, M.; YAMAMOTO, H.; KURAZONO, K.; IMAOKA, M. K.; YAMAMOTO, K. M.; FUJIHASHI, M. H.; NODA, H.; KIYONO; MCGHEE, J. R.; Mutants in the ADP-ribosyltransferase cleft of cholera toxin lack diarrheagenicity but retain adjuvanticity. **J. Exp. Med**, 185, 1203-1210, 1997.
- YAN, J.; WANG, Y.; SHAO, Y. F.; MAO, Y. F.; LI, H. W.; LUO, Y. H. Construction of prokaryotic expression system of *ltB-ureB* fusion gene and identification of the recombinant protein immunity and adjuvancity. **World J. Gastroenterol.** 10, 2675-2679, 2004.
- ZUERNER, R. L.; HAAKE, D.; ADLER, B.; SEGERS, R. Technological Advances in the Molecular Biology of *Leptospira*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 2, 455-462, 2000.
- ZUERNER, R. L.; KNUDTSON, W.; BOLIN, C. A.; TRUEBA, G. Characterization of outer membrane and secreted proteins of *Leptospira interrogans* serovar pomona. **Microb Pathog**, 10(4), 311-22, 1991.