

**ESTUDO COMPARATIVO DA
RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDA
EM CAMUNDONGOS POR VÍRUS QUE
INFECTAM PLANTAS**

DESIRÉE ROLIM BEZERRA

FORTALEZA - CEARÁ

2003

**ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA INDUZIDA EM CAMUNDONGOS POR
VÍRUS QUE INFECTAM PLANTAS**

DESIRÉE ROLIM BEZERRA

**Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-
Graduação em Bioquímica, como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Bioquímica da
Universidade Federal do Ceará**

**FORTALEZA – CEARÁ
2003**

B469e

Bezerra, Desirée Rolim

Estudo comparativo da resposta imunológica induzida em camundongos por vírus que infectam plantas/ Desirée Rolim Bezerra.- Fortaleza:2003. 151f.: il.-

Orientador: Maria da Guia Silva Lima
Tese (Doutorado) em Bioquímica.

1.Vírus 2.Imunologia 3.Camundongos
I. Universidade Federal do Ceará.

C.D.D. 574.192
C.D.U.578.1

Essa tese foi submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, como parte dos requisitos parciais à obtenção do Grau em Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Desirée Rolim Bezerra

Tese aprovada em 04 de abril de 2003

Prof^a. Maria da Guia Silva Lima, Dr^a
Orientadora

Prof. José Albérico de Araújo Lima, PhD
Conselheiro (UFC)

Prof^a. Dirce Fernandes de Melo, Dr^a
Conselheira (UFC)

Prof^a. Diana Célia Souza Nunes Pinheiro, Dr^a
Conselheira (UECE)

Prof^a. Deijanira Alves de Albuquerque, Dr^a
Conselheira (UFMT)

*Aos meus pais, José Lima e Idália
Ao meu esposo, Gilvan
Aos meus filhos, Diego, Arthur e Clarissa
Às minhas irmãs, Célia e Aparecida e ao meu
cunhado, João Batista
À Socorro
Aos meus professores, Maria da Guia e Albersio*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** por me conceder saúde, força e entusiasmo para vencer todos os obstáculos;

À Prof^ª. Dr^ª MARIA DA GUIA SILVA LIMA, pela orientação deste trabalho, pela confiança depositada, sua valorosa orientação e pela estimada amizade. Por seu exemplo de coragem, determinação e senso de justiça que muito contribuíram para meu crescimento pessoal;

Ao Prof. Dr. JOSÉ ALBERSIO DE ARAÚJO LIMA, pela co-orientação, valiosas contribuições, análises e sugestões de grande importância neste trabalho, bem como, pelo apoio e amizade nos momentos mais difíceis de minha vida acadêmica;

À Prof^ª. Dr^ª DIRCE FERNANDES DE MELO pelas valiosas sugestões e constante apoio e amizade;

À Prof^ª. Dr^ª DIANA CÉLIA SOUZA NUNES PINHEIRO, pela presteza no seu atendimento e suas opiniões de grande valia nesta tese;

À Prof^ª. Dr^ª DEIJANIRA ALVES DE ALBUQUERQUE, pela honrosa presença na banca examinadora e pelas suas sugestões tão bem vindas a este trabalho;

Agradecimento especial ao Prof. Dr. ANTÔNIO AMAURY ORIÁ FERNANDES, Diretor Presidente do Instituto CENTEC, pela sua compreensão e ajuda que permitiram a elaboração desta tese;

À minha querida irmã CÉLIA BEZERRA, pelo seu amor e apoio constante nas horas mais difíceis;

Ao Prof. LUIZ WYSS REBOUÇAS CHAGAS, coordenador do CVT de Horizonte, pela sua amizade e grande incentivo;

Aos amigos, INÁCIO ALMEIDA, NEILE, JOÃO COSTA, MARIA DO CARMO, ALDIANA, SILVANA, MARIA, PIO, ALMIR e todos os demais funcionários do CVT Horizonte que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

Aos amigos, do laboratório de Virologia Vegetal, FÁTIMA, ANA CLÁUDIA, NAJARA, SHIRLEY, JOAQUIM TORRES que com seu espírito de coleguismo e habilidade técnica muito me ajudaram na preparação desta tese;

Às amigas DENIZE, LURDINHA, ANA CLÁUDIA MARINHO, ISABELA, VERÔNICA, ADRIANA e MÁRCIA pela agradável convivência diária, pelo apoio, companheirismo e grande ajuda nos trabalhos;

Ao DANIEL que como bolsista de Iniciação Científica acompanhou e ajudou na execução deste trabalho;

Aos bolsistas, estudantes de graduação e pós-graduação dos Laboratórios de Bioenergética I e II (HÉLIO, EDUARDO, ALANA, ÉRIKA, EDSON, ALESSANDRA, ALÁIDES E YURI) pela ajuda e colaboração em muitos momentos;

Agradecimento especial ao Prof. Dr CLÁUDIO CABRAL CAMPELLO e OLIVARDO FACÓ pelas análises estatísticas e pelos gráficos.

À ANGELA por sua amizade e apoio;

À Prof^a. RITA LIDUINA, coordenadora do CVT-Labomar, pelo seu apoio;

Ao Prof. TADEU ABREU DE OLIVEIRA por sua atenção e por ter aberto as portas do seu laboratório;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo sem a qual não seria possível a realização desse trabalho.

Ao Instituto Centro de Ensino Tecnológico do Estado do Ceará (CENTEC), pelo apoio e liberação, que permitiu a finalização deste trabalho.

Ao Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), pelo fornecimento de animais de laboratório para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao laboratório de Virologia Vegetal da UFC, pelo apoio e suporte na realização dos experimentos deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram possibilitando a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

Conteúdo	Página
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xix
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxii
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Vírus de Plantas	1
1.1.1 - <i>Tobacco mosaic virus</i>	4
1.1.2 - <i>Cucumber mosaic virus</i>	5
1.1.3 - <i>Squash mosaic virus</i>	7
1.1.4 - <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>	8
1.2 – Resposta Imune	10
1.3 - Utilização de Vírus de Plantas em Procedimentos de Vacinação e como Ferramentas em Estudos Imunológicos	12
2 – OBJETIVOS	20
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 – Fontes Iniciais dos Vírus	22
3.2 – Animais	22
3.3 - Purificação dos Vírus	22
3.3.1 - Purificação do TMV	22
3.3.1.1 - Obtenção dos Extratos de Plantas de <i>N. benthamiana</i> Infectada pelo TMV e Sadia Utilizadas na Alimentação dos Animais	24
3.3.2 - Purificação do SqMV	24
3.3.3 - Purificação do CMV	25
3.3.4 - Purificação do Potyvirus	26
3.4 - Caracterização das Proteínas dos Vírus	26

3.4.1 - Análise espectrofotométrica	26
3.4.1.1 - Preparação viral purificada – TMV	26
3.4.1.2 Preparação viral purificada – SqMV	27
3.4.1.3 - Preparação viral purificada – CMV	27
3.4.1.4 - Preparação viral purificada – CABMV	27
3.4.2 - Dosagem de proteínas dos vírus.....	27
3.4.3 - Eletroforese das proteínas dos vírus	28
3.4.3.1 - Preparação das amostras protéicas do TMV.....	28
3.4.3.2 - Preparação da amostra protéica do SqMV	28
3.4.3.3 - Preparação das amostras protéicas do CMV	29
3.4.3.4 - Preparação das amostras protéicas do CABMV	29
3.5 - Inoculação dos Vírus em <i>Chenopodium amaranticolor</i>	30
3.6 - Preparação do Adjuvante	30
3.7 - Imunização com os Diferentes Vírus	31
3.7.1 - Imunização com TMV	31
3.7.1.2 - Imunização por via subcutânea com as proteínas do TMV	31
3.7.1.3 - Imunização oral com o extrato total de plantas de <i>Nicotiana bentamiana</i> sadia e infectada com o TMV	31
3.7.1.4 - Imunização oral com o TMV purificado	32
3.7.1.5 - Imunização oral com o TMV purificado termo-inativado	32
3.7.1.6 - Imunização nasal com o TMV purificado	32
3.7.2 - Imunizações com SqMV, CMV e CABMV	33
3.7.2.1- Imunização oral com os vírus purificados: SqMV, CMV e CABMV	33
3.7.2.2 - Imunização oral com os vírus SqMV e CMV purificados e termo-inativados	33
3.7.2.3 - Imunização nasal com os vírus purificados: SqMV e CMV	33
3.8 – Coleta dos Soros	34
3.9 – Sorologia	34
3.9.1 - Imunodifusão em agar (OUCHTERLONY)	34
3.9.2 – ELISA	35
3.9.3 - Reações de anafilaxia cutânea passiva (PCA).....	36
3.9.3.1 - Detecção de IgE por PCA em ratos	36
3.10 - Análise Estatística	37

4 – RESULTADOS	38
4.1 - Sintomatologia Ocasionalada pelos Vírus nas Hospedeiras Específicas Usadas para Multiplicação	38
4.2 - Caracterização das preparações virais purificadas	38
4.2.1. - Análise espectrofotométrica das preparações virais purificadas	38
4.2.2 - Análise por Eletroforese em sistema SDS-PAGE dos vírus nativos e termo-inativados	44
4.2.3 - Análise da sintomatologia ocasionada pelos vírus nativos e termo-inativados	52
4.3 - Avaliação da Resposta Imunológica Humoral de Camundongos “Swiss” aos Vírus	52
4.3.1 - Avaliação por Dupla Difusão em Agar da Resposta Imunológica de Camundongos Imunizados por Diferentes Vias	52
4.3.1.1 - Imunização por via subcutânea	52
4.3.1.2 - Imunização por via oral com TMV nativo e termo-inativado	52
4.3.1.3 - Imunização por via oral com CMV nativo e termo-inativado	56
4.3.1.4 - Imunização por via oral com SqMV nativo e termo-inativado	56
4.3.1.5 - Imunização por via oral com CABMV nativo	56
4.3.2 - Avaliação da resposta imunológica a diferentes tipos de vírus, por ELISA, com diferentes tipos de sensibilização da placa e diferentes vias de sensibilização	59
4.3.2.1 - Imunizações com TMV	59
4.3.2.1.1.- Imunização por via subcutânea: com 100 µg de TMV purificado, sem adjuvante testada em placa de ELISA sensibilizada com o vírus purificado.	59
4.3.2.1.2. - Imunização por via subcutânea: com 100µg de TMV purificado, associado ao adjuvante Al(OH) ₃ , testada em placa de ELISA sensibilizada com o vírus purificado	59
4.3.2.1.3.- Imunização por via subcutânea: com 100 µg de TMV purificado, sem adjuvante testada em placa de ELISA sensibilizada com o extrato de <i>N. benthamiana</i> infetada com TMV	67
4.3.2.1.4. Imunização por via subcutânea: com 100 µg de TMV purificado associado ao adjuvante Al(OH) ₃ testada em placa de ELISA sensibilizada com o extrato de <i>N. benthamiana</i> infetada com TMV	67
4.3.2.1.5 - Imunização por via subcutânea: com 100 µg de extrato foliar infectado por TMV testada em placa de ELISA sensibilizada com	

