

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

RESPOSTA IMUNOLÓGICA  
HUMORAL EM CAMUNDONGOS  
IMUNIZADOS COM O "VÍRUS DO  
MOSAICO SEVERO DO CAUPI  
(CPSMV)"

MARIA IZABEL FLORINDO GUEDES

N.Cham T574.192 G958r T

Autor: Guedes, Maria Izabel Florindo.

Título: Resposta Imunologica Humoral em



1248022

Ac. 43999

BCT

PORTALEZA — CEARÁ

1999

RESPOSTA IMUNOLÓGICA  
HUMORAL EM CAMUNDONGOS  
IMUNIZADOS COM O “VÍRUS DO  
MOSAICO SEVERO DO CAUPI  
(CPSMV)”

*Disponível*

MARIA IZABEL FLORINDO GUEDES

Tese apresentada à Coordenação do Curso de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, para a obtenção do Título de **Doutor** em **Bioquímica**, área de concentração em Bioquímica Vegetal.

FORTALEZA - CEARÁ

1999

UFC/BU/BCT

02/03/2000



R1248022

C613460

T574.192

Resposta Imunologica Humoral em  
Camundon

G958r

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL EM  
CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM O “VÍRUS  
DO MOSAICO SEVERO DO CAUPI (CPSMV)”**

UAZ

MARIA IZABEL FLORINDO GUEDES

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Guia Silva Lima

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA, 1999

Esta tese foi apresentada, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Tese será permitido desde que seja feita de acordo com as normas de ética científica.

Maria Izabel Florindo Guedes

TESE APROVADA EM: 21 de Dezembro de 1999.

---

Dr<sup>a</sup> Maria da Guia Silva Lima  
Dept<sup>o</sup> de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará  
Orientadora

---

Dr<sup>a</sup> Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro  
Dept<sup>o</sup> de Medicina Veterinária  
Universidade Estadual do Ceará  
Conselheiro

---

Dr<sup>a</sup> Maria Erivalda Farias de Aragão  
Dept<sup>o</sup> de Biologia  
Universidade Estadual do Ceará  
Conselheiro

---

Dr<sup>a</sup> Dirce Fernandes de Melo  
Dept<sup>o</sup> de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará  
Conselheiro

---

Dr. José Albérico de Araújo Lima  
Dept<sup>o</sup> de Fitotecnia  
Universidade Federal do Ceará  
Conselheiro

*Ao meu esposo Luiz.*

*Aos meus filhos Luizinho,*

*Sarah e Tsabela.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Maria da Guia Silva Lima, não só pela orientação valiosa deste trabalho, mas pelo ensinamento de vida, dedicação, paciência e sobre tudo pela capacidade de começar de novo, como se fosse a primeira vez.

Ao Prof. José Albérico de Araújo Lima pela co-orientação deste trabalho e pelas valiosas sugestões

À prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Dirce Fernandes de Melo, pelas sugestões na elaboração final do trabalho

À prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro, pelas sugestões, apoio e incentivo.

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria Erivalda Farias de Aragão, pelas sugestões, por sua preciosa ajuda durante a realização deste trabalho e principalmente pela amizade.

À prof.<sup>a</sup>. Denise pela amizade

Ao colega Adeildo, por sua grande ajuda na elaboração técnica deste trabalho, pela amizade e principalmente pelo espírito de solidariedade manifesto em todos os momentos.

Aos colegas e amigos do laboratório que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho e, de modo especial Ana Cláudia, Maria de Lourdes, Isabella, Márcia Marques, Maria Lúcia, Desirée, Márcia Rocha, Alana, Luciana, Érica, Evando, Márcio, Jarbas e Daniel

Ao meu esposo Luiz e filhos Luizinho, Sarah e Isabela que souberam tolerar minha ausência física, compreendendo-me nos momentos mais difíceis durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Wagner e Vandi, pelo apoio, pela amizade e imprescindível ajuda na elaboração deste trabalho.

Finalmente, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

## SUMÁRIO:

Conteúdo	Páginas
<b>LISTAS DE FIGURAS</b>	ix
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xiii
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1 - CULTURA DE <i>Vigna unguiculat</i> L .....	1
2 - VIROSES DO CAUPI .....	3
3 - Caracterização do CPSMV .....	5
4 - VIRUS DE VEGETAIS COMO SISTEMA DE EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS .....	6
5 - RESPOSTA IMUNOLÓGICA .....	9
5.1 - Compartimentalização da imunidade .....	9
6 - VIAS DE IMUNIZAÇÃO .....	11
6.1 - Via subcutânea .....	11
6.2 - Via oral .....	11
6.3 - Via intranasal .....	13
7 - IMUNOADJUVANTES .....	14
7.1 - Imunoadjuvantes mucoso .....	17
8 - TOLERÂNCIA ORAL .....	18
9 - USO DE VIRUS QUE INFECTAM VEGETAIS COMO VETORES NA PRODUÇÃO DE VACINAS .....	19
<b>OBJETIVOS GERAIS</b> .....	25
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	25

<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
1-MATERIAL VEGETAL .....	26
2-ANIMAIS .....	26
3-PURIFICAÇÃO DO VÍRUS .....	26
3.1-Obtenção dos Extratos de Plantas de <i>V. unguiculata</i> Infetada Pelo Vírus CPSMV e Sadia.....	28
4 - CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA VIRAL .....	28
4.1 - Análise em Espectrofotômetro da Preparação Viral Purificada .....	28
4.2 - Dosagem de Proteínas .....	29
4.3 - Eletroforese das Proteínas .....	29
5 - IMUNIZAÇÃO .....	30
5.1 - Preparação dos Adjuvantes .....	30
5.1.1 - Marcol .....	30
5.1.2 - Gel de Hidróxido de Alumínio .....	31
5.2 - Imunização por Via Subcutânea com as Proteínas Totais do Vírus do Mosaico Severo do Caupi (CPSMV) .....	31
5.2.1 - Imunização por Via oral .....	32
5.2.1.1 - Imunização Oral com Extrato Total de Plantas de <i>V.</i> <i>unguiculata</i> infetada com o CPSMV e sadia .....	32
5.2.1.2 - Imunização oral com o CPSMV Purificado .....	33
6 - OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS .....	33
7 - SOROLOGIA .....	33
7.1 - Imunodifusão em Agar (OUCHTERLONY) .....	33
7.2 - ELISA .....	34
7.3 - WESTERN BLOTTING .....	35
7.3.1 - Tampão PBS para a realização do teste .....	35
7.3.2 - Realização .....	35

7.3.3 - Revelação do Imunoblotting .....	36
7.4 - Imunoprecipitação Quantitativa .....	37
7.5 - Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva .....	38
7.5.1 - Para IgE .....	38
7.5.2 - Para IgG1 .....	39
8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
<b>RESULTADOS</b> .....	41
1 - CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO VIRAL DE CPSMV .....	41
1.1 - Análise Espectrofotométrica .....	41
1.2 - Análise por Eletroforese em Sistema de SDS-PAGE .....	41
2 - Avaliação da Resposta Imunológica por ELISA .....	48
2.1 - Avaliação da Resposta IgG1 específica por PCA .....	54
2.2 - Avaliação da Resposta IgE específica por PCA .....	63
3- RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL DE CAMUNDONGOS 'SWISS' IMUNIZADOS POR VIA ORAL .....	69
3.1 - Avaliação da Resposta Imunológica por Dupla Difusão em agar ..	69
3.2 - Avaliação da Resposta Imunológica IgG1-específica por PCA .....	72
3.3 - Avaliação da Resposta Imunológica IgE - específica por PCA. ....	72
3.4 - Avaliação por ELISA .....	75
3.5 - Análise por Western Blotting dos Anticorpos Séricos Específicos Induzidos por Imunização de Camundongos por via Subcutânea com Proteínas do Capsídeo do CPSMV .....	79
4 - COMPARAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS ANTISSOROS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS POR VIA SUBCUTÂNEA E POR VIA ORAL DO CPSMV .....	79

<b>DISCUSSÃO</b> .....	82
A INFEÇÃO POR CPSMV E A CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO CAPSÍDEO VIRAL .....	82
RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDA POR CPSMV MINISTRADO POR VIA SUBCUTÂNEA .....	83
RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDA POR CPSMV MINISTRADO POR VIA ORAL .....	88
RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS .....	93
<b>CONCLUSÕES</b> .....	94
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	95

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Plantas de <i>Vigna unguiculata</i> sadia.....	02
FIGURA 2: Plantas de caupi <i>Vigna unguiculata</i> , sistemicamente infetada pelo mosaico severo do caupi (CPSMV), apresentando sintomas de mosaico severo com bolhosidades.....	04
FIGURA 3: Espectro de absorção ultra-violeta de suspensão purificada de CPSMV.....	42
FIGURA 4: Perfil eletroforético das subunidades protéicas do capsídeo do CPSMV, em SDS-PAGE a 17%: .....	43
FIGURA 5: Teste de imunodifusão dupla em meio de agar demonstrando a especificidade dos antissoros obtidos de camundongos imunizados com 10 µg de CPSMV purificado usando como adjuvantes Al(OH) <sub>3</sub> ou Marcol. ....	45
FIGURA 6 - Cinética da síntese de imunoglobulinas totais através de teste de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY) em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg CPSMV .....	46
FIGURA 7 - Cinética de síntese de imunoglobulinas totais através de teste de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY) em camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg CPSMV.....	47
FIGURA 8 - Cinética de síntese de imunoglobulinas totais através de teste de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY) em camundongos imunizados por via subcutânea com CPSMV + Marcol. ....	49
FIGURA 9 - Cinética de síntese de imunoglobulinas totais através de teste de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY) em camundongos imunizados por via subcutânea com CPSMV + Al(OH) <sub>3</sub> .....	50
FIGURA 10: Anticorpos específicos contra o CPSMV detectados em camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg de proteínas	

de capsídeo do CPSMV (28 dias após a imunização)- (A) e soro preimune-(B), através de análise por Western blotting.....	51
FIGURA 11– Teste Enzyme linked immunossorbent assay (ELISA) com antissoro policlonal de camundongos imunizados com 10 µg CPSMV + Marcol na diluição de 1:400.....	52
FIGURA 12 – Teste Enzyme linked immunossorbent assay (ELISA) com antissoro policlonal de camundongos imunizados com 100 µg CPSMV + Marcol na diluição de 1:400.....	53
FIGURA 13– Teste Enzyme linked immunossorbent assay (ELISA) com antissoro policlonal de camundongos imunizados com 10 µg CPSMV + Al(OH) <sub>3</sub> na diluição de 1:400.....	55
FIGURA 14 –Teste Enzyme linked immunossorbent assay (ELISA) com antissoro policlonal de camundongos imunizados com 100 µg CPSMV + Al(OH) <sub>3</sub> na diluição de 1:400. ....	56
FIGURA 15: Resposta imunológica do tipo IgG1 em soros de camundongos imunizados por via subcutânea com proteínas dos capsídeos do CPSMV, detectados através de PCA (Anafilaxia Passiva Cutânea. . .	57
FIGURA 16 – Resposta do tipo IgG1 em camundongos imunizados por via subcutânea com CPSMV .....	59
FIGURA 17 – Resposta do tipo IgG1 em camundongos imunizados por via subcutânea com CPSMV .....	60
FIGURA 18 – Resposta do tipo IgG1 em camundongos imunizados por via subcutânea com CPSMV + Marcol .....	61
FIGURA 19 – Resposta do tipo IgG1 em camundongos imunizados por via subcutânea com CPSMV + Al(OH) <sub>3</sub> . ....	62
FIGURA 20: Resposta imunológica do tipo IgE, detectados através de PCA (Anafilaxia Passiva Cutânea) em soros de camundongos	

imunizados por via subcutânea com 10 µg e 100 µg de CPSMV proteínas dos capsídeos do CPSMV + Al(OH) <sub>3</sub> como adjuvante. ....	64
FIGURA 21 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de CPSMV .....	65
FIGURA 22 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg de CPSMV. ....	66
FIGURA 23 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de CPSMV + Marcol.....	67
FIGURA 24 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de CPSMV + Al(OH) <sub>3</sub> . ....	68
FIGURA 25 - Anticorpos específicos detectados em soro de camundongos (25 dias após o início da imunização), detectados por teste de imunodifusão dupla em agar. ....	70
FIGURA 26 – Cinética da síntese de imunoglobulinas totais através de teste de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY) em camundongos imunizados por via oral com extrato de planta de <i>V unguiculata</i> infetada pelo CPSMV e CPSMV purificado.....	71
FIGURA 27: Resposta imunológica do tipo IgG1 específicas para o CPSMV detectados em camundongos imunizados por via oral através de PCA: .....	73
FIGURA 28 - Resposta do tipo IgG1 (PCA) em camundongos imunizados por via oral com extrato total de folhas de <i>V. unguiculata</i> infectada com CPSMV e com o CPSMV purificado.....	74
FIGURA 29: Cinética da síntese de anticorpos específicos contra o CPSMV em soro de camundongos com extratos de folhas de planta infetada pelo CPSMV detectada por ELISA. ....	76
FIGURA 30: anticorpos específicos contra o CPSMV em soros de camundongos imunizados por via oral com extrato de folhas de <i>V.</i>	

<i>unguiculata</i> infectadas pelo CPSMV, detectados por ELISA, usando diferentes diluições de soro e antígenos. ....	77
FIGURA 31: Anticorpos específicos contra o CPSMV obtidos em soro de camundongos imunizados com extratos de folhas de planta infetada pelo CPSMV (25 dias após o início da imunização) detectados através de teste de ELISA, usando diferentes diluições do soro. ....	78
FIGURA 32: Anticorpos específicos contra o CPSMV (IgG e IgA) detectados em soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de folhas de planta de <i>V. unguiculata</i> infetadas pelo CPSMV por imunoblotting após imunoprecipitação de vírus purificado com o antissoro. ....	80
FIGURA 33: Perfil eletroforético dos anticorpos específicos contra o CPSMV, detectados em soros de camundongos imunizados por via oral e via subcutânea com CPSMV purificado, extrato de folhas planta <i>V. unguiculata</i> infetadas pelo vírus e extrato de folhas de planta sadia e o perfil eletroforético da mucosa do intestino dos camundongos, em eletroforese nativa a 7%. ....	81

## ABREVIATURAS

- Al(OH<sub>3</sub>)-Hidróxido de Alumínio
- PCA- Anafilaxia Cutânea Passiva
- IgG- Imunoglobulina do tipo G
- IgE- Imunoglobulina do tipo IgE
- IgA- Imunoglobulina do tipo de IgA
- CT- Toxina do *Vibrio cholerae*
- SDS- Dodecil Sulfato de Sódio
- RNA- Ácido ribonucléico
- DNA- Ácido desoxirribonucléico
- GALT- Tecido Linfóide associado ao intestino
- APCs- Células apresentadoras de antígeno
- IL-4- Interleucina-4
- IL-5- Interleucina-5
- IL-6- Interleucina-6
- Th2- Linfócitos T auxiliares
- Pb- Pares de bases
- PEG- Polietileno Glicol
- NaCl- Cloreto de Sódio
- KCl- Cloreto de Potássio
- HCl- Ácido Clorídrico

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ - Fosfato de Potássio

$\text{NaOH}$ - Hidróxido de Sódio

ET- Extrato Total

Ca- cerca de

## RESUMO

O "Vírus do Mosaico Severo do Caupi"- (CPSMV) é um vírus pertencente ao gênero *Comovirus* que infecta as plantas da leguminosa *V. unguiculata* causando séria redução no rendimento da produção de grãos. Ao ser purificado e submetido a SDS-PAGE, foi revelado que o vírus apresenta um perfil eletroforético com três bandas protéicas de 42, 23 e 21 kDa. O vírus purificado foi usado para imunização subcutânea de camundongos "swiss" com duas doses imunizantes contendo 10 e 100 µg de proteína (do capsídeo viral). Foi detectada síntese de anticorpos séricos específicos, sejam IgG totais, seja IgG1, mesmo na ausência de adjuvantes. Tanto o marcol como o gel de Al(OH)<sub>3</sub> revelaram capacidade adjuvante sobre a síntese de anticorpos específicos contra CPSMV, em doses de 10 e 100 µg, usado em imunizações por via subcutânea. Na síntese de IgG totais e de IgG1, o marcol teve um melhor efeito adjuvante quando associado a dose de 10 µg de CPSMV e o gel de Al(OH)<sub>3</sub> teve melhor desempenho associado à dose de 100 µg. Com a imunização por via subcutânea com 10 e 100 µg de CPSMV houve síntese de IgE anti-CPSMV, em presença de adjuvante. Dessa forma, o Al(OH)<sub>3</sub> teve efeito potencializador mais pronunciado sobre a síntese de IgE quando associado à baixa dose imunizante (10 µg) de CPSMV. Já com o marcol, o efeito potencializador foi melhor quando era associado à dose alta de CPSMV

(100µg). A imunização por via subcutânea com 10 e 100 µg de CPSMV sem adjuvante não provocou síntese de IgE específicas para o vírus. O CPSMV purificado e o extrato de folhas de plantas infectadas pelo mesmo, ministrados por via oral, induziram uma resposta sérica com a produção de IgG e IgA específicas, anti-CPSMV. Não foi detectada síntese de anticorpos específicos contra as demais proteínas presentes no extrato de folhas de plantas infectadas por esse vírus. Pelo fato de o CPSMV, ministrado por via oral, ter demonstrado capacidade imunogênica seletiva (formação de anticorpos anti-CPSMV e não induzir síntese de anticorpos específicos contra as demais proteínas do extrato de plantas), tal característica pode dar fundamento a novos procedimentos de produção de anticorpos, sem exigir a purificação prévia do vírus. Além disso, o CPSMV, ao ser um bom imunógeno pela via oral, torna-se um candidato privilegiado para expressar antígenos na produção de vacinas contra patógenos em humanos e/ou outros animais uma vez que não apresenta os efeitos colaterais de outros carreadores usados com a mesma finalidade. Por outro lado, os resultados apresentados contribuem com outra maneira de estudar os mecanismos da tolerância imunológica, observada com frequência bem maior do que a indução de síntese de anticorpos específicos, quando se usa a rota oral nos procedimentos de imunização.

## ABSTRACT

The Cowpea Severe Mosaic Severo Virus (CPSMV) belongs to the *comovirus* genus that infects plants of the legume, *V. unguiculata* causing serious shortage in the crop production of grains. The SDS-PAGE analysis of purified CPSMV revealed an electrophoretic profile with 3 protein bands of 42, 23 and 21 kDa.. The purified CPSMV was used for subcutaneous immunization of swiss mice in two immunizing doses containing 10 and 100  $\mu\text{g}$  protein (from the viral capsid) and synthesis of specific total IgG and IgG1 was detected in the serum. Marcol as well as  $\text{Al}(\text{OH})_3$  were shown to have adjuvant abilities on the synthesis of specific antibodies against CPSMV. In the synthesis of total IgG and IgG1, marcol had a better adjuvant effect when associated to the low subcutaneous immunizing dosis of CPSMV (10 $\mu\text{g}$ ) and the gel of  $\text{Al}(\text{OH})_3$  had a better adjuvant role associated to the high dose of CPSMV (100  $\mu\text{g}$ ). Specific IgE was detected with both subcutaneous immunizing doses in the presence of both adjuvants;  $\text{Al}(\text{OH})_3$  had a more pronounced adjuvant effect in the synthesis of IgE when associated to the low immunizing dosis (10  $\mu\text{g}$ ) of CPSMV while the adjuvant effect of marcol was shown when it was associated to the high dosis of CPSMV (100  $\mu\text{g}$ ). In the absence of adjuvants, subcutaneous immunization with 10 and 100  $\mu\text{g}$  CPSMV did not induce specific synthesis of IgE. Mice orally immunized either with purified CPSMV or with leaf extract

from plants infected by CPSMV induced specific production of IgG and IgA, anti-CPSMV. Synthesis of specific antibodies was not detected against the other proteins present in the leaf extract of *V. unguiculata*. By the fact that CPSMV, by oral route, has been demonstrated to possess selective immunogenic capacity, (induced the synthesis of anti-CPSMV antibodies without inducing synthesis of specific antibodies against other proteins of the leaf extract of *V. unguiculata* plants), such characteristic might justify new viral contamination diagnostic procedures, avoiding previous virus exhaustive purifications. Furthermore, CPSMV, as a good immunogen by oral route, becomes a privileged candidate to express antigens in the production of vaccines against pathogens for humans and/or other animals since it has no side effects as other antigen expressing carriers used with the same purpose. On the other hand, the present results contribute with another way of investigating the mechanisms of immunological tolerance established during the immunizations by the oral immunization procedures, rather than the production of specific antibodies.

## INTRODUÇÃO

### 1 - CULTURA DE *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

O caupi é uma dicotiledônea que pertence à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolinae* e ao gênero *Vigna*, que de acordo com MARÉCHAL *et al.* (1978), apresenta 84 espécies, das quais, segundo o mesmo autor, 66 encontram-se na África, onde são consideradas endêmicas. Isso sugere que o gênero *Vigna* deve ter tido sua evolução ligada a esse continente. O caupi foi trazido para as Américas tropicais pelos espanhóis, por volta de 1700, junto com o comércio de escravos (Singh *et al.*, 1997).

A espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (FIGURA 1), vulgarmente conhecida como feijão-de-corda, feijão fradinho, feijão macássar, feijão de praia e carpi, é uma leguminosa comestível dotada de alto conteúdo protéico e pouco exigente em termos de fertilidade de solo, constituindo-se, assim, uma fonte alimentar de grande importância para as populações pobres em países tropicais menos desenvolvidos (Araújo *et al.*, 1984). É uma cultura amplamente difundida, principalmente nas áreas semi-áridas da região Nordeste do Brasil, entre os pequenos agricultores, sendo a principal cultura de subsistência. Além do grão, suas folhas e vagens imaturas são usadas como alimento, sendo bastante nutritivas, fornecendo proteína, vitaminas e minerais. O grão contém em média 23-25% de proteína e 50-67 % de amido (Araújo *et al.*, 1984). O caupi, através da fixação simbiótica de nitrogênio, não só mantém como eleva o nível desse nutriente no solo, após a incorporação dos resíduos da sua colheita (Singh *et al.*, 1997).



FIGURA 1: Plantas de *V. unguiculata*, sadia

## 2 – VIROSES DO CAUPI

As viroses, invariavelmente, ocupam posição de destaque como fator limitante da produtividade de várias cultivares de caupi em diferentes partes do mundo (Lima & Nelson, 1977; Lima, 1978; Brioso *et al.*, 1994). No estado do Ceará, as doenças causadas por viroses têm sido consideradas como um dos principais problemas fitopatológicos do caupi, ocasionando elevadas reduções na sua produtividade (Lima & Nelson, 1977; Lima *et al.*, 1981; Vale & Lima, 1994).

De acordo com SINGH *et al.*, (1997) o caupi pode ser infectado por mais de 20 espécies de vírus pertencentes à diferentes famílias e/ou gêneros. Entre as principais viroses que causam danos à cultura do caupi no estado do Ceará, pode-se mencionar as pertencentes às seguintes famílias e gêneros: família *Comoviridae* e gênero *Comovirus*, vírus do mosaico severo do caupi (“cowpea severe mosaic virus”, CPSMV), família *Potyviridae* e gênero *Potyvirus*, vírus do mosaico do caupi transmitido por afídeos (“cowpea aphid-borne mosaic”, CABMV) e vírus do mosaico do caupi blackeye (“blackeye cowpea mosaic virus”, BLCMV), família *Bromoviridae* e gênero *Cucumovirus*, vírus do mosaico do pepino (“cucumber mosaic virus”, CMV), família *Geminiviridae* e gênero *Begomovirus*, vírus do mosaico dourado do caupi (“cowpea golden mosaic virus”, CGMV)

FIGURA

severo

bol

Recentemente um isolado do vírus do mosaico dourado - CGMV pertencente também à família *Geminiviridae* mas ao gênero *Geminivirus* subgrupo III, foi constatado em diversos locais do estado do Ceará (Lima *et al.*, 1998).

Dentre os vírus acima citados merece destaque o CPSMV, que infecta naturalmente a planta de *V. unguiculata* (Brioso *et al.*, 1994) (FIGURA 2)



FIGURA 2: Plantas de *V. unguiculata*, sistemicamente infectada pelo mosaico severo do caupi (CPSMV), apresentando sintomas de mosaico severo com bolhosidades

ocasionando severa diminuição na produtividade dessa cultura (LIMA *et al.*, 1989).

### 3.0 –CARACTERIZAÇÃO do CPSMV

O CPSMV foi por muito tempo, considerado uma raça do “Cowpea Mosaic Virus” (CPMV), mas posteriormente foi reconhecido como um vírus distinto (Fulton & Scott, 1979; De Jager, 1979).

As partículas do CPSMV, como os de todos os comovírus, apresentam virions não envelopados, exibindo morfologia isométrica, com diâmetro entre 28 a 30 nm. Cada capsídeo é formado por 60 cópias de uma proteína longa (“Large”, L) e uma cópia da proteína pequena (“Small”, S) (Murphy *et al.*, 1995; Chen & Bruening., 1992), e essas proteínas têm massas moleculares aparentes de 42 kDa e 23 kDa, respectivamente (Murphy *et al.*, 1995). De acordo com MURPHY *et al.*, (1995) a capa protéica dos comovírus, provavelmente apresenta proteínas glicosiladas.

Assim como em todos os comovirus, o genoma do CPSMV possui dois segmentos de RNA de fita simples, com tamanhos de 5,8 kb (RNA1) e 3,6 kb (RNA2) (Murphy *et al.*, 1995) os quais foram sequenciados por CHEN & BRUENING (1992) que mostraram ser a sequência 5'-r UAUUAAAAUUUU, comum aos dois RNAs, o que está de acordo com o descrito na literatura para outros comovírus (Lomonossoff & Shanks, 1983; Van Wezenbeek *et al.*, 1983; Mac Farlane *et al.*, 1991 e Chen & Bruening, 1992).

Ambos RNAs genômicos do CPSMV são necessários para que ocorra a infecção sistêmica na planta hospedeira. O RNA1 codifica funções necessárias à replicação, enquanto o RNA2 codifica as proteínas necessárias para o movimento do vírus, célula a célula e a longa distância (sistêmico), bem como

codifica as proteínas do capsídeo (Goldbach *et al.*, 1980; Willink & Van Kammen, 1989).

#### 4-VÍRUS DE VEGETAIS COMO SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS

Os vírus que infectam os vegetais, reconhecidos como não patogênicos para seres humanos e outros animais, têm atraído particular atenção por sua possível utilização como vetores de expressão de genes provenientes de outros sistemas biológicos de interesse (Scholthof *et al.*, 1996).

Devido as suas características de ser transmitido mecanicamente, de atingir alta concentração na planta hospedeira, de ser um vírus estável e de fácil purificação, o CPMV tem sido o vírus mais utilizado com o propósito de expressar genes estrangeiros em sua capa protéica (Usha *et al.*, 1993). Pesquisas anteriores sobre o uso do CPMV como um vetor de expressão, determinaram algumas normas para a construção de quimeras viáveis e geneticamente estáveis (Stanley, *et al.*, 1993; Porta *et al.*, 1994). Primeiro, as seqüências estrangeiras devem ser adicionadas à seqüência do CPMV do tipo selvagem sem que haja substituição dos genes nativos; segundo, os métodos para introdução de genes estrangeiros que resultam na duplicação da seqüência em cada lado da inserção são inadequados, pois ocorre perda do gene inserido durante a recombinação homóloga; terceiro, o sítio preciso da inserção dentro do "loop"  $\beta$ B- $\beta$ C da proteína S é importante para maximizar o crescimento das quimeras. Usando essas regras, mais de 30 diferentes quimeras com CPMV já foram produzidas nos últimos 3-4 anos, como: o 'Rhinovirus-14'-HRV-14 (Porta *et al.*, 1994); o Vírus da 'Imunodeficiência Humana-1'-HIV-1 (Porta *et al.*, 1994; McLain *et al.*, 1996 e XU *et al.*, 1996); o 'Vírus Food-and-Mouth'-FMDV (Usha *et al.*, 1993).. As partículas quiméricas têm se mostrado estáveis em pH 1,0 e até quando

incubadas com pepsina (Xu *et al.*, 1996). As quimeras resultantes foram purificadas através de plantas de caupi infectadas e induziram uma resposta imunológica específica, quando utilizadas para imunização subcutânea de diferentes animais. Na maioria dos casos, a presença de seqüências heterólogas não afeta a capacidade do CPMV de se replicar nas plantas e a produção de vírus modificados é semelhante à produção obtida em plantas infectadas com o vírus nativo. A propagação do vírus quimérico pode ser realizada através da inoculação do extrato de folhas de plantas infectadas com o mesmo, para outras plantas saudáveis. Uma investigação sobre a estabilidade genética de diversas quimeras determinou que as inserções podem ser mantidas intactas, por pelo menos 10 passagens seriadas, desde que o tamanho da inserção não ultrapasse 30 aminoácidos (Porta & Lomonosoff, 1994).

