

RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS PELAS VIAS ORAL E NASAL COM *Papaya lethal yellowing virus*

(Humoral immune response of mice immunized by oral and nasal routes with *Papaya lethal yellowing virus*)

José Evando Aguiar Beserra JÚNIOR¹, Márcia Maria Mendes MARQUES¹, Maria Izabel Florindo², Maria Erivalda Farias de ARAGÃO^{2*}, Marlos Gomes MARTINS, Victor Emanuel Pessoa MARTINS & Maria da Guia Silva LIMA¹

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará; ²Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Ceará

RESUMO

O vírus *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), conhecido por sua capacidade de infectar naturalmente o mamoeiro (*Carica papaya* L.), promoveu uma resposta imune humoral em camundongos imunizados pelas vias oral e nasal. Anticorpos específicos foram detectados pelos testes de ELISA e imunodifusão dupla no soro de animais imunizados por via oral, tanto com extrato bruto de folhas infectadas, com o vírus purificado, como pela via nasal com o vírus purificado. A quantificação dos anticorpos específicos revelou predominância de síntese de imunoglobulinas G (IgG). Não foi detectada resposta imune, com síntese de anticorpos específicos contra as proteínas das folhas não-infectadas. Devido a imunogenicidade do PLYV e por não ser patogênico para animal e homem, este vírus pode ser considerado um candidato a carreador e/ou vetor de antígenos a serem usados em procedimentos de imunização de seres humanos e outros animais.

PALAVRAS-CHAVE: *Papaya lethal yellowing virus*, imunização oral, imunização nasal, *Carica papaya*

ABSTRACT

The *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), known for its capacity to naturally infect papaya (*Carica papaya* L.), promoted a humoral immune response in mice immunized via oral and nasal application. ELISA and immunodiffusion tests detected specific antibodies in sera of animals orally immunized with a crude extract of infected leaves and with purified virus, and in sera of animals immunized by nasal route with purified virus. Quantification of the specific antibodies revealed predominance of synthesis of immunoglobulins-G (IgG). Immune response was not detected, with synthesis of specific antibodies, against the proteins of the uninfected leaves. Due to the immunogenicity induced by PLYV and the fact it is not pathogenic to animal or humans, this virus can be considered a candidate as a carrier and/or vector of antigens to be used in immunization procedures.

KEY-WORDS: *Papaya lethal yellowing virus*, oral immunization, nasal immunization, *Carica papaya*

*Autor para correspondência:

Laboratório de Bioquímica Humana, Centro de Ciências da Saúde/Universidade Estadual do Ceará
Av. Paranjana, 1700
CEP 60740-000 Fortaleza – CE, Brasil
e-mail: florin@daterranet.com.br

INTRODUÇÃO

Os vírus que infectam vegetais não são capazes de infectar ou induzir efeitos patogênicos em vertebrados. Por outro lado, muitos desses vírus têm habilidades de estimular uma resposta imunológica, com conseqüente formação de anticorpos específicos contra as proteínas do capsídeo viral, quando inoculados por vias nem sempre favoráveis à imunização, como as vias oral e nasal (FLORINDO et al., 1997; BRENNAN et al., 1999).

O *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) é um vírus pertencente possivelmente à família Tombusviridae e gênero *Carmovirus* (LORETO et al., 1983), possuindo morfologia isométrica com 29-32 nm de diâmetro. Trata-se de um vírus com capsídeo constituído de uma proteína de aproximadamente 36 kDa e genoma do tipo RNA de hélice simples de $1,6 \times 10^3$ kDa (OLIVEIRA et al., 1989). A imunização por via oral é de interesse preferencial por ser a rota fisiológica de entrada dos alimentos e de microorganismos patogênicos. De acordo com MAGISTRIS (1998), essa é uma via natural e não invasiva, apresentando algumas vantagens sobre a imunização parenteral, sobretudo porque a imunização através dessa via pode induzir síntese de IgA e IgG específicas, tanto nas respostas imunológicas das mucosas como humoral, o que podem inibir a colonização de patógeno. Mas a administração de antígenos pela via oral geralmente leva à tolerância imunológica e não à síntese de anticorpos (STROBEL & MOWAT, 1998; MELO et al., 1994). A indução de uma resposta imune através dessa via geralmente é difícil, pois necessita de doses elevadas e repetidas de antígenos devido às adversidades do trato gastrointestinal, tais como acidez, presença de enzimas hidrolíticas e falta de transportadores específicos na membrana do endotélio. Uma outra forma de induzir uma imunização eficiente, evitando os problemas inerentes à via oral, é a utilização da via nasal (RUDIN et al., 1998). A imunização por via nasal requer, geralmente, 10 vezes menos imunógeno para uma efetiva imunização (BRENNAN et al., 1999). Ambas as vias, oral e nasal, apresentam vantagens de aplicação sobre a via subcutânea, atualmente a