vírus purificado	67
4.3.2.1.6 - Imunização por via subcutânea: com 100 µg de extrato foliar infectado por TMV testada em placa de ELISA sensibilizada com o extrato de <i>N. benthamiana</i> infetada com TMV	72
4.3.2.1.7 - Imunização por via subcutânea: com 100µg de extrato foliar sadio de <i>N. benthamiana</i> testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado	72
4.3.2.1.8 - Imunização por via subcutânea: com 100µg de extrato foliar sadio de <i>N. benthamiana</i> testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de <i>N. benthamiana</i> infetada com o TMV	72
4.3.2.2 - Respostas imunes ao TMV purificado (nativo e termo-inativado), ao extrato de planta infetada e ao extrato de planta sadia ministrados por via oral foram testados testada em placas de ELISA sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com extrato de plantas sadias	72
4.3.2.2.1.- Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de TMV nativo testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado	82
4.3.2.2.2 - Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de TMV nativo testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de <i>N. benthamiana</i> infetada com o TMV	82
4.3.2.2.3 - Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de TMV termo-inativado testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de <i>N. benthamiana</i> infetada com o TMV	82
4.3.2.2.4 - Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de TMV termo-inativado testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de <i>N. benthamiana</i> infetada com o TMV	82
4.3.2.2.5 - Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de extrato foliar infectado com TMV testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado	85
4.3.2.2.6 - Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de extrato foliar infectado com TMV testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de <i>N. benthamiana</i> infetada com o TMV	85
4.3.2.2.7 - Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de extrato foliar sadio de <i>N. benthamiana</i> testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado	85
4.3.2.2.8 - Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de extrato foliar sadio de <i>N. benthamiana</i> testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de <i>N. benthamiana</i> infetada com TMV	

com TMV	86
4.3.2.3 - As respostas imunes ao TMV purificado, ministrados por via nasal foram testados com placas sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com o extrato de plantas sadias	86
4.3.2.3.1 - Imunização Nasal: com 100µg (10 doses de 10 µg) de TMV testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado	86
4.3.2.3.2 - Imunização Nasal: com 100 µg de TMV testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de <i>N. benthamiana</i> infetada com o TMV	86
4.3.2.4 - Comparação das respostas imunes induzidas pelo TMV pelas vias oral e nasal	90
4.3.2.5 - Imunizações com CMV.....	90
4.3.2.5.1 - As respostas imunes ao CMV purificado (nativo e termo-inativado) ministrado por via oral foram testados com o uso das placas sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com o extrato de plantas sadias	90
4.3.2.5.1.1 - Imunização oral: com 1mg de CMV nativo (10 doses de 100 µg), testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado	90
4.3.2.5.1.2 - Imunização oral: com 1mg de CMV nativo (10 doses de 100 µg), testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato de <i>C. pepo</i> infetada com CMV	98
4.3.2.5.1.3 - Imunização oral: com 1mg de CMV termo-inativo testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado	98
4.3.2.5.1.4 - Imunização oral: com 1mg de CMV termo-inativo testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato de <i>C. pepo</i> infetada com CMV	98
4.3.2.5.2 - As respostas imunes ao CMV purificado (nativo e termo-inativado), ministrados por via nasal foram testadas com placas sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com o extrato de plantas sadias (FIGURA 44)	98
4.3.2.5.2.1 - Imunização nasal: com 100 µg de CMV testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado	98
4.3.2.5.2.2 - Imunização nasal: com 100 µg de CMV testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato de <i>C. pepo</i> infetada com CMV	101
4.3.2.5.3 - Comparação das respostas imunes induzidas pelo CMV ministrado pelas vias oral e nasal testadas em placa de ELISA sensibilizada com CMV purificado	101
4.3.2.6 - Imunizações com SqMV	101
4.3.2.6.1 - As respostas imunes ao SqMV purificado (nativo e termo-	

inativado) ministrados por via oral foram testados com placas de ELISA sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com o extrato de plantas sadias	101
4.3.2.6.1.1 - Imunização oral: com 1mg (10 doses de 100 µg) de SqMV nativo testada em placas de ELISA sensibilizada com vírus purificado	101
4.3.2.6.1.2 - Imunização oral: com 1mg de SqMV nativo testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato de <i>C melo</i> híbrido 'Hi Mark' infetada	110
4.3.2.6.1.3 - Imunização oral: com 1mg (10 doses de 100 µg) de SqMV termo-inativado, testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado	110
4.3.2.6.1.4 - Imunização oral: com 1mg (10 doses de 100 µg) de SqMV termo-inativado, testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato de <i>C melo</i> híbrido 'Hi Mark' infetada	110
4.3.2.6.2 - As respostas imunes ao SqMV purificado nativo ministrado por via nasal, foram testadas em placas de ELISA sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com o extrato de plantas sadias	114
4.3.2.6.2.1 - Imunização nasal: com 100µg de SqMV testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado	114
4.3.2.6.2.2 - Imunização nasal: com 100µg de SqMV testada em placa de ELISA placa sensibilizada com extrato de <i>C melo</i> híbrido 'Hi Mark' infetada	114
4.3.2.6.3 - Comparação das respostas imunes induzidas pelo SqMV ministrado pelas vias oral e nasal testada com placas de ELISA sensibilizadas com sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas.	114
4.3.2.7 - Imunizações com CABMV	114
4.3.2.7.1 - As respostas imunes ao CABMV purificado ministrado por via oral foram testadas com placas de ELISA sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com o extrato de plantas sadias	119
4.3.2.7.1.1 - Imunização oral: com 0,5 mg (10 doses de 50 µg) de CABMV nativo, testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado	119
4.3.2.7.1.2 - Imunização oral: com 0,5 mg (10 doses de 50 µg) de CABMV nativo testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato de <i>V. unguiculata</i> infetada	119
4.3.2.8 - Comparações das respostas imunes induzidas pelo: TMV, CMV, SqMV e CABMV pela via oral, testadas com placas de ELISA	

sensibilizadas com cada vírus purificado e com os extratos de plantas infetada por cada vírus	119
4.3.2.9 - Comparações das respostas imunes induzidas pelo: TMV, CMV, SqMV e CABMV pela via nasal, testadas com placas de ELISA sensibilizadas com cada vírus purificado e com os extratos de plantas infetada com cada vírus	124
4.3.3 - Avaliação da Resposta Imunológica IgE Específica em camundongos imunizados pela via subcutânea com TMV purificado (sem ou com adjuvante) e com extrato de <i>N. benthamiana</i> sadia ou infetada com TMV e imunizados pela via oral com os vírus purificados: TMV, CMV e SqMV	124
5 – DISCUSSÃO	127
5.1 - A Infecção Por TMV e a Caracterização das Proteínas do Capsídeo Viral	127
5.2 - Resposta Imunológica Induzida por TMV Ministrado pelas Vias: Subcutânea, Oral e Nasal	128
5.3 - Infecção por CMV e a Caracterização das Proteínas do Capsídeo Viral	132
5.4 - Resposta Imunológica Induzida por CMV Ministrado pelas Vias: Oral e Nasal	133
5.5 – A Infecção por SqMV e a Caracterização das Proteínas do Capsídeo Viral	134
5.6 - Resposta Imunológica Induzida por SqMV Ministrado pelas Vias: Oral e Nasal	135
5.7 – A Infecção por CABMV e a Caracterização das Proteínas do Capsídeo Viral	136
5.8 - Resposta Imunológica Induzida por CABMV Ministrado por Via Oral	136
5.9 - Comparação da Intensidade da Resposta Imunológica Induzida pelos Diferentes Vírus pela Via Oral	137
5.10 - Comparação da Intensidade da Resposta Imunológica Induzida pelos Diferentes Vírus pela Via Nasal	137
6 – CONCLUSÕES	140
- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142

LISTA DE FIGURAS

	página
1 A – <i>Nicotiana.benthamiana</i> infectada pelo TMV. B - <i>N.benthamiana</i> sadia	39
2 A – <i>Curcubita. pepo</i> cv caserta infectada pelo CMV. B - <i>C. pepo</i> cv caserta sadia.....	40
3 A - <i>Cucumis. melo</i> híbrido 'Hy Mark' infectada SqMV; B - <i>C. melo</i> híbrido 'Hy Mark' sadia	41
4 A - <i>Vigna .unguiculata</i> infectada pelo CABMV; B – <i>V. unguiculata</i> sadia .	42
5 Espectro de absorção ultravioleta de suspensão purificada de TMV.....	43
6 Espectro de absorção ultravioleta de suspensão purificada de CMV.....	45
7 Espectro de absorção ultravioleta de suspensão purificada de SqMV.....	46
8 Espectro de absorção ultravioleta de suspensão purificada de CABMV .	47
9 Perfil eletroforético da subunidade protéica do capsídeo do TMV, em SDS-PAGE a 17%. Linhas: 1 – Padrões de massas moleculares aparentes, linhas: 2 – TMV purificado e linhas 3 – TMV purificado termo-inativado	48
10 Perfil eletroforético da subunidade protéica do capsídeo do CMV, em SDS-PAGE a 17%. Linhas: 1 – Padrões de massas moleculares aparentes, linha 2 – CMV purificado e linha 3 – CMV termo-inativado. ...	49
11 Perfil eletroforético das subunidades protéicas dos capsídeos do SqMV, em SDS-PAGE a 17%. Linha: 1 – Padrões de massas moleculares, linha 2 – SqMV purificado e linha 3 – SqMV termo-inativado.....	50
12 Perfil eletroforético da subunidade protéica do capsídeo do CABMV, em SDS-PAGE a 17%. Linha: 1 – Padrões de massas moleculares aparentes e linha 2 – CABMV purificado	51
13 Folhas de <i>Chenopodium amaranticolor</i> . A - inoculada com TMV termo-inativado; B – inoculada com TMV purificado.....	53

- 14 Teste de imunodifusão dupla em meio de Agar demonstrando a especificidade dos antissoros obtidos de camundongos imunizados com TMV puro e com o TMV mais o adjuvante $Al(OH)_3$. Orifícios centrais: A - anticorpos específicos para o TMV obtidos de camundongos imunizados com 100 µg de proteínas do capsídeo viral sem diluição. B - anticorpos específicos para o TMV obtidos de camundongos imunizados com 100 µg de proteínas do capsídeo viral e $Al(OH)_3$ sem diluição. Orifícios periféricos: V – 5 µg de vírus purificado, N - Extrato de folhas de *N. benthamiana* infectada pelo vírus (1:2 p/v) e S - Extrato de folhas de *V. unguiculata* sadia (1:2 p/v). 54
- 15 Anticorpos específicos em soro de camundongos (28 dias após o término da imunização), detectados por teste de imunodifusão dupla em Agar sem SDS. Os orifícios centrais contêm 10 µL de soro sem diluição: (A) - soro de camundongos imunizados por via oral com TMV purificado na diluição 1:2; (B) - soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de *N. benthamiana* infectada pelo TMV na diluição 1:2 e (C) - soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de *N. benthamiana* sadia. Os orifícios periféricos contêm os antígenos: (V) – 5 µg de vírus purificado; (N) – extrato de folhas de *N. benthamiana* (1:2 p/v) infectada pelo vírus e (S) - extrato de folhas de *N. benthamiana* sadia (1:2 p/v). 55
- 16 Anticorpos específicos em soro de camundongos (35 dias após o término da imunização), detectados por teste de imunodifusão dupla em Agar sem SDS. Os orifícios centrais contêm 10 µL de soro, na diluição 1:2: (A) - soro de camundongos imunizados por via oral com CMV purificado; (B) - soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de *C. pepo* cv caserta infectada a pelo CMV e (C) - soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de sadia. Os orifícios periféricos contêm os antígenos: (V) – 5 µg de vírus purificado; (H) – extrato de folhas de *C. pepo* cv caserta (1:2 p/v) infectada pelo vírus e (S) - extrato de folhas sadias de *C. pepo* cv caserta (1:2 p/v). 57
- 17 Anticorpos específicos em soro de camundongos (28 dias após o término da imunização), detectados por teste de imunodifusão dupla em Agar sem SDS. Os orifícios centrais contêm 10 µL de soro, na diluição de 1:2: (A) - soro de camundongos imunizados por via oral com SqMV purificado; (B) - soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de *C. melo* híbrido 'Hy Mark' infectada pelo SqMV e (C) - soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de *C. melo* híbrido 'Hy Mark' sadia. Os orifícios periféricos contêm os antígenos: (V) – 5 µg de vírus purificado; (M) – extrato de folhas de *C. melo* híbrido 'Hy Mark' (1/2 p/v) infectada pelo vírus e (S) - extrato de folhas de *C. melo* híbrido 'Hy Mark' sadia (1/2 p/v). 58
- 18 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com TMV nativo com adjuvante, de acordo com o tipo de sensibilização da placa 60