Recentemente BRENNAN *et al.*, (1999) demonstraram que o CPMV expressando a proteína B da bactéria *Staphylococcus aureus* funcionou como um potente imunógeno através das vias oral e nasal

O vírus do mosaico do fumo ("tobacco mosaic virus", TMV) também vem sendo utilizado como um sistema de apresentação de antígeno, mostrando-se eficiente quando utilizado para expressar uma enzima (Hamamoto *et al.*, 1993), uma proteína ZP3 (Fitchen *et al.*, 1995). Essas proteínas foram acumuladas em grandes quantidades em plantas de *Nicotiana tabacco* L., foram purificadas e utilizadas para imunização, induzindo uma resposta imunológica.

O "Tomato Bushy Stunt Virus" (TBSV) expressou a glicoproteína 120 (gp120) do vírus da imunodeficiência humana, HIV-1. O gene que expressa a gp 120 foi inserido na capa protéica do TBSV e a quimera foi replicada. As quimeras, então produzidas, foram purificadas e utilizadas para a imunização de camundongos através da via subcutânea, induzindo uma resposta imunológica.

com produção de anticorpos específicos para os dois vírus, HIV-1 e TBSV (Joelson *et al.*, 1997).

O “vírus do mosaico da alfafa” (*alfafa mosaic virus-AMV*) também funcionou com eficiência para expressar epítomos do vírus da raiva e do vírus HIV-1, sendo que as quimeras produzidas foram multiplicadas em plantas de *N. tobacco*, posteriormente purificadas e utilizadas para indução de uma resposta imunológica através de imunização de camundongos por via subcutânea. (Yusibov *et al.*, 1998)

Foi demonstrado pela primeira vez por FLORINDO *et al.* (1997) a imunogenicidade do CPSMV utilizando a via oral. Camundongos "swiss" foram imunizados com vírus purificado ou com extrato de folhas de *V. unguiculata* infectada pelo mesmo. Em seguida, LIMA *et al.* (1998) reproduziram esses resultados, imunizando coelhos também por via oral. A partir de então outros modelos começaram a ser testados utilizando essa via.

O AMV foi utilizado para expressar o vírus da raiva induzindo uma resposta imunológica sistêmica e mucosa, quando camundongos eram imunizados por via oral com as quimeras purificadas e com folhas de espinafre contendo as mesmas (Modelska *et al.*, 1998)

DURRANI *et al.* (1999) mostraram que a imunização de camundongos por via intranasal com duas doses de quimera do CPMV e HIV-1, induzindo respostas imunológicas mucosa e sistêmica, produzindo IgA e um alto nível de anticorpos séricos, principalmente IgG2a específicos para o HIV-1 e CPMV. Resultados semelhantes foram observados por BRENNAN *et al.* (1999) utilizando quimeras do CPMV e uma proteína da bactéria *Staphylococcus aureus*

## 5- RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A resposta imunológica é um mecanismo de defesa, que leva os animais vertebrados a produzirem anticorpos e células reativas, em resposta a uma grande variedade de moléculas, especialmente proteínas. Todas as respostas imunológicas são iniciadas pelo reconhecimento de antígenos estranhos. Isto conduz a ativação de linfócitos que reconhecem especificamente o antígeno, e culmina no desenvolvimento de mecanismos que modulam o efeito fisiológico da resposta, isto é a eliminação do antígeno (Abbas *et al.*, 1998).

As respostas imunológicas são eventos complexos que envolvem tecidos, células e interações moleculares. Entre os mediadores solúveis, as citocinas aparecem para controlar, em um grau considerável, a natureza dessa resposta (Boyaka *et al.*, 1999). As respostas imunológicas são influenciadas pela rota de imunização, pela natureza do antígeno e ainda pela presença de elementos biologicamente ativos que servem para mediar o tropismo específico nos tecidos (Anderson, 1999). Os adjuvantes, vetores ou veículos, também influenciam na qualidade e quantidade de uma resposta imunológica (Walker, 1994; Spriggs, 1996).

### 5.1 -Compartimentalização da imunidade

Atualmente vem sendo firmado um conceito de compartimentalização da resposta imunológica pela existência de, no mínimo, dois sistemas imunes, um sistema imune periférico e um sistema imune mucoso. Esses sistemas operam separada e simultaneamente em muitas espécies, incluindo os seres humanos (Anderson, 1999) e a própria imunidade sistêmica pode resultar de uma combinação da imunidade periférica com a imunidade mucosa.

O conceito anatômico de compartimentalização da imunidade é baseado na contribuição de conhecimentos oriundos de várias disciplinas (Kroemer *et al.*, 1993). A anatomia da captação do antígeno, a fisiologia e a bioquímica da recirculação dos linfócitos e o microambiente único dos tecidos, têm funções que influenciam significativamente a qualidade das respostas humoral e celular.

A maneira como cada tecido linfóide entra em contato com os antígenos afeta a resposta imunológica. Assim, alguns antígenos podem produzir qualitativamente diferentes respostas em linfonodos, baço ou placas de "Peyer" (Anderson, 1990). Os antígenos na corrente linfática são filtrados, capturados, processados e apresentados quando a linfa passa sobre as células apresentadoras de antígenos nos linfonodos. Tal processamento de antígenos nos linfonodos resulta no que se definiu como "imunidade periférica", caracterizada pelo aparecimento de IgG no sangue. Na corrente sangüínea, os antígenos são também filtrados, capturados, processados e apresentados em interfaces estratégicas estabelecidas entre o sangue e os tecidos no baço. Isto também resulta em "imunidade periférica" (Anderson, 1999). O microambiente do baço é de certa forma mais complexo porque acomoda as células apresentadoras de antígenos circulantes e as células T e B imunoreativas de outros tecidos comprometidos com as imunidades periférica ou mucosa. Os antígenos no lúmen dos órgãos dos tratos respiratório ou gastrintestinal não são destrutivelmente endocitados pelas células epiteliais especializadas, chamadas de células "M", são "trespassados" para as células no interior das placas de "Peyer", onde ocorre o desencadeamento do processo da "imunidade mucosa", caracterizado pela produção de IgA (Anderson, 1999).

A distinção entre sistemas que regula imunidade humoral versus imunidade celular (Rocken & Shevach, 1996) não deve ser confundida com imunidade "periférica" ou "mucosa". Imunidade celular e imunidade humoral

estão presentes em ambos os sistemas periférico e mucoso, mas os isotipos de anticorpos e a seletividade das células T efectoras do órgão podem ser diferentes. Algumas das interações e citocinas envolvidas no controle da imunidade celular ou humoral estão também envolvidas no desencadeamento da imunidade periférica versus mucosa e vice-versa (Mosmann & Sad, 1996).

## 6 - VIAS DE IMUNIZAÇÃO

### 6.1 - Via subcutânea

A via subcutânea é uma via artificial bastante usada experimentalmente para indução de anticorpos circulantes em processos de vacinação em seres humanos e outros animais, e ainda, em produção de anticorpos contra vírus de vegetais, para utilização em diagnósticos.

Uma das vantagens da utilização dessa via é o fato do antígeno administrado não sofrer a interferência dos processos do trato digestivo, entretanto existem restrições quanto ao uso dessa via, pois a mesma necessita de adjuvantes para induzir uma resposta imunológica eficiente, com a maioria dos antígenos.

### 6.2 - Via oral

A via oral vem sendo bastante utilizada nos procedimentos de imunização uma vez que, é por ela que a maioria dos patógenos inicia o processo infeccioso interagindo com a mucosa do hospedeiro. Além disso, a via oral é de interesse preferencial por ser a via fisiológica de entrada dos alimentos. De acordo com MAGISTRIS (1998) o ponto prático da imunização por via oral, é que essa é uma via natural, não invasiva, facilita uma possível vacinação em

massa e a aceitação da vacina pelo público é maior. A imunização pela via oral tem várias vantagens sobre a imunização parenteral sobretudo porque a imunização pelas mucosas induz a síntese de anticorpos específicos (IgA) diretamente no sítio de infecção e esses anticorpos podem inibir o ataque e a colonização do patógeno, bem como podem neutralizar sua atividade tóxica. A imunização através da mucosa estimula a resposta imune sistêmica do tipo IgA e ainda estimula a do tipo IgG que representa uma barreira contra a invasão dos tecidos pelos microorganismos. A outra vantagem da imunização por via oral é que, em caso de vacinação ela pode ser feita independente do estado de saúde do candidato a receber a vacina MAGISTRIS (1998).

Apesar das vantagens do uso da via oral, para a indução de uma resposta imunológica, seja sistêmica, seja mucosa, essa via é limitada por alguns obstáculos. Um deles é o da dose do antígeno imunizante, isto é, sendo a quantidade de antígeno absorvida pequena, faz-se necessário ministrar quantidades relativamente grandes do mesmo, o que ocasiona, freqüentemente, o estado de tolerância imunológica (Maureen & Ferguson, 1986; Van der Heijden *et al.*, 1991; Melo *et al.*, 1994; Weiner *et al.*, 1997; Strobel & Mowat, 1998). Pequenas quantidades de proteínas, administradas pela via oral, escapam da digestão enzimática no intestino e são absorvidas como antígenos intactos (Mowat, 1987; Strobel & Mowat, 1998). Apenas 2% das proteínas administradas oralmente podem ser absorvidas, levando ao desencadeamento de três importantes conseqüências imunológicas: indução de uma resposta imunológica mucosa, com produção de IgA secretora; indução de uma resposta imunológica sistêmica, o que é mais difícil e desenvolvimento de um estado de tolerância imunológica o que acontece com mais freqüência.

Alguns aspectos do processo de imunização por via oral vêm sendo estudados e foi demonstrado que certas características são necessárias aos antígenos administrados por essa via, para desempenhar sua função como

imunógeno. As proteínas imunogenicamente ativas, administradas pela via oral possuem atividades ligantes, como as desempenhadas pelas lectinas, sendo portanto, proposto que essas moléculas seriam capazes de ligar-se especificamente a glicolipídios e glicoproteínas existentes na superfície da mucosa intestinal, sendo assim internalizadas e transportadas para a corrente sanguínea (Aizpurua & Russel, 1988).

Considerando-se a importância da imunização por via oral e o fato da exposição do ser humano a muitos patógenos como vírus e bactérias ocorrer inicialmente através do contato com a mucosa, parece ser importante a procura de substâncias imunogênicas, como é o caso dos vírus de vegetais e/ou proteínas de bactérias desprovidas de toxicidade, que possam atuar como adjuvantes efetivos na mucosa para a produção de vacinas (Mckenzie & Halsey, 1984).

Extensivos estudos de estratégias para desenvolver efetivos sistemas que possam aumentar a absorção do antígeno, prevenir sua degradação e ainda ser capaz de induzir uma resposta imunológica eficaz são do maior interesse MESTECKY *et al.* (1997).

Um melhor entendimento dos fatores moleculares e celulares envolvidos na regulação da imunidade de mucosa, aumentaria a segurança nos procedimentos de vacinação, com o objetivo de induzir uma resposta imune de caráter protetor apropriado contra um determinado patógeno (Boyaka *et al.*, 1999).

### 6.3 - Via Intranasal

A via intranasal já foi muito utilizada, sobretudo por sua relação com os fenômenos ligados a asma, rinites alérgicas e outras reações alérgicas do trato respiratório. Estudos de vários laboratórios têm mostrado que uma grande

quantidade de antígenos, administrados pela via nasal, são altamente efetivos na indução de respostas imunológicas mucosa e parenteral (Abraham, 1992). A imunização através da via intranasal apresenta vantagens em relação a via oral, por evitar o contato com as enzimas degradativas do trato gastrointestinal (Brennan *et al.*, 1999). Além disso, a via intranasal necessita de 10 vezes menos antígeno do que a via oral.

A via intranasal quando utilizada com: vacinas vivas (Gilleland *et al.*, 1997); vírus vetores (Ball *et al.*, 1998; O'Neal *et al.*, 1997); e peptídeos sintéticos (Staats *et al.*, 1996), sem a adição de adjuvantes, tem mostrado estimular respostas imunes de altos títulos, induzindo proteção em sítios distantes. Três rotas de imunização de camundongos (traqueal, nasal e peritoneal) com adenovírus, induziram respostas imunológicas de mucosa com a produção de IgA secretora e sérica com a síntese de IgG e IgG2a (Boyaka *et al.*, 1999).

## 7 - IMUNOADJUVANTES

Na segunda década do século XX, com os trabalhos realizados na produção de soros obtidos de animais para a terapia humana, foi descoberta que certas substâncias, principalmente o hidróxido de alumínio (GLENNY *et al.*, 1926), associados ou emulsificados com um antígeno, potencializavam a produção de anticorpos, ou seja, essas substâncias atuavam como adjuvantes. Desde então, o uso de adjuvantes para a produção de anticorpos em animais de laboratório tornou-se uma prática rotineira em várias áreas de pesquisa. Apesar da importância dos adjuvantes, mesmo em nossos dias, ainda não existe adjuvante ideal, cuja potência aparentemente pode variar segundo o antígeno usado na produção de diferentes imunoglobulinas.

Os adjuvantes são compostos capazes de estimular ou de regular a resposta imunológica específica para o antígeno (LYCKE *et al.*, 1992). O efeito dos adjuvantes resulta principalmente de duas atividades: a) possibilita a concentração do antígeno em local onde os macrófagos possam encontrá-lo (efeito "depósito"); b) induz a síntese de citocinas que regulam a função linfocitária. Os sais de alumínio provavelmente têm uma função de depósito, induzindo pequenos granulomas nos quais o antígeno é retido (ROITT, 1997). Até o presente momento os adjuvantes mais utilizados são os de sais de alumínio descritos por (GLENNY *et al.*, 1926), e o adjuvante completo de Freund (composto por óleo mineral, agente emulsificante e a bactéria *Mycobacterium bovis*, morta pelo calor) e o adjuvante incompleto de Freund (semelhante ao adjuvante completo, sem a presença da bactéria) (FREUND, 1951). Contudo, esses adjuvantes apresentam vantagens e desvantagens. Os adjuvantes à base de sais de alumínio não estimulam uma forte resposta imunológica contra todos os antígenos e, geralmente, não induzem imunidade mediada por células (WARREN *et al.*, 1986); enquanto que o adjuvante de Freund é um excelente potencializador da resposta imune contra o antígeno, induzindo respostas imunológicas humoral e celular, no entanto, pode induzir a síntese de imunoglobulinas inespecíficas (Leclerc & Chedid, 1978; Kenney *et al.*, 1989). Além disso, esses adjuvantes são ineficientes para desencadear respostas imunes contra proteínas de baixo peso molecular, particularmente, haptenos e peptídeos, a menos que estejam ligados covalentemente a moléculas maiores e imunogênicas (ALBUQUERQUE, 1994). Portanto, a resposta imunológica será desenvolvida, tanto contra a molécula carreadora, como contra o antígeno

Além dos adjuvantes mencionados anteriormente, várias outras substâncias imunomoduladoras de diferentes características estão em fase experimental, entre as quais encontra-se o marcol 52 associado a montanide 888,

os quais mostraram-se superiores ao  $Al(OH)_3$ , (Muneer & Afzal, 1989; Muneer *et al.*, 1994). O PCPP (poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene]) descrito por PAYNE *et al.*, (1995) e a QS-21 (uma fração purificada de extrato de saponina de *Quillarja saponina*) descrita por KENSIL *et al.*, (1991) são apontados como excelentes adjuvantes quando ministrados com diferentes antígenos.

Outras substâncias que vêm atraindo bastante atenção são os polímeros biodegradáveis, os quais podem ser usados para formar micropartículas que encapsulam o antígeno, protegendo-o de degradação e deteriorização (Anderson, 1999), quando utilizados tanto pela via mucosa ou parenteral. Os ácidos poliídrixidos, ácidos poliaminos e polyanidrido (DAVIS., 1998), látex, poly (metilmetacrilato), poliacrilamida, alginato, copolímeros de ehyline-vinil acetato (Michalek *et al.*, 1994) têm apresentado os melhores resultados

Outros dois adjuvantes descritos por (Slaoui.1998) que merecem ser mencionados são: Smithkline Beecham Sistema 4-(SBAS4) e Smithkline Beecham Sistema 2-(SBAS2). O SBAS4 é uma combinação de sais de alumínio e monophosforil lipídio A (MPL) que é mais eficiente na indução de uma resposta imunológica, quando comparado aos sais de alumínio isoladamente. O SBAS2 é baseado em uma combinação de monophosforil lipídio A (MPL), QS-21 (uma fração purificada de extrato de saponina de *Q. saponina*) e uma emulsão de óleo e água. Essa mistura mostrou-se capaz de induzir um alto nível de anticorpos, quando utilizada associada ao vírus da hepatite B, em imunização de camundongos pela via subcutânea

## 7.1 - Imunoadjuvante mucoso

A utilização da via oral nos procedimentos de imunização representa uma abordagem desafiadora uma vez que, ao ser usada para ministrar antígenos ela mobiliza o tecido linfóide associado ao intestino (GALT), podendo induzir imunidade mucosa e imunidade sistêmica. Apesar disso, a via oral também pode conduzir ao estado de não reatividade, conhecido como tolerância imunológica (Boyaka *et al.*, 1999). Nesse contexto, a procura de adjuvantes que sejam eficazes nos procedimentos de imunização pela via oral vêm se revelando do maior interesse. Foi assim constatada a capacidade da maioria das enteroxinas produzidas pelo *Vibrio cholerae* que se mostraram excelentes imunógenos quando ministradas pela via oral, passando a ser empregadas como carreadores de antígenos, e a ser consideradas como "adjuvantes mucosos" (LYCKE *et al.*, 1992; VAN DER HEIJDEN, 1991; XU-AMARO *et al.*, 1993; HOLMGREN *et al.*, 1998). As propriedades das toxinas produzidas pelo *Vibrio cholerae*, CT e CTB podem ser atribuídas ao fato das mesmas serem resistentes à degradação das enzimas da mucosa e ligarem-se, com alta afinidade às células linfóides e epiteliais da mucosa, incluindo células M, células apresentadoras de antígenos (APCs) e outras células B e T (McKENZIE & HALSEY, 1984; HOLMGREN *et al.*, 1998). Além disso, a CT co-administrada oralmente com o antígeno, induz a produção de IL-4, IL-5 e IL-6 por células Th2 favorecendo a síntese de IgA específica para o antígeno usado (XU-AMARO *et al.*, 1993; VanCOTT, *et al.*, 1996).

Outras substâncias estão sendo testadas em fase experimental como "adjuvante mucoso" como é o caso do PLGA, um polímero biodegradável (ácido D-L-lático-co-glicólico), que tem se mostrado eficiente para desencadear uma resposta imune tanto pela via oral como nasal. Outro biopolímero que vem sendo testado é a quitosana, que é uma substância derivada de crustáceos pela desacetilação da quitina. A quitosana está também presente em cogumelos e

fungos (Artursson *et al.*, 1994). Devido a natureza catiônica da quitosana esse composto é um bioadesivo e tem sido constatado que, quando administrado por via oral associado a drogas ou antígenos, permanece por longo período na superfície da mucosa. (Davis, 1998). Por essa propriedade, foi sugerido também que o mesmo atue nas estreitas junções entre as células da mucosa, facilitando a entrada do antígeno e conseqüentemente aumentando a produção de anticorpos (Artursson *et al.*, 1994).

## 8.- TOLERÂNCIA ORAL

A tolerância imunológica refere-se a um estado de não reatividade imunológica específica, induzida por uma administração anterior, via oral, do antígeno (Mowat, 1987). A tolerância decorre da interação de antígenos com receptores em linfócitos, sob condições em que os linfócitos não são ativados, tornam-se irresponsivos (Matzinger, 1994). Os antígenos que induzem tolerância são chamados tolerogênicos, para serem distinguidos dos imunogênicos, que geram respostas imunes. A tolerância a antígenos próprios é uma propriedade fundamental do sistema imune e sua perda leva a doenças auto-imunes (Abbas *et al.*, 1998). Normalmente, todos os antígenos próprios atuam como tolerogênicos. Muitos antígenos estranhos podem ser imunogênicos ou tolerogênicos, dependendo de sua natureza fisicoquímica, dose e via de administração. A exposição de um indivíduo a antígenos imunogênicos estimula a imunidade específica e, para a maioria das proteínas imunogênicas, exposições subseqüentes geram potencialização das respostas secundárias. Ao contrário, a exposição a um antígeno tolerogênico não somente deixa de induzir imunidade específica, como também inibe a ativação linfocitária por administração subseqüentes de formas imunogênicas do mesmos antígeno (Abbas *et al.*, 1998).

Assim sendo, quando um antígeno é oralmente administrado, a resposta mais frequente do trato gastrointestinal, é a tolerância imunológica e não a imunidade (Chen *et al.*, 1995). No entanto a tolerância oral é atualmente reconhecida como uma forma de tolerância periférica, na qual os linfócitos maduros dos tecidos linfóides periféricos se tornam não funcionais ou hiporesponsivos pela administração anterior do antígeno (Strobel & Mowat, 1998).

Não existe uma maneira fácil para explicar o fenômeno da imunidade mucosa e tolerância oral. Está claro que resta muito a ser aprendido sobre a tolerância imunológica a antígenos estranhos, especialmente sobre os mecanismos moleculares de tolerância e as diferenças nos efeitos bioquímicos dos imunogênicos e tolerogênicos sobre linfócitos específicos (Abbas *et al.*, 1998)

## 9.0-USO DE VÍRUS QUE INFECTAM VEGETAIS COMO VETORES NA PRODUÇÃO DE VACINAS

Os vírus que infectam os vegetais têm ultimamente despertado grande interesse para os imunologistas, pela possibilidade de serem usados como veículos ou vetores para expressar antígenos na produção de vacinas para animais e/ou humanos, isso com base na grande vantagem que os mesmos, não ocasionam doenças em humanos e outros animais (Moffat, 1995; Modelska *et al.*, 1998). Alguns grupos de pesquisadores têm utilizado certos vírus que infetam vegetais para expressar fragmentos de proteínas antigênicas em sua superfície, originando quimeras, na esperança de que essas partículas de vírus modificadas possam desencadear uma resposta imunológica. O objetivo seria então, que esses vírus funcionassem como um sistema de apresentação de epítomos na fabricação de vacinas. Para tanto um gene que expressa o antígeno de interesse, é inserido no genoma do vírus vetor, o qual poderá infetar a planta

uma vez que não perde a sua a sua capacidade infectiva. Esses resultados abrem perspectivas para um tipo de aplicação dos vírus de vegetais em um domínio que vem sempre acenando para uma larga aplicação na medicina profilática, que é o uso de materiais biológicos inertes nos procedimentos de vacinação.

O uso de vírus como vetor gênico em sistema bacteriano, é uma prática bastante comum na maioria dos laboratórios de biologia molecular, onde os bacteriófagos são usados como veículos de clonagem para a amplificação do DNA estrangeiro (Scholthof *et al.*, 1996). Essa idéia de usar os vírus que infetam os vegetais como sistema de expressão de um gene estrangeiro, não é recente, surgiu quando SHEPHERD (1968) relatou que o “vírus do mosaico da couve-flor (Cauliflower mosaic virus-CaMV), pertencente ao gênero *Geminivirus* continha no genoma, DNA de fita dupla e que o DNA clonado de CaMV causava infecção quando inoculado mecanicamente em plantas. Até então, pensava-se que todos os vírus de vegetais eram vírus que continham apenas RNA. Houve uma grande expectativa sobre o uso do CaMV e outros do gênero *Geminivirus* como vetores de genes em plantas. Vários pesquisadores sugeriram que o CaMV poderia ser usado como vetor de expressão de genes (Gronemborn *et al.*, 1981). Posteriormente, BRISSON *et al.* (1984 ) substituíram o gene responsável pela transmissão do CaMV (gene II) por inseto pelo gene da diidrofolatoredutase bacteriana (de 240 pb). A partir dessas tentativas iniciais, outros genes pequenos foram expressos pelo CaMV mas, em geral, surgiam problemas com o “empacotamento” do gene inserido ou com outro tipo de “repressão” estrutural não identificado que limitava o tamanho dos genes estrangeiros, ou a rápida deleção do gene inserido ou ainda a limitada gama de hospedeiros. Outra desvantagem, é que, os vírus pertencentes ao gênero '*Geminivirus*', geralmente apresentam dificuldades na transmissão mecânica.

Até a década de 60 não havia possibilidade do uso de vírus com genoma RNA para expressar proteínas estranhas, pois os mesmos não podiam

ser submetidos à tecnologia do DNA recombinante. Seu uso só foi possível após a descoberta da transcriptase reversa, que permitiu a transcrição reversa do RNA viral em cDNA completo que pode ser inserido em plasmídeos para a clonagem molecular (Scholthof *et al.*, 1996). Além disso, os sistemas de transcrição facilitaram a síntese de transcritos RNA-infecciosos a partir de clones de cDNA completos. Uma década depois, essa abordagem levou a avanços sem precedentes nas análises de vírus RNA positivos. Radicalmente houve uma inversão na situação, e a manipulação do genoma dos vírus (RNA) de planta tornou-se uma rotina (Johnson *et al.*, 1997), e vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos, usando esses vírus como vetores para expressão de genes (Porta & Lomonosoff, 1996).

No entanto, o uso de partículas de vírus de planta para expressar peptídeos heterólogos requer meios que modifiquem geneticamente o genoma viral (Johnson *et al.*, 1997). Além disso, para determinar se um vírus pode ser usado como vetor, deve-se observar: a sua capacidade de infectar os hospedeiros vegetais de forma eficiente, a natureza das infecções virais que ocorrem em curto espaço de tempo (uma a duas semanas após a inoculação), a facilidade com que muitos vírus são transmitidos mecanicamente, o vasto ciclo de plantas hospedeiras e a rapidez na obtenção dos resultados. Alguns vírus não são transmitidos mecanicamente, como por exemplo, os *Luteovírus* e alguns *Geminivírus*, que são vírus limitados ao floema e por isso dificultam a transmissão mecânica de planta para planta (Scholthof *et al.*, 1996)

Embora qualquer gene estrangeiro tenha potencial para ser expresso a partir do vírus vetor, talvez existam pré-requisitos que ainda são desconhecidos (Johnson & Lomonosoff, 1997). É necessário ter cuidado com interferências substanciais nas funções do vírus e com o monitoramento direto e sensível da expressão gênica (Scholthof *et al.*, 1996). Por esse motivo, para reduzir os possíveis efeitos das mudanças no genoma do vírus, as quais ocorrem com a

introdução de genes estrangeiros, muitos investigadores têm sugerido que o gene substituído não seja essencial. Esse pré-requisito, obviamente, proíbe a substituição dos genes associados com a replicação ou com o movimento do vírus na planta. Contudo, genes que codificam os fatores de transmissão do mesmo por insetos são fortes candidatos à substituição. Embora alguns vírus que infectam vegetais precisem do gene da capa protéica para infetar sistemicamente uma planta, existem outros exemplos de vírus que são infectivos, mesmo na ausência do gene da capa protéica (Scholthof *et al.*, 1996).

Embora os primeiros vírus de planta que tiveram testados seu potencial como vetor de expressão de gene tenham sido os vírus que possuem DNA (Covey & Hull, 1992; Stanley, 1993), os vírus isométricos e alongados, RNA positivos, têm se revelado melhores para serem utilizados como vetores (Rothnie *et al.*, 1994).

O “Brome Mosaic Virus”-(BMV) foi o primeiro vírus com RNA, que infecta vegetal, usado para expressar um gene estrangeiro (French *et al.*, 1986). Muitos outros vírus têm sido testados, como o “Tomato Bushy Stunt Virus”-(TBSV) (Joelson *et al.*, 1997), o Potato Virus X-“PVX”(Baulcombe *et al.*, 1995) e o Tobacco Etch Virus-“TEV” (Dolja *et al.*, 1994). No entanto, os vírus sobre os quais se tem mais informações a respeito de suas estruturas, são os mais usados como sistema de apresentação de peptídios como é o caso do CPMV e TMV (Johnson *et al.*, 1997)

De acordo com Scholthof *et al.*, (1996) os vírus alongados podem teoricamente, superar os bloqueios de “empacotamento” impostos por alguns vírus esféricos e, por isso, podem ser mais flexíveis e estáveis para a expressão de genes estrangeiros. Assim sendo o TMV, possuindo o RNA de fita simples positivo, foi o primeiro vírus alongado a ser explorado quanto ao potencial como vetor. A substituição do gene da capa protéica do TMV por CAT (cloranfenicol

acetiltransferase) resultou em níveis substanciais da expressão do gene estrangeiro nas folhas da planta inoculada (Takamatsu *et al.*, 1987). Contudo, a capa protéica do TMV é necessária para que o movimento do vírus, a longa distância, seja eficiente (Dawson *et al.*, 1988). O TMV está entre os primeiros vírus que infectam os vegetais a ser utilizado como carreador de moléculas para epítomos antigênicos (Fitchen *et al.*, 1995). Os antígenos produzidos em plantas resultado de expressão em TMV, induzem a produção de anticorpos quando injetados em camundongos. (McLain *et al.*, 1995). A limitação dessas tentativas com esse vírus, como vetor de expressão de um gene, tem sido relativo ao tamanho dos peptídeos que podem ser incorporados à sua capa protéica. Geralmente somente peptídeos com 25 aminoácidos têm sido expressos com sucesso na capa protéica do TMV (Yusibov *et al.*, 1997).