mais utilizada em procedimentos de vacinação, uma vez que estas vias não requerem adjuvantes. O antígeno administrado pela via subcutânea não sofre a interferência do pH ácido nem das enzimas proteolíticas do trato digestivo. Entretanto, existem inconvenientes quanto ao uso dessa via, pois a mesma, geralmente, necessita de adjuvantes para induzir uma resposta imunológica eficiente (RUDIN et al., 1998). A busca de vírus que infectam vegetais que sejam capazes de estimular a síntese de anticorpos específicos quando administrados por alguma dessas vias, torna-se uma alternativa para o desenvolvimento de vacinas mais seguras. Assim, devido a imunogenicidade do PLYV e por não ser patogênico para animal e homem, este vírus pode ser considerado um candidato a carreador e/ou vetor de antígenos a serem usados em procedimentos de imunização de seres humanos e outros animais.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da resposta imunológica humoral induzida em camundongos da raça *Swiss* imunizados pelas vias oral e nasal com PLYV.

MATERIAL E MÉTODOS

O vírus PLYV foi inoculado em plantas de mamoeiro sadias, mantidas em condições naturais de temperatura, luminosidade e umidade em uma casa de vegetação, para multiplicação viral. Objetivando a produção de anti-soros específicos, o PLYV foi purificado a partir de folhas de mamoeiro mecanicamente infectadas, através do método de precipitação com polietilenoglicol (PEG) 6.000 e clarificação do extrato foliar com n-butanol como descrito por LIMA & AMARAL (1985). Para confirmação da pureza da suspensão viral, uma amostra da suspensão protéica do vírus purificado foi analisada em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com o método descrito por LAEMMLI (1979). A proteína do capsídeo do PLYV teve seu peso molecular estimado de acordo com proteínas padrão (α -lactoalbumina – 14,2KDa, inibidor de tripsina – 20,1KDa, albumina bovina – 66,0KDa e ovalbumina – 45,0KDa) utilizadas como referência (Fig. 1). A dosagem de proteína da suspensão viral purificada foi medida pelo método de BRADFORD

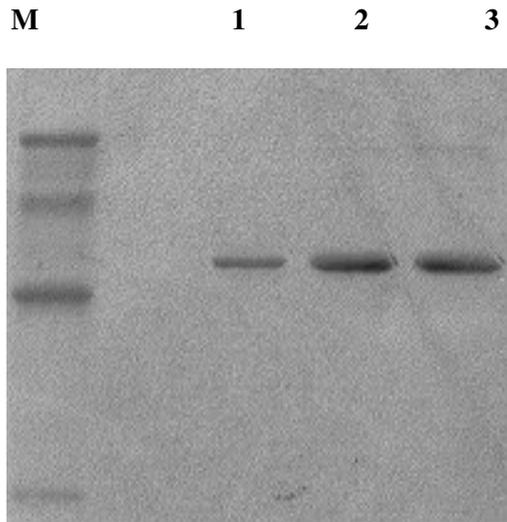


Figura 1. Eletroforese em sistema de SDS-PAGE do PLYV purificado revelando a migração de uma proteína com massa molecular estimado em 36 kDa. M - marcadores de massa molecular; colunas 1, 2 e 3 - 5 μ L, 10 μ L e 15 μ L da suspensão viral purificada, respectivamente.

(1976). A concentração de proteína do capsídeo viral foi estimada tomando como padrão uma curva obtida com albumina sérica bovina (BSA).

Dois grupos de cinco camundongos da raça Swiss (fêmeas com aproximadamente 8 semanas de idade), cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, foram oralmente imunizados com 10 doses consecutivas de: a) 10

μ g de proteína do vírus purificado; b) 3 mg de extrato foliar de mamoeiro infectado com PLYV. As doses foram administradas utilizando uma cânula de gavagem adaptada a uma seringa, em intervalos de 24 h. Um terceiro grupo foi imunizado pela via nasal com 2,5 μ g de proteína do vírus purificado em 10 doses administradas com uma pipeta automática, em intervalos de 24 horas. Reforços foram dados nos dias 21 e 35 a contar do início da imunização.