19	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com TMV nativo sem adjuvante, de acordo com o tipo de sensibilização da placa	61
20	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com TMV nativo com e sem adjuvante, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado	62
21	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com TMV nativo com e sem adjuvante, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada	68
22	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com extrato de <i>Nicotiana benthamiana</i> infetada por TMV, sem adjuvante, de acordo com o tipo de sensibilização da placa	69
23	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com extrato de <i>Nicotiana benthamiana</i> sadia, sem adjuvante, de acordo com o tipo de sensibilização da placa	70
24	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com extrato de <i>Nicotiana benthamiana</i> sadia e infetada por TMV, sem adjuvante, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado	71
25	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com extrato de <i>Nicotiana benthamiana</i> sadia e infetada por TMV, sem adjuvante, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada	73
26	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com TMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa ...	74
27	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com TMV inativado de acordo com o tipo de sensibilização da placa	75
28	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com extrato de <i>Nicotiana benthamiana</i> infetada por TMV de acordo com o tipo de sensibilização da placa	76
29	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com extrato de <i>Nicotiana benthamiana</i> sadia de acordo com o tipo de sensibilização da placa	77
30	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com: TMV nativo e inativado, com extrato de <i>Nicotiana benthamiana</i> sadia e infetada por TMV, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado	83
31	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com: TMV nativo e inativado, com extrato de <i>Nicotiana</i>	

<i>benthamiana</i> sadia e infectada por TMV, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada	84
32 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com TMV de acordo com o tipo de sensibilização da placa	87
33 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com TMV, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado	89
34 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com TMV, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada	91
35 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral e nasal com TMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa	92
36 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa ..	93
37 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CMV inativado de acordo com o tipo de sensibilização da placa	94
38 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CMV nativo e inativado, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado	97
39 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CMV nativo e inativado, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada	99
40 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com CMV de acordo com o tipo de sensibilização da placa	100
41 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com CMV, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado	102
42 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com CMV, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada	104
43 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral e nasal com CMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa	105
44 Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com SqMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa.	106

45	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com SqMV inativado de acordo com o tipo de sensibilização da placa	107
46	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com SqMV nativo e inativado, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado	111
47	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com SqMV nativo e inativado, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada	112
48	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com SqMV de acordo com o tipo de sensibilização da placa	113
49	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com SqMV, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado	116
50	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com SqMV, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada	117
51	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral e nasal com SqMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa	118
52	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CABMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa	120
53	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CABMV nativo, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado	122
54	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CABMV nativo, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada	123
55	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com os vírus: TMV, CMV, SqMV e CABMV nativos de acordo com o tipo de sensibilização da placa	125
56	Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com os vírus: TMV, CMV e SqMV nativos de acordo com o tipo de sensibilização da placa	126

LISTA DE TABELAS

	página
1 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via subcutânea com TMV nativo sem adjuvante.....	63
2 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via subcutânea com TMV nativo com adjuvante.....	64
3 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via subcutânea com extrato de <i>N. benthamiana</i> infetada com o TMV.....	65
4 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via subcutânea com extrato de <i>N. benthamiana</i> sadia.....	66
5 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com TMV nativo.....	78
6 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com TMV inativado.....	79
7 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com extrato de <i>N. benthamiana</i> infetada com o TMV.....	80
8 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com extrato de <i>N. benthamiana</i> sadia.....	81
9 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via nasal com TMV nativo.....	88
10 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com CMV nativo.....	95
11 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com CMV inativado sem adjuvante.....	96
12 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via nasal com CMV nativo.....	103
13 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com SqMV nativo.....	108
14 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com SqMV inativado.....	109
15 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via nasal com SqMV nativo.....	115
16 Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com CABMV nativo.....	121

RESUMO

Alguns vírus de plantas vêm se revelando úteis para a expressão de antígenos na produção de vacinas. O presente trabalho é um estudo comparativo da capacidade imunogênica dos seguintes vírus que infectam plantas: *Tobacco mosaic virus*-TMV, *Cucumber mosaic virus*-CMV, *Squash mosaic virus*-SqMV e *Cowpea aphid-borne mosaic virus*-CABMV em camundongos imunizados pelas vias subcutânea, oral e nasal. TMV, CMV, SqMV e CABMV, após purificados foram analisados espectrofotometricamente e apresentaram curvas características dos gêneros ou das famílias às quais pertenciam. Esses vírus na forma nativa foram inoculados em *Chenopodium amaranticolor* induziram lesões necróticas locais e foram analisados eletroforeticamente, mostrando que, os capsídeos do TMV, do CMV e do CABMV apresentaram apenas uma proteína com massas moleculares aparentes de 17, 29 e 35 kDa respectivamente. Já a capa protéica do SqMV apresentou duas proteínas com massas moleculares aparentes de 21 e 43 kDa. Todos os vírus, exceto o CABMV, após inativação a 100 °C por 10 min mostraram as mesmas bandas protéicas ao serem analisados por eletroforese. Contudo, ocorreu uma perda da sua capacidade infectante, uma vez nenhum dos vírus causou lesões necróticas locais em *C. amaranticolor*. Aparentemente, as estruturas tridimensionais do capsídeo viral dos vírus de planta exercem um papel fundamental na preservação da integridade funcional dos ácidos nucléicos dos vírus que causam doenças nas plantas infectadas. A capacidade

imunogênica desses vírus foi testada em camundongos por diferentes vias. O TMV na forma nativa foi capaz de induzir resposta imune em camundongos "swiss" imunizados pelas vias subcutânea, oral e nasal. A imunização pela via subcutânea em presença de Al(OH)₃ revelou o efeito adjuvante dependendo do método de avaliação dos títulos de anticorpos específicos. O CMV e o SqMV, na forma nativa, induziram resposta imune em camundongos imunizados pelas vias oral e nasal. Todos os vírus, TMV, CMV e SqMV, perderam as capacidades infectante e imunogênica após termo-inativação. Não foi detectada resposta imune contra as proteínas do extrato de folhas de *N. benthamiana*, planta-hospedeira do TMV, a despeito de ter sido detectada resposta imune ao TMV quando foi utilizado o extrato de folhas infectadas para induzir imunização nos camundongos pelas vias subcutânea e oral. Não foi detectada síntese de IgE específica em camundongos imunizados pelas vias subcutânea e oral nem com TMV nativo nem com extrato de folhas infectadas por este vírus. Igualmente, não houve síntese de IgE específica quando os camundongos foram imunizados pelas vias oral e nasal com CMV e SqMV. Os resultados da avaliação da capacidade imunogênica do CABMV não foram conclusivos. Já o TMV, por suas características, parece ser um vírus de escolha para imunização quer pela via subcutânea, quer pela oral, quer pela nasal. O CMV mostrou tendência a induzir melhor resposta imunológica por via oral e o SqMV pela via nasal. A capacidade imunogênica dos vírus vegetais aparentemente está relacionada com a estrutura dos vírus, mas essa possibilidade necessita ainda de experiências complementares. Além disso, os vírus vegetais parecem ser dotados de propriedades especiais que os tornam candidatos a futura utilização em procedimentos de imunização/vacinação.

ABSTRACT

Some viruses of plants have been shown to be useful for the expression of antigens in the production of vaccines. The present work is a comparative study of the immunogenic capacity of the following viruses: *Tobacco mosaic virus-TMV*, *Cucumber mosaic virus-CMV*, *Squash mosaic virus-SqMV* and *Cowpea aphid-terminal mosaic virus-CABMV* in mice immunized by the subcutaneous, oral and nasal routes. After purification, TMV, CMV, SqMV and CABMV, were spectrophotometrically analyzed and they presented curves characteristics of their genera or families. These viruses in the native form, inoculated in *Chenopodium amaranticolor*, induced local necrotical lesions and by electroforetic analysis it was shown that, the capsid of TMV, CMV and CABMV just presented protein bands with apparent molecular masses of 17, 29 and 35 kDa respectively. Concerning the SqMV it presented two protein bands with apparent molecular masses of 21 and 43 kDa. All the viruses, except CABMV, after inactivation at 100 °C for 10 min, showed the same protein bands they had prior the thermo-inactivation. However, there was a loss of the infectant capacity of the virus since none of them caused local necrotic lesions in *C. amaranticolor*. Apparently, the three-dimensional structures of the viral capsid of the plant viruses play a fundamental role in the preservation of the functional integrity of the nucleic acids of the viruses that cause diseases in the infected plants. The immunogenic capacity of those viruses was tested in mice by different routes. TMV in the native form was able

to induce immune response in "swiss" mice immunized by the subcutaneous, oral and nasal routes. The immunization through the subcutaneous route, in presence of Al(OH)₃, revealed that the adjuvant effect depends on the method of evaluation of the titres of specific antibodies. CMV and SqMV, in the native form, induced immune response in mice immunized by the oral and nasal routes. All the viruses, TMV, CMV and SqMV, lost their infectant and immunogenic capacity capacities after thermo-inactivation. Immunogenic response was not detected against the proteins of the extract of leaves of *N. benthamiana*, host-plant of TMV, in spite that a immune response has been detected by TMV, when the extract of TMV infected leaves was used to induce immunization in the mice by subcutaneous and oral routes. Synthesis of specific IgE was not detected in mice immunized by subcutaneous and oral routes, nor with native TMV, nor with extract of leaves infected by this virus. Similarly, specific IgE synthesis was not detected with CMV and SqMV immunized mice by oral and nasal routes. The results of the evaluation of the immunogenic capacity of CABMV were not conclusive. TMV, by its characteristics is a preferential virus for immunization through the subcutaneous, oral and nasal routes. CMV showed a tendency to induce better immune response by oral route and SqMV by the nasal one. Apparently, the immunogenic capacity of the vegetable viruses is related to the structure of the viruses. However, further experiments are still required. Furthermore, viruses of plants seem to be endowed with special properties that turn them candidates to future use in Immunization/vaccination procedures.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Virus de Plantas

A primeira referência de sintoma de doença em plantas, que poderia ser ocasionado por vírus, está registrada em um poema composto pela imperatriz Koken da Áustria no ano de 752 (Inouye & Osaki, 1981). Na época, entretanto, os vírus de plantas ainda não eram reconhecidos como tais. Em 1776, Charles L'Ecluse descreveu uma modificação na coloração de tulipas, que séculos depois foi reconhecida como sendo ocasionada por um vírus transmitido por pulgão (Walkey, 1985).

As investigações sobre doenças ocasionadas por vírus foram realmente iniciadas em 1886 por Adolfo Mayer, que estudou uma doença do fumo (*Nicotiana tabacum* L.) na Holanda e demonstrou que seu agente causal podia ser transmitido por extrato de plantas infetadas e injetadas em plantas saudáveis. Para reforçar seu achado, ele demonstrou, que fervendo o extrato o agente infeccioso era inativado, mas acabou concluindo que o mosaico do fumo era causado por uma bactéria de reduzido tamanho ou uma enzima capaz de auto-reprodução (Mayer, 1886).