Para reduzir os possíveis efeitos negativos que ocorrem com o aumento no tamanho do genoma dos vírus, muitos pesquisadores têm estudado a possibilidade de desenvolver vírus vetores. O genoma do TMV tem sido utilizado ultimamente como plasmídeo vetor, 30BRz (William Dawson, Florida State University, Gainesville) e o vetor TB2 (Donson *et al.*, 1991) que pode ser usado para expressar a capa protéica de outro vírus de planta expressando uma quimera como mostrou YUSIBOV *et al.* (1997).

Outros trabalhos com o TMV têm atraído a atenção por o mesmo servir de vetor (suporte) para expressar um outro vírus que infecta vegetal em sua capa protéica (Spitsin *et al.*, 1999; Yusibov *et al.*, 1998) que mostraram a expressão da capa protéica do vírus do mosaico da alfafa- (AMV) por TMV.

Podemos apontar várias razões pelas quais é vantajoso expressar uma seqüência de polipeptídeo na superfície de uma molécula carreadora. Entre as quais, a capacidade das proteínas do capsídeo viral em juntar em sua estrutura e multiplicar macromoléculas (Johnson *et al.*, 1997). Outra grande vantagem em

utilizar os vírus que infetam os vegetais é a possibilidade de purificação do peptídeo de interesse, ou seja, a quimera multiplicada (Van Rooijen & Moloney, 1995). Os capsídeos de vírus de plantas, são particularmente atrativos candidatos para sistema de apresentação de epítomos, devido ao rápido crescimento em larga quantidade, purificação fácil e são extremamente estáveis (Lomonosoff & Johnson, 1996).

Assim sendo os vírus que podem ser usados como vetores, assumem uma valiosa importância para a pesquisa em todas as áreas que os mesmos possam ser utilizados. Contudo, a expressão de genes estrangeiros pode ter, também valor comercial, especialmente para a produção de compostos farmacêuticos (Lomonosoff *et al.*, 1995). Utilizando o sistema de expressão gênica podemos observar que vários produtos podem ser multiplicados em plantas via vírus vetor, como:  $\alpha$ -trichosanthion, um inibidor do HIV-1 e enkephalin em TMV (Lin *et al.*, 1996; Takamatsu *et al.*, 1990). Assim, a apresentação do epítomo, para o uso em vacinas, deve ser uma alternativa atrativa, eficaz, segura e barata para a pesquisa convencional e para os regimes de imunização intensiva. Além disso, as vacinas baseadas em vírus de vegetais podem ser facilmente estocadas, reconstituídas e podem também, sobreviver a ambientes extremos que prejudicariam outros tipos de vacinas (Scholthof *et al.*, 1996).

## **OBJETIVO GERAL**

Estudar a capacidade imunogênica de proteínas do capsídeo viral do CPSMV por via oral e por via subcutânea em camundongos "swiss", tendo em vista a possibilidade de usar o vírus como sistema de expressão de antígenos na produção de vacinas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 - Caracterizar a suspensão viral de CPSMV
- 2 - Avaliar a resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com diferentes doses de proteínas de CPSMV purificado com diferentes adjuvantes.
- 3 - Avaliar a resposta imunológica humoral de camundongos por via oral com proteínas de CPSMV purificado e com o extrato de folhas de planta de *V. unguiculata* infectada.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1-MATERIAL VEGETAL

No presente trabalho foram utilizadas plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar "Pitiúba". As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, a partir de sementes fornecidas pelo Banco de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

### 2-ANIMAIS

Foram empregados camundongos "swiss", fêmeas, com idade entre 6 e 10 semanas, mantidos em colônia fechada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Essa colônia teve início com animais fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (Campinas SP) para constituição das colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Foram usados também ratos albinos, machos de 300 a 400 g, mantidos nas mesmas condições.

### 3.-PURIFICAÇÃO DO VÍRUS

O vírus do "mosaico severo do caupi" (CPSMV) foi purificado de acordo com o método descrito por LIMA & AMARAL (1985) com algumas modificações.

As plantas de *V. unguiculata* foram mecanicamente inoculadas com CPSMV, sete dias após o plantio em vasos, sendo mantidas em casa de

vegetação. Para a purificação, o tecido foliar foi coletado duas semanas após a inoculação do vírus e macerado em tampão de extração (fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, contendo 0,5% do anti-oxidante sulfito de sódio), na proporção de 1:2 (p/v). Após a maceração, o material foi filtrado em gaze dupla para eliminação dos fragmentos maiores da planta. O extrato obtido foi submetido a uma clarificação com 8% de n-butanol por uma noite, à temperatura de 4 °C, sob leve agitação. Na manhã seguinte a mistura foi submetida a uma centrifugação (centrífuga SORVAL, ROTOR GSA) a 10.000 g durante 10 min. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante adicionou-se 6% de polietileno glicol (PEG PM 6000) e 4% de NaCl, com o objetivo de precipitar o vírus. Essa mistura foi levemente agitada por 1 h à 4 °C, em seguida foi centrifugada a 10.000 g durante 10 min. em ROTOR GSA. O precipitado foi suspenso em 30 mL de tampão fosfato 0,01M e pH 7,5. A suspensão foi levemente agitada por 40 min. submetida a uma centrifugação de 12.000 g por 10 min. no ROTOR SS-34 da centrífuga SORVAL. O precipitado foi descartado e o sobrenadante contendo o vírus foi submetido a mais três ciclos de precipitação com PEG, como foi descrito anteriormente. Após as etapas de precipitação com PEG, o sobrenadante final contendo o vírus foi submetido a uma ultra-centrifugação de 120.000 g durante duas horas.

4.1.3. O precipitado final contendo o vírus foi ressuspenso em 3 mL de tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,2. A suspensão obtida foi dividida em alíquotas de 1 mL e acondicionada à temperatura de -4 °C, até o momento de ser usado.

### 3.1-Obtenção dos Extratos de Plantas de *V. unguiculata* Infectada Pelo “CPSMV” e Sadia

O extrato total (ET) de plantas infectadas por CPSMV utilizado na imunização dos camundongos foi obtido a partir de folhas de *V. unguiculata*. As plantas foram mecanicamente inoculadas com o CPSMV sete dias após a germinação e colhidas 14 dias após a inoculação do vírus. As folhas foram maceradas em solução de NaCl 0,15 M, na proporção de 1:1 (p/v). O extrato obtido foi filtrado e mantido a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a utilização.

Para a obtenção do extrato de planta sadia foi utilizado o mesmo método do extrato anterior (ET de planta infetada).

## 4-CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA VIRAL

### 4.1-Análise em Espectrofotômetro da Preparação Viral Purificada

A suspensão contendo o vírus purificado foi diluída na proporção de 1:50 em tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,2 e analisada em um espectrofotômetro VARIANT DMS-70, usando-se a faixa de comprimento de onda de 240 a 310 nm. Sua concentração foi calculada usando-se um coeficiente de extinção igual a 8,1 o qual é utilizado para média das partículas virais do gênero dos comovírus (BRUENING, 1978) (Figura 3).

#### 4.2-Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteína da suspensão viral foi determinada pelo método de Bradford (1976). A concentração de proteínas do capsídeo viral foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina.

#### 4.3-Eletroforese das Proteínas

A proteína do capsídeo viral, foi analisada em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) de acordo com o método descrito por LAEMMLI (1979), adaptado para o uso de placas de vidro (10x7,2 mm). O “stacking” gel de concentração 4% (duas placas) foi preparado com 3,68 mL de água destilada, 0,65 mL de bis-acrilamida (30 %), 0,63 mL de Tris-HCl 1 M pH 6,8, 50  $\mu$ L de SDS 10 % (p/v), 5  $\mu$ L de Tetramethilenodiamine-(Temed) e 25  $\mu$ L de persulfato de amônio 10 % (p/v). O gel de separação a 17 % foi composto de 1,45 mL de água destilada, 2,5 mL tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 100  $\mu$ L de SDS 10 % (p/v), 5,83 mL de bis-acrilamida (30 %), 8,5  $\mu$ L de (Temed) e 85  $\mu$ L de persulfato de amônio a (10 %).

As amostras protéicas foram preparadas a partir de 10 e 20  $\mu$ L de uma suspensão (7 mg/mL) de vírus purificado, as quais foram adicionadas em “eppendorf” contendo 90 e 80  $\mu$ L de tampão da amostra Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; SDS 10 % (p/v); glicerol 20 % (v/v);  $\beta$ -mercaptoetanol 4 % (v/v) e Azul de Bromofenol 2 % (p/v)) seguindo aquecimento a 100°C durante 2 min.

Alíquotas de 20  $\mu$ L dessas amostras, correspondendo a 14 e 28  $\mu$ g de proteína de capsídeo viral foram aplicadas aos géis de poliacrilamida.

A eletroforese transcorreu à temperatura ambiente de 25 °C em tampão Tris-glicina pH 8,0 (glicina 250 mM; Tris-base 25 mM; SDS 0,1 % (p/v)), a 150 volts e 40 mA (constante), até que o azul de bromofenol ficasse aproximadamente 2 cm do final do gel separador. Foi utilizada uma fonte regulável de corrente contínua da BioRAD. Para visualização das bandas, o gel foi corado, por imersão, em uma solução contendo 0,25 % de “Comassie Brilliant Blue R-250” (SIGMA), 40 % de metanol, 10 % de ácido acético e água destilada durante 15 min. O descoramento do gel foi realizado com uma solução contendo 7 % de ácido acético, 30 % de metanol e água destilada.

Como padrão de massa molecular foram utilizados: albumina sérica bovino (BSA) com 66 kDa, ovalbumina 45 kDa, inibidor de tripsina 20,1 kDa e  $\alpha$ -Lactalbumina 14,2 kDa.

## 5.0-IMUNIZAÇÃO

### 5.1-Preparação dos Adjuvantes

#### 5.1.1-Marcol

O óleo mineral marcol foi misturado a uma solução salina 0,15 M, estéril, na proporção de 1:1. Em seguida, a mistura foi agitada com um micro “mix da ARNO” até a formação de uma emulsão consistente. Na referida emulsão, foi adicionado CPSMV purificado para imunizar dois grupos de camundongos. Em um grupo, cada camundongo recebeu uma dose de (200  $\mu$ L emulsão + 10  $\mu$ g do vírus purificado) e o outro grupo (200  $\mu$ L de emulsão + 100  $\mu$ g do vírus).

### 5.1.2-Gel de Hidróxido de Alumínio - $\text{Al}(\text{OH})_3$

O outro adjuvante usado foi o hidróxido de alumínio -  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , devido o seu forte poder de adsorção de proteínas e por representar o melhor adjuvante para uma resposta imunológica do tipo IgE (PROUVOST- DANON *et al.*, 1966). O gel foi preparado, adicionando-se 15 g de sulfato de amônio e alumínio [ $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ] em 180 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, sendo em seguida acrescentados 75 mL de NaOH 1 N, gota a gota. A solução ficou em repouso por 24 h, formando um precipitado de  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . O precipitado foi suspenso em 200 mL de água destilada e em seguida centrifugado em uma SORVAL, ROTOR GSA a 2.000 g durante 20 min. Essa operação foi repetida por 5 vezes. Após a última centrifugação o precipitado foi ressuspenso em 15 mL de água destilada a fim de se obter um gel espesso, porém pipetável, tendo-se o cuidado de fazer uma boa homogeneização para evitar formação de grumos.

Para determinação do peso seco, foram tomadas alíquotas de 1 mL da suspensão, as quais foram colocadas em estufa a 100 °C durante 24 h. Em seguida determinada a concentração.

O gel foi ajustado para uma concentração de 1 mg/mL com NaCl 0,15 M e adicionadas as doses do vírus (CPSMV). Cada animal recebeu uma dose de 200  $\mu\text{L}$  da mistura contendo 200  $\mu\text{g}$  de adjuvante  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e 10  $\mu\text{g}$  do CPSMV. Outro grupo foi imunizado nas mesmas condições com 100  $\mu\text{g}$  do vírus.

### 5.2-Imunização por Via Subcutânea Com as Proteínas Totais do Vírus CPSMV

Grupos de 10 camundongos "SWISS" (fêmeas) com 7 a 8 semanas de idade foram imunizados por via subcutânea, na região dorsal, com doses

equivalentes a 10 e 100  $\mu\text{g}$  de proteína dos capsídeos do vírus, tendo como adjuvantes: óleo mineral (Marcol) e o gel de hidróxido de alumínio  $\text{Al}(\text{OH})_3$  na concentração de 1mg/mL, como descritos anteriormente. Os animais receberam reforços com 21 e 35 dias após o início da imunização. Os animais foram sangrados com 7, 14, 21, 28, 35, e 42 dias após o início da imunização.

### 5.2.1-Imunização Por Via Oral

#### 5.2.1.1-Imunização Oral Com o Extrato Total de Plantas de *Vigna unguiculata* Infectada com o CPSMV e Sadia

Grupos de dez camundongos “swiss” foram imunizados por via oral, com doses dos extratos descritos anteriormente, com o auxílio de uma sonda. Cada animal recebeu diariamente uma dose de 0,2 mL do extrato contendo 0,7  $\mu\text{g}$  de proteínas durante dez dias consecutivos. Os animais receberam reforços 20 e 25 dias após o início da imunização. As amostras de sangue foram coletadas com pipeta de Pasteur no plexo retro-orbital dos camundongos, com 5, 10, 15, 30 e 90 dias após o término da imunização.

Outro grupo de 10 camundongos “swiss” (fêmeas com dois meses de idade) também foi imunizado por via oral através de uma sonda com extrato de planta sadia mencionado anteriormente. Os animais receberam 0,2 mL do extrato contendo 0.6 mg de proteínas durante 10 dias consecutivos e os reforços foram ministrados 20 e 25 dias após o início da imunização. As amostras de sangue foram coletadas com pipeta de Pasteur no plexo retro-orbital dos camundongos. A sangria ocorreu nos mesmos dias da sangria dos animais imunizados com o extrato de planta infetada.

### 5.2.1.2-Imunização Oral com o CPSMV Purificado

Camundongos "SWISS" (grupos de 10 fêmeas com dois meses de idade foram imunizados pela via oral com 10 doses de 200  $\mu$ L de uma suspensão de vírus purificado, contendo 50  $\mu$ g de proteínas do capsídeo viral, com o auxílio de uma sonda. As doses foram ministradas durante 10 dias consecutivos. Não foi dado nenhum reforço. Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital, para a obtenção dos anti-soros, com 5, 10, 15, 20 e 90 dias após o término da alimentação.

## 6. - OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS

As amostras de sangue foram coletadas com pipetas pasteur por punção no plexo retro-orbital dos camundongos. O "pool" de sangue foi deixado em repouso durante uma hora à temperatura ambiente, para retração do coágulo. Após a retração, o soro foi recolhido e centrifugado a 3.000 g por 10 min. para que o tornasse livre das hemácias. Em seguida os anticorpos obtidos foram armazenados a  $-20$  °C. Este procedimento foi adotado para todos os experimentos.

## 7.- SOROLOGIA:

### 7.1 Imunodifusão em Agar (OUCHTERLONY)

Os anticorpos obtidos das diferentes imunizações foram usados em testes sorológicos de dupla difusão em agar, contendo 0,75 % (p/v) de agar noble (SIGMA), 0,85 % (p/v) de NaCl e 0,05 % (p/v) de  $\text{NaN}_3$  segundo Brioso *et al.*, (1994). Foram usados como antígenos, o ET de folha de planta de *V.*



21248022

*unguiculata* infectada com o CPSMV, o ET de planta de *V. unguiculata* sadia e o vírus purificado.

Os anticorpos foram diluídos em série, nas proporções de 1:2 a 1:1024 em solução de NaCl 0,15 M.

## 7.2- ELISA

Os anticorpos específicos para o CPSMV foram submetidos a testes de ELISA indireto (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Para esses ensaios, as placas (U96-POLYSORP-NUNC-IMMUNO PLATE BATCH 016181) foram sensibilizadas com ET de planta de *V. unguiculata* infectada com o vírus em estudo (10 µg/orifício) , com ET de planta de *V. unguiculata* sadia (10 µg/orifício) e CPSMV purificado (3 µg/orifício). Todos os antígenos foram diluídos em tampão de carbonato de sódio 50 mM, pH 9,6, sendo usado 100 µl em cada poço. As placas foram incubadas por uma noite a uma temperatura de 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS (NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O e KCl)-Tween (0,05 %) e bloqueadas por 2 h a uma temperatura de 37 °C com PBS- Molico a 5%. Após a lavagem das placas, foram adicionados os anticorpos (obtidos de camundongos imunizados por via subcutânea e oral) diluídos em tampão de bloqueio (1 : 10 a 1:1280) e as placas foram incubadas durante uma noite a uma temperatura de 4 °C. As placas foram novamente lavadas e em cada uma adicionado o conjugado imunoglobulinas anti-mouse (Dako No. P 260. DK-2600 Glostrup Denmark) ligadas à peroxidase, em uma diluição de 1:1.000, por 2 h a uma temperatura de 37 °C. A seguir, as placas foram lavadas com PBS-Tween. A reação foi desenvolvida por adição de orthophenylenediamine (OPD) após a placa ter sido incubada por 20 min. a uma temperatura de 37 °C. A reação foi parada com a adição de 20 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 N e sua intensidade foi avaliada espectrofotometricamente em um

comprimento de onda de 492 nm com um micro Elisa Labystems Multiskam MS.

### 7.3-WESTERN BLOTTING

#### 7.3.1-Tampão PBS para realização do teste:

NaCl – 40,0 g

KCl – 1,0 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 5,75 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0 g

H<sub>2</sub>O milli-Q q.s.p. – 500 mL

Essa solução tinha o pH ajustado para 6,5 e era considerada estoque sendo diluída 10 vezes por ocasião de seu uso.

#### 7.3.2-Realização

Para a realização do teste de western blotting foram utilizadas proteínas dos capsídeos do vírus CPSMV purificado, extrato de planta infectada e extrato de planta sadia. As proteínas foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 4-17% (SDS-PAGE), como descrito no item (4.3) e depois transferidas para uma membrana de nitrocelulose. No presente caso a transferência foi realizada para uma membrana de nitrocelulose, marca SIGMA, com poros de 0,2 µm em uma cuba de eletrotransferência vertical marca HÖEFFER. Foi utilizada uma solução tampão de transferência, composta de: glicina 39 mM, SDS 0,0375 % (m/v) e metanol 20 % (v/v) em tampão Tris 48

mM pH 7,2, em volume final de 1.500 mL, sob as condições de amperagem constante de 150 mA fornecida por uma fonte marca PHARMACIA BIOTECH, modelo EPS-600 usando o programa (Bio- Rad V=300, mA=150 e W=30). O tempo de transferência foi de 3h. Todo o processo ocorreu em câmara fria, sendo a agitação do tampão de transferência realizada por um agitador magnético.

Após a transferência, as membranas foram imersas numa solução corante de Ponceau a 0,5 % (0,5 g do corante de "Ponceau," 1,0 mL de ácido acético glacial e 100 mL de água milli-Q q.s.p) por 10 min. Em seguida as membranas foram lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante, quando então era visualizada a presença das proteínas. Após essa etapa, a membrana foi incubada com uma solução tampão de PBS com 5 % de leite desnatado marca MOLICO em geladeira, por aproximadamente 18 h, para bloqueio dos sítios ativos livres da membrana..

### 7.3.3-Revelação do immunoblotting

Após a incubação, a membrana foi lavada quatro vezes por 15 min., com a solução tampão PBS-Molico (5 %) contendo Tween-20, sob leve agitação. Em seguida, a membrana foi imersa em tampão PBS contendo anticorpos obtidos através de imunização subcutânea, numa diluição de 1:500 e incubada por duas horas. A membrana lavada nas mesmas condições foi transferida para uma placa de petri contendo o conjugado imunoglobulinas anti-mouse (Dako No. P 260. DK-2600 Glostrup Denmark) ligadas à peroxidase, em uma diluição de 1:1000 por 2 h , sob leve agitação, à temperatura ambiente. A seguir a membrana foi submetida novamente a quatro lavagens e colocada em uma solução reveladora, com substrato para peroxidase, composta de: 100 µL de diaminabenzidina (DAB) 0,1 g/mL e 100 µL de Cloreto de Níquel (NiCl<sub>2</sub>) 0,4

g/mL diluídos em água destilada, 7,5  $\mu$ L de Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 30V, completando o volume para 20 mL com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,2. A solução reveladora contendo a membrana era mantida no escuro, à temperatura ambiente por aproximadamente 30 min. A reação foi interrompida com a lavagem da membrana com água destilada. Quando a mesma foi seca e posteriormente fotografada.

#### 7.4- Imunoprecipitação quantitativa

A imunoprecipitação foi realizada misturando-se 50  $\mu$ L de uma suspensão de CPSMV purificado (7 mg/mL) com igual volume do anticorpo. A mistura foi incubada a uma temperatura de 4 °C por uma noite. Em seguida, a mistura foi submetida a uma centrifugação de 9.800 g, por 10 min. Decorrido esse tempo, o precipitado foi lavado com água destilada e resuspenso em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5, contendo 1 % de Triton X-100 (v/v) e NaCl 0,5 M e centrifugado a 9.800 g por 5 min. e o novo precipitado submetido ao mesmo tratamento. Com o objetivo de eliminar o triton, o precipitado foi lavado três vezes com um tampão fosfato 10 mM pH 7,2 contendo 0,1 % de SDS (m/v) e submetido a uma eletroforese em condições desnaturantes com SDS (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (1970). O “stacking” e o “main” géis continham 4 e 12 % de acrilamida respectivamente, como descrito anteriormente. Em seguida, foi feita uma transferência pelo método de Towbin *et al.* (1979). A transferência foi realizada para uma membrana de nitrocelulose, marca SIGMA, com poros de 0,2  $\mu$ m em uma cuba de eletrotransferência vertical marca HÖEFFER. Os immunoblots foram revelados usando como anticorpos secundários, o anti-IgG conjugado à peroxidase e o anti-IgA conjugado à fosfatase alcalina de camundongos.

### 7.5- Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)

A determinação dos títulos de anticorpos das classes IgG1 e IgE foi feita por reações de anafilaxia cutânea passiva como descrito por OVARY (1952) e modificada por MOTA & WONG (1969).

Os títulos de PCA foram definidos como logaritmo na base 2 do inverso da diluição máxima do antissoro ( $D_{m\acute{a}x.}$ ) capaz de provocar uma reação cutânea positiva.

$$\text{Título de PCA} = \text{Log}_2 1/D_{m\acute{a}x.}$$

#### 7.5.1- Para IgE

A determinação dos títulos dos anticorpos do tipo IgE foi feita em ratos albinos machos. A pele da região dorsal dos animais foi depilada sob leve anestesia com éter e injetada intradermicamente em pontos previamente marcados com os anticorpos diluídos em solução salina 0,15 M. Após um período de latência de 18 a 20 h, um rato recebeu por via endovenosa, na veia peniana, 1 mL de azul de Evans a 0,5 % em solução salina contendo 1 mg de proteína dos capsídeos viral. Nas mesmas condições, outro rato recebeu o extrato total de folhas de *V. unguiculata* infectada com o vírus e um terceiro recebeu o extrato de folhas da planta sadia. Cada teste foi realizado em duplicata.

Depois de 30 min. os ratos foram sacrificados com éter e a pele dissecada para a leitura da reação, observadas através de manchas azuladas, provocadas por extravasamento do corante, nos locais das aplicações dos anticorpos, nas diversas diluições.

### 7.6.2- Para IgG<sub>1</sub>

Para detectar imunoglobulinas do tipo IgG<sub>1</sub>, camundongos *swiss* foram utilizados. A pele da região dorsal dos animais foi depilada sob leve anestesia com éter, e 50 µL das diluições seriadas dos anticorpos foram injetados, por via intradérmica. Após um período de duas horas, as reações foram desencadeadas em três grupos, da seguinte maneira: - um grupo foi injetado por via endovenosa, no plexo retro-orbital 250 µL de azul de Evans a 0,5 % em solução salina contendo 250 µg de proteína dos capsídeos do vírus, o segundo grupo foi desencadeado nas mesmas condições utilizando extrato de planta de *V. unguiculata* infectada com vírus e ainda um terceiro grupo foi desencadeado com extrato de planta sadia. Após 30 min. os camundongos dos diferentes grupos foram sacrificados em câmara fechada em presença de éter. A pele foi dissecada para a leitura da reação, observadas através de manchas azuladas provocadas pelo extravasamento do corante nos locais das aplicações dos anticorpos nas diversas diluições.

### 8.0-Análise Estatística

Os títulos de PCA para IgG<sub>1</sub> e IgE obtidos pela imunização subcutânea com o CPSMV purificado, utilizado como controle nas doses (10 e 100 µg) foram comparados entre si e com os demais experimentos (10 e 100 µg + marcol e 10 e 100 µg + Al(OH)<sub>3</sub>). O objetivo da comparação foi detectar qual dos adjuvantes teve maior efeito na indução de IgE e IgG, assim como observar que dose seria melhor para a imunização.

Análise de variância com dois fatores foi utilizada na comparação dos tratamentos, ou seja, de seus efeitos sobre a resposta imunológica em diferentes períodos de tempo e para testar a interação entre os fatores tratamento e tempo.

O teste de Tukey foi utilizado para detectar os efeitos significativamente diferentes sobre a resposta imunológica com cada dose, cada adjuvante e também, para detectar as diferenças significativas entre a resposta primária e a secundária. Todas as comparações foram realizadas com os resultados obtidos através de PCA, ELISA e dupla difusão em agar (OUCHTERLONY).

### 1.1. Antígeno e adjuvantes

O antígeno utilizado foi o vírus da febre aftosa (FSA), tipo PSMV, na região ultra-purificada, com o conteúdo proteico de 100 µg, com o máximo de infectividade. A concentração de antígeno foi estimada através de ensaio de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY) em 100 µg/mL.

### 1.2. Anticorpos secundários

Os anticorpos secundários utilizados foram o soro anti-FSA, produzido em camundongos, e o soro anti-FSA, produzido em cavalos. O soro anti-FSA em camundongos foi produzido em 43 dias de vida.

## RESULTADOS

### 1-CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO VIRAL DE CPSMV

#### 1.1-ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA

O espectro de absorção da suspensão purificada do CPSMV, na região ultravioleta (FIGURA 3), apresenta característica de nucleoproteínas, com o máximo de absorção a 260 nm. A concentração do vírus na solução foi estimada através da densidade óptica obtida em 260 nm (1,450) em 6,9 mg/mL.

#### 1.2-Análise por Eletroforese em Sistema de SDS-PAGE

O perfil eletroforético em SDS-PAGE da proteína do capsídeo do CPSMV revela a migração de três frações com massas moleculares estimadas em 43, 23 e 21 kDa (FIGURA 4).