A resposta imune induzida pelo PLYV foi quantificada pela determinação de anticorpos específicos nos soros obtidos nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 a contar do início da imunização, através dos testes sorológicos ELISA (ALMEIDA, 1995) e imunodifusão dupla em ágar, como descrito por BRIOSO et al. (1994). Para ambos os testes foram usados como antígenos, o PLYV purificado, o extrato de folhas de mamoeiro infectadas pelo PLYV e o extrato de folhas de mamoeiro não-infectadas. Como anticorpos secundários foram utilizados anti-imunoglobulinas totais e anti-IgG de camundongos conjugados à peroxidase.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil eletroforético do PLYV purificado revelou a migração de uma banda protéica com massa molecular estimada em 36 kDa (Fig. 1), o que está de acordo com os resultados obtidos por OLIVEIRA et al. (1989). O PLYV, seletivamente,

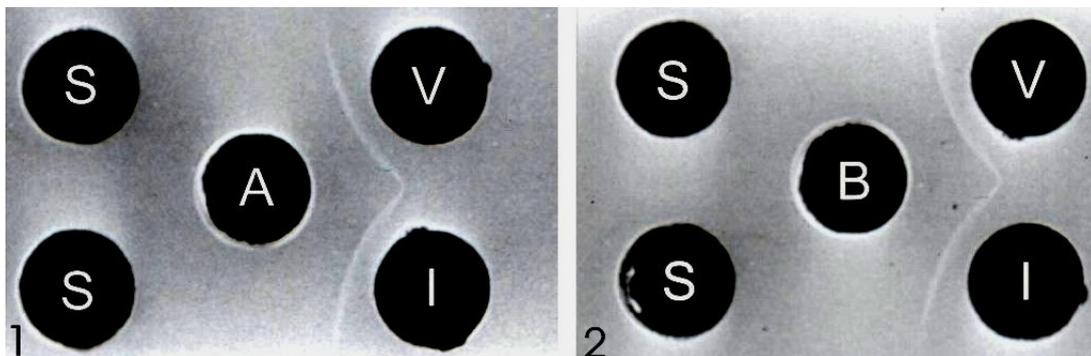


Figura 2. Teste de imunodifusão dupla revelando a especificidade dos anti-soros aos 28 dias obtidos de camundongos imunizados com 10 μ g de proteína purificada do capsídeo do PLYV. Os orifícios centrais contêm 15 μ L de anti-soros de camundongos imunizados pelas vias: oral (A) e nasal (B). Os orifícios periféricos contêm 15 μ L dos antígenos: (V)- PLYV purificado, (I)- Extrato de folhas de mamoeiro infectadas pelo vírus, (S)- Extrato de folhas de mamoeiro não-infectadas.

Figura 3. Teste de ELISA revelando a cinética da síntese de imunoglobulinas totais específicas para o PLYV em anti-soro de camundongos imunizados pela via oral com 3 mg de extrato total de folhas infectadas pelo PLYV ou com 10 µg de proteínas do capsídeo viral purificado, e pela via nasal com 2,5 µg de proteínas do capsídeo viral purificado. Como controle foi usado soro de camundongos não-imunizados. As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

induziu síntese de anticorpos séricos específicos quando inoculado tanto pela via oral, quanto pela nasal, utilizando como imunógenos o extrato total de folhas infectadas pelo PLYV ou proteínas do capsídeo viral purificado. Resultados semelhantes foram obtidos por (FLORINDO, 1999; FLORINDO et al., 2002) com o Cowpea Severe Mosaic Virus (CPSMV). Através de teste de imunodifusão dupla foi avaliada a reatividade específica dos anti-soros dos animais imunizados.

Nenhuma reação foi obtida contra o extrato foliar não-infectado (Fig. 2). A cinética da síntese de imunoglobulinas totais anti-PLYV, medidos por ELISA (Fig. 3), demonstra uma contínua elevação do título destes anticorpos, ao longo dos 42 dias, em contraste com o anti-soro pré-imune. Até 286 dias após o fim da imunização, foram detectados anticorpos específicos para o PLYV (dados não apresentados), indicando que a resposta imune é duradoura e não induz tolerância. Dentre as várias

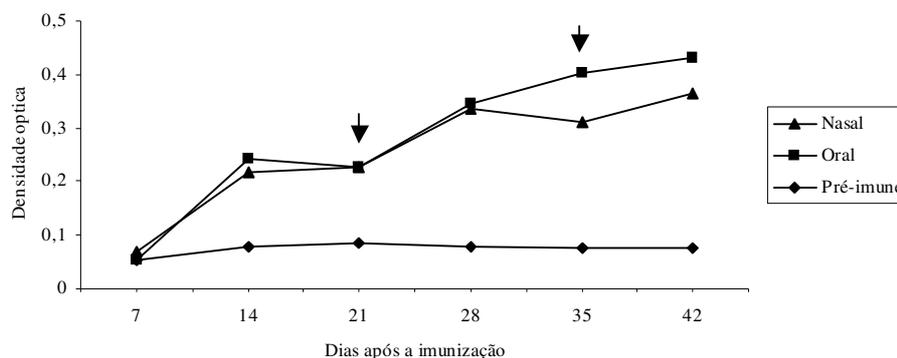


Figura 4. Teste de ELISA revelando a cinética da síntese de anticorpos IgG específicos para o PLYV em anti-soro de camundongos imunizados pelas vias oral com 10 µg e nasal com 2,5 µg de proteínas do capsídeo viral purificado. Como controle foi usado soro de camundongos não-imunizados. As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

imunoglobulinas avaliadas em teste de ELISA, a classe IgG mostrou-se predominante nas imunizações com vírus purificado pelas vias oral e nasal (Fig. 4). Embora os animais imunizados com vírus purificado pela via nasal tenham recebido doses quatro vezes menores que aqueles imunizados pela via oral, as imunizações por ambas as vias demonstraram ser eficientes na indução de síntese de anticorpos específicos para o capsídeo viral, o que está de acordo com os resultados obtidos por DURRANI et al. (1998).