A primeira prova científica da existência de um vírus foi estabelecida somente em 1892, por Ivanowski (1892) que trabalhava com o mesmo material estudado por Mayer. Ele demonstrou que o extrato de plantas infetadas não perdia sua infetividade, mesmo após passar através de um filtro à prova de bactérias. Ele também provou que o agente causal do mosaico do fumo não podia ser cultivado em meios artificiais de cultura, nem observado ao microscópio óptico. As idéias da época estavam influenciadas pela teoria da patogenicidade, que postulava para cada doença infecciosa a existência de um microorganismo que pudesse ser observado ao microscópio óptico, cultivado artificialmente em meio de cultura e que pudesse ser retido pelos filtros contra bactérias. Ivanowski (1892) não deu o devido valor a sua grande descoberta

sobre a filtrabilidade do agente causal e acabou por admitir que o mosaico do fumo seria causado por uma bactéria muito pequena ou uma toxina produzida por bactérias (Ivanowski, 1892), o que Mayer já tinha demonstrado.

Beijerinck (1898) foi o primeiro pesquisador a opor-se à teoria bacteriana. Confirmou os resultados obtidos por Ivanowski (1892) e realizou estudos mais detalhados, demonstrando que o agente causal do mosaico do fumo podia difundir-se em meio de agar. Concluiu, também, que o agente causal da doença não poderia ser um organismo "corpúscular" e admitiu tratar-se de um *contagium vivum fluidum* (fluido vivo contagioso) o qual chamou de vírus para distingui-lo de uma bactéria (Beijerinck 1898; Milner, 1998). Após uma série de inoculações em plantas hospedeiras, Beijerinck (1898) observou que o vírus era capaz de reproduzir-se em plantas, manter-se infetivo, até mesmo em folhas secas de fumo, por dois anos, permanecer ativo no solo e ainda penetrar na planta através de ferimentos no sistema radicular, método peculiar de penetração dos vírus de planta, que tem alta estabilidade. Martinus Beijerinck é considerado o pai da virologia (Walkey, 1985).

No mesmo ano, Loeffler & Frosch (1898) mostraram que o agente causal da febre aftosa dos animais que passava de animal para animal, mesmo depois de elevada diluição do extrato, era causado por um agente similar ao agente do mosaico no fumo (Loeffler & Frosch, 1898; Gibbs & Harrison, 1976).

Uma outra importante descoberta para a Virologia Vegetal foi feita por Holmes (1929), que mostrou "reações necróticas localizadas" denominadas "reações de hipersensibilidade", em folhas de plantas inoculadas com vírus, induzidas pelas infecções virais que eram produzidas em folhas de fumo quando elas eram inoculadas com extrato de planta com *Tobacco mosaic virus* (TMV). Holmes (1929) demonstrou também que o número de lesões era proporcional à concentração do vírus no inóculo e que cada lesão podia ser usada em análise quantitativa de preparações de plantas. Este método, ainda hoje, fornece a base para testes quantitativos de muitos vírus de plantas (Walkey, 1985). Holmes (1929) constatou ainda, a existência de variações entre a susceptibilidade de folhas de uma mesma planta e que as metades opostas de uma mesma folha apresentavam graus de suscetibilidade bastante semelhantes.

Takahashi & Rawlins (1932) utilizaram a técnica da birrefringência de fluxo para mostrar que o TMV era composto de partículas longas e finas, tipo bastonetes.

Stanley (1934) observou que a infetividade do TMV era destruída por “pepsina” e admitiu que o vírus era, provavelmente, constituído de proteínas. Somente em 1935, Stanley (1935) obteve o TMV em forma de cristais, através de um processo de purificação, utilizando o sulfato de amônia para cristalizar, concluindo que o TMV era uma proteína autocatalítica, que necessitava da presença de células vivas para sua multiplicação. Embora os estudos de Stanley (1935) não tenham reconhecido os vírus como um núcleo-proteína, eles foram o marco do início da moderna virologia de plantas (Walkey, 1985). Em 1937, Bawden & Pirie (1937) relataram que o TMV consistia de 95% de proteína e 5% de ácido ribonucléico (RNA).

Outro grande passo, no que diz respeito às funções dos vírus, foi dado quando foi mostrado por Hershey & Chase (1952) e Gierer & Schramm (1956) demonstraram que o ácido nucléico estava envolvido na infectividade dos vírus.

Resultados de pesquisas posteriores confirmaram que o ácido nucléico constitui o material genético dos vírus. As preparações purificadas de ácidos nucléicos de vários vírus foram capazes de infectar e causar doenças em plantas hospedeiras, bem como de produzir novas partículas virais. Os agentes causais de algumas doenças vegetais, inclusive a “exocorte dos citrus” são constituídos unicamente de RNA. Tais patógenos são conhecidos como viróides (Hadidi *et al.*, 1998).

As características morfológicas das partículas dos vírus vegetais só puderam ser estudadas, após 1940, com o advento do microscópio eletrônico e, desde então, este sofisticado instrumento tem sido de inestimável valor para o estudo e o desenvolvimento da Virologia (Gibbs & Harrison, 1976).

Taxonomicamente os vírus são classificados dentro de famílias e gêneros dentro do reino Vírus de acordo com seu principal hospedeiro, isto é, bactéria, alga, fungo, protozoário, planta, invertebrado e vertebrado. No caso de vírus de uma família infetar vários tipos de hospedeiros é indicado o gênero

correspondente ao hospedeiro no qual ele foi primeiro identificado (van Regenmortel *et al.*, 2000).

Os vírus de plantas são vistos como uma entidade simples, com relação ao seu estado estrutural e genético, isto é, uma partícula é constituída de um único segmento de ácido nucléico (DNA ou RNA) de filamento simples ou duplo, envolvido pela capa protéica. Contudo, está comprovado que vários vírus de plantas possuem seu genoma dividido em vários segmentos, os quais se acham distribuídos em duas, três ou quatro discretas partículas, todas necessárias ao completo funcionamento do vírus em questão (Murphy *et al.*, 1995).

O presente estudo foi feito com quatro diferentes vírus de plantas, pertencentes a famílias e gêneros distintos: o vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus*-TMV) gênero *Tobamovirus*, o vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) família *Bromoviridae* e gênero *Cucumovirus*, o vírus do mosaico da abobrinha (*Squash mosaic virus*, SqMV) família *Comoviridae* e gênero *Comovirus* e um "isolado" do vírus do mosaico do caupi transmitido por pulgão (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV) família *Potyviridae* e gênero *Potyvirus*, obtido de *Sesamum orientale* L.

1.1.1 - Tobacco mosaic virus

O TMV, que já completou seu primeiro século de identificação, tem mantido sua posição de destaque, como o primeiro vírus a ter sua composição química determinada, o primeiro a ter sido visto ao microscópio eletrônico, o primeiro que as partículas infecciosas foram vistas *in vitro* e o primeiro que teve seu genoma seqüenciado. Para um patógeno com somente quatro genes, o TMV tem dado uma notável contribuição para a biotecnologia e para a Biologia Molecular (Milner, 1998).

O TMV pertence ao gênero *Tobamovirus* que até agora não está classificado em família específica (van Regenmortel *et al.*, 2000), com ampla distribuição geográfica pelo mundo, infectando naturalmente inúmeras espécies vegetais, notadamente o fumo, *Nicotiana* spp e tomateiro, *Lycopersicon esculentum* Mill. (Lima & Chagas, 1974). O primeiro registro de TMV em

plantas de fumo e tomate no Estado do Ceará foi feito por Lima & Chagas (1974). Sua transmissão dá-se, através de contato entre as plantas e algumas vezes por sementes, embora não haja relatos de infecção do embrião pelo mesmo. Os vírus são encontrados em todas as partes da planta hospedeiras. As partículas virais freqüentemente formam grandes inclusões cristalinas visíveis ao microscópio óptico. Muitas espécies do gênero *Tobamovirus* têm sido historicamente consideradas como estirpes ou linhagens do TMV. Atualmente, elas são definidas como espécies individuais, com base nas informações das seqüências de nucleotídeos (van Regenmortel *et al.*, 2000).

O TMV apresenta uma morfologia cilíndrica alongada de aproximadamente 18 nm de diâmetro e 300-310 nm de comprimento, com um único segmento de RNA de aproximadamente 6,6-6,9 kb de tamanho e com massa molecular estimada em 2.000 kDa. O capsídeo viral apresenta uma única proteína de massa molecular estimada em 17 kDa e com cerca de 2.130 cópias da mesma (van Regenmortel *et al.*, 1993). A capa protéica (CP) não é necessária para a movimentação do vírus de célula a célula, mas tem papel importante na acumulação do mesmo no feixe vascular. Há três proteínas não estruturais codificadas pelo genoma do TMV, com massas moleculares de 126-129 kDa, 183-187 kDa e 28-31 kDa, respectivamente. Essas proteínas estão envolvidas na replicação viral e são encontradas no citoplasma da célula infectada. A proteína de 28-31 kDa está relacionada com o movimento viral célula a célula (van Regenmortel *et al.*, 2000).

1.1.2 - *Cucumber mosaic virus*

O CMV é o vírus padrão do gênero *Cucumovirus* e pertence à família *Bromoviridae*. Os cucumovírus possuem morfologia poliédrica e genoma quadripartite contido em três partículas de aproximadamente 30 nm de diâmetro, com 32 capsômeros por nucleotídeos (Rybicki, 1995).

O vírus é encontrado em todas as partes da planta e as células infectadas apresentam inclusões citoplasmáticas cristalinas freqüentemente hexagonais ou aproximadamente esféricas.

O CMV contém 18% de ácido nucléico (Smith, 1986), com quatro

segmentos de RNA linear em cada estrutura (RNA-1, RNA-2, RNA-3 e RNA-4). O comprimento total do genoma é 8621 nt. O maior segmento é o do RNA-1, variando entre 3.200-3.644 nt; o segundo maior é o RNA-2, com variação de 2.600- 3.050 nt; o terceiro é o RNA-3, com 2.100-2.216 nt, e o quarto segmento é um RNA subgenômico, com 800 a 1.000 nt (Rybicki, 1995). A extremidade 3' é semelhante em todos os RNAs da espécie, possuindo 200 nt em toda a sua seqüência. As proporções de base nitrogenadas são 24% de guanina, 23% de adenina, 23% de citosina, 30% de uracil (Smith, 1986). Há um encapsidamento do RNA-3 juntamente com o subgenoma RNA-4, que é responsável pela codificação da proteína da proteína (CP). O RNA-4 é uma cópia da parte do RNA-3 que é encontrado em células infectadas. O RNA-1 e o RNA-2 são encapsidados separados, resultando num genoma dividido em três partículas diferentes (van Regenmortel *et al.*, 2000).

É freqüente a detecção de uma quinta molécula de RNA em isolados de CMV propagados por inoculação mecânica. Esse quinto RNA constitui um RNA satélite (SatRNA), incapaz de multiplicar-se na ausência dos três RNAs genômicos do CMV (RNA-1, RNA-2 e RNA-3). O SatRNA é detectado em preparações de RNA viral, como uma quinta banda de RNA com 315-405 nt, além dos três RNAs genômicos e do RNA subgenômico (RNA-4). Os SatRNAs possuem fita linear simples, mas apresentam estrutura secundária com pareamento de bases em torno de 49%. Este fato, provavelmente, é responsável pela alta estabilidade e sobrevivência dos SatRNAs (Garcia-Arenal *et al.*, 1987).