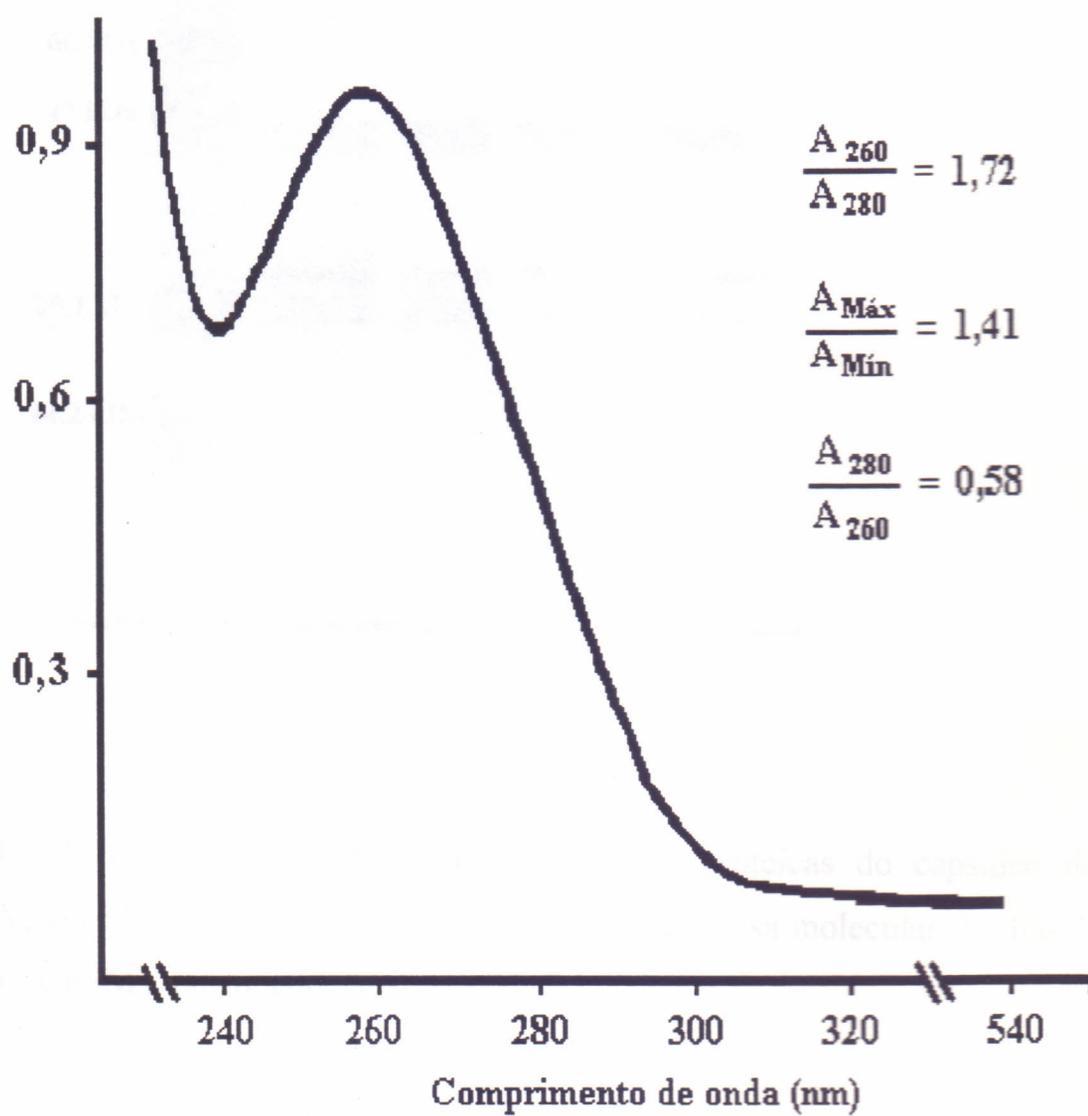


FIGURA 3 – Espectro de absorção ultra-violeta de suspensão purificada de CPSMV

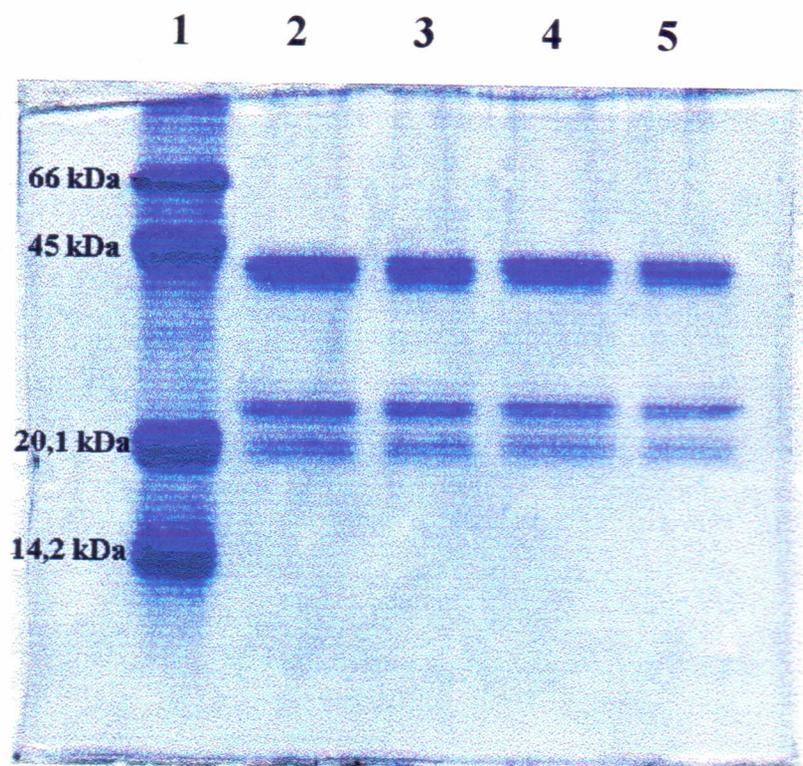


FIGURA 4: Perfil eletroforético das subunidades protéicas do capsídeo do CPSMV, em SDS-PAGE a 17%: Linha 1-padrão de massa molecular, Linhas 2, 3, 4 e 5 - CPSMV purificado.

## 2.0 -RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL DE CAMUNDONGOS 'swiss' IMUNIZADOS COM 10 e 100 µg de CAPSÍDEO DE CPSMV, POR VIA SUBCUTÂNEA, COM Al(OH)<sub>3</sub> e MARCOL COMO ADJUVANTES

### 2.1.-Avaliação da Resposta Imunológica por Dupla Difusão em agar e por Western blotting

Os anticorpos policlonais de camundongos imunizados com o CPSMV purificado, apresentaram reatividade específica, contra o vírus purificado e contra o extrato de planta infectada pelo mesmo. Nenhuma reação foi obtida contra o extrato de plantas sadias (FIGURA 5).

A cinética da síntese de anticorpos totais, induzida pela imunização subcutânea com 10 µg de CPSMV, avaliada por dupla difusão em agar é mostrada na (FIGURA 6), onde se vê que o Al(OH)<sub>3</sub> não aumentou a síntese de anticorpos, sobretudo ao cabo de 42 dias após a imunização inicial, enquanto o marcol teve um efeito mais pronunciado sobre a síntese de anticorpos, nas respostas secundária e terciária.

A cinética da síntese de anticorpos totais induzida pela imunização subcutânea com 100 µg de CPSMV é mostrada na (FIGURA 7), onde observa-se o efeito estimulante de ambos os adjuvantes já no 7º dia da resposta primária, mostrando-se mais efeitos na resposta secundária. Verifica-se que o efeito do marcol é superior ao do Al(OH)<sub>3</sub>, no entanto, chegando ambos a um mesmo valor, 7 dias após o segundo reforço (42 dias após a imunização inicial).

Os efeitos comparativos da imunização de camundongos com 10 e 100 µg de CPSMV em presença de cada um dos adjuvantes, marcol e Al(OH)<sub>3</sub>,

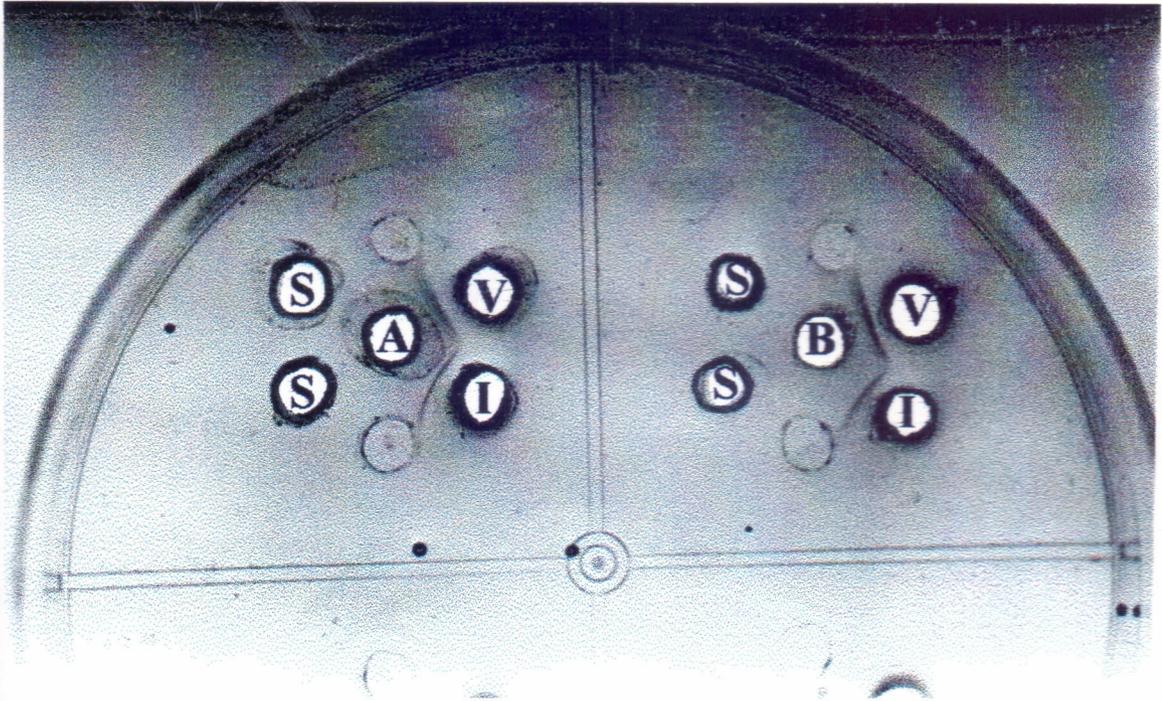


FIGURA 5: Teste de imunodifusão dupla em meio de agar demonstrando a especificidade dos antissoros obtidos de camundongos imunizados com 10  $\mu\text{g}$  de CPSMV purificado usando como adjuvantes  $\text{Al}(\text{OH})_3$  ou Marcol. Orifícios centrais: A-anticorpos específicos para o CPSMV obtidos de camundongos imunizados com 10  $\mu\text{g}$  de proteínas do capsídeo viral e  $\text{Al}(\text{OH})_3$  como adjuvante na diluição de 1:64, B-anticorpos específicos para o CPSMV obtidos de camundongos imunizados com 10  $\mu\text{g}$  de proteínas do capsídeo viral e Marcol como adjuvante na diluição de 1:64. Orifícios periféricos: V-CPSMV purificado, I - Extrato de folhas de *V. unguiculata* infetada pelo vírus, S - Extrato de Extrato de folhas e de *V. unguiculata* sadia.

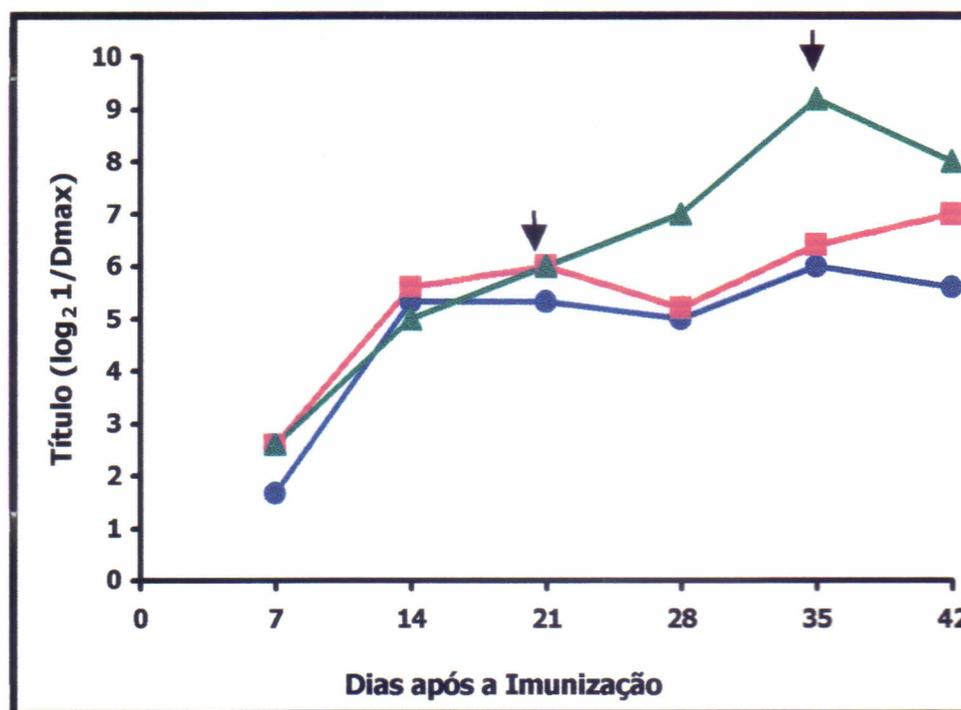


FIGURA 6 - Cinética da síntese de imunoglobulinas totais através de teste de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY) em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de vírus CPSMV ( ● ), 10 µg de vírus CPSMV + Al (OH)<sub>3</sub> ( ■ ) e 10 µg de vírus CPSMV + Marcol ( ▲ ). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços. O marcol difere estatisticamente dos demais ao nível de  $\alpha \leq 0,05$ .

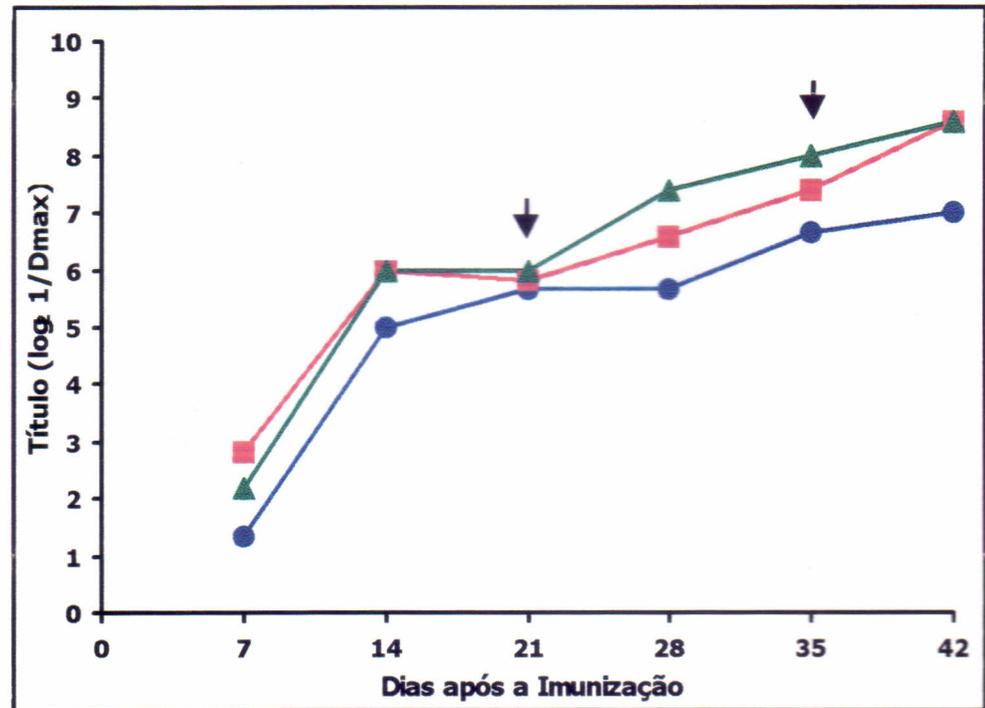


FIGURA 7 - Cinética de síntese de imunoglobulinas totais através de teste de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY) em camundongos imunizados por via subcutânea com 100  $\mu$ g de vírus CPSMV (●), 100  $\mu$ g de vírus CPSMV + Al(OH)<sub>3</sub> (■) e 100  $\mu$ g de vírus CPSMV + Marcol (▲). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços. Não há diferença estatística significativa entre os três tratamentos com  $\alpha \leq 0,05$ .

na síntese de anticorpos totais demonstraram que em presença de marcol, a síntese de anticorpos foi ligeiramente superior nos camundongos imunizados com 100  $\mu\text{g}$  e apenas no 35º dia houve um efeito superior nos animais imunizados com 10  $\mu\text{g}$  de CPSMV (FIGURA 8).

Em presença de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  a resposta primária foi praticamente idêntica quando os animais foram imunizados com 10 e 100  $\mu\text{g}$ . No entanto um efeito mais elevado foi observado, tanto na resposta secundária como na terciária, quando os animais foram sensibilizados com 100  $\mu\text{g}$  de CPSMV (FIGURA 9)

O teste de western blotting, comprova a presença de anticorpos específicos contra CPSMV no soro dos camundongos imunizados por via subcutânea com vírus purificado (FIGURA 10), observando-se que esse soro continha apenas anticorpos específicos para o CPSMV quer quando foi usado o vírus purificado, quer quando se usou um extrato de folhas de *V. unguiculata* infectadas pelo vírus. Não houve reconhecimento de nenhuma proteína da planta sadia.

## 2.2-Avaliação da Resposta Imunológica por ELISA

A reação imunológica com duas doses (10 e 100  $\mu\text{g}$ ) de CPSMV, tendo o marcol como adjuvante mostram a especificidade dos anticorpos policlonais (FIGURAS 11 e 12) . A resposta secundária, aos 28 dias foi aumentada de ca. 30 % quer com 10 quer com 100  $\mu\text{g}$  de antígeno, o que só pode ser constatado quando a placa de ELISA foi sensibilizada com CPSMV purificado. Contudo, há uma tendência à diminuição da síntese de anticorpos na imunização com a dose de 10  $\mu\text{g}$  aos 35 e 45 dias que não é observada quando a dose imunizante foi de 100  $\mu\text{g}$ . Quando a placa foi sensibilizada com CPSMV purificado, a reação de especificidade dos anticorpos contra o CPSMV, foi mais

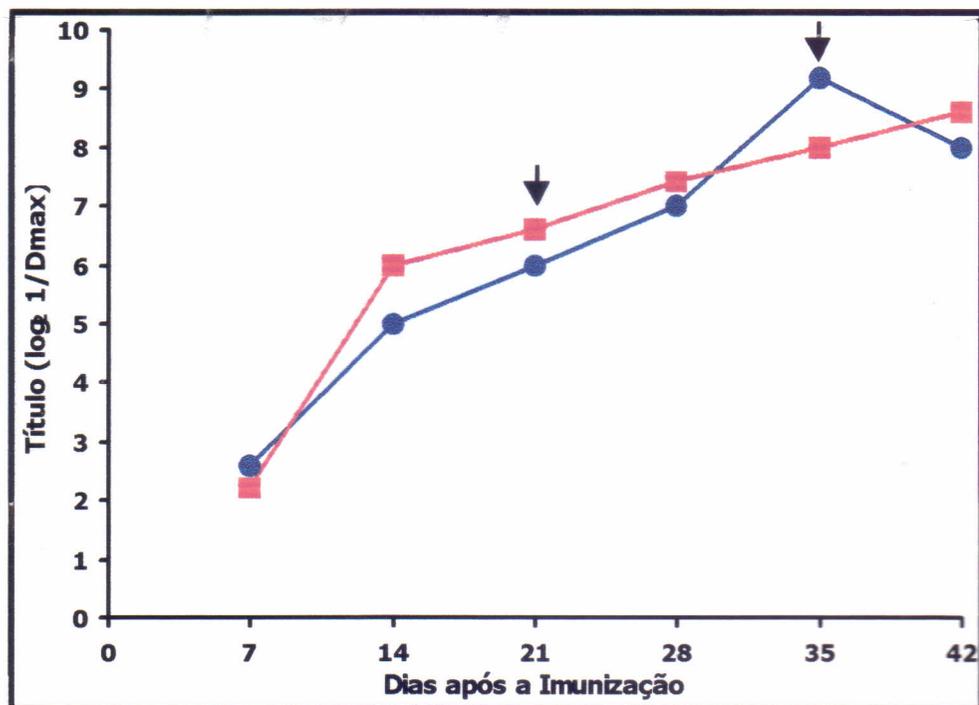


FIGURA 8 - Cinética de síntese de imunoglobulinas totais através de teste de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY) em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de vírus CPSMV + Marcol (●), 100 µg de vírus CPSMV + Marcol (■). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços. Não existe diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com  $\alpha \leq 0,05$ .

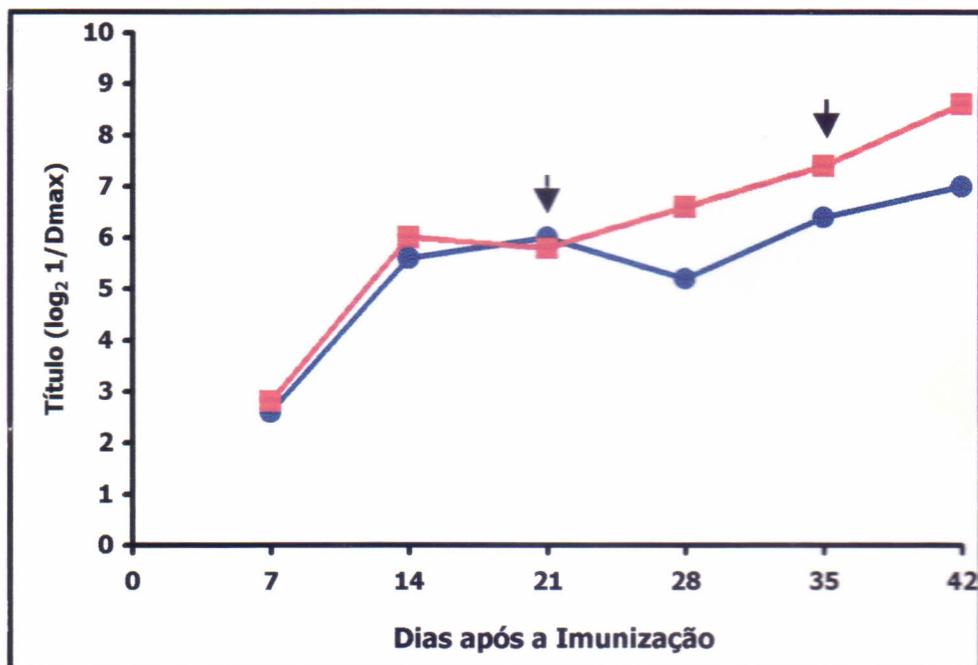


FIGURA 9 - Cinética de síntese de imunoglobulinas totais através de teste de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY) em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de CPSMV + Al(OH)<sub>3</sub> ( • ), 100 µg de CPSMV + Al(OH)<sub>3</sub> ( ■ ). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços. Não existe diferença estatística significativa entre os dois tratamentos com  $\alpha \leq 0,05$ .

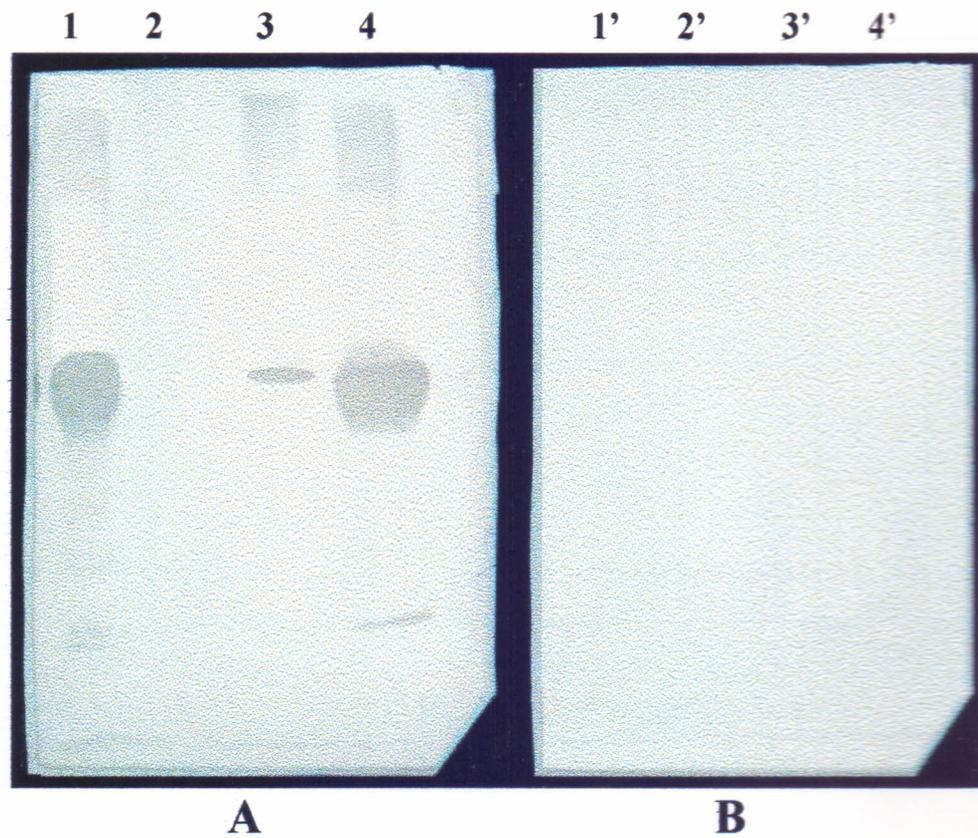


FIGURA 10: Anticorpos específicos contra o CPSMV detectados em camundongos imunizados por via subcutânea com 100  $\mu$ g de proteínas de capsídeo viral (28 dias após a imunização) - (A) e soro preimune - (B), através de análise por Western blotting: (Linhas 1,4 e 1' 4') - CPSMV purificado; (linha 2,2') - extrato de folhas de planta sadia e (linhas 3 e 3') - extrato de folhas de planta infectada.

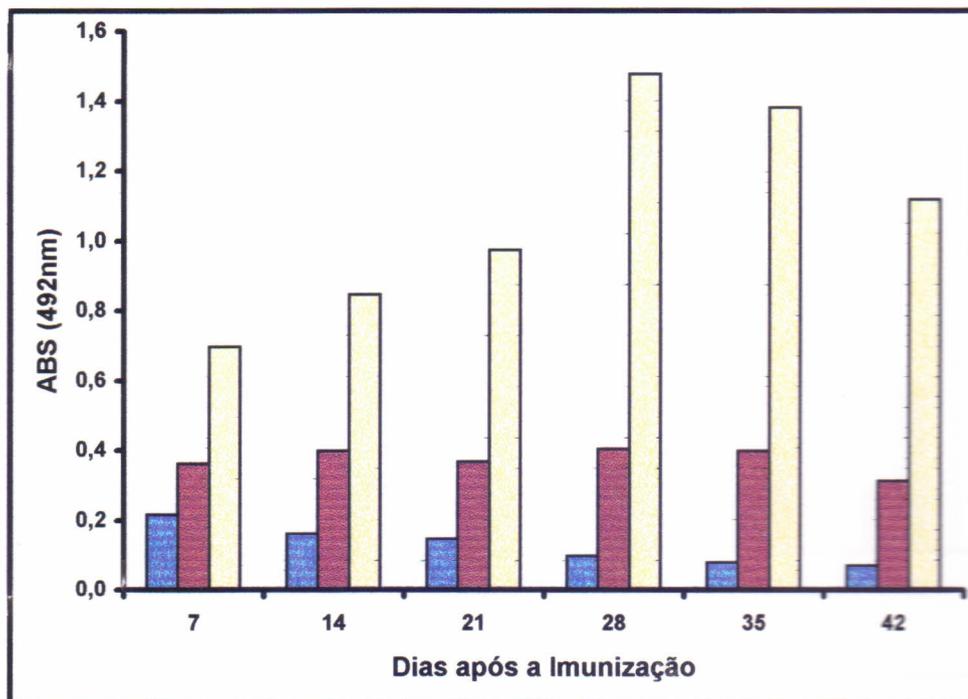


FIGURA 11- Teste Enzyme linked immunossorbent assay (ELISA) com antissoro policlonal de camundongos imunizados com 10  $\mu$ g CPSMV + Marcol na diluição de 1:400, mostrando que as reações específicas contra o CPSMV purificado (■) são bem mais elevadas do que com a planta infectada (■) pelo vírus, a reação com a planta sadia (■). Existe uma diferença estatística significativa entre as médias das reações com a planta sadia, planta infectada e com o vírus purificado. Porém não existe diferença significativa quando compara-se as doses (10 e 100  $\mu$ g) usadas para a imunização.

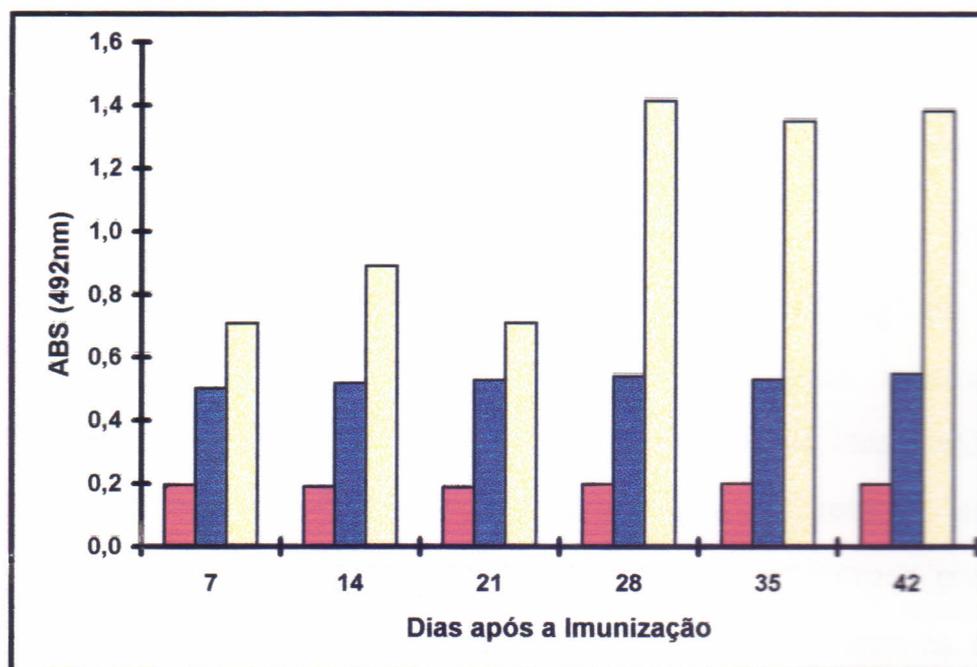


FIGURA 12 – Teste de “Enzyme linked immunossorbent assay” (ELISA) com antissoro policlonal de camundongos imunizados com 100  $\mu$ g CPSMV + Marcol na diluição de 1:400, mostrando que as reações específicas contra o CPSMV purificado (■) são bem mais elevadas do que com a planta infectada pelo vírus (■) e com a planta sadia (■). Os tratamentos diferem estatisticamente entre si.

intensa do que a obtida com a sensibilização da placa com o extrato de folhas infectadas.