Pelas características demonstradas, o PLYV apresenta potencial para ser utilizado como carreador ou vetor de antígenos a serem usados em procedimentos de imunização animal e/ou humana como sugerem LOMONOSOFF & HAMILTON (1997) e BRENNAN et al. (1999).

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.M.R. Noções de sorologia aplicadas a fitovirologia. Londrina, Embrapa-CNPSo, 105p. 1995.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- BRENNAN, F.R.; BELLABY, T.; HELLIWELL, S.M.; JONES, T.D.; KAMSTRUP, S.; DALSGAARD, K.; FLOCK, J.I.; HAMILTON, W.D. Chimeric plant virus particles administered nasally induce systemic and mucosal immune responses in mice. *Journal of Virology*, v.73, p.930-938, 1999.
- BRIOSO, P.S.T; DUQUE, F.F; SAYÃO, F.A.D; LOURO, R.P; KITAJIMA, E.W; OLIVEIRA, D.F. Vírus do Mosaico Severo do Caupi-Infecção Natural em Mungo Verde, *Vigna radiata*. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, p.420-429, 1994.
- DURRANI, Z.; MCLNERNEY, T.L.; MCLAIN, L.; JONES, T.; BELLARBY, T.; BRENNAN, F.R.; DIMMOCK, N.J. 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. *Journal Immunology Methods*, v.220, p.93-103, 1998.
- FLORINDO, M.I.; SILVA, A.C.M.; LIMA, J.A.A.; SILVA LIMA, M. Produção de anticorpos em camundongos por via oral com vírus de planta. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.335, 1997.
- FLORINDO, M.I. Resposta Imunológica Humoral em Camundongos Imunizados com o “Vírus do Mosaico Severo do Caupi (CPSMV)”. Tese da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 110p., 1999.
- FLORINDO, M.I.; ARAGÃO, M.E.F.; SILVA, A.C.M.; OTOCH, M.L.; FERNANDES DE MELO, D.; LIMA, J.A.A.; SILVA, M.G. Immune response induced in mice by oral immunization with cowpea Severe mosaic virus. *Brazilian Journal Medical Biological Research*, v.35, p.827-835, 2002.
- LAEMMLI, U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680, 1979.
- LIMA, J.A.A.; AMARAL, M.R.G. Purificação e sorologia de “squash mosaic virus” isolado de melancia. *Fitopatologia Brasileira*, v.10, p.605-611, 1985.
- LOMONOSSOFF, G.P.; HAMILTON, W.D.O. Cowpea mosaic virus-based vaccines. *Plant Biotechnology*, v.240, p.177-189, 1997.
- LORETO, T.J.G.; VITAL, A.F.; RESENDE, J.A.M. Ocorrência de um amarelo letal do mamoeiro solo no estado de Pernambuco. *O Biológico*, v.49, p.275-279, 1983.
- MAGISTRIS, M. T. Mucosal adjuvant effect of genetically modified cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin derivatives. *Research in Immunology*, v.149, p.33-35, 1998.
- MELO, V.M.M.; XAVIER-FILHO, J.; SILVA LIMA, M; PROUVOST-DANON, A. Allergenicity and tolerance to proteins from Brazil nut (*Bertholletia excelsa* h. b. k.). *Food and Agricultural Immunology*, v.6, p.185-195, 1994.
- OLIVEIRA, C.R.B.; RIBEIRO, S.G.; KITAJIMA, E.W. Purificação e propriedades químicas do vírus do amarelecimento letal do mamoeiro isolado do Rio Grande do Norte.

Fitopatologia. Brasileira, v.14, p.114, 1989.
RUDIN, A.; JOHANSSON, E.L.; BERGQUIST,
C.; HOLMGREN, J. Differential kinetics and
distribution of antibodies in serum and nasal and
vaginal secretions after nasal and oral

vaccination of humans. *Infection and Immunity*,
v.66, p.3390-3396, 1998.

STROBEL, S.; MOWAT, A.M. Immune responses
to dietary antigens: Oral tolerance. *Immunology
Today*, v.19, p.173-181, 1998.

Recebido em 20.01.2003

Aceito em 12.05.2003