O CMV, como todos os vírus deste gênero, possui 86% de proteínas, sendo a da CP de aproximadamente 29 kDa (Brioso, 1986). As três proteínas não estruturais possuem massas moleculares diferentes, a maior com 36.30 kDa (replicase – traduzida do RNA-1), a segunda, 31.00 kDa, supostamente a polimerase traduzida do RNA-2 e a terceira com 9.90 kDa, possivelmente responsável pelo movimento das proteínas.(van Regenmortel *et al.*, 2000).

O CMV pode ser transmitido mecanicamente, por enxerto e por meio de afídeos, de forma não persistente, que retêm o vírus por menos de 4 h e não o transmitem para sua progênie. São conhecidas mais de 60 espécies de afídeos vetoras do vírus, principalmente *Aphis gossypii* Glover, *Myzus persicae*

Sulzer, *Acyrtosiphum pisum* Harris e *Aphis. Craccivora* Koch. Por outro lado, a disseminação por sementes pode ocorrer em algumas espécies de hospedeiros com taxa de transmissibilidade entre 4 e 18% (Kaper & Waterworth, 1981).

O CMV possui ampla gama de hospedeiros entre cereais, forrageiras, plantas lenhosas, herbáceas e ornamentais (Duarte *et al.*, 1992; Espinha & Gaspar, 1997). Há mais de 1000 espécies consideradas hospedeiras potenciais naturais do CMV (Palukaitis *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1995;). O sintoma mais comum é o mosaico, porém, sintomas severos podem-se manifestar em espécies hospedeiras, causando até a morte. Alguns sintomas intermediários são: lesões locais (cloróticas e necróticas), manchas cloróticas, manchas anelares, deformação foliar, mosaico e nanismo (Kaper & Waterworth, 1981). O CMV ocasiona doenças em várias espécies cultivadas (Francki *et al.*, 1979), sendo que, no Brasil, ele é conhecido por causar problemas na banana (*Musa spp.*) (Trindade *et al.*, 1998), no maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) (Colariccio *et al.*, 1987), na ervilha (*Pisum sativus* L.) (Dusi *et al.*, 1992) e em pimenta do reino (*Piper nigrum* L.) (Maciel-Zambolim *et al.*, 1990). No Ceará, foi inicialmente registrada a infecção natural do CMV em *Phaseolus lunatus* (Lima & Santos, 1985), em infecção dupla com o vírus do mosaico do caupi transmitido por pulgão (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV), apresentando sintomas de mosaico e necrose sistêmica.

1.1.3 - Squash mosaic virus

O SqMV pertence à família *Comoviridae*, gênero *Comovirus*. As partículas do SqMV, como de todos os comovírus, apresentam morfologia isométrica, com diâmetro entre 28 e 30 nm. Cada capsídeo é formado por 60 cópias de uma proteína longa ("Large", L) e uma cópia da proteína pequena ("Small", S) (Chen & Bruening, 1992; van Regenmortel *et al.*, 2000). Essas proteínas têm massas moleculares aparentes de 42 kDa e 23 kDa, respectivamente. As partículas do SqMV sedimentam-se em três componentes, T, M e B, mas seu genoma, que possui dois segmentos de RNA de fita simples, está dividido apenas em duas partículas: B (RNA-1) e M (RNA-2) pois a

partícula T é vazia (van Regenmortel *et al.*, 2000). Essas partículas têm os tamanhos de 5,8 Kb (RNA-1) e 3,6 Kb (RNA-2). Ambos RNAs genômicos do SqMV são necessários para que ocorra a infecção sistêmica na planta hospedeira. O RNA-1 codifica funções necessárias à replicação, incluindo a polimerase, enquanto o RNA-2 codifica as proteínas para o movimento do vírus, célula a célula e a longa distância (sistêmico), bem como codifica as proteínas do capsídeo (Willink & van Kamment, 1989). Os dois RNAs são traduzidos em poliproteínas que são clivadas por uma proteinase viral (codificada pelo RNA-1), resultando em várias proteínas intermediárias (van Regenmortel *et al.*, 2000).

A transmissão desse vírus na natureza, assim como de todos os vírus do mesmo gênero, dá-se exclusivamente por besouros, especialmente por membros da família *Chrysomelidae*, que são capazes de reter sua habilidade de transmissão, por dias ou semanas. Os comovírus também têm estreita gama de hospedeiro, variando de 11 a 15 espécies, restritas a poucas espécies da família *Leguminosae* (van Regenmortel *et al.*, 2000).

1.1.4 - Cowpea aphid-borne mosaic virus

O quarto vírus estudado é um isolado do vírus do mosaico do caupi transmitido por pulgão (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV) obtido de *S. orientale*, pertencente à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*. A família *Potyviridae* constitui o maior e, do ponto de vista econômico, o mais importante grupo taxonômico de vírus de plantas. Os potyvírus infetam mais de 2.000 espécies de plantas em mais de 550 gêneros de 81 famílias botânicas (Brunt *et al.*, 1996). O CABMV, como todo potyvírus, possui partícula alongada, flexuosa, com 670-760 nm de comprimento por 11-16 nm de diâmetro (Shukla *et al.*, 1994). Ele também é composto por uma única molécula de RNA de hélice simples, senso positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos envoltos por aproximadamente 2.200 cópias de uma proteína capsial, com massa molecular em torno de 34 kDa (van Regenmortel *et al.*, 2000).

Normalmente, todos os potyvírus induzem sintomas macroscópicos que podem ser observados na forma de mosqueado, mosaico, clorose,

necrose, deformações foliares e de frutos e, até infecções latentes sem sintomas. Os potyvírus invadem o hospedeiro sistemicamente, requerendo, assim, uma série de interações compatíveis entre vírus e hospedeiro (Carrington *et al.*, 1996). De acordo com a infecção sistêmica, as partículas virais podem ser encontradas dispersas no citoplasma de células infetadas, as quais apresentam modificações específicas que se manifestam na forma de estruturas microscópicas, diferentemente das células normais, conhecidas como inclusões cilíndricas (CIs) ou cata-ventos (Edwardson *et al.*, 1993). A capacidade de induzir inclusões em cata-vento é considerada pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), como uma característica intrínseca da família *Potyviridae* (Fenner, 1976)

Como todos os vírus da família *Potyviridae*, o genoma dos potyvírus possui uma única janela aberta de leitura (*Open reading frame*, ORF), que produz uma poliproteína (350 kDa). Após o processamento da poliproteína resultam oito a dez proteínas com funções biológicas diferentes em quantidades estequiometricamente idênticas. O vírus utiliza quantidades variáveis de cada proteína e aquelas produzidas em excesso são acumuladas na forma de inclusões (Carrington & Freed, 1990).

A análise da proteína da CP dos potyvírus indica a presença de três regiões distintas: uma região amino-terminal, variável em tamanho e seqüência; uma região central, altamente conservada, contendo de 215 a 227 aminoácidos e uma região carboxi terminal de 18 a 20 aminoácidos. As regiões amino- e carboxi-terminal estão voltadas para o exterior da molécula e são responsáveis pelas propriedades antigênicas da partícula viral (van Regenmortel *et al.*, 2000).

O RNA dos vírus da família *Potyviridae* possui de 5,4 a 6,4% do total da massa da partícula e possui uma proteína de origem viral ("viral protein genome – linked", VPG) ligada covalentemente à sua extremidade 5', e uma cauda poli-A na extremidade 3' (Riechmann *et al.*, 1989,1991).

Os potyvírus são transmitidos por afídeos (Homoptera: *Aphididae*), que os transmitem de maneira não-persistente, não circulativa e com especificidade pequena, ou seja, uma espécie viral pode ser transmitida por vários gêneros e espécies de afídeos e, uma determinada espécie de afídeos

pode transmitir inúmeras espécies virais. As espécies de afídeos dos gêneros: *Aphis*, *Myzus* e *Macrosiphum* destacam-se como os principais vetores, principalmente por serem polípagos (alimentam-se de um grande número de espécies vegetais), por possuírem grande mobilidade e por ocorrerem em grandes populações na natureza (Murant *et al.*, 1988). Segundo Ramos (2002), considerando as características de transmissão não-circulativa e a baixa especificidade da transmissão dos potyvírus, compreende-se a importância que têm os insetos vetores na disseminação dos vírus. Além disso, a extrema rapidez com que os afídeos adquirem os potyvírus torna ineficiente o controle químico dos insetos, para a redução do índice de incidência da doença.

Os potyvírus são também facilmente transmitidos mecanicamente, de plantas infetadas para plantas saudas, através de extratos de plantas infetadas ou extratos virais purificados.

1.2 – Resposta Imune

O sistema imune utiliza moléculas endógenas para controlar invasores e estas moléculas podem distinguir o “self” (próprio) do “non-self” (não próprio) e a intensidade da reação de defesa ocorre de maneira muito seletiva e específica (Holland & Vizi, 2002). Os órgãos linfóides primários (timo e medula óssea) e os órgãos linfóides secundários (baço, amídalas e nódulos linfóides) têm papel importante na resposta imune (Holland & Vizi, 2002).

O sistema imune compreende dois sistemas: o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo. Esses dois sistemas são de funcionamento conectado e justaposto (Nairn & Helbert, 2002). O sistema imune inato é a primeira linha de defesa, e o primeiro a retirar antígenos estranhos (ex: bactérias e vírus) do organismo (Holland & Vizi, 2002). O sistema adaptativo é usualmente solicitado pelo sistema inato e somente começa a atuar se o sistema inato falhar em controlar os invasores, ou se o organismo que está invadindo tem uma maneira de evitar a interação com o sistema inato (Nairn & Helbert, 2002).

A ação do sistema imune inato diz respeito à resistência básica, presente desde o nascimento e atua de maneira não específica através de

barreiras físico-químicas, tais como a pele, membranas mucosas, temperatura, pH, mediadores químicos como a lisozima, o interferon, o sistema complemento, entre outras moléculas (Suradhat *et al*, 2001). Além disso, tem também a barreira fagocítica conferida pelos neutrófilos, monócitos, macrófagos de tecidos, a barreira citotóxica conferida pelas células matadoras naturais (células NK) e pela barreira inflamatória (Almeida & Lima, 2001; Nairn & Helbert, 2002). O sistema imune inato tem uma capacidade limitada de distinguir um micróbio do outro, apresentando moléculas e receptores que reconhecem padrões moleculares conservados na maioria dos microorganismos (Malhotra *et al.*, 2000). Esse processo é rápido, pois é ativado da mesma maneira por um grande espectro de patógenos microbianos que agem antes da resposta imune antígeno-específica (Bogdan *et al*, 2000).

Ao contrário do sistema imune inato, o sistema imune adaptativo é caracterizado por especificidade e memória (Holland & Vizi, 2002). Esse sistema é constituído pela medula óssea, o timo, o baço e os linfonodos, os nódulos linfáticos, os linfócitos do sangue, da linfa, do tecido conjuntivo e do tecido epitelial. A organização dos tecidos linfóides otimiza o contato íntimo e estreita a faixa de interações das populações celulares que cooperam na geração das respostas imunes (Abbas, *et al.*, 2000). Esclarecimentos importantes no entendimento do sistema imune vieram com a descoberta do primeiro receptor de célula B, e mais tarde com o receptor de célula T. A identidade imunológica de um organismo e suas células é definida pela superfície das moléculas através do complexo principal de histocompatibilidade. As respostas específicas envolvem a participação de linfócitos com atuação de receptores específicos de superfície celular, como estrutura de reconhecimento de antígeno (TCR e Ig) e são classificadas em resposta imune celular, mediada por linfócitos T e resposta imune humoral, mediada por linfócitos B. Para que ocorra a estimulação do sistema imune de uma maneira mais eficaz, é necessária a participação de pelo menos três populações celulares: as células apresentadoras de antígeno (Vecchione *et al*, 2002), os linfócitos T e os linfócitos B (Almeida & Lima, 2001). Essas células estão também envolvidas na modulação da resposta imune (Holland & Vizi, 2002). Segundo Borel & Hiestand (1999), o sistema imune não está, de início,

interessado com o "self" e o "non-self", e sim com a detecção e proteção contra o perigo. Este paradigma implica que o sistema imune não faz o trabalho sozinho, mas recebe comunicações positivas e negativas de uma extensa rede de tecidos. Este conceito é o que suporta a mais promissora estratégia capaz de englobar a complexidade do procedimento da imunorregulação, especialmente com rejeição crônica e indução à tolerância. Essa estratégia é também compatível com a suposição de que não existe diferença fundamental entre supressão severa ou rejeição crônica num transplante e correção de uma resposta auto-imune, por exemplo, artrite (Borel & Hiestand, 1999).