As reações com a planta sadia, planta infectada e vírus purificado apresentam diferenças estatisticamente significantes com  $\alpha \leq 0,05$ . Porém não existe diferença significativa quando compara-se a 10 e 100  $\mu\text{g}$  de CPSMV usadas para a imunização.

A reação imunológica com duas doses (10 e 100  $\mu\text{g}$ ) de CPSMV (FIGURA 13 e 14), tendo o  $\text{Al}(\text{OH})_3$  como adjuvante mostraram as especificidades dos anticorpos policlonais. Quando a dose de imunização foi de 10  $\mu\text{g}$ , a maior síntese de anticorpos, foi revelada após o 1º reforço, isto é, aos 28 e caindo aos 42 dias (FIGURA 13). Os títulos de anticorpos produzidos quando a imunização foi feita com 100  $\mu\text{g}$  de CPSMV, aumentaram ca. 60% aos 28 dias, diminuindo aos 35 e aumentando aos 42 dias. A reação mais elevada foi observada quando a placa de ELISA foi sensibilizada com CPSMV purificado. Observa-se um resultado semelhante, porém com menos intensidade, quando a sensibilização da placa foi feita com extrato de folhas de planta infectada (FIGURA 14).

### 2.3-Avaliação da Resposta IgG1-específica por PCA

A reação qualitativa de anticorpo policlonal de camundongos foi detectada por PCA em camundongos (IgG1), contra CPSMV purificado (FIGURA 15 A). Não foi possível individualizar as reações quando a PCA foi desencadeada com extrato de folhas de *V. unguiculata* infectadas pelo vírus CPSMV, o que ocasionou uma coloração difusa (FIGURA 15 B). A mesma coloração azul difusa foi observada desencadeando-se a PCA com extrato de folhas de *V. unguiculata* sadias (FIGURA 15 C).

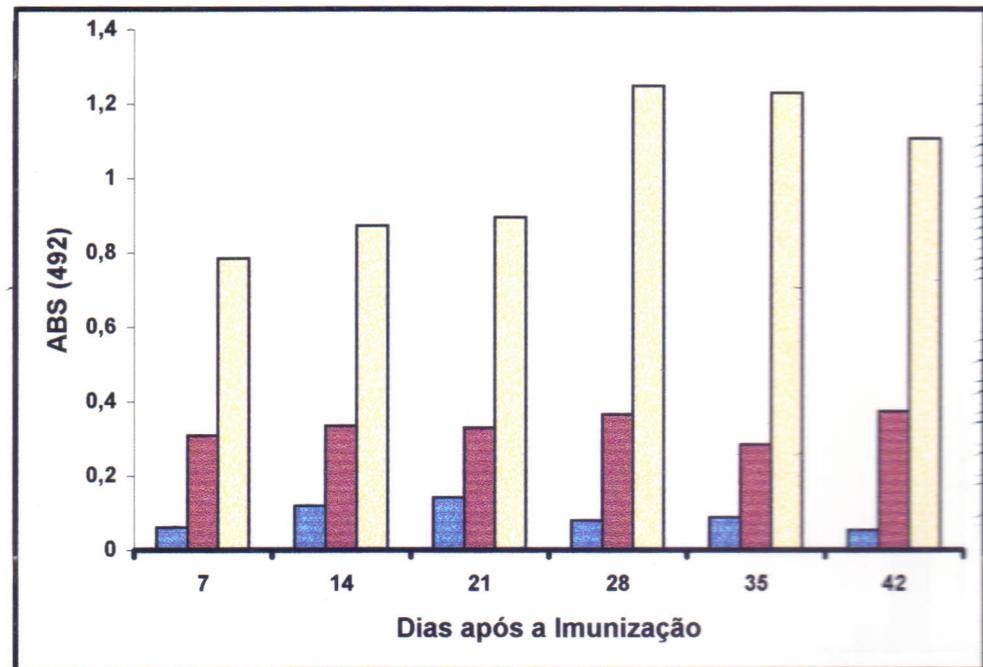


FIGURA 13– Teste Enzyme linked immunossorbent assay (ELISA) com antissoro policlonal de camundongos imunizados com 10  $\mu\text{g}$  CPSMV +  $\text{Al}(\text{OH})_3$  na diluição de 1:400, mostrando que as reações específicas contra o CPSMV purificado (■) são bem mais elevadas do que com a planta infetada (■) pelo vírus, a reação com a planta sadia (■). Os tratamentos diferem estatisticamente entre si.

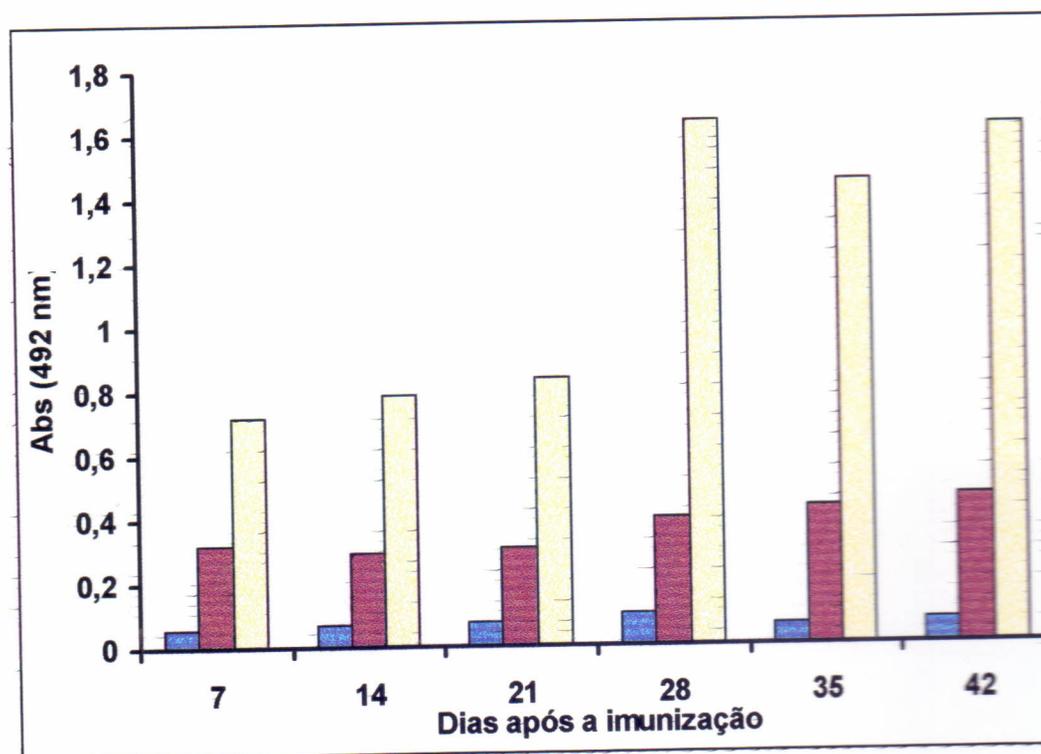


FIGURA 14 – Teste de “Enzyme linked immunossorbent assay” (ELISA) com antissoro policlonal de camundongos imunizados com 100  $\mu\text{g}$  CPSMV +  $\text{Al}(\text{OH})_3$  na diluição de 1:400, mostrando reações específicas contra o CPSMV purificado (■), planta infectada (■) e planta sadia (■). Existe uma diferença significativa entre os três tratamentos com  $\alpha \leq 0,05$ , enquanto que as doses não diferem entre si.

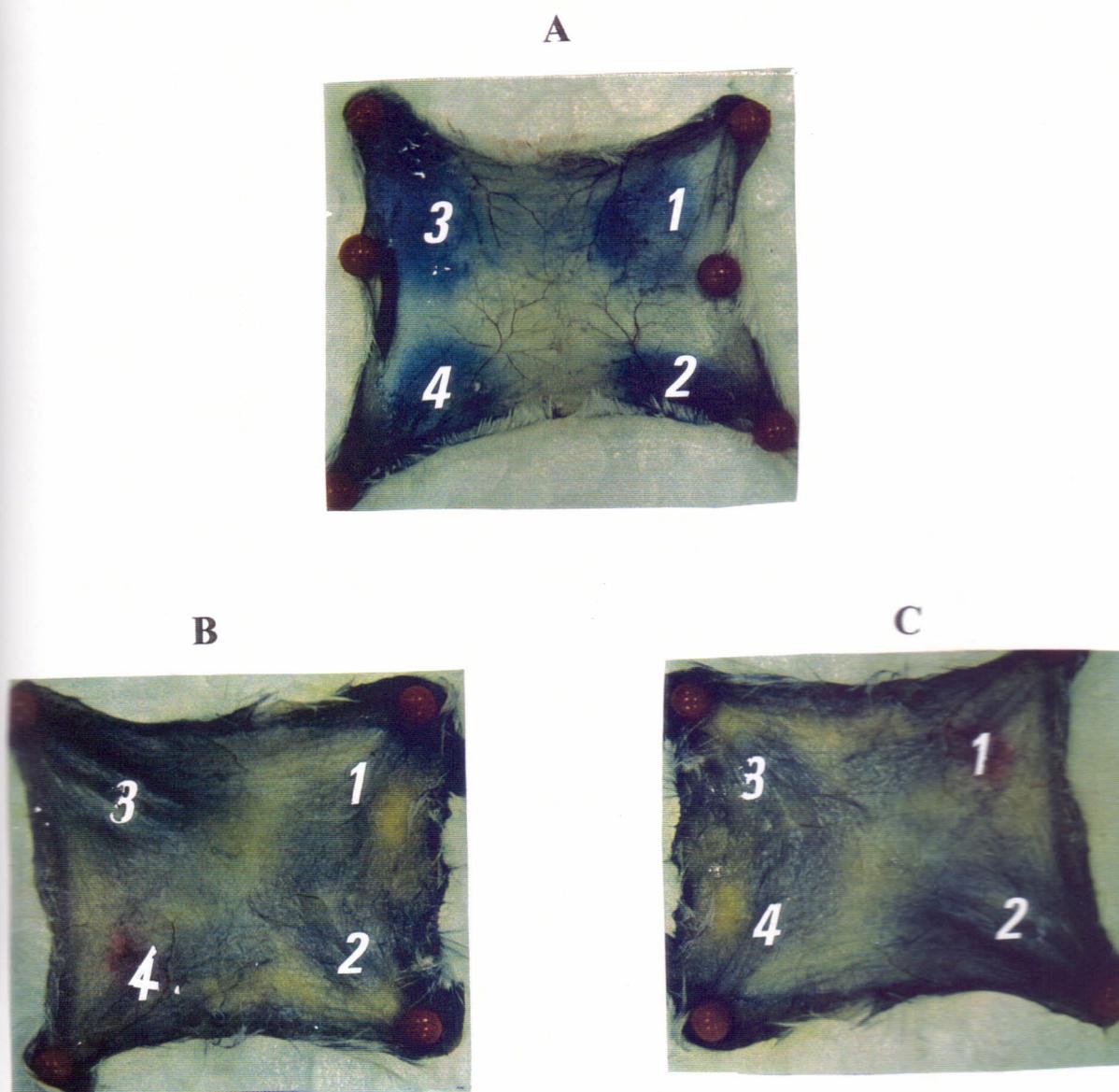


FIGURA 15: Resposta imunológica do tipo IgG1 em soros de camundongos imunizados por via subcutânea com proteínas dos capsídeos do CPSMV, detectados através de PCA (Anafilaxia Passiva Cutânea): 1A -soro de camundongos imunizados com 10  $\mu\text{g}$  de CPSMV +  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , na diluição de 1:64 (42 dias após a imunização); 2 A -soro de camundongos imunizados com 10  $\mu\text{g}$  de CPSMV +  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , na diluição de 1:2 (7 dias após a imunização); 3 A -soro de camundongos imunizados com 10  $\mu\text{g}$  de CPSMV + Marcol, na diluição de 1:64 (42 dias após a imunização); 4 A -soro de camundongos imunizados com 10  $\mu\text{g}$  de CPSMV + Marcol, na diluição de 1:2 (7 dias após a imunização) desencadeados com o CPSMV purificado; B- os mesmos soros, sendo as reações desencadeadas com o extrato de folhas de *V. unguiculata* infectadas pelo CPSMV; purificado; C- os mesmos soros, sendo as reações desencadeadas com o extrato de folhas de *V. unguiculata* sadia.

A cinética da síntese de IgG1 induzida por imunização de camundongos com 10  $\mu\text{g}$  de CPSMV, avaliada por PCA demonstra o efeito do  $\text{Al}(\text{OH})_3$  no início da resposta primária (7 e 14 dias) foi superior ao do marcol (FIGURA 16). Essa situação inverteu-se aos 21 dias e o marcol passou a exercer um maior efeito adjuvante que o  $\text{Al}(\text{OH})_3$  tanto na resposta secundária como na terciária.

De acordo com a cinética da síntese de IgG1 induzida por imunização de camundongos com 100  $\mu\text{g}$  de CPSMV, avaliada por PCA, o efeito de ambos os adjuvantes, marcol e  $\text{Al}(\text{OH})_3$  foram praticamente idênticos, com exceção da resposta primária tardia (21 dias) em que o efeito do  $\text{Al}(\text{OH})_3$  foi mais elevado que o do marcol (FIGURA 17).

Os efeitos comparativos da imunização de camundongos com 10 e 100  $\mu\text{g}$  de CPSMV em presença de cada um dos adjuvantes, na síntese de IgG1 específica, em presença de marcol, não foi muito diferente na resposta primária dos camundongos imunizados com 10 e 100  $\mu\text{g}$  de CPSMV mas revelou-se mais pronunciado, nos animais imunizados com 10  $\mu\text{g}$ , após a primeira dose de reforço (28 dias), tornando-se praticamente idênticas nas respostas secundária e terciária (FIGURA 18).

A síntese de IgG1 em presença de  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , foi maior na resposta primária precoce (7 e 14 dias) nos animais imunizados com 10  $\mu\text{g}$  de CPSMV mas com 21 dias essa resposta foi invertida, passando a ser maior quando os animais foram imunizados com 100  $\mu\text{g}$  (FIGURA 19). Nas repostas secundária e terciária a síntese de IgG1 específica permaneceu idêntica nos animais imunizados com ambas as doses de CPSMV.

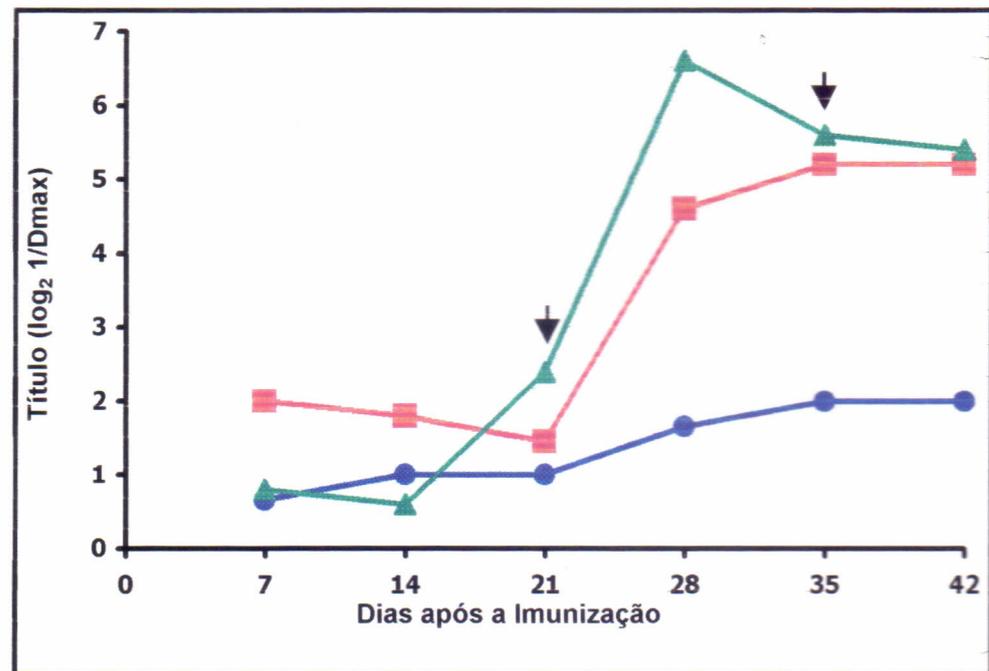


FIGURA 16 - Resposta do tipo IgG1 em camundongos imunizados por via subcutânea com 10  $\mu$ g de CPSMV (•), 10  $\mu$ g de CPSMV + Al(OH)<sub>3</sub> (■) e 10  $\mu$ g de CPSMV + Marcol (▲). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços. O tratamento com Marcol mostrou-se estatisticamente superior aos demais com  $\alpha \leq 0,05$ .

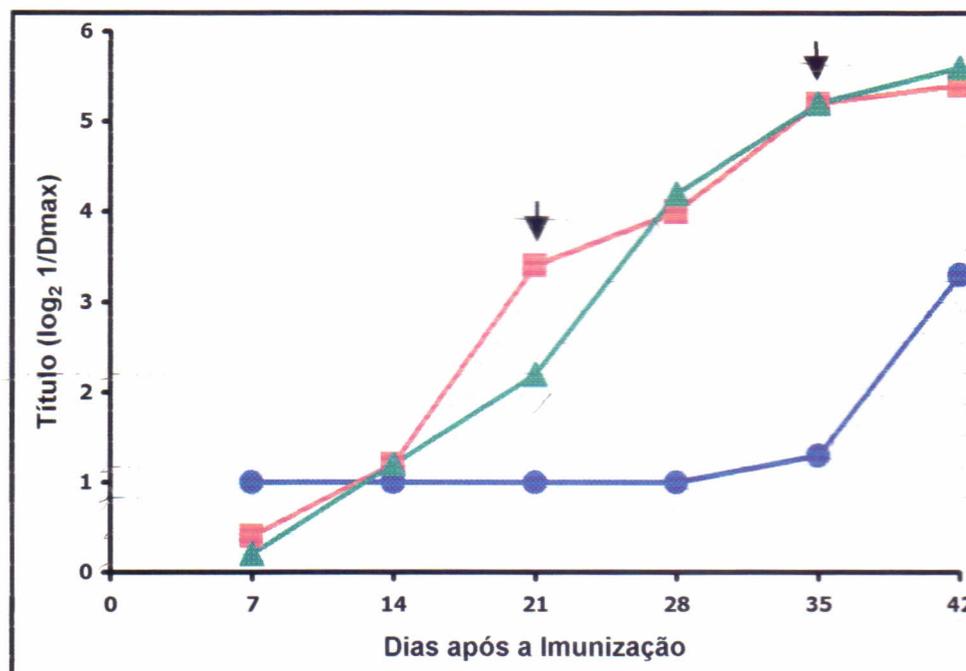


FIGURA 17 - Resposta do tipo IgG1 em camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg de CPSMV (•), 100 µg de CPSMV + Al(OH)<sub>3</sub> (■) e 100 µg de CPSMV + Marcól (▲). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços. Não existe diferença estatística significativa entre o Marcól e o Al(OH)<sub>3</sub>.

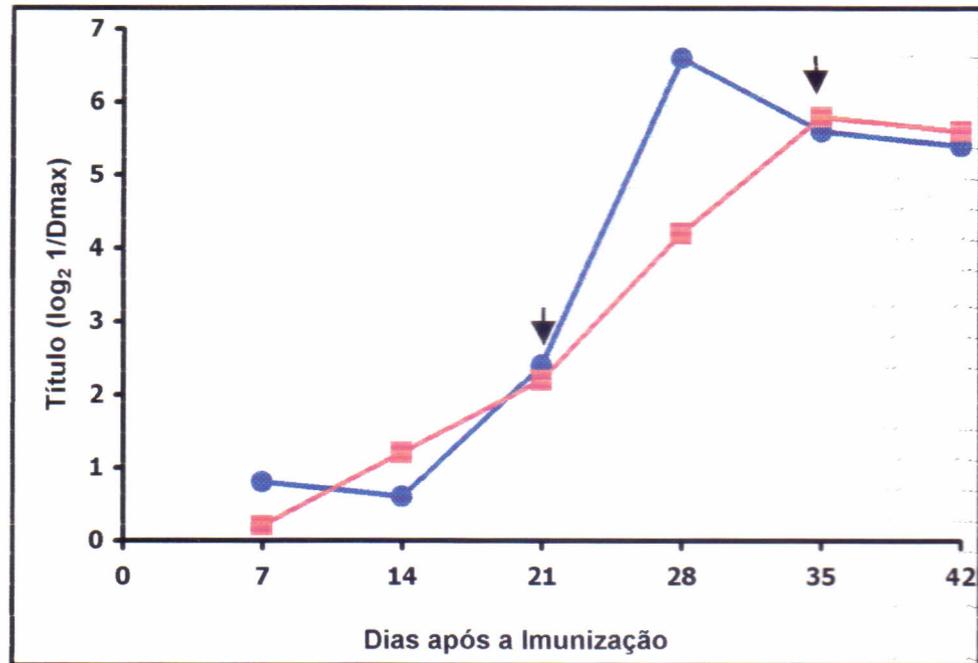


FIGURA 18 - Resposta do tipo IgG1 em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de CPSMV + Marcol (•), 100 µg de CPSMV + Marcol (■). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços. Não existe diferença significativa entre os tratamentos com 10 e 100 µg de CPSMV.

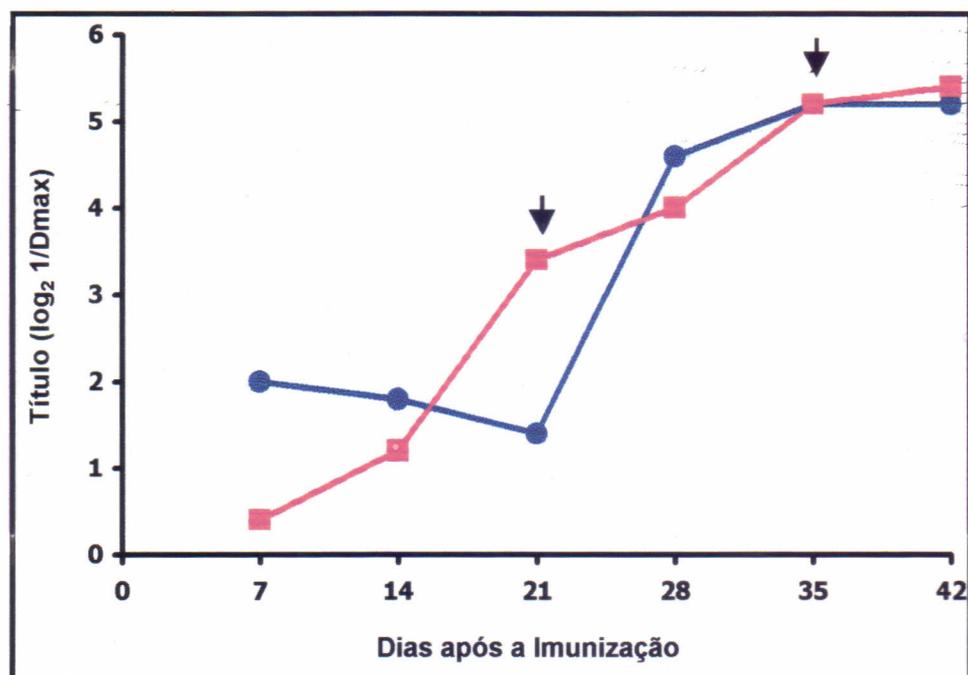


FIGURA 19 - Resposta do tipo IgG1 em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de CPSMV + Al(OH)<sub>3</sub> ( ● ), 100 µg de CPSMV + Al(OH)<sub>3</sub> ( ■ ). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços. Não existe diferença significativa entre os dois tratamentos com  $\alpha \leq 0,05$ .

#### 2.4-Avaliação da Resposta IgE específica por PCA

A reação qualitativa de anticorpo policlonal de camundongos foi detectada por PCA em rato (IgE), contra CPSMV purificado (FIGURA 20).

Na cinética da síntese de IgE induzida por imunização de camundongos com 10 µg de CPSMV, avaliada por PCA, não foi detectada síntese de IgE, em ausência dos dois adjuvantes, ao longo dos 42 dias do período da resposta imunológica (FIGURA 21). Em presença de Al(OH)<sub>3</sub>, não houve síntese de IgE em resposta primária, enquanto na presença de marcol a síntese de IgE já aparece no fim da resposta primária (21 dias). Sete dias após o primeiro reforço (28 dias) a síntese de IgE foi mais elevada em presença do Al(OH)<sub>3</sub> do que a detectada com o uso do marcol, caindo ambas a um mesmo nível no 35º dia e atingindo níveis relativamente próximos após o 2º reforço (42 dias).

Na cinética da síntese de IgE induzida por imunização de camundongos com 100 µg de CPSMV, avaliada por PCA, não foi detectada síntese de IgE, em ausência dos 2 adjuvantes, ao longo dos 42 dias do período da resposta imunológica (FIGURA 22). Não houve síntese de IgE na resposta primária em presença de Al(OH)<sub>3</sub> e essa resposta foi muito pequena em presença do marcol. O efeito do marcol foi superior ao do Al(OH)<sub>3</sub> durante as respostas secundária e terciária.

Os efeitos comparativos da imunização de camundongos com 10 e 100 µg de CPSMV em presença de cada um dos adjuvantes, isto é, marcol e Al(OH)<sub>3</sub>, na síntese de IgE específica, mostram a síntese de IgE (FIGURA 23 e 24). Em presença de marcol, a dose de 100 µg de CPSMV na imunização induziu uma síntese mais elevada em resposta primária precoce (14 dias) e após o primeiro reforço (28 dias) (FIGURA 23). A síntese de IgE em presença de

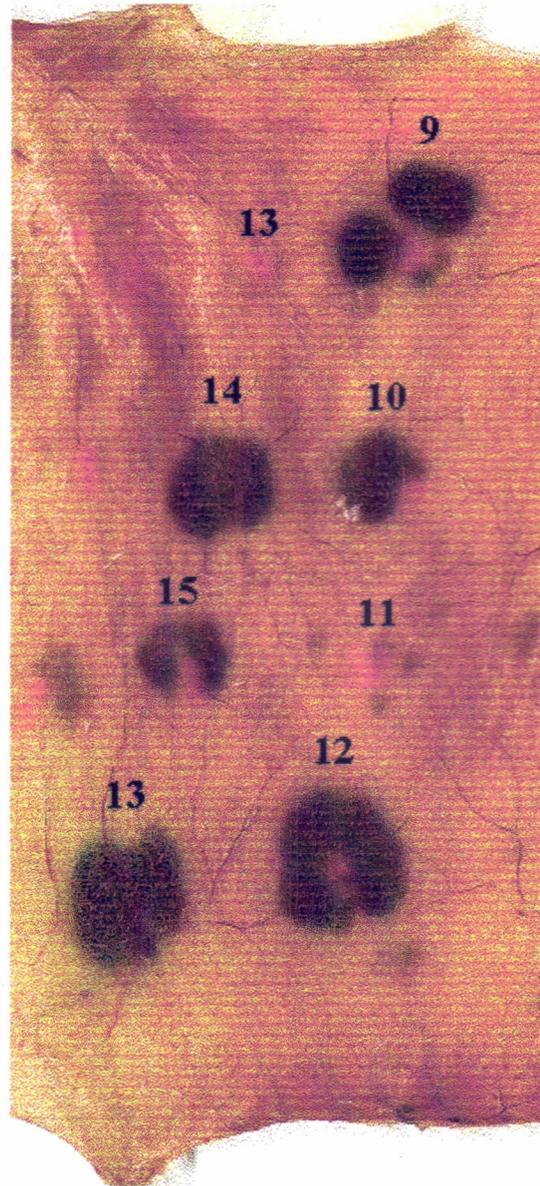


FIGURA 20: Resposta imunológica do tipo IgE, detectados através de PCA (Anafilaxia Passiva Cutânea) em soros de camundongos imunizados por via subcutânea com 10 e 100  $\mu$ g de CPSMV proteínas dos capsídeos do CPSMV +  $AL(OH)_3$  como adjuvante: -Pontos 9 e 10 (28 dias após a imunização com 10  $\mu$ g de CPSMV-diluição de 1:8 e 1:16 respectivamente), ponto 11 (35 dias após a imunização com 10  $\mu$ g de CPSMV na diluição de 1:8), pontos 12 e 13 (42 dias após a imunização com 10  $\mu$ g de CPSMV na diluição de 1:64 e 1:128 respectivamente), ponto 14 (35 dias após a imunização com 100  $\mu$ g de CPSMV, na diluição de 1:4), ponto 15 (42 dias após a imunização com 100  $\mu$ g de CPSMV, na diluição de 1:32), ponto 13 (28 dias após a imunização com 100  $\mu$ g de CPSMV, na diluição de 1:32).