A compartimentalização da resposta imunológica é realizada pela existência de, no mínimo, dois sistemas imunes, um sistema imune periférico e um sistema imune mucoso, que operam juntos e separados em muitas espécies (Anderson, 1999). A imunidade periférica é caracterizada pelo aparecimento de anticorpos específicos IgG no sangue depois que os antígenos são processados nos nódulos linfáticos (Anderson, 1999). A própria imunidade sistêmica pode resultar de uma combinação dos dois. Segundo Chen (2000) o sistema imune mucoso difere em vários caminhos do sistema imune sistêmico. A imunização da mucosa freqüentemente resulta na estimulação da resposta mucosa e imune sistêmica, enquanto que a imunização tipicamente sistêmica somente induz resposta sistêmica sem ativar o sistema imune mucoso. A indução da resposta mucosa leva à produção de anticorpos IgA secretores (sIgA) específicos diretamente no sítio de infecção, os quais não são usualmente produzidos pela imunização sistêmica (Chen, 2000) e esses anticorpos podem inibir o ataque e a colonização do patógeno, bem como podem neutralizar sua atividade tóxica.

1.3 - Utilização de Vírus de Plantas em Procedimentos de Vacinação e como Ferramentas em Estudos Imunológicos

Por mais de 200 anos, a vacinação tem sido a arma mais eficaz para combater as doenças infecciosas. Com o crescente número de cepas bacterianas patogênicas resistentes aos antibióticos, doenças até alguns anos atrás controladas, estão retornando de maneira muito mais infecciosa, e a necessidade por vacinação global ainda continua a maior prioridade. A

vacinação de animais domésticos para consumo humano pode reduzir bastante a administração de antibióticos, minimizando assim o risco de desenvolvimento de linhagens resistentes de bactérias patogênicas (Carter III & Langridge, 2002).

Existem, porém, limitações no emprego de vacinas, como por exemplo, o potencial risco de respostas alérgicas às proteínas animais copurificadas durante o preparo da vacina, como no caso do desenvolvimento do vírus da influenza em ovos de galinha. Além disso, muitas vacinas parenterais *contêm conservantes tóxicos* como formaldeído e fosfato de alumínio (Scheibner, 1993). Ainda mais importante, a necessidade de pessoal treinado para aplicação injetável, meio de refrigeração para conservação e o risco de injúrias associadas às vacinas parenterais, tornam as vacinas convencionais de difícil acesso a países pobres, onde as doenças infecciosas continuam ser endêmicas (Carter III & Langridge, 2002).

Atualmente, as vacinas mais utilizadas são de vírus e bactérias atenuadas, obtendo uma resposta imune duradoura, mesmo na ausência de adjuvantes. Porém, esses tipos de vacinas apresentam reverses, como dificuldade de cultura *in vitro*, a persistência como também a perda de virulência por variações genéticas desses microorganismos atenuados (Olzewska & Stewart, 2001).

Os vírus de plantas vêm sendo estudados como vetores para a expressão de antígenos na produção de vacinas, uma vez que não foram reconhecidos como patogênicos para animais e/ou humanos (Modelska *et al.*, 1998).

A natureza antigênica dos vírus de plantas foi inicialmente descoberta por Devorak (1927) que produziu anti-soros contra extrato de plantas de batata sadia e extrato de plantas de batata com sintomas típicos de mosaico. Os anti-soros foram obtidos através da inoculação de coelhos diferentes, com extrato de plantas sadias e extrato de plantas doentes. Devorak (1927) demonstrou que ambos anti-soros possuíam anticorpos comuns, mas tinham um maior título para o antígeno homólogo (antígeno igual ao usado na sensibilização do animal) do que para o heterólogo (antígeno diferente ao usado na sensibilização do animal).

Trabalhos mais detalhados para demonstrar a antigenicidade dos vírus de plantas, ou seja, a capacidade dos mesmos induzirem a formação de anticorpos quando injetados em animais foram realizados por Purdy (1929) com o TMV. Através da imunização de coelhos com o TMV, Purdy (1929) obteve anti-soros contra extrato de plantas sadias e extrato de plantas infetadas com TMV e observou que o anti-soro contra extrato de plantas infetadas com o TMV possuía anticorpos altamente específicos para os vírus, capazes, até, de neutralizar sua infetividade (Purdy, 1929; Gibbs & Harrinson, 1976).

Segundo Anderson (1999) as respostas imunológicas são influenciadas pela rota de imunização, pela natureza do antígeno e pela presença de elementos biologicamente ativos que servem para mediar o tropismo específico nos tecidos.

A maneira mais freqüente de provocar o contacto do antígeno com o sistema imunológico de um animal, é a de sensibilizá-lo através da via subcutânea, que é uma via artificial bastante usada para indução de anticorpos circulantes em procedimentos de vacinação em humanos e animais (Mäkelä, 2000; Carter III & Langridge, 2002).

Uma das vantagens do uso da via subcutânea é o fato de o antígeno por ela administrada não sofrer degradação pelo sistema digestivo, além da dose utilizada ser menor e, muitas vezes, de única aplicação. As desvantagens do seu uso, porém, são inúmeras como, por exemplo, ser capaz apenas de estimular a resposta imune sistêmica (Mestecky, 1987). Outra desvantagem do emprego desta via é o requerimento de seringas estéreis e profissionais treinados para aplicar a injeção, tornando-a onerosa financeiramente, especialmente para países em desenvolvimento (Mäkelä, 2000).

A via oral é muito adequada para administração de vacinas (Kaden & Lange, 2001), por ser a rota natural de entrada dos alimentos e de vários patógenos (Aizpurua *et al.*, 1988). Ela, ao contrário da via subcutânea, estimula tanto a resposta imune periférica quanto à sistêmica (Nugent *et al.*, 1998). Os antígenos administrados por esta via passam através do lúmen intestinal, são rapidamente internalizados e processados por células epiteliais especializadas denominadas de "células M" (devido às suas inúmeras micro-pregas na

superfície luminal) e são apresentadas às células linfóides subepiteliais das placas de Payer (células B e T) (Abbas *et al.* 2000). Após a sensibilização pelo antígeno, as células B proliferam e começam a secretar sIgA (Pereira, 2000). Essas células, eventualmente, podem deixar as placas de Peyer e migrar através da circulação sistêmica a vários sítios mucosos, incluindo o sítio de indução original (Frey & Neutra, 1997). As células T auxiliares do tipo 2 (Th2), preponderantes nos sítios mucosos, são também sensibilizadas pelo antígeno, podendo secretar inúmeras interleucinas, estimulando as células B de outros sítios mucosos e do sistema imune periférico a proliferar e secretar anticorpos conferindo, assim uma resposta imune sistêmica (Anderson, 1999). Contudo, o pH ácido e as enzimas proteolíticas do sistema digestivo, fazem com que se torne necessária uma alta concentração do imunógeno, ministrado em doses sucessivas o que pode ocasionar ainda um quadro de tolerância oral ao imunógeno (Brennan *et al.*, 1999). A imunização de animais por esta rota também se tem mostrado eficiente na produção de anti-soros policlonais específicos para vírus de planta por trata-se de uma técnica simples, rápida e barata, criando perspectivas para produção de anti-soros contra vírus de plantas, que são de difícil purificação, com alta imunogenicidade (Lima *et al.*, 2001, Florindo *et al.* 2002, Bezerra *et al.*, 2002).

Outra via de introdução do antígeno que vem sendo bastante estudada é a via intranasal, especialmente, na prevenção de doenças respiratórias, devido ao fato de requerer uma quantidade cerca de dez vezes menor de imunógeno para uma efetiva imunização do que a via oral (Brennan *et al.*, 1999). Pesquisas recentes de imunização em animais de laboratório mostram que a via intranasal tem gerado amplo interesse na comunidade científica como uma rota alternativa para administração de drogas e biomoléculas que são susceptíveis as enzimas degradativas do trato digestivo (Priyanca *et al.*, 2002). Esta rota é capaz de induzir uma resposta imune igual ou superior à da via oral (Brennan *et al.*, 1999; Durrani *et al.*, 1999) e também tem se mostrado eficiente na produção de anti-soros policlonais específicos para vírus de planta (Beserra Jr., 2001). Isto pode ser atribuído a uma elevada vascularidade e permeabilidade da mucosa nasal (Priyanca *et al.*, 2002). Esta via quando utilizada com vacinas vivas (Kanden & Lange, 2001) e vírus vetores

(Ball *et al.*, 1998) sem uso de adjuvantes, tem induzido respostas imunes de elevados títulos, induzindo proteção em sítios distantes. A interação do antígeno com a mucosa nasal e com o tecido linfóide associado a naso-faringe (NALT) dependerá de variados fatores como a natureza física (solubilidade do antígeno), a dose e a frequência de contato do antígeno (Sminia *et al.*, 1999). Antígenos pequenos e de grande solubilidade são capazes de penetrar naturalmente na mucosa nasal e esses serão englobados pelas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos). Em contraste, antígenos grandes e de pouca solubilidade são capturados pelas células M associadas ao NALT. As células precursoras de plasmócitos secretores de sIgA são originados, principalmente em estruturas linfo-epiteliais organizadas. Elas amadurecem nos linfonodos regionais e entram na circulação via ducto torácico e podem ser levadas a sítios mucosos distantes onde se diferenciarão. Como em outras partes do sistema imune das mucosas, linfócitos B antígeno-específicos e linfócitos T migram do NALT para os linfonodos e só em seguida retornam a circulação (Davis, 2001).

Devido à importância da imunização pelas vias oral e nasal, bem como, o fato da exposição do ser humano a muitos patógenos como vírus e bactérias ocorrer inicialmente através do contato com as mucosas, torna-se importante a procura de substâncias imunogênicas como é o caso dos vírus de vegetais e proteínas de bactérias desprovidas de toxicidade que possam atuar como carreadores ou adjuvantes efetivos na mucosa para a produção de vacinas (McKenzie & Halsey, 1984).

Os adjuvantes, vetores ou veículos, também podem influenciar na qualidade e quantidade de uma resposta imunológica (Springgs, 1996; Florindo, 1999; Chen, 2000; Lavelle *et al.*, 2001). Descobertas recentes feitas através de pesquisas usando vacinas de distribuição mucosa e adjuvante mucoso mostraram uma melhora da imunização em modelos animais. Novas classes de adjuvantes mucosos tais como: a toxina da cólera (CT) produzida pelo *Vibrio cholerae*, a enterotoxina termo-lábil (LT) produzida pela *Escherichia coli* e oligonucleotídeos têm-se mostrado como potentes adjuvantes mucosos, sem toxicidade detectável nos animais (Chen, 2000).

Novas estratégias de distribuição tais como a utilização de vetores

recombinantes vivos (vírus de plantas), plasmídeos de DNA e plantas transgênicas para apresentar antígenos são promessas atuais para aumentar a eficiência da distribuição de antígenos (Carter III & Langridge, 2002).

Os vírus de plantas vêm sendo muito usados como carreadores, como meio e expressão de fragmentos de proteínas patogênicas em sua superfície, originando quimeras, a fim de que essas partículas virais modificadas possam desencadear uma resposta imunológica (Modelska *et al.*, 1998). Para tanto, um gene que expressa o antígeno de interesse, é inserido no genoma do vírus vetor, o qual poderá infectar a planta uma vez que não perdendo sua capacidade infetante, ao replicar-se expressa a seqüência antigênica de interesse, no seu capsídeo viral (Lomonossoff & Johnson, 1991; Brennan *et al.*, 1999; Koo *et al.*, 1999 ; Staczek *et al.*, 2002).

A idéia de usar vírus de plantas como sistema de expressão de um gene estrangeiro não é recente, tendo surgido quando Shepherd (1968) relatou que o vírus do mosaico da couve-flor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV), pertencente a família *Caulimoviridae* e ao gênero *Caulimovirus*, continha no seu genoma DNA de fita dupla e que o DNA clonado de CaMV causava infecção quando inoculado mecanicamente em plantas. A partir de tentativas iniciais realizadas por vários pesquisadores (Gronemborn *et al.*, 1981; Brisson *et al.* (1984), outros genes pequenos foram expressos pelo CaMV, mas, em geral, surgiam problemas com o empacotamento do gene inserido ou com tipo de "repressão" estrutural não identificado que limitava o tamanho dos genes estrangeiros. Outra grande desvantagem é a dificuldade, freqüentemente, apresentada pelos vírus do gênero acima mencionado para se propagarem em plantas hospedeiras, devido só ser possível sua transmissão mecânica por enxertia ou por vetores.

Até a década de 60, não havia possibilidade do uso de vírus de RNA para expressar peptídeos antigênicos, pois os mesmos não podiam ser submetidos à tecnologia do DNA recombinante. Com a descoberta da transcriptase reversa, a transcrição reversa do RNA em cDNA completo tornou possível a inserção de RNA em plasmídeos para clonagem molecular (Scholthof *et al.*, 1996, Alberts *et al.*, 1997). Literalmente, houve uma inversão na situação e a manipulação do genoma dos vírus de vegetais de RNA tornou-

se uma rotina (Jonhson *et al.*, 1997).

O *Brome mosaic virus* (BMV), pertencente à família *Bromoviridae* e ao gênero *Bromovirus*, foi o primeiro vírus vegetal de RNA, usado para expressar um gene estrangeiro (French *et al.*, 1986). Muitos outros vírus têm sido testados, como *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) família e gênero (Joelson *et al.*, 1997) e o *Potato virus Y* (PVY) pertencente à família *Potyviridae* e ao gênero *Potyvirus* (Hinrichs *et al.*, 1997). No entanto, os vírus sobre os quais se têm mais informações sobre seu genoma e a estrutura de seu capsídeo viral, são os mais usados como sistemas apresentadores de antígenos, como é caso do TMV e do *Cowpea mosaic virus* (CPMV) pertencente à família *Comoviridae* e ao gênero *Comovirus* (van Regenmortel *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1997).

O TMV foi um dos primeiros vírus vegetais a serem utilizados como veículo de epítomos antigênicos (Turpen *et al.*, 1995; Fitchen *et al.*, 1995). Os antígenos, produzidos em plantas resultados de expressão em TMV, induzem a produção de anticorpos e até a vacinação efetiva quando injetados em camundongos (Wigdorovitz *et al.*, 1999; Koo *et al.*, 1999; Staczek *et al.*, 2002). O TMV tem sido considerado como um vírus de potencial elevado para expressar genes estranhos (Han *et al.*, 2000). Um TMV quimérico foi construído inserindo seqüências representando peptídeos, 9-14 mer (TDAYNQKLSERRAN) da proteína F da membrana de *Pseudomonas aeruginosa* entre os aminoácidos Ser 154 e Gly155 da CP do TMV. Este foi o primeiro exemplo do uso do TMV na construção de uma quimera, contendo um epítopo bacteriano (Staczek, 2002).

O TMV também tem sido usado como vetor para expressar em plantas uma completa janela de leitura, codificando uma grande proteína antigênica do vírus que causa a febre aftosa (Wigdorovitz *et al.*, 1999).

Pelas mencionadas razões, os vírus que infectam plantas, através de seus capsídeos virais revelam-se atraentes candidatos para sistema de apresentação de epítomos antigênicos em procedimentos de vacinação, devido à sua rápida propagação e em grande quantidade nas plantas hospedeiras (uma a duas semanas), de protocolo de purificação bem conhecido e fácil com a obtenção de altos rendimentos das partículas virais (1 a 3 g/kg de tecido foliar). Muitos vírus são termoestáveis, sendo assim, as vacinas produzidas a

partir desses vírus não precisariam ser estocadas sob refrigeração (Scholtof *et al.*, 1996). Podem ainda ser livres de contaminantes patogênicos e livres de conservantes (Carter III & Langridge, 2002).

2 - OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVOS GERAIS

Estudar comparativamente a resposta imune humoral sistêmica induzida em camundongos utilizando-se vírus de plantas: TMV, CMV, SqMV e CABMV, tendo em vista a possibilidade de usá-los como sistemas de expressão de antígenos na produção de vacinas.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar bioquimicamente as suspensões virais de TMV, CMV, SqMV e CABMV obtidos de plantas infectadas.
- Quantificar anticorpos séricos específicos de camundongos imunizados pelo TMV purificado por via nasal, oral (nativo e termo-inativado) e subcutânea (associado ou não ao adjuvante).
- Quantificar anticorpos séricos específicos de camundongos imunizados com o extrato de folhas de *N.benthamiana* sadia e infetada pelo TMV por via subcutânea.
- Determinar a cinética de anticorpos séricos específicos de camundongos imunizados pelo CMV purificado por via oral (nativo e termo-inativado) e por via nasal com determinação da cinética de síntese de anticorpos específicos.
- Determinar a cinética de síntese de anticorpos específicos de camundongos imunizados pelo SqMV purificado por via oral (nativo e termo-inativado) e por via nasal.
- Quantificar a cinética de síntese de anticorpos específicos de camundongos imunizados pelo CABMV purificado por via oral (nativo) através da quantificação de anticorpos séricos específicos.
- Quantificar por anafilaxia cutânea passiva (PCA) a produção de IgE específica em camundongos imunizados com os diferentes vírus que

infectam vegetais

- Comparar os vírus e as vias de imunização, tendo em vista a possibilidade de usa-los como sistema de expressão de antígenos em protocolos de vacinação/imunização.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Fontes Iniciais dos Vírus

Todos os vírus (TMV, CMV, SqMV e CABMV) foram obtidos do Banco ativo de vírus do Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal do Ceará, onde vêm sendo mantidos em casa de vegetação, *in vivo*, em suas respectivas hospedeiras, (TMV - *Nicotiana. Benthamiana* Domin, CMV - *Curcubita .pepo* L. cv caserta, SqMV - *Cucumis. Melo* L. híbrido 'Hy Mark' e CABMV - *Vigna unguiculata* (L) Walp.) através de inoculações periódicas e/ou congelados em folhas de plantas hospedeiras à - 80 °C em freezer.

3.2 - Animais

Foram utilizados ratos albinos (*Ratus norvegicus*) da linhagem "Wistar", machos, de 300 a 400 g e fêmeas de camundongos "Swiss", com idade entre seis e dez semanas de 25g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. As colônias dos animais mencionados tiveram início com animais fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (Campinas SP). Foram utilizados e mantidos em condições adequadas de luz e temperatura, com ração e água à vontade.

3.3 - Purificação dos Vírus

3.3.1 - Purificação do TMV

Para o procedimento de purificação do TMV, aplicou-se a técnica de Gooding & Herbet (1967), modificada por Lima & Chagas (1974), com pequenas adaptações.

Sementes de *N benthamiana*, cedidas pelo Laboratório de Virologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Ceará, foram semeadas em vasos em casa de vegetação e seis semanas após o plantio, o vírus foi inoculado, em razão das plantas de *N. benthamiana* infectadas pelo TMV apresentarem bons sintomas sistêmicos em apenas quatro a cinco dias após inoculação. Os sintomas eram caracterizados por mosaico severo, necroses e murcha, indicando ótimo nível de concentração viral, que após três ou quatro dias leva a morte da planta. Objetivando sua purificação, o tecido foliar de cerca de 50 plantas com aproximadamente 30 cm de altura e com folhas sistemicamente infectadas foi coletado quatro dias após a inoculação e utilizado na purificação, segundo a técnica de Gooding & Hebert (1967), com algumas modificações. O material foliar foi homogeneizado em liquidificador com solução tamponada de fosfato 0,1 M, pH 7,0, contendo 1% de sulfito de sódio na proporção de 100 g de folhas para 200 mL da solução descrita. Filtrou-se o extrato através de gaze dupla e em cada 100 mL de suco obtido foram adicionados 8 mL de n-butanol. Previamente agitada durante 60 min, a mistura foi submetida a uma centrifugação de 10.000 g, durante 10 min, em centrífuga SORVAL, ROTOR GSA, para precipitar o coágulo esverdeado que se formou. Descartou-se o precipitado, enquanto 6% de polietileno glicol (peso molecular de 6.000 Da) e NaCl 0,1 M foram adicionados ao sobrenadante que após agitado por 60min, foi centrifugado à velocidade de 10.000 g, durante 15 min (ROTOR SS-34). Em seguida à centrifugação, procedeu-se o descarte da parte líquida e o precipitado, contendo o vírus, foi ressuspenso em, aproximadamente, 2/5 do volume inicial, com solução tampão de fosfato, 0,1 M pH 7,0. Depois de clarificada por centrifugação de 10.000 g, durante 10 min, a suspensão de TMV foi submetida a mais duas precipitações com polietileno glicol e NaCl, usando-se 6% de PEG e NaCl 0,1 M. A cada processo de precipitação seguiu-se uma clarificação à 10.000 g durante 10 min.

A suspensão final, encerrando o vírus, foi examinada no espectrofotômetro onde foi calculada sua concentração na suspensão.

A suspensão obtida foi dividida em alíquotas de 1 mL, acondicionadas e mantidas à temperatura de -4°C , até o momento de serem usadas.

3.3.1.1 - Obtenção dos Extratos de Plantas de *N. benthamiana* Infectada pelo TMV e Sadia Utilizadas na Alimentação dos Animais

O extrato total de plantas infectadas (EPI) por TMV utilizado na imunização dos camundongos foi obtido a partir de folhas de *N. benthamiana*. As plantas de aproximadamente 30 cm de altura foram mecanicamente inoculadas com o TMV e colhidas quatro a cinco 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 °C até a utilização. De forma semelhante, foi preparado extrato de planta sadia (EPS) para uso em imunização.

3.3.2 - Purificação do SqMV

O vírus do SqMV foi purificado de acordo com o método descrito por Lima & Amaral (1985) com algumas modificações.

As plantas de *C melo* híbrido 'Hy Mark' foram mecanicamente inoculadas com SqMV, dez dias após o plantio, em vasos mantidos em casa de vegetação. Para a purificação, o tecido foliar foi coletado 15 dias após a inoculação do vírus e macerado em liquidificador comum, na presença de tampão fosfato de potássio 0,5 M, pH 7,5, contendo 0,5% do anti-oxidante sulfito de sódio (NaSO₃), 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 3h a temperatura de 4 °C, sob leve agitação. Em seguida a mistura foi submetida a uma centrifugação de 10.000g durante 10min. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante adicionou-se 8% de PEG.(pm 6.000) e NaCl 0,1 M com o objetivo de precipitar o vírus. Essa mistura foi levemente agitada por 60min à 4°C, em seguida foi centrifugada à 14.000 durante 12 min em Rotor GSA. O precipitado foi suspenso em 25mL de tampão fosfato 0,05 M pH 7,5, agitado por 40 min e submetido a uma nova centrifugação à 10.000g por 10min. 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 ultracentrifugação de 120.000 g por 90 min.