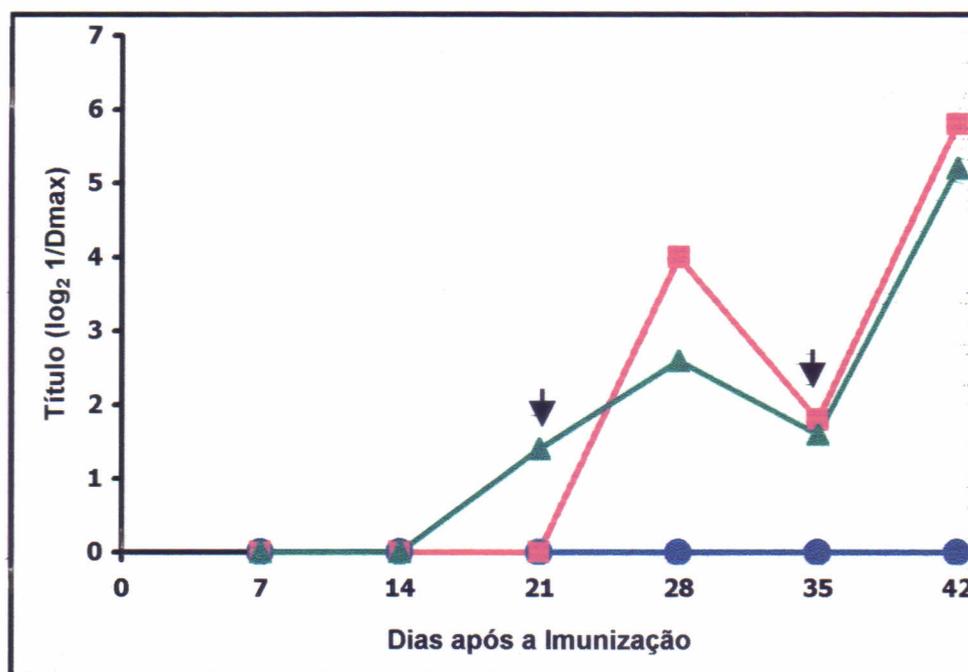


FIGURA 21 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de CPSMV (●), 10 µg de CPSMV + Al(OH)<sub>3</sub> (■) e 10 µg de CPSMV + Marcol (▲). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços. O Al(OH)<sub>3</sub> apresentou uma diferença estatística significativa quando comparado com Marcol.

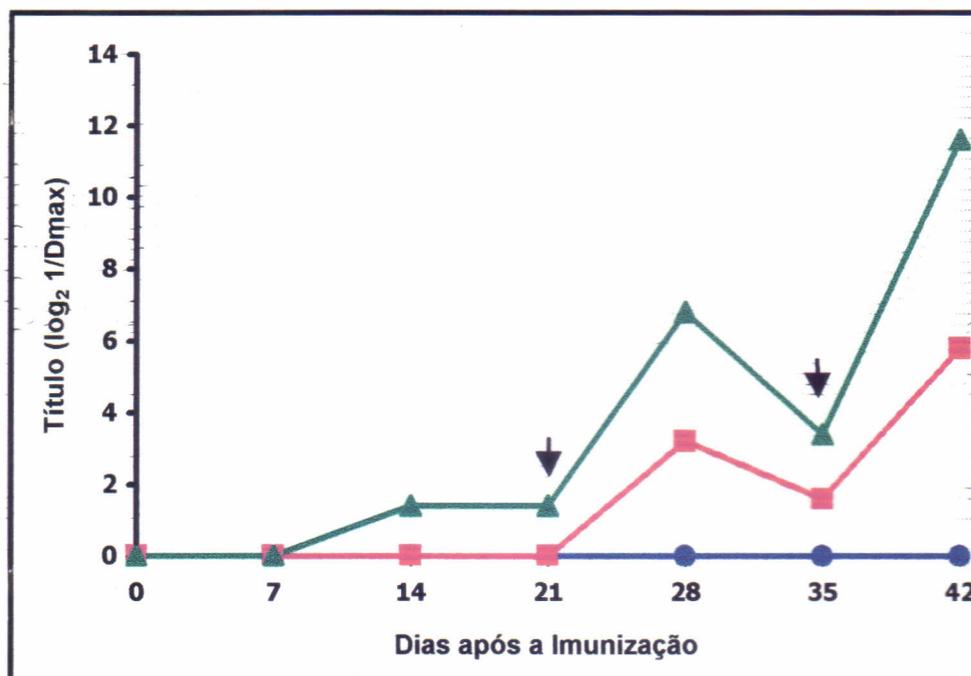


FIGURA 22 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg de CPSMV (●), 100 µg de CPSMV + Al(OH)<sub>3</sub> (■) e 100 µg de CPSMV + Marcol (▲). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços. Não existe diferença significativa entre os tratamentos com Marcol e com o Al(OH)<sub>3</sub>.

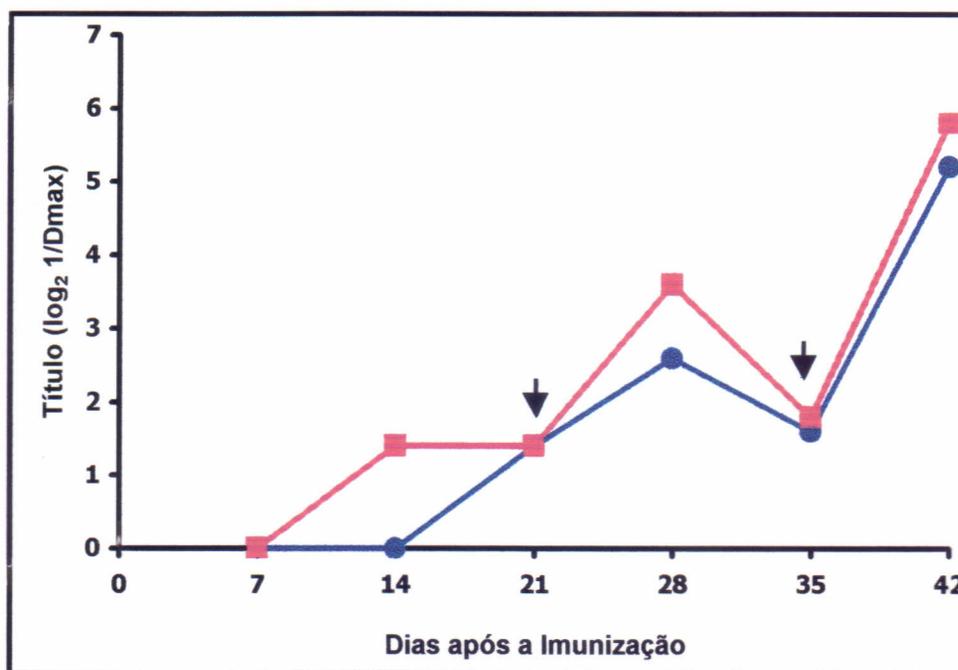


FIGURA 23 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de CPSMV + Marcol (●), 100 µg de CPSMV + Marcol (■). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços. Não existe diferença estatística significativa entre os dois tratamentos com  $\alpha \leq 0,05$ .

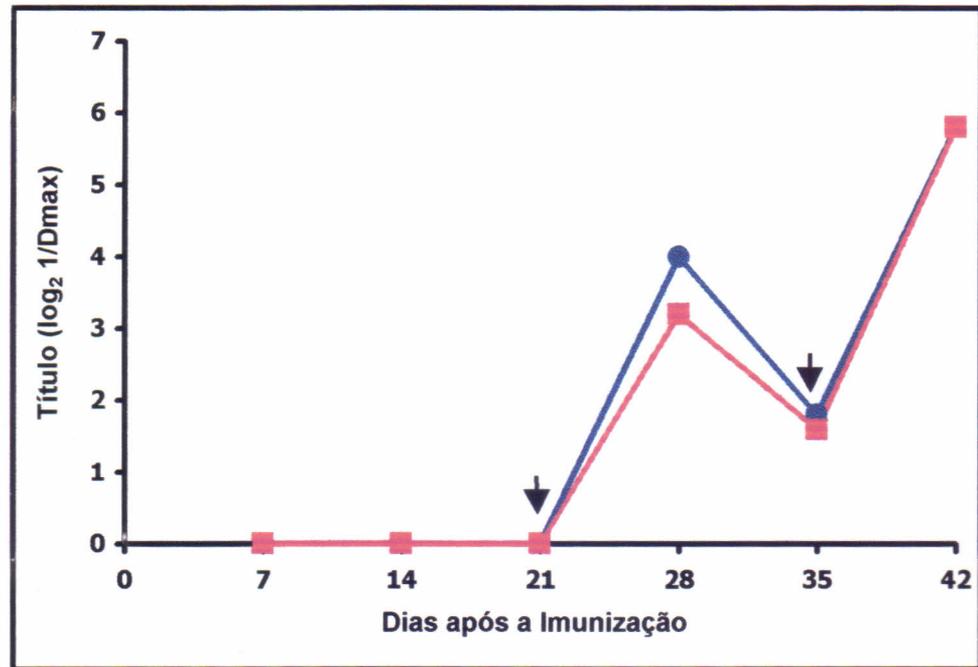


FIGURA 24 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de CPSMV + Al(OH)<sub>3</sub> ( ● ), 100 µg de CPSMV + Al(OH)<sub>3</sub> ( ■ ). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços. Não existe diferença estatística significativa entre os dois tratamentos com  $\alpha \leq 0,05$ .

Al(OH)<sub>3</sub>, não foi detectada na resposta primária induzida nem por 10 nem por 100 µg de CPSMV (FIGURA 24). Nas respostas secundária e terciária a síntese de IgE específica induzida pelas duas doses de CPSMV foi praticamente idêntica.

### 3.- RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL DE CAMUNDONGOS 'SWISS' IMUNIZADOS POR VIA ORAL

#### 3.1.-Avaliação da Resposta Imunológica por Dupla Difusão em agar

A reatividade qualitativa do anticorpo policlonal de camundongos imunizados por via oral, contra o extrato de plantas infectadas ou contra vírus purificado, foi detectada até a diluição 1:64 (FIGURA 25 A e B). Nenhuma reação foi observada contra o extrato de plantas sadias (FIGURA 25 C).

A cinética da síntese de anticorpos totais induzida pela imunização oral de camundongos, avaliada por dupla difusão em agar, demonstra que 5 dias após o término da imunização oral, (15 dias após o início da imunização) há uma produção de anticorpos de mesma intensidade, quer os animais tenham sido imunizados com vírus purificado, quer com extrato de folhas infectadas (FIGURA 26). Nos dias 35 e 40, essa resposta foi mais pronunciada nos animais alimentados com o extrato de folhas infectadas.

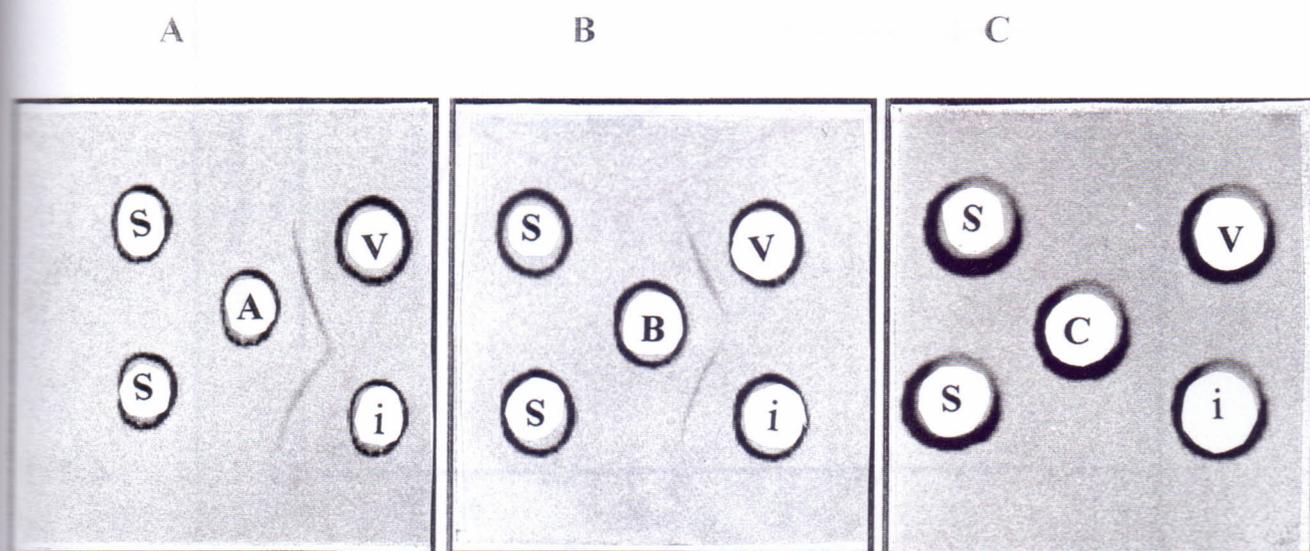


FIGURA 25: Anticorpos específicos em soro de camundongos (25 dias após o início da imunização), detectados por teste de imunodifusão dupla em agar. Os orifícios centrais contém 10  $\mu$ L de soro, na diluição de 1:4: (A)-soro de camundongos imunizados por via oral com CPSMV purificado; (B)- soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de folhas de *V. unguiculata* infectada pelo CPSMV e (C)- soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de folhas de *V. unguiculata* sadia. Os orifícios periféricos contém os antígenos: (v)-5  $\mu$ g de vírus purificado; (i)-extrato de folhas de *V. unguiculata* (1:2 p/v) de folhas de plantas infectadas pelo vírus e (s)-extrato de folhas de plantas de *V. unguiculata* sadia

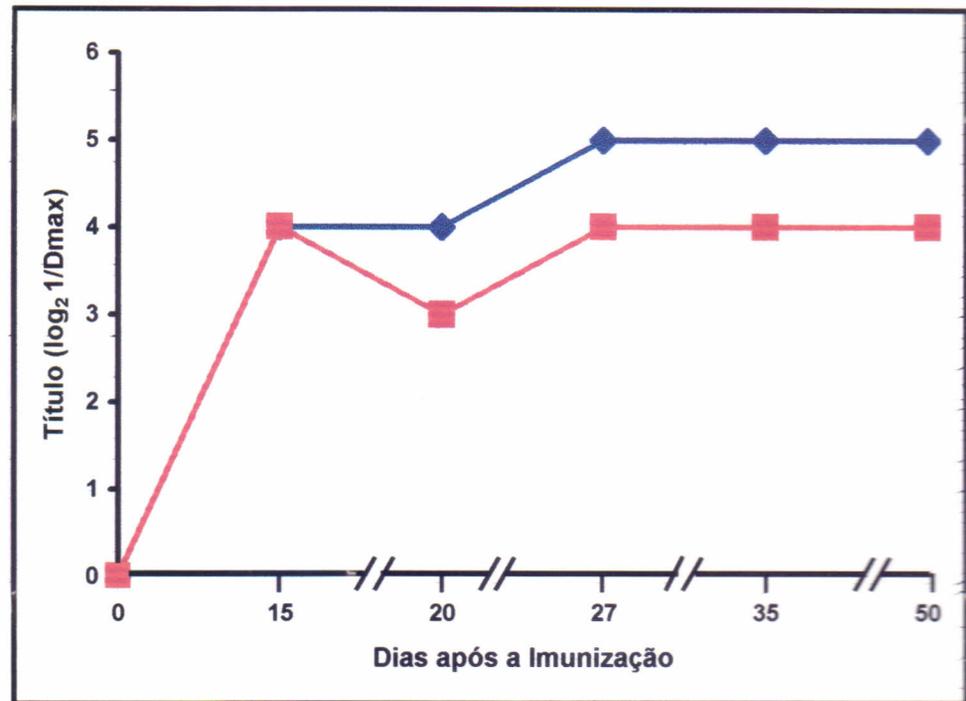


FIGURA 26 - Cinética da síntese de imunoglobulinas totais através de teste de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY) em camundongos imunizados por via oral com extrato de planta de *V unguiculata* infectada pelo CPSMV (•), CPSMV purificado (■).

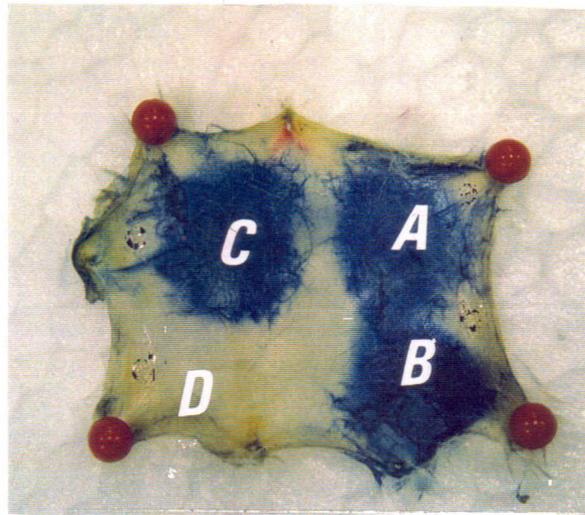
### 3.2.-Avaliação da Resposta Imunológica IgG1-específica por PCA

A reatividade qualitativa do anticorpo policlonal de camundongos foi detectada por PCA em camundongos (IgG1), contra CPSMV purificado (FIGURA 27 A). Não foi possível individualizar as reações, quando a PCA foi desencadeada com extrato de folhas de *V. unguiculata* infectadas pelo CPSMV, o que ocasionou uma coloração difusa (FIGURA 27 B). A mesma coloração azul difusa foi observada desencadeando-se a PCA com extrato de folhas de *V. unguiculata* sadias (FIGURA 27 C)

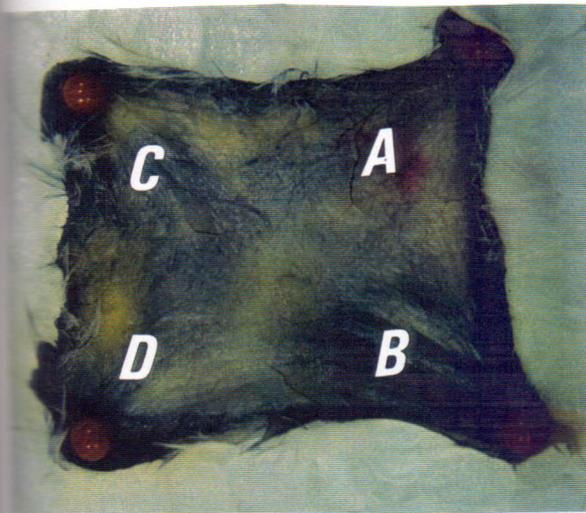
A cinética da síntese de IgG1 induzida por imunização oral de camundongos avaliada por PCA, após 5 e 25 dias do término da imunização mostrou a síntese de IgG1 específica contra CPSMV, se revelando mais elevada quando os camundongos foram alimentados com extrato de folhas de *V. unguiculata* infectadas pelo CPSMV do que nos animais alimentados com CPSMV purificado (FIGURA 28). Com 40 dias após o fim da imunização o teor de anticorpos específicos foi igual para os animais imunizados tanto com o CPSMV purificado com o extrato de folhas de *V. unguiculata* infectadas.

### 3.3. Avaliação da Resposta Imunológica IgE-específica por PCA

Não foi detectada IgE específica (por PCA em ratos) contra CPSMV no soro de camundongos imunizados por via oral, nas mesmas condições em que foi detectada IgG1 específica contra CPSMV (testada por PCA em camundongos).



27-B



27-C

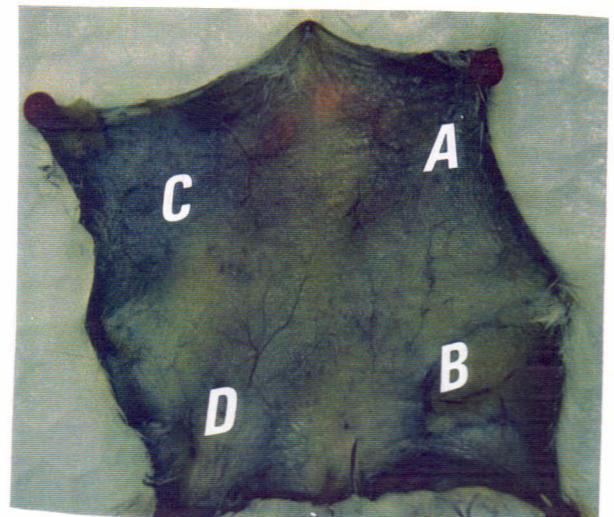


FIGURA 27: Resposta imunológica do tipo IgG1 específicas para o CPSMV detectados em camundongos imunizados por via oral através de PCA: A-antissoro obtido de camundongos (14 dias a partir do início da imunização) com extrato de folhas de plantas de *V. unguiculata* infectada pelo CPSMV, diluído de 1:2; B-antissoro obtido de camundongos 35 dias a partir do início da imunização (14 dias após o primeiro reforço) com extrato de folhas de plantas de *V. unguiculata* infectada pelo CPSMV, diluído de 1:4; C-antissoro obtido de camundongos 42 dias a partir do início da imunização (7 dias após o segundo reforço) com extrato de folhas de plantas de *V. unguiculata* infectada pelo CPSMV, diluído de 1:8; D- antissoro obtido de camundongos 35 dias a partir do início da imunização (14 dias após o primeiro reforço) com extrato de folhas de plantas de *V. unguiculata* sadia, diluído de 1:4. A reação de PCA foi desencadeada com 250  $\mu$ g de proteína do capsídeo viral (27-A). A figura (27-B e 27-C) contém os mesmos soros que a figura (27-A) sendo que a reação de PCA da figura (27-B) foi desencadeada com extrato de *V. unguiculata* infectada pelo CPSMV e a figura (27-C) desencadeada com extrato de *V. unguiculata* sadia.

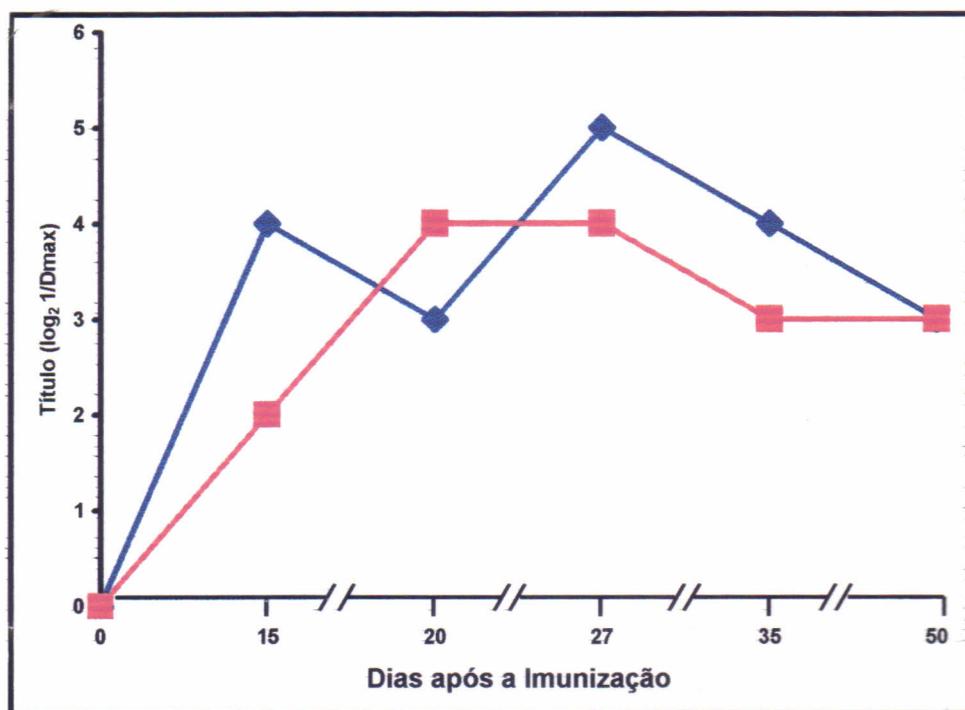


FIGURA 28 - Resposta do tipo IgG1 (PCA) em camundongos imunizados por via oral com extrato total de folhas de *V. unguiculata* infectada com CPSMV (●) e com o CPSMV purificado (■)

### 3.4.-Avaliação por teste de ELISA

A cinética de síntese dos anticorpos anti-CPSMV medidos por ELISA, em camundongos alimentados com extrato de folhas de *V. unguiculata* infectadas pelo CPSMV, demonstra que 7 dias após o término da imunização oral houve um aumento do título de anticorpos ca. de 4 vezes maior que o do soro pré-imune e esse título permaneceu constante até o 21º dia. Quando foi aplicado uma dose de reforço houve então um aumento na síntese dos anticorpos, que caiu e aumentou novamente após ser ministrada uma segunda dose de reforço aos 35 dias, após o fim da imunização oral (FIGURA 29).

A produção de anticorpos anti-CPSMV, no 14º dia após o primeiro reforço foi demonstrada em placa de ELISA sensibilizada com CPSMV purificado e com os extratos de plantas sadia e infectadas (FIGURA 30). Observa-se que o título de anticorpos específicos revelado contra CPSMV purificado foi ca. de 3 vezes maior que a reação com a planta infectada e ca de 8 vezes maior que com a planta sadia.

A representação gráfica da produção de anticorpos anti-CPSMV dos camundongos imunizados oralmente com CPSMV purificado (em várias diluições) demonstra que o anticorpo específico, contra o CPSMV purificado mostrou-se reativo até uma diluição de 1:1280 (FIGURA 31).

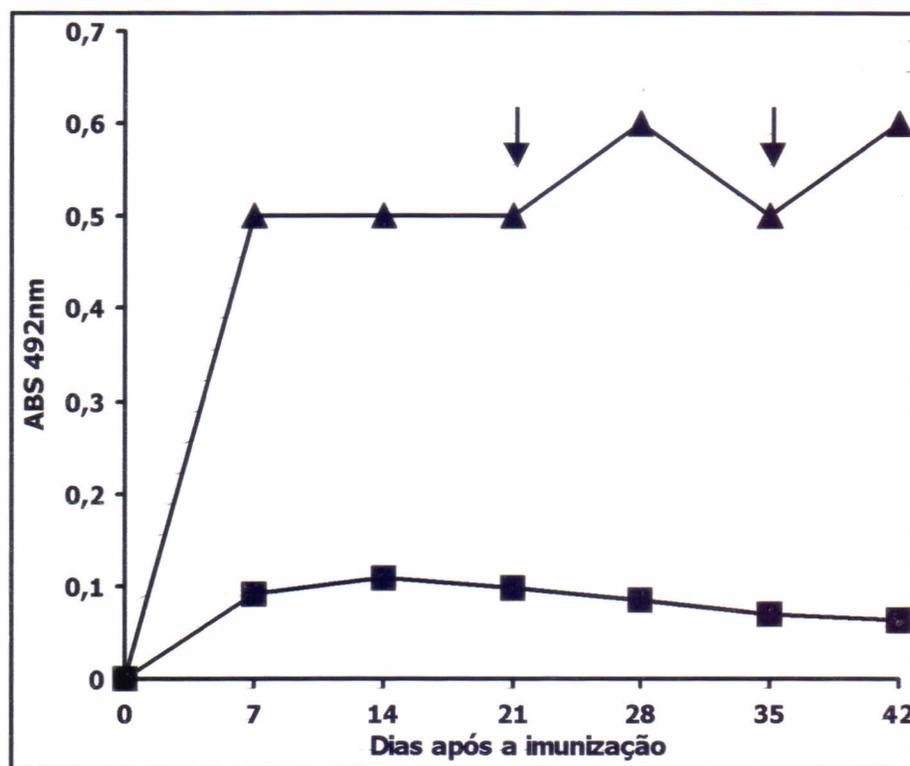


FIGURA 29: Cinética da síntese de anticorpos específicos contra o CPSMV em soro de camundongos com extratos de folhas de planta infetada pelo CPSMV detectada por (ELISA) usando soros diluídos de 1:400: (▲) e soro preimune (■). O antígeno utilizado foi o CPSMV purificado. As setas indicam os dias em que foram aplicados os reforços.

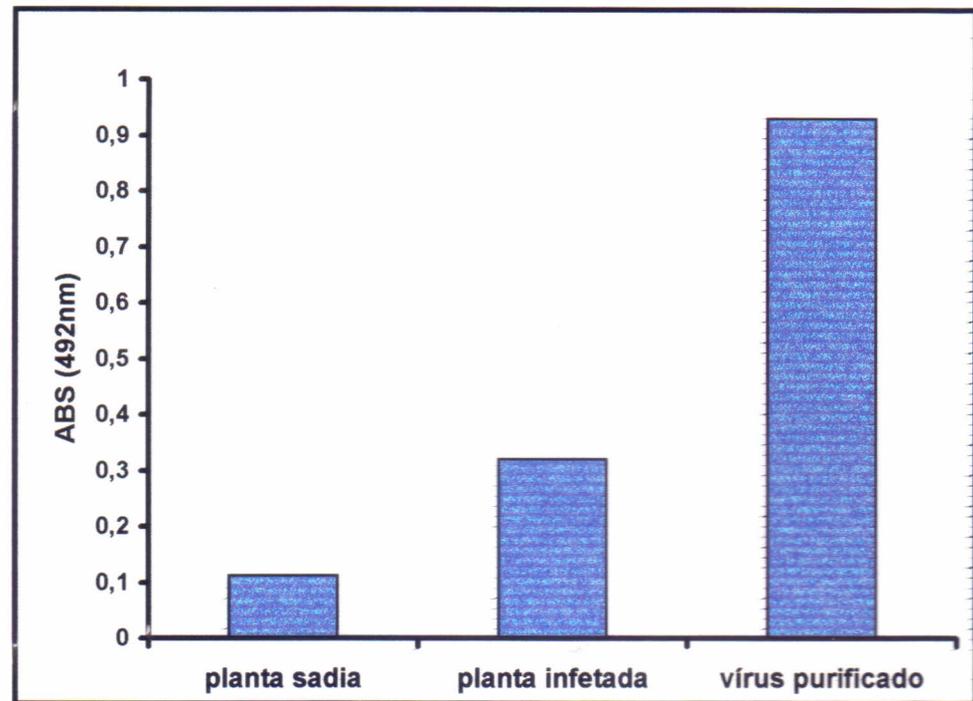


FIGURA 30 –Anticorpos específicos contra o CPSMV de soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de folhas de *V. Unguiculata* infectadas pelo CPSMV detectado por ELISA, usando diferentes diluições do soro e antígenos: VP- vírus purificado, PI- planta infectada e PS- planta sadia. Existe uma diferença significativa ao nível de  $\alpha \leq 0,05$ .

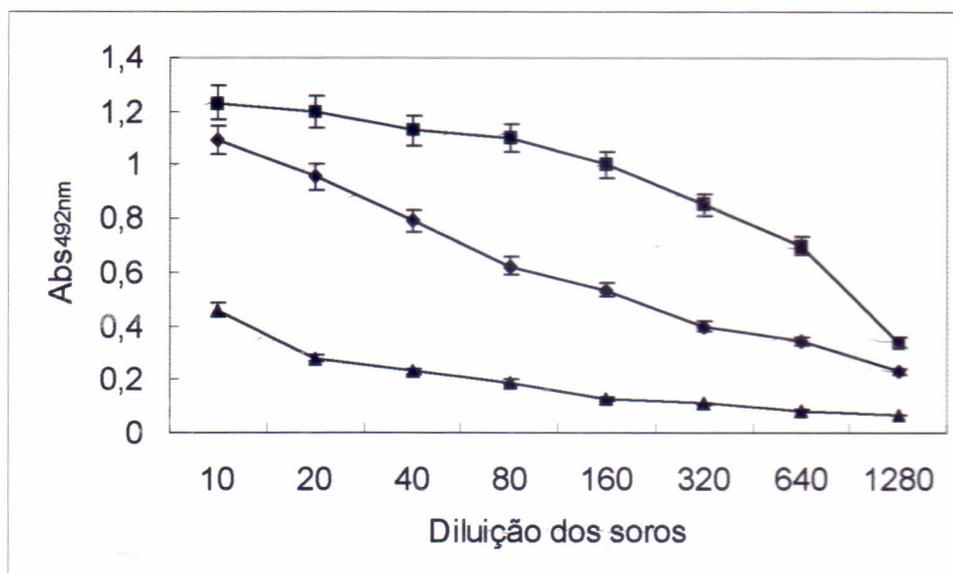


FIGURA 31: Anticorpos específicos contra o CPSMV obtidos em soro de camundongos imunizados com extratos de folhas de planta infectada pelo CPSMV (25 dias após o início da imunização) detectados através de teste de ELISA, usando diferentes diluições do soro. Os antígenos utilizados foram: vírus purificado (■), planta infectada (◆) e planta sadia (▲).

### 3.5-Análise por Western Blotting dos Anticorpos Séricos Específicos Induzidos por Imunização de Camundongos por via Subcutânea com Proteínas do Capsídeo do CPSMV.

A presença de IgG e IgA específicas para CPSMV, foi detectada através de teste de imunoblotting, em soro de camundongos oralmente imunizados com extrato de folhas infectadas por CPSMV (FIGURA 32).

### 4. COMPARAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS ANTISSOROS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS POR VIA SUBCUTÂNEA E POR VIA ORAL COM CPSMV

Eletroforese nativa, demonstra que não existe diferença nos perfis dos anticorpos de camundongos imunizados com CPSMV, seja por via subcutânea, seja por via oral (FIGURA 33).

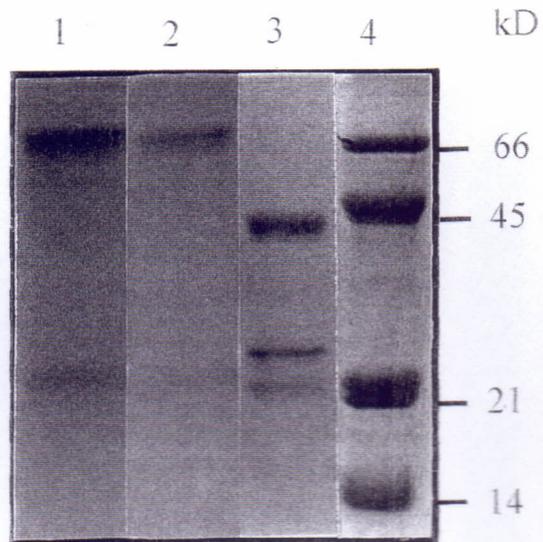


FIGURA 32 - Anticorpos específicos contra o CPSMV (IgG e IgA) detectados em soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de folhas de planta de *V. unguiculata* infetadas pelo CPSMV por imunoblotting após imunoprecipitação de vírus purificado com o antissoro.

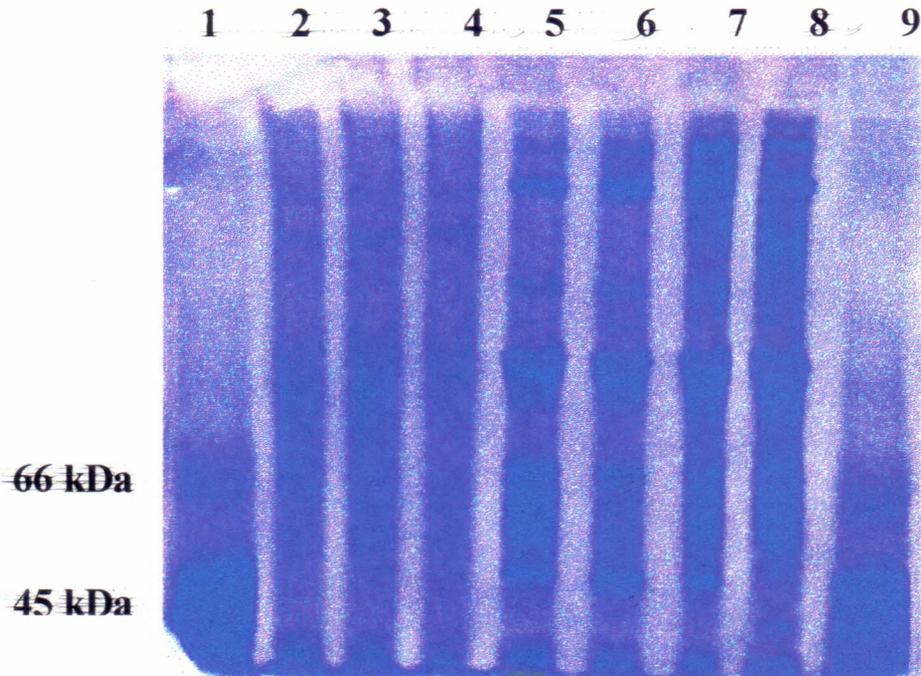


FIGURA 33: Perfil eletroforético dos antissoros específicos contra o CPSMV, detectados em soros de camundongos imunizados por via oral e via subcutânea com CPSMV purificado, extrato de folhas planta *V. unguiculata* infectadas pelo vírus e o perfil eletroforético da mucosa do intestino dos camundongos, em eletroforese nativa a 7%. Linhas 1 e 9 (marcadores de massa molecular), Linha 2, 3 e 4 (extrato da mucosa intestinal de camundongo imunizado por via oral), Linha 5 e 8 (soro de camundongos imunizados por via oral com o CPSMV purificado), Linha 6 (soro de camundongos imunizados por via oral com o extrato de plantas infectadas pelo CPSMV), Linha 7 (soro de camundongos imunizados por via subcutânea com o CPSMV purificado).

## DISCUSSÃO

### A INFECÇÃO POR CPSMV E A CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO CAPSÍDEO VIRAL

O CPSMV ocasiona um mosaico severo com bolhosidade nas folhas das plantas de *V. unguiculata* mecanicamente inoculadas (FIGURA 2), mostrando grande diferença quando a mesma é comparada com as folhas da planta sadia (FIGURA 1). Esses sintomas são compatíveis com os descritos por (Lima *et al.*, 1986; Brioso *et al.*, 1994).

A suspensão purificada do CPSMV mostra um espectro de absorção ultra violeta, típico de vírus poliédrico, com as relações de absorção entre 260 e 280 nm  $A_{260}/A_{280} = 1,72$  e a absorção máximo ( $A_{259}$ ) e mínimo em ( $A_{240}$ ) foi de aproximadamente 1,41 (FIGURA 3). A suspensão apresentou-se homogênea e límpida, o que sugere a eficiência do método utilizado para a purificação do mesmo. A concentração do vírus na suspensão, estimada pelo teor de proteína (FIGURA 3), foi de 6,9 mg/mL, estando de acordo com o já obtido por LIMA *et al.* (1986), em processo de purificação do mesmo vírus.

As proteínas do capsídeo viral migraram em três componentes (FIGURA 4), os quais apresentaram massas moleculares estimadas de 42, 23 e 21 kDa, o que está de acordo com BRIOSO *et al.*, (1994). Embora os comovírus habitualmente apresentem somente duas subunidades protéicas na composição do capsídeo (Murphy *et al.*, 1995), a presença de um terceiro componente no perfil eletroforético da suspensão viral purificada é fato que pode ocorrer entre os membros desse grupo de vírus (Brioso *et al.*, 1994). A observação dessas características eletroforéticas também já foram constatadas em outros membros do gênero *comovirus*, como no 'Andean Potato Mottle Virus'(Brioso *et al.*,

1993); no 'Bean Pod Mottle Virus', no 'Cowpea Mosaic Virus' e no CPSMV (Lin *et al.*, 1984; Joisson & Van Regenmortel, 1991). A presença da terceira banda protéica poderia ser explicada pela utilização de vírus purificado extraído dos tecidos vegetais em estágio inicial de infecção. Evidências nesse sentido foram obtidas na determinação do perfil eletroforético do 'Bean Pod Mottle Virus' (Joisson & Van Regenmortel, 1991).

### RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDA POR CPSMV MINISTRADO POR VIA SUBCUTÂNEA

A resposta imunológica de camundongos imunizados com CPSMV pela via subcutânea foi avaliada por testes de dupla difusão em agar, ELISA e "Western blotting" usando os soros obtidos de animais imunizados com 10 e 100 µg de CPSMV com marcol e/ou Al(OH)<sub>3</sub> como adjuvantes. Pode-se observar que o CPSMV mostrou sua atividade imunogênica induzindo a síntese de anticorpos específicos contra o vírus. Os anticorpos reconheceram especificamente o CPSMV em suspensão purificada do vírus, bem como, no extrato de planta infectada pelo mesmo. Nenhuma reação foi observada contra as proteínas da planta sadia como é mostrado no teste de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY) (FIGURA 5) e confirmado com o resultado do teste de "Western blotting" (FIGURA 10). Isso demonstrou que houve somente a formação de anticorpos específicos contra o vírus.

Através do teste de ELISA pode-se observar elevados níveis de imunoglobulinas totais específicas mesmo na resposta primária, e a reação mais elevada ocorreu quando se utilizou vírus purificado para sensibilizar a placa. A diferença da reação de planta infectada com planta não infectada é pequena,

quando comparada com às obtidas com outros vírus de planta, também em teste de ELISA. Isto parece está relacionado com a presença de alguma substância (s), presente no extrato vegetal, que impede a ligação do CPSMV à placa (FIGURAS 11, 12, 13 e 14). Não existe diferença estatística significativa com  $\alpha \leq 0,05$ , quando utilizamos 10 ou 100  $\mu\text{g}$  de CPSMV.

Os efeitos dos adjuvantes marcol e  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , ministrados com doses baixa e alta (10 e 100  $\mu\text{g}$ ) de CPSMV sobre a indução da síntese de imunoglobulinas totais específicas, foram avaliados pelos testes de OUCHTERLONY e ELISA (FIGURAS 6 a 14). Observou-se que os títulos de anticorpos anti-CPSMV durante a resposta primária, mantiveram-se constantes ao longo do tempo, não havendo nenhuma diferença significativa entre os efeitos induzidos por ambos os adjuvantes (avaliados por Ouchterlony) com as duas doses imunizantes de CPSMV. (FIGURAS 6 e 7 ). Por outro lado, durante a resposta secundária, logo após o primeiro reforço, os títulos de anticorpos específicos obtidos com o tratamento de 10  $\mu\text{g}$  de CPSMV associado ao marcol, mostraram-se mais elevados quando comparados com os induzidos pelo tratamento de 10  $\mu\text{g}$  de CPSMV associado ao  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Essa diferença revelou-se estatisticamente significativa, quando analisados através do teste de Tukey, com nível de significância  $\alpha \leq 0,05$  (FIGURAS 6, 11 e 13). Esses resultados mostraram que o efeito do marcol na produção de imunoglobulinas totais com dose baixa do CPSMV foi superior ao do  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Essas observações confirmam resultados obtidos por MUNEER *et al.* (1994), ALWIS *et al.* (1981), MUNEER & AFZAL (1989) que mostraram a superioridade do marcol quando comparado com o  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , quando esses adjuvantes foram utilizados em vacinação de bovinos contra o vírus da raiva. Resultados contraditórios porém, foram obtidos por PRETO *et al.* (1991) quando utilizaram esses adjuvantes em procedimentos de imunização com o vírus da raiva em búfalos. Ainda podemos dizer que o marcol teve melhor efeito adjuvante quando associado a baixa dose

de CPSMV (FIGURAS 6 e 8), embora essa diferença, com relação à dose de 100  $\mu\text{g}$ , só foi observada aos 35 dias após a imunização inicial. Já o  $\text{Al}(\text{OH})_3$  produziu pequena diferença na síntese de anticorpos específicos quando comparado ao controle, sendo essa diferença mais pronunciada aos 42 dias (FIGURA 6). Logo, pode-se concluir que o mais eficiente efeito induzido pelo marcol é observado com a dose baixa de CPSMV e o do  $\text{Al}(\text{OH})_3$  foi com a dose alta de CPSMV (FIGURAS 8 e 9 ). Apesar da diferença na ação do marcol como adjuvante ter-se revelado melhor com a dose baixa, comparando-se o perfil das curvas, como um todo, a dose alta (100  $\mu\text{g}$ ) de CPSMV revelou-se mais adequada com ambos os adjuvantes, sendo tal efeito ainda mais evidente com o  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Esse baixo efeito adjuvante apresentado pelo  $\text{Al}(\text{OH})_3$  com o vírus em estudo, está de acordo com a observação de WARREN *et al.* (1986), os quais mostraram que os adjuvantes à base de sais de alumínio não estimulam resposta imunológica forte contra todos os antígenos e concordam também com o que foi apresentado por WALKER (1994) e SPRIGGS (1996) que chamaram atenção da necessidade de adequação entre os adjuvantes e os antígenos utilizados.

Com relação à produção de IgG1 específica por PCA, observou-se que as PCAs desencadeadas com o vírus purificado detectaram reações específicas nítidas e com bordas delimitadas (FIGURA 15-A). No entanto, as PCAs desencadeadas com o extrato de folhas de plantas de *V. unguiculata* infectadas pelo vírus (FIGURA 15-B) e as desencadeadas com extratos de planta sadia (FIGURA 15-C) apresentaram um extravasamento difuso do corante nas peles dos dorsos dos animais, sem bordas definidas. A literatura não apresenta referências sobre esses resultados, sugere-se que substância (s) contida (s) nos extratos foliares, exerçam uma ação sobre as paredes vasculares, provocando uma saída do corante para os tecidos.

O CPSMV induziu a produção de IgG1 independente da dose, mesmo sem a presença de adjuvantes. Ambas as doses, mostraram respostas primárias e secundárias que se mantiveram constantes, embora com a dose alta tenha sido observado uma elevação dos títulos aos 42 dias. Quando observa-se o efeito dos adjuvantes com a dose baixa (10  $\mu\text{g}$ ), nota-se que apesar do  $\text{Al}(\text{OH})_3$  ter induzido um melhor efeito durante a resposta primária, não existe nenhuma diferença significativa entre os três tratamentos (FIGURA 16). Por outro lado, durante a resposta secundária, logo após o primeiro reforço, os tratamentos tanto com marcol como com o  $\text{Al}(\text{OH})_3$  mostraram-se significativamente superiores quando comparados com o controle. Nossos resultados concordam com ASTRID *et al.* (1997) que constataram um aumento de IgG1 específica anti-ovalbumina quando utilizaram o  $\text{Al}(\text{OH})_3$  como adjuvante. No entanto, o marcol exerceu melhor efeito adjuvante que o  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , aos 28 dias, apesar desse efeito ser menos estável.

Quando foram feitas as mesmas comparações com a dose alta (100  $\mu\text{g}$  de CPSMV) com relação ao efeito dos dois adjuvantes, pode-se observar que o  $\text{Al}(\text{OH})_3$  foi melhor aos 21 dias e durante a resposta secundária tornou-se igual ao marcol, ocorrendo então a estabilização de ambos ao longo do tempo, até 42 dias após a imunização.

Pode-se observar que, com a síntese de IgG1 específica, aconteceu o mesmo observado com as imunoglobulinas totais, isto é, o efeito do marcol foi maior ao ser associado com a dose menor de CPSMV (FIGURA 18) embora tivesse início lento mas que se revelou duradouro ao longo do tempo (FIGURAS 16 e 17). Com relação ao  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , observou-se que seu efeito adjuvante sobre a síntese de IgG1 é maior e mais estável com a dose maior do antígeno (100  $\mu\text{g}$ ) (FIGURA 19).

À guisa de conclusão pode-se dizer que: a) a dose maior (100µg de CPSMV) foi sempre mais imunogênica do que a de 10 µg e a que contribui para um efeito mais estável dos adjuvantes; b) o marcol exerce melhor efeito adjuvante quando associado ao antígeno em baixa dose; c) o Al(OH)<sub>3</sub> exerce melhor efeito adjuvante quando associado ao antígeno em dose alta; d) a resposta imunológica exercida pelo CPSMV em ausência de adjuvantes é mais tardia, aumentando de modo mais significativo após o segundo reforço (FIGURAS 16 e 17).

Quanto à síntese de IgE anti - CPSMV, observou-se que o CPSMV sem associação com adjuvantes, não induziu a formação de IgE específica (FIGURAS 21, 22). Como as reações alérgicas a alimentos são caracterizadas pelo nível de IgE específicas no soro e pela ativação de mastócitos do intestino (Astrid *et al.*, 1997; Nobuyuki *et al.*, 1997; Strobel & Mowat, 1998), a ausência de síntese de IgE é um resultado atraente, uma vez que os vírus que infectam os vegetais têm despertado grande interesse para os imunologistas, pela possibilidade de serem usados como veículos ou vetores para expressar antígenos, na produção de vacinas para animais e/ou humanos (Moffat, 1995; Modelska *et al.*, 1998; Scholthof *et al.*, 1996).

Quando se compara o efeito do marcol e o do Al(OH)<sub>3</sub> sobre a síntese de IgE, associada a doses alta e baixa de CPSMV (10 e 100 µg), observa-se que ambos potencializaram a síntese de IgE. Contudo, o Al(OH)<sub>3</sub> teve um efeito superior ao do marcol quando associado à dose baixa de CPSMV (FIGURA 21). Esses resultados comprovam os de PROUVOST-DANON *et al.* (1977) e de NOBUYUKI *et al.* (1997), nos quais a resposta do tipo IgE é mais intensa quando a dose do antígeno sensibilizante é mais baixa. Apesar disso, o Al(OH)<sub>3</sub> não potencializou a resposta primária com nenhuma das doses, mostrando que a resposta do tipo IgE é tardia, só ocorrendo após o primeiro reforço. Quando se

compara o efeito dos dois adjuvantes associados à dose alta (100 µg de CPSMV), observa-se que o marcol teve melhor desempenho e potencializou a síntese de IgE mais cedo, ou seja, durante as respostas primária com 10 e 100 µg de CPSMV (FIGURAS 21 e 22).

Pode-se concluir que, na indução de resposta do tipo IgE com o CPSMV o Al(OH)<sub>3</sub> tem melhor efeito adjuvante associado à dose baixa do CPSMV e o marcol, associado com a dose alta (FIGURAS 23 e 24). Esse resultado é interessante na medida em que o Al(OH)<sub>3</sub> era tido como o melhor adjuvante para uma resposta do tipo IgE (Prouvost-Danon *et al.*, 1977; Nobuyuki *et al.*, 1997).

### **RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDA POR CPSMV MINISTRADO POR VIA ORAL**

A resposta imunológica humoral sistêmica em camundongos swiss imunizados por via oral com CPSMV purificado e/ou com extrato de *V. unguiculata* infectada pelo mesmo, foi observada através da síntese de anticorpos específicos contra as proteínas do capsídeo viral. Os anticorpos policlonais interagiram especificamente com o CPSMV em suspensão purificada do vírus e no extrato de folhas de planta infectada. Nenhuma reação foi observada contra as proteínas da planta sadia no teste de OUCHTERLONY (FIGURA 25-A e B). Os anticorpos obtidos através de imunização oral com extrato de planta sadia não apresentaram nenhuma reação em teste de OUCHTERLONY (FIGURA 25-C). Por outro lado, pode-se observar que os

títulos dos anticorpos produzidos contra o extrato de folhas de plantas infectadas pelo CPSMV, mostraram-se um pouco mais elevados do que os obtidos com o vírus purificado (FIGURA 26). Isto provavelmente ocorreu, porque os tecidos vegetais protegeram o vírus da ação degradativa das enzimas proteolíticas, presentes no trato gastrintestinal. Resultados semelhantes foram constatados por MODELSKA *et al.* (1998) que sugeriram a existência de alguma substância presente na planta, funcionando como adjuvante (para induzir uma resposta imunológica).

Em teste de ELISA indireto, com anticorpo policlonal pode-se observar elevados níveis de imunoglobulinas totais específicas contra o CPSMV. A reação contra o vírus purificado foi mais elevada do que com a planta infectada, o que parece está relacionado com a presença de alguma substância (s), presente no extrato vegetal que impede a ligação do CPSMV à placa de ELISA. A diferença das reações com vírus purificado e planta infectada não foram estatisticamente diferentes com  $\alpha \leq 0,05$ , em teste de Tukey. Embora as mesmas apresentassem diferenças significativas, quando comparadas com a reação da planta não infectada (FIGURAS 27 e 28). Quando a placa de ELISA é sensibilizada somente com vírus purificado, a cinética da síntese de imunoglobulinas totais (FIGURA 29), mostrou a produção de anticorpos específicos para CPSMV, com títulos elevados altamente significativos, quando comparados com os títulos dos soros pré-ímmunes. Esses resultados mostram claramente o papel antigênico do vírus por via oral, quer seja em camundongos imunizados com vírus purificado, quer seja com extrato de folhas infectadas por vírus. Dessa forma, abre-se a perspectiva do emprego desse procedimento, como método rápido e preciso para a produção de anticorpos contra outros vírus que infectam vegetais, em busca de diagnóstico.

Aparentemente o CPSMV possui a capacidade preferencial para induzir uma resposta imunológica sistêmica sem requerer adjuvante, tal

propriedade, faz do CPSMV um candidato a vetor em sistema de expressão de antígenos para a produção de vacinas, uma vez que os vírus que infectam os vegetais, não causam doenças ao homem e/ou outros animais (Moffat, 1995; Jhonson *et al.*, 1997; Modelska *et al.*, 1998).

É fato bastante conhecido que a via oral é de interesse preferencial em procedimentos de vacinação, por ser a via fisiológica de entrada dos alimentos e também de germes de natureza patogênica. De acordo com MAGISTRIS, (1998) o ponto prático da imunização por via oral, é que essa é uma via natural, não invasiva e as peculiaridades da imunogenicidade do CPSMV pela rota oral, fortalecem seu interesse como vetor de outros antígenos. Ainda, a imunização pela via oral tem várias vantagens sobre a imunização parenteral, sobretudo porque a imunização através dessa via pode induzir a síntese de IgA e IgG específicas, tanto local como periférica (Mosmann & Sad, 1996) que podem inibir o ataque e a colonização do patógeno e ainda neutralizar sua atividade tóxica. Observou-se neste trabalho a presença de IgG e IgA específicas para o CPSMV (FIGURA 32).

A imunogenicidade do CPSMV revela-se de grande interesse, quando se leva em consideração que a administração de antígenos pela via oral, geralmente leva à tolerância e não a indução de anticorpos (Weiner *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 1994; Strobel & Mowat, 1998; Chen *et al.*, 1995). A indução de uma resposta imune através da rota oral é muito difícil e requer doses elevadas e repetidas de antígenos (Maureen & Ferguson, 1996; Van der Heijden *et al.*, 1991; Melo *et al.*, 1994; Weiner *et al.*, 1994) devido ao pH ácido e à presença de enzimas proteolíticas no trato gastrintestinal (Bukawa *et al.*, 1995). Além disso, a resposta imunológica quando induzida pela rota oral é baixa, de curta duração e freqüentemente confinada às mucosas (Richman *et al.*, 1981). Como pode-se observar não foi o que ocorreu com o CPSMV. De acordo com AIZPURUA & RUSSEL-JONES (1988) a capacidade de um antígeno induzir uma resposta

imune sistêmica pela rota oral, está relacionada com as propriedades estruturais do antígeno, que pode se ligar especificamente a vários glicolipídios e glicoproteínas localizadas na superfície das células da mucosa, sendo conseqüentemente internalizado e transportado para a circulação.

Ainda não temos uma explicação clara sobre a imunogenicidade do vírus pela rota oral, mas pode-se sugerir que isto está relacionado com a presença de proteína glicosilada (Murphy *et al.*, 1995) e a estrutura icosaédrica do vírus o que está de acordo com BRENNAN *et al.* (1999) que sugeriram que a estrutura icosaédrica do CPMV pode ter facilitado a sua ligação à mucosa e conseqüentemente, desencadeado uma resposta imunológica.

Recentemente, foi mostrado que o estado conformacional da capa protéica do CPSMV pode existir em quatro estados (Gaspar *et al.*, 1997). Essa característica estrutural poderia constituir uma razão para a facilidade imunogênica do CPSMV, pela via oral. Outro aspecto ainda não esclarecido, seria o de associar imunogenicidade ao material genético do vírus, restando ainda como uma via aberta ao esclarecimento.

A indução de IgG específica anti-CPSMV pela rota oral, reforça ainda mais a idéia desse vírus ser apontado como um bom candidato a vetor na produção de vacinas, uma vez que a IgG funciona como barreira de proteção contra doenças (Magistris, 1998). Esses anticorpos trabalham em conjunto com a IgM para internalizar e destruir o patógeno (Anderson, 1999). Outra vantagem a respeito do uso do CPSMV como vetor, é que o mesmo não induz produção de IgE, situação oposta à das toxinas CT e LT que vêm ultimamente sendo usadas por muitos pesquisadores como adjuvante para induzir uma resposta imune mucosa (Van Der Heijden *et al.*, 1991; Spangler, 1992; Bromandder *et al.*, 1993; Magistris, 1998). Além disso, caso a síntese de IgE estivesse aumentada nas imunizações com vírus, não se poderia descartar uma reação anafilática local ou

sistêmica, após a imunização oral com essas proteínas como já foi anteriormente mencionado por BOYAKA *et al.* (1999).

A capacidade de empacotamento do CPSMV, ainda não é conhecida. Contudo, devido a organização da estrutura de seu capsídeo e de seu genoma ser semelhante ao CPMV (Chen & Bruening, 1992; Kalmar & Eastwell, 1989) pode-se esperar um comportamento parecido para os dois vírus. Tem sido demonstrado que, a presença de seqüências heterólogas não afeta a capacidade do CPMV infectar plantas hospedeiras e as quimeras produzidas têm-se mostrado estáveis em pH 1,0 (Xu *et al.*, 1996). Por essas razões, o uso do CPMV tem sido muito atrativo para a produção de vacinas (Scholthof *et al.*, 1996). Entre as seqüências já expressas na superfície do CPMV estão peptídeos de rhinovirus-14 (HRV-14) e HIV-1 (Johnson & Lomonossoff, 1997), doença foot-and-mouth (FMDV) (Usha *et al.*, 1993).

Por sua capacidade de imunização por via subcutânea ou oral e por induzir uma surpreendente e preferencial resposta imunológica quando administrado por a via oral, o CPSMV é um candidato ideal para estudos imunológicos de mecanismos de tolerância, e sobretudo, de carreamento de antígenos patogênicos para o homem e/ou outros animais. A resposta imunológica por via oral, levanta ainda muitos aspectos a serem esclarecidos, tais como o da morfologia dos vírus, sua interação com as mucosas e da sua interação com o seu material genético, possibilitando uma facilitação na internalização dos mesmos através da mucosa e de sua possível capacidade imunogênica.

## RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

- 1 - O CPSMV mostrou-se imunogênico, induzindo síntese de anticorpos específicos (IgG totais e IgG1) por via subcutânea, mesmo na ausência de adjuvantes;
- 2 - O marcol e o gel de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  potencializaram a resposta imunológica, quando associados ao CPSMV.
- 3 - O marcol revelou-se um bom adjuvante para a síntese de IgG1, tanto associado à dose baixa ( $10\mu\text{g}$ ) como à dose alta ( $100\mu\text{g}$ ) do antígeno (CPSMV). O gel de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  foi um melhor adjuvante para a síntese de IgG1, quando associado à dose alta ( $100\mu\text{g}$ ) de antígeno (CPSMV);
- 4 - O CPSMV, nos esquemas de imunização utilizados por via subcutânea não induz resposta imunológica do tipo IgE, havendo necessidade da presença de imunoadjuvantes para que IgE anti-CPSMV seja produzida;
- 5 - O CPSMV purificado, ou em extrato de folhas de *V. unguiculata* infectadas por esse vírus, induziu síntese de anticorpos séricos anti-CPSMV, do tipo IgG totais, IgG1 e IgA. Não foi detectada síntese de anticorpos específicos contra proteínas das folhas de *V. unguiculata*;
- 6 - Não foi detectada síntese de IgE anti-CPSMV no soro de camundongos alimentados quer com o vírus purificado, quer com extrato de folhas de plantas infectadas.

## CONCLUSÕES:

De acordo com os resultados mostrados o CPSMV, induziu síntese de imunoglobulinas totais, IgG e IgA, o que pode ser observado tanto pela via oral como pela via subcutânea. O CPSMV conserva sua capacidade imunogênica ao ser internalizado pela rota oral, seja com o vírus purificado ou com extrato da planta infectada. Isso sugere que a resposta imunológica a esse vírus, ocorre em dois sistemas imunes, um sistema imune periférico e um sistema imune mucoso. Além do mais CPSMV é um vírus de fácil transmissão mecânica, apresenta boa concentração na planta infectada e pode ser facilmente purificado. Essas características tornam esse vírus um candidato privilegiado para expressar antígenos na produção de vacinas contra patógenos em humanos e/ou outros animais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. (1998). *Imunologia Celular e Molecular*. 2ª ed. Livraria e Editora Revinter Ltda. 5p.
- ABRAHAN, E (1992). Intranasal immunization with bacterial polysaccharide containing liposomes enhances antigen-especific pulmonary secretory antibody response. *Vaccine* 10: 461-468.
- AIZPURUA, H. J, & RUSSEL JONES, G. J (1988). Oral Vaccination. Identification of classes of Proteins that Provoke an Immune Response upon Oral Feeding. *J. Exp. Med.* 167: 440-451.
- ALBUQUERQUE, D. J. (1994). Efeito adjuvante da jacalina sobre a resposta imune humoral. Universidade de Campinas, São Paulo. 9p. Tese de doutorado.
- ALWIS, M.C.L. DE; SUMANASENA, T.G.; VIPULASIRI, A.A. & ARAWWAWALA, C.B. (1981). Recent improvement to the haemorrhagic septicaemia oil adjuvant vaccine. *Ceylon vet J.* 29: 27
- ANDERSON, A.O (1999). Peripheral and mucosal immunity: critical issues for oral vaccines design. U.S. Army medical Research Institute of Infections diseases. *Reviews*, 21702-5011.
- ANDERSON, A.O. (1990) Structure and organization of the lymphatic system. Pp. 14-45 in *Immunophysiology. The role of cells and cytokines in immunity and inflammation*, Chapter 2,. Oppenheim, J.J and Shevach, E. eds. New York: Oxford University Press.
- ARAÚJO, J.P.P.; RIOS, G.P.; WATT, E.E.; NEVES, B.P.; FAGERIA, N.K.; OLIVEIRA, I.P.; GUIMARÃES, C.M.; SILVEIRA FILHO, A. (1984). A cultura do caupi, *Vigna unguiculata* (L) Walp.): descrição e recomendações

técnicas de cultivo, Goiânia, EMBRAPA/CNPAF. 82p.  
(EMBRAPA/CNPAF. Circular Técnico, 18.

- ARTURSSON, P; LINDMARK, T; DAVIS, S. S. & ILLUM, L. (1994). Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.* 11, 1358.
- ASTRID, G.S.; VAN HALTEREN, MAARTEN, J.F.; VAN DER CAMMEN; JEIKE BIEWENGA; SVELKOU, F.J.; KRAAL, G. (1997). IgE and mast cell responses on intestinal allergen exposure: A murine model to study the onset of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99; 94-99.
- BALL, J.M; HARDY, M.E; ATMAR, R.L; CONNER, M.E & ESTES, M.E. (1998). Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *J. Virol.* 72: 1345-1353.
- BAULCOMBE, D.C.; CHAPMAN, S.; SANTA-CRUZ, S. (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* 7: 1045-1053.
- BOYAKA, P.N, MARINARO, M, VANCOTT, J.L, TAKAHASHI, I; FUJIIHASHI, K; YAMAMOTO, M; VAN GINKEL, F.W; JACKSON, R.J, KIYONO, H & MCGHEE, J.R (1999). Strategies for mucosal vaccine development. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.*, 60(4): 35-45.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- BRENNAN, F.R., BELLABY, T., HELLIWELL, S.M., JONES, T.D., KAMSTRUP, S., DALSGAARD, K., FLOCK, J.I., HAMILTON, W.D. (1999). Chimeric plant virus particles administered nasally induce systemic and mucosal immune responses in mice. *J. Virol.* 73, 930-938.

- BRIOSO, P. S. T.; FERREIRA, M.A. & OLIVEIRA, D.E. (1993). "Potato Virus Y"- Identificação de estirpe infectando naturalmente pimentão (*Capsicum annum* L.) 'Margareth'. *Fitopatol. Bras.* 18: 274.
- BRIOSO, P. S. T; DUQUE, F. F; SAYÃO, F. A. D; LOURO, R. P; KITAJIMA, E. W; & OLIVEIRA, D. F. (1994). Virus do Mosaico Severo do Caupi- Infecção natural em Mungo Verde, *Vigna radiata*. *Fitopatol. Bras.* 19: 420-429.
- BRISSON, N. PASZKOWSKI, J. PENSWICK, J.R.; GRONENBORN, N.; PASZKOWSKI, I.; HOHN, T. (1984). Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector. *Nature* 310: 511-514.
- BROMANDDER, M.T., & C.O. Elson. (1993). Reduction in oral immunogenicity of cholera toxin B subunit by N-terminal peptide addition. *Infect. Immun.* 61(2):384-390.
- BRUENING, G. (1978). Comovirus group. *Descriptions of Plant Viruses* N° 199. Commonw. Micol. Inst./ Assoc. Appl. Biol., Kew Surrey, England. 5p.
- BUKAWA, C.O., HOLLAND, S.P; DERTZBAUGH, M.T; CUFF, C.F. & ANDERSON, A.O. (1995). Morphologic and functional alterations of mucosal T cells by cholera toxin and its B subunit. *J. Immunol.* 154:1032-1040.
- CHEN, X & BRUENING, G. (1992). Nucleotide Sequence and genetic map of cowpea severe mosaic virus RNA2 and comparisons with RNA2 of other comoviruses. *Virology* 187, 682-692.
- CHEN, X. & BRUENING, G. (1992). Cloned DNA copies of cowpea severe mosaic virus genomic RNA-s : infectious transcripts and complete nucleotide sequence of RNA 1. *Virology* 191, 607-618.

- CHEN, Y., J. INOBE, R. MARKS, P. GONNELLA, V.K. KUCHROO, & H.L. WEINER. (1995). Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 376:177-189.
- COVEY, S.N & HULL, R. (1992). Genetic engineering with double-stranded DNA viruses. In *Genetic Engineering with Plant Viruses*, ed. TMA Wilson. J.W Davies, pp. 217-249.
- DAVIS, S. S. (1998). Polymeric systems for vaccine delivery. *Res. Immunol.* 149, 49-52.
- DAWSON, W.O; BUBRICK, P; GRANTHAM, G.L. (1988). Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement, and symptomatology. *Phytopathology* 78: 783-789.
- DE JAGER, C. P. (1979). Cowpea severe mosaic virus. In "Descriptions of Plant Viruses" (B. D. Harrison and A. F. Murrant, Eds.). No. 209. Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists (CMI/AAB), Kew, U. K.
- DOLJA, V.V; HALDEMAN, R; ROBERTSON, N.L; DOUGHERTY, W.G; CARRINGTON, J.C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO.J.* 13: 1482-1491.
- DONSON, J; KEARNEY, C.M; HILF, M.E; DAWSON, W.O. (1991). Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7204-7208.
- DURRANI, Z.; MCLNERNEY, T.L.; McLAIN, L.; JONES, T.; BELLARBY, T.; BRENNAN, F.R.; DIMMOCK, N.J. (1998). Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide from HIV-1 gp41 stimulates better

- mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. *J. Immunol. Methods* 220: 93-103.
- FIFCHEN, J., BEACHY, R.N. & HEIN, M.B. (1995). Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody responses. *Vaccine* 13, 1051-1057.
- FLORINDO, M. I; SILVA, A. C. M; LIMA, J. A. A ; SILVA LIMA, M (1997). Produção de Anticorpos em Camundongos Imunizados por via Oral com Virus de Planta. *Fitopatol. Bras.* 22-335.
- FRENCH, R; JANDA, M; AHLQUIST, P. (1986). Bacterial gene inserted in na engineered RNA virus: efficient expression in monocotyledonous plant cells. *Scie.*, 231: 1294-1297
- FREUND, J. (1951). The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization. *Am. J. Clin. Phatol.* 21, 645-656.
- FRIEDMAN, A. & WEINER, H.L. (1994).Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6688.
- FULTON, J.P. & SCOTT, H.A. (1979). A serogrouping concept for legume comoviruses. *Phytopathology* 69: 305- 306.
- GASPAR, L.P., JOHNSON, J.E., SILVA, J.L. AND DA POIAN, A. T. (1997). Partially folded states of the capsid protein of Cowpea Severe Mosaic Virus in the disassembly pathway. *J. Mol. Biol.* 24, 456-466.
- GILLELAND, H.E; Jr. GILLELAND, L.B; STACZEK, J;HARTY, R.N; GARCIA-SASTRE, A; ENGELHARDT, O.G & PALESE, P. (1997). Chimeric influenza viruses incorporating epitopes of outer membrane protein F as vaccine against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Behring Inst. Mitt.* 98: 291-301.

- GLENNY, A. T; POPE, G. C. G; WANDDINGTON, H.; WALLACE, U. (1926). The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J. Pathol. Bacteriol.* 29, 38-40.
- GOLDBACH, R; REZELMAN, R. & VAN KAMMEN, A. (1980). Independent replication and expression of B-component RNA of cowpea mosaic virus. *Nature* 286: 297-300.
- GRONENBORN, B; GARDNER, R.C; SCHAEFER, S; SHEPHERD, R.J. (1981). Propagation of foreign DNA in plants using cauliflower mosaic virus as vector. *Nature* 294: 773-776.
- HAMAMOTO, H; SUGIYAMA, Y; NAKAGAWA, N; HASHIDA, E; MATSUNAGA, Y. (1993). A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systemic production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato. *Bio-Technology* 11: 930-932.
- HOLMGREN, J.; BERGQVIST, M; BÄCKSTRÖM, C; CZERKINSKY, C; FREDRIKSSON, E. L; JOHANSSON, M; LEBENS, M; LINDBLAD, M; MIELCAREK, N; RASK, C; RUDIN and SUN. J. B. (1998). New prospects for mucosal immunization: anti-infectious and anti-inflammatory vaccines. *Res. Immunol.* 149, 29-31.
- JOELSON, T; AKERBLÖM, L; OXELFELT, P; STRANDBERG B; TOMENIUS, K; MORRIS, T (1997). Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. *J. Gen. Virol.* 78: 1213-1217.
- JOHNSON, J; LIN, T & LOMONOSSOFF (1997). Presentation of heterologous peptides on plant viruses: Genetics, Structure, and Function. *Annu. Ver. Phytopathol.* 35: 67-86.

- JOISSON, C. & VAN REGENMORTELO, M.H.V. (1991). Influence of the C terminus of the small proteins subunit of Bean Pod Mottle Virus on the antigenicity of the virus determined using monoclonal antibodies and anti-peptide antiserum. *J.Gen. Virol.* 72: 2225-2232
- KALMAR, G.B. AND EASTWELL, K.C. (1989). Reaction of coat proteins in different aggregation states with monoclonal antibodies. *J. gen. Virol.* 70, 3451-3457.
- KENNEY, J. S; HUGHES, B. W; MASADA, M. P; ALISSON, A.C. (1989). Influence of adjuvantes on the quantity, affinity, isotope and epitope specificity of murine antibodies. *Immunol. Methods* 121, 157-166.
- KENSIL, C.R. (1991). Separation and characterization of Saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina Cortex. *J. Immunol.* 146: 431-437.
- KROEMER, G., E. CUENDE, AND C. MARTINEZ-A. (1993). Compartmentalization of the peripheral immune system. *Adv. Immunol.* 53:157.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)*. 227: 680.
- LECLERC, F. A. & CHEDID, L. (1978). Influence of a synthetic adjuvant (MDP) on qualitative and quantitative changes of serum globulins. *Immunology* 35, 963-970.
- LIMA, A. A.(1978). Blackeye cowpea mosaic virus: purification partial characterization, serology and immunochemical and cytological techniques for detection of virus infected legume seeds. Gainesville, University of Florida, 154p. Tese de Doutorado.

- LIMA, J. A. A. & AMARAL, M. R. G. (1985). Purificação e sorologia de 'squash mosaic virus' isolado de melancia. *Fitopatol. Bras.* 10 : 605-611.
- LIMA, J. A. A. & NELSON, M. R. (1977). Obtenção de anti-soro específico contra "Cowpea Mosaic Virus" no Estado do Ceará. *Fitopatol. Bras.* 9: 58.
- LIMA, J. A. A. ; SILVEIRA, L. F. S; OLIVEIRA, J. P. (1989). Não Transmissibilidade de "Cowpea Severe Mosaic Virus" por sementes de *Vigna Unguiculata* cvs Pitiuba e Seridó . *Fitopatol. Bras.* 14: 50- 54.
- LIMA, J. A. A; and NELSON, M. R. (1974). Purificação e identificação sorológica de cowpea mosaic virus em *Vigna unguiculata* Endl. No Ceará. *Ciên. Agron.* 3: 5-8.
- LIMA, J.A.A.; GONÇALVES, M.F.B. & SANTOS, C.D.G. (1989). Diferenças e similaridades entre estirpes de "Cowpea Severe Mosaic Virus" isoladas no Ceará e Piauí. *Fitopatol. Bras.* 11: 115-129.
- LIMA, J.A.A.; OLIVEIRA, F.M.E.S.; KITAJIMA, E.W. & LIMA, M.G.A. (1981). Propriedades biológicas, citológicas e sorológicas de um potyvirus isolado de feijão de corda no no Ceará. *Fitopatol. Bras.* 6: 205-216.
- LIMA, J.A.A.; R.C.A. & CARVALHO, S.M.C. (1998). Serological identification of cowpea golden mosaic virus with polyclonal antiserum to a macroptilium geminivirus isolate. *Virus: Reviews and Research* 3: 143.
- LIMA, J.A.A; GONÇALVES, M.F.B. & SANTOS, C.D.G. (1986). Diferenças e similaridades entre estirpes de "Cowpea Severe Mosaic Virus" isoladas no Ceará e piauí. *Fitopatol. Bras.* 11: 115-129.
- LIMA, J.A.A; LIMA, R.C.A; FLORINDO, M.I. (1998). Production of polyclonal antisera specific to plant viruses by rabbit oral immunization. 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Phathology. (Abstracts-vol. 2).

- LIN, M.T.; HILL, J.H.; KITAJIMA, E.W. & COSTA, C.L. (1984). Two new serotypes of cowpea severe mosaic virus. *Phytopathol.* 74: 581-585.
- LIN, N.S; LEE, Y.S; LIN, B.Y; LEE, C.W; HSU, Y.H. (1996). The open reading frame of bamboo mosaic potexvirus satellite RNA is not essential for its replications and can be replaced with a bacterial gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3138-3142.
- LOMONOSSOFF, G.P. & JOHNSON, J.E (1996). Use of macromolecular assemblies as expression systems for peptides and synthetic vaccines. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6: 176-182.
- LOMOSSOFF, G.P & SHANKS, M. (1983). The nucleotide sequence of cowpea mosaic virus B RNA. *EMBO J.* 2: 2253-2258.
- LOMOSSOFF, G.P. & JOHNSON, J.E. (1995). Eukaryotic viral expression systems for polypeptides. *Sem. Virol.* 6: 257-267.
- LYCKE, N., T. TSUJI, & J. HOLMGREN. (1992). The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur. J. Immunol.* 22:2277-2281.
- MacFARLANE, S.A.; SHANKS, M.; DAVIES, J.W.; ZLOTNICK, A. & LOMONOSSOFF, G.P. (1991). Analysis of the nucleotide sequence of bean pod mottle virus middle component RNA. *Viriology* 183: 401-405.
- MAGISTRIS, M. T. (1998). Mucosal adjuvant effect of genetically modified cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin derivatives. *Res. Immunol.* 149: 33-35.
- MARÉCHAL, R., J. M. MASCHERPA, & F. STAINIER, (1978). Etude taxonomique d'un groupe d' espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna*

- (Papilionaceae) sur la base données morphologiques et polliniques, traitées pour l'analyse informatique, *Boissiera* 28: 1-273.
- MATZINGER, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Ann. Rev. Immunol.* 12:991-1045.
- MAUREEN, G. B. & FERGUSON, A. (1986). Oral tolerance to ovalbumin in mice: studies of chemically modified and 'biologically filtered' antigen. *Immunology* 57: 627-630.
- MCKENZIE, S. J. & HALSEY, J. F. (1984). Cholera toxin B subunit as a carrier protein to stimulate a mucosal immune response. *J. Immunol.* 133: 1818-1824.
- McLAIN, L; DURRANI, Z; WISNIEWSKI, LA; PORTA, C; LOMONOSSOFF, G, P; DIMMOCK, N. J. (1996). Stimulation of Neutralizing Antibodies to Human Immunodeficiency Virus type 1 in three Strains of Mice immunized with a 22 amino acid peptide of gp41 Expressed on the Surface of a Plant Virus. *Vaccine.* 14: 799-810.
- McLAIN, L; PORTA, C; LOMONOSSOFF, G.P; DURRANI, Z. & DIMMOCK, N.J (1995). Human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibodies raised to a gp41 peptide expressed on the surface of a plant virus. *AIDS Hum. Retroviruses* 11: 327-324.
- MELO, V. M. M; XAVIER-FILHO, J; SILVA-LIMA, M; & PROUVOST-DANON, A. (1994). Allergenicity and Tolerance to Proteins from Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* h. b. k ). *Food & Agricultural.* 6: 185- 195.
- MESTECKY, J.; MICHALECK, S.M.; MOLDOVEANU, Z. & RUSSEL, M.W. (1997), Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune response in humans. *Berhing Institute Metteilungen* 98: 33-43

- MICHALEK, S.M., J.H. ELDRIDGE, R. CURTISS III, & K.L. ROSENTHAL. 1994 Antigen delivery systems: new approaches to mucosal immunization. Pp. 373-380 in Handbook of Mucosal Immunology, P.L. Ogra, J.
- MODELSKA, A., DIETZCHOLD, B., SLEYSH, N, FU, Z.F., STEPLEWSKI, K., HOOPER, D.C., KOPROWSKI, H. & YUSIBOV, V. (1998). Immunization against rabies with plant-derived antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95(5): 2481-5.
- MOFFAT, A.S. (1995). Exploring transgenic plants as a new vaccine source. Science 268:558-660.
- MOSMANN, T.R., AND S. SAD. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol. Today 17:138-146.
- MOTA, I. & WONG, D. (1969). Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylacti activity of mouse antisera during the course of immunization. Life Sci. 8:813-820.
- MOWAT, A.M. (1987). The regulation of immune responses to dietary protein antigens. Immunology today, 8, 93-98.
- MUNEER. R. & AFZAL,M. (1989). Preliminary studies on improved oil-adjuvant vaccine for haemorrhagic septicaemia in buffalo calves. Ver. sci. tech. Off. Int. Epiz. 8: 999-1004.
- MUNEER. R.; AKHTAR, S. & AFZAL,M. (1994). Evaluation of three oil-adjuvant vaccines against *Pasteurella multocida* in buffalo calves. Ver. sci. tech. Off. Int. Epiz. 13: 837-843.
- MURPHY, F. A; FAUQUET, C. M; BISHOP, D. H. L; GHABRIAL, S. A; JARVIS, A. W; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A & SUMMERS, M. D.(1995). Virus taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses . Arch. Virology. Suppl. 10. Wien-New York, Springer Verlag 341p.

- NOBUYUKI, S; SAWAMURA, S.; TANAKA, K.; AIBA, Y.; CHIHARU, K.; & KOGA, Y. (1997). The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J. Immunology* 159: 1739-1745.
- O'NEAL, C.M; CRAWFOR, S.E; ESTES, M.K & CONNER, M.E.(1997). Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. *J. Virol.* 71: 8707-8717.
- OVARY, Z. (1958). Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. *Journal of immunology* 81, 355-358.
- PAYNE, L.G. (1995). Water-soluble phosphazene polymers for parenteral and mucosal vaccine delivery, in "Vaccine Design: The subunit and adjuvant approach". (Powell, M.F; Newman, M.J). (pp. 473-493). Plenum Press. New York.
- PORTA, C; LOMONOSSOFF, G.P. (1996). Use of viral replicons for the expression of genes in plants. *Mol. Biotechnol.* 5: 209-221.
- PORTA, C; SPALL, V.E; LOVELAND, J; JOHNSON, J.E; BARKER, P.J. & LOMONOSSOFF, G.P. (1994). Development of cowpea mosaic virus as a highyielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology* 202: 949-955.
- POUVOST-DANON, A., SILVA, M & JAVIERRE, M.Q. (1966). Active anaphylactic reaction in mouse peritoneal mast cell in vitro. *Life Sci.* 5: 289-297.
- PRETO, ANGELA. A; FERNANDES, MAURÍCIO, J; HAYASHI, Y; GERMANO; PEDRO, M. L & SIMAR, P (1991). Preparação da vacina anti-rábica PV/BHK em emulsão oleosa e avaliação do poder imunogênico em bovinos. *Arq. Biol. Tecnol.* 34: 609-616. 1991

- PROUVOST-DANON, A.; MOUTON, D, ABADIE,A,. MEVEL J.C & BRIOZZI (1977). Genetic regulation of IgE and agglutinating antibody synthesis in lines of mice selected for high or low immune responsiveness. *Eur. Immunol.* 7: 342-348.
- RICHMAN, L.K.; GRAEFF, A.S. & STROBER, W. (1981). Antigens presentation by macrophage enriched cells from the mouse Peyer's patch. *Cell. Immunol.* 62: 1100.
- ROCKEN, M., AND E.M. SHEVACH. (1996). Immune Deviation - The Third Dimension of Nondeletional T Cell Tolerance. *Immunol. Reviews* 149:175-194.
- ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D.K.; (1997). *Imonlogia*. 4<sup>a</sup> ed. 19p.
- ROTHNIE, H.M.; CHAPDELAIN, Y.; HOLN, T. (1994). Pararetroviruses and retroviruses: a comparative review of viral structure and gene expression strategies. *Adv. Virus Res.* 44: 1-67.
- SCHEEPERS, K; BECHT, H. (1994). Protection of mice against an influenza virus infection by oral vaccination with viral nucleoprotein incorporated into immunostimulating complexes. *Medical Microbiology* 183 ( 5 ) : 265 – 278.
- SCHOLTOF, H.B; SCHOLTOF, B.G, JACKSON, A.O (1996). Plant virus vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu. Ver. Phytopathol*, 34: 229-323.
- SHEPHERD, R.J; WAKEMAN, R.J; ROMANKO, R.R. (1968). DNA in cauliflower mosaic virus. *Virology* 36: 150-152.
- SINGH, B.B.; MOHAN Raj, DASHIELL, K.E.; JACKAI, L.E.N. eds. (1997). *Advances in Cowpea research*. Copublication of International Institute of Tropical agriculture (IITA) PP. 159-175.

- SLAOUI, M. (1998). Recent advances with new vaccine adjuvants: from preclinical to clinical development. *Res. Immunol.* 149, 15-18.
- SPANGLER, B.D. (1992) Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 56:622-647.
- SPITSIN, S; STEPLEWSKI, K; FLEYSH, N; BELANGER, H; MIKHEEVA, T; SHIVPRASAD, S; DAWSON, W; KOPROWSKI, H. & YUSIBOV, V. (1999). Expression of alfafa mosaic virus coat protein in tobacco mosaic virus (TMV) deficient in the production of its native coat protein supports long distance movement of a chimeric TMV. *Proc. Acad. Sci. USA* 96: 2549-2553.
- SPRIGGS, M.K., 1996 One Step Ahead of the Game: Viral Immunomodulatory Molecules. *Ann. Rev. Immunol.* 14:101-130.
- STAATS, H. F; NICHOLS, W.G & PALKER, T.J. (1996). Mucosal immunity to HIV-1 systemic and vaginal antibody responses after intranasal immunization with the HIV-1 C4/V3 peptide TISP10 MN (A). *J.Immunol.* 157: 462-472.
- STANLEY, J. (1993). Geminiviruses; plant viral vectors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 91-96.
- STROBEL, S. AND MOWAT, A.MCL. (1998). Immune responses to dietary antigens: Oral tolerance. *Immunol. Today*, 19, 173-181.
- TAKAMATSU, N; ISHIKAWA, M; MESHI, T. & OKADA, Y. (1987). Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco mosaic plants mediated by TMV RNA. *EMBO J.* 6: 307-311.
- TAKAMATSU, N; WATANABE, Y; YANAGY, H; MESHI, T; SHIBA, T. & OKADA, Y. (1990). Production of Enkephalin in tobacco protoplast using tobacco mosaic virus RNA vector. *FEBS Lett.* 269: 73-76.

- TOWBIN, J., STAEBELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 76, 4350-4354.
- USHA, R., ROHLL, J.B., SPALL, V.E., SHANKS, M., MAULE, A J., JOHNSON, J.E. & LOMONOSSOFF, G.P. (1993). Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology* 197, 366-374.
- VALE, C.C. & LIMA, J.A.A. (1994). Efeitos de infecção isolada e mista de vírus de grupos distintos em carpi. *Fitopatol. Bras.* 19: 193-197.
- VAN der HEIJDEN, P. J; BIANCHI, T. J; DOL, M.; PALS, J. W; STOK, W & BOKHOUT, B. A. (1991). Manipulation of Intestinal Immune Responses Against Ovalbumin by Cholera Toxin and its B Subunit in Mice . *Immunology.* 72: 89 - 93 .
- Van ROOIJEN, G.J.H. & MOLONEY, M.M. (1995) Plant seed oil bodies as carriers of foreign proteins. *Biotechnology* 13: 72-77.
- Van WEZENBEEK, P.; VERVER, J.; HARMSSEN, J.; VIS, P. & VAN KAAMMEN, A. (1983). Primary structure and gene organization of the middle component RNA of cowpea mosaic virus. *EMBO J.* 2: 941-946.
- VanCOTT, j. L. H. F. STAATS, D W PASCUAL, M. ROBERTS, S. N. CHAFFIELD, M. YAMAMOTO, M. COSTE, P. CARTER, H. KIYONO & J. R. McGhee. (1996). Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper cell subsets, macrophages, and derived cytokines following oral immunization with live recombinant *Salmonella*. *J. Immunol.* 109, 47-53.
- Walker, R.I. (1994). New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. *Vaccine* 12(5):387-400.

- WARREN, H. S; VOGEL, R.R. & CHEDID, L. A (1986). Current status of immunological adjuvants. *Ann. Ver. Immunol.* 4, 369-388.
- WEINER, H.L. (1997). Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol. Today* 18: 335.
- WEINER, H.L.; FRIEDMAN, A.; MILLER, S.J.; KHOURY, A.; AL-SABBAGH, L.; SANTOS, M.; SAYRGH, R.B.; NUSSENBLATT, D.E.; TRENTHAM, D.E.. & HAFLER, D.A. (1994). Oraltolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu. Ver. Immunol.* 12; 809.
- WILLINK, J. & Van KAMMEN , A. (1989). Cell-to-cell transport of cowpea mosaic virus requires both the 58k/48k proteins and the capsud proteins. *J. Gen. Virol.* 70: 2279-2286.
- XU, F., JONES, T.D. AND RODGERS, P. B. (1996). Potencial of chimaeric plant virus particles as novel, stable vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 87, 201-205.
- XU-AMARO, J.; KIYONO, H.; JACKSON, R.J.; STAATS, H.F.; FUJIHASHI, K.; BURROWS, P.D.; ELSON, C.O.; PILLAI, S.; McGHEE, J.R. (1993). Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J. Exp. Med.* 178: 1309-1320
- YUSIBOV, V; MODELSKA, A.; STEPLEWSKI,K.; AGADJANYAN, M.; WEINER, D.; HOOPER, D.C. & KOPROWSKI. (1998). Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies irus and HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5784-5788.