O precipitado final, contendo o vírus, foi ressuspendido em 3 mL de tampão Tris -HCl 0,02 M pH 8,2. A suspensão final, encerrando o vírus, foi examinada no espectrofotômetro onde foi calculada sua concentração na suspensão.

A suspensão obtida foi dividida em alíquotas de 1 mL, acondicionadas e mantidas à temperatura de -4 °C, até o momento de ser utilizada.

3.3.3 - Purificação do CMV

O vírus foi multiplicado em *C. pepo* 'Caserta' para posterior purificação. As folhas das plantas de 'Caserta', oito dias após o plantio, foram inoculadas com o isolado de CMV. Quinze dias após a inoculação as folhas, sistemicamente infectadas, foram coletadas para a purificação do vírus. O vírus foi extraído em tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 7,5 contendo 1 mM de EDTA e 0,1% de Na₂SO₃ na proporção de 1 g de tecido foliar para 1 mL tampão. O extrato foliar foi clarificado com clorofórmio na proporção de 1:1, seguido de centrifugação de 12.000 g por 10 min. O vírus foi precipitado com 8% de PEG (p/v) e ressuspendido em tampão de borato de sódio 5 mM com EDTA, contendo 2% de triton X-100. Após uma clarificação de 18.000 g por 15 min, o vírus foi precipitado por ultracentrifugação à 130.000 g durante 1h e 40 min. Uma purificação adicional foi efetuada mediante centrifugação em gradiente de densidade em equilíbrio de Cs₂SO₄.

A suspensão final, encerrando o vírus, foi examinada no espectrofotômetro para o cálculo da concentração viral na suspensão.

A suspensão obtida foi dividida em alíquotas de 1mL, acondicionadas e mantidas à temperatura de -4 °C, até o momento de ser usado.

3.3.4 - Purificação do Potyvirus

Para o processo de purificação, utilizou-se basicamente, o método adotado por Purcifull & Hiebert (1979) com algumas modificações. As centrifugações utilizadas nos processos de purificação utilizadas nos processos de purificação foram realizadas na centrífuga Sorval RC-5B e na centrífuga Beckman L7-55, respectivamente.

A etapa inicial consistiu da maceração das folhas em liquidificador comum, na presença de tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 7,5, acrescido de 0,5% de NaSO₃, na proporção de 1,0 g de tecido foliar infectado para 2,0 mL de tampão. Depois de filtrado em gaze dupla, o extrato foi clarificado e homogeneizado com 8% de n-butanol, através de agitação lenta e constante por 5 h e centrifugado à 6.000 g durante 10 min. Ao sobrenadante recolhido, adicionou-se 8% de PEG, 3% de triton X-100 e NaCl 0,1M, sendo a mistura submetida a agitação lenta durante 60 min. Em seguida, o vírus foi precipitado através de uma centrifugação de 12.000 g por 10 min e ressuspendido em tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 8,2 e, em seguida, submetido a uma ultracentrifugação de 80.000g por 2horas e 40min em colchão de sacarose a 30%.

3.4 - Caracterização das Proteínas dos Vírus

3.4.1 - Análise espectrofotométrica

3.4.1.1 - Preparação viral purificada - TMV

A suspensão final, encerrando o vírus, foi diluída na proporção de 1:10 em tampão Tris 0,02 M, pH 8,2 e analisada em um espectrofotômetro VARIANT DMS-70, na faixa de comprimento de onda de 240 a 310 nm. Sua concentração foi calculada na suspensão, por meio da densidade ótica, obtida no comprimento de onda 260 nm e coeficiente de extinção igual a 3,0 o qual é utilizado para média das partículas virais do gênero dos *Tobamovirus* (Lima & Chagas, 1974).

3.4.1.2 Preparação viral purificada - SqMV

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 como média para as partículas virais do gênero dos *Comovirus* (Bruening, 1978).

3.4.1.3 - Preparação viral purificada - CMV

A suspensão contendo o vírus 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, utilizando-se a faixa de comprimento de onda de 220 a 340 nm Sua concentração foi calculada usando-se um coeficiente de extinção a 260 nm igual a 5,0, o qual é utilizado como média para as partículas virais do gênero dos cucumovirus (Francki *et al.*, 1979).

3.4.1.4 - Preparação viral purificada - CABMV

A suspensão contendo o vírus foi diluída na proporção de 1:10 em tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,2 e analisada em um espectrofotômetro VARIANT DMS - 70, utilizando-se a faixa de comprimento de onda de 220 a 340 nm Sua concentração foi calculada usando-se um coeficiente de extinção a 260 nm igual a 2,8 obtido para o PVY determinado por Stace-Smith & Tremaine (1980).

3.4.2 - Dosagem de proteínas dos vírus

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

3.4.3-Eletroforese das proteínas dos vírus

A proteína do capsídeo de todos os vírus em estudo foi analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970), adaptado para uso de placas de vidro (10x7,2mm). 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 μ L de SDS 10% (p/v), 5 μ L de Tetramethilenodiamine-(Temed) e 25 μ L de persulfato de amônio 10% (p/v). O gel de separação a 17,5% foi composto de 1,45 mL de água destilada, 2,5 mL tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 100 μ L de SDS 10% (p/v), 5,83 mL de bis-acrilamida (30%), 8,5 μ L de (Temed) e 85 μ L de persulfato de amônio a 10%.

3.4.3.1 - Preparação das amostras protéicas do TMV

As amostras protéicas foram preparadas a partir de 0,6 e 0,3 μ L de uma suspensão (1,74 mg/mL) de vírus adicionadas em tubos "eppendorf" contendo 11,4 e 11,7 μ L de tampão da amostra Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; SDS 10% (p/v); glicerol 20% (v/v); β -mercaptoetanol 4% (v/v) e Azul de Bromofenol 2% (p/v) seguindo-se aquecimento a 100 °C durante 2 min.

Alíquotas de 12 μ L dessas amostras, correspondendo a 1,0 e 0,5 μ g de proteína de capsídeo viral foram aplicadas aos géis de poliacrilamida.

3.4.3.2 - Preparação da amostra protéica do SqMV

A amostra protéica foi preparada a partir de 0,3 μ L de uma suspensão (4,0 mg/mL) de vírus adicionadas em tubo "eppendorf" contendo 11,7 μ L de tampão da amostra Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; SDS 10% (p/v); glicerol 20% (v/v); β -mercaptoetanol 4% (v/v) e Azul de Bromofenol 2% (p/v) seguindo aquecimento a 100 °C durante 2 min. Alíquotas de 12 μ L dessa amostra, correspondendo a 1,2 μ g de proteína de capsídeo viral foram aplicadas aos géis de poliacrilamida.

3.4.3.3 - Preparação das amostras protéicas do CMV

As amostras protéicas foram preparadas a partir de 0,6 e 0,3 μL de uma suspensão (3,44 mg/mL) de vírus adicionadas em tubo "eppendorf" contendo 11,4 e 11,7 μL de tampão da amostra Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; SDS 10% (p/v); glicerol 20% (v/v); β -mercaptoetanol 4% (v/v) e Azul de Bromofenol 2% (p/v) seguindo-se aquecimento à 100 °C durante 2 min.

Alíquotas de 12 μL dessas amostras, correspondendo a 2 e 1 μg de proteína de capsídeo viral foram aplicadas aos géis de poliacrilamida.

3.4.3.4 - Preparação das amostras protéicas do CABMV

As amostras protéicas foram preparadas a partir de 0,6 μL de uma suspensão (0,918 mg/mL) de vírus adicionadas em tubo "eppendorf" contendo 11,4 μL de tampão da amostra Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; SDS 10% (p/v); glicerol 20% (v/v); β -mercaptoetanol 4% (v/v) e Azul de Bromofenol 2% (p/v) seguindo-se aquecimento à 100 °C durante 2 min.

Alíquotas de 12 μL dessas amostras, correspondendo a 0,4 μg de proteína de capsídeo viral foram aplicadas aos géis de poliacrilamida.

Todas as eletroforeses transcorreram à temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C em tampão Tris-glicina pH 8,0 (glicina 250 mM; Tris-base 25mM; SDS 0,1%(p/v)), a 150 volts e 40 mA (constante), até que o azul de bromofenol saísse do gel separador. Foi utilizada uma fonte regulável de corrente contínua, BIO RAD. Para visualização das bandas, o gel foi corado, por imersão, em uma solução contendo 0,25% de "Comassie Brilhante Blue R-250" (SIGMA), 40% de metanol, 10% de ácido acético e água destilada durante 15 min. O descoramento do gel foi realizado com solução contendo 7% de ácido acético, 30% de metanol e água destilada.

Como padrão de massa molecular foram utilizados: albumina sérica bovina (BSA) com 66 kDa, ovalbumina 45 kDa, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 36 kDa, anidrase carbonica 29 kDa, tripsinogênio 24 kDa,

inibidor de tripsina 20,1 kDa e α -Lactalbumina 14,2 kDa.

3.5 - Inoculação dos Vírus em *Chenopodium amaranticolor*

Todos os vírus (TMV, CMV, SqMV e CABMV), depois de purificados, foram inoculados separadamente em plantas de *C. amaranticolor* (hospedeira de lesão necrótica local), para serem testados quanto a sua capacidade de causar infecção. A inoculação também foi feita em folhas de *C. amaranticolor* quando os vírus foram termo-inativados, por 10 min a 100 °C, para verificação da capacidade infectante dos mesmos.

3.6 - Preparação do Adjuvante

Foi utilizado o gel de Hidróxido de alumínio, $Al(OH)_3$, devido o seu forte poder de adsorção de proteínas e por representar o melhor adjuvante para uma resposta imunológica do tipo IgE (Prouvoust - Danon *et al.*, 1966). O gel foi preparado, adicionando-se 15 g de sulfato de amônio e alumínio ($AlNH_4(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$) em 180 mL de H_2O 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 $Al(OH)_3$. O precipitado foi suspenso em 200 mL de água destilada e, em seguida, centrifugado à 2000 g durante 20 min. Essa operação foi repetida por cinco vezes. Após a última centrifugação o precipitado foi ressuspenso em 15 mL de água destilada a fim de obter um gel espesso, porém pipetável, tendo-se o cuidado de fazer uma boa homogeneização para evitar a formação de grumos.

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

O gel foi ajustado para uma concentração de 1 mg/mL com NaCl 0,15 M e adicionadas as doses do vírus (TMV). Cada animal recebeu uma dose de 200 μ L da mistura contendo 200 μ g de adjuvante $Al(OH)_3$ e 100 μ g do vírus.

3.7 - Imunização com os Diferentes Vírus

3.7.1 - Imunização com TMV

O TMV foi utilizado para induzir resposta imune em camundongos através de 3 diferentes vias.

3.7.1.2 - Imunização por via subcutânea com as proteínas do TMV

Dois grupos de cinco camundongos "Swiss" (fêmeas) com sete a oito semanas de idade foram imunizados por via subcutânea, na região dorsal, com dose de 100 µg de proteína dos capsídeos do vírus, tendo como adjuvante o gel de hidróxido de alumínio $Al(OH)_3$ na concentração de 1 mg/mL, como descrito anteriormente. Os animais receberam reforços com 21 e 35 dias após o início da imunização. Todos os animais foram sangrados com 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após o início da imunização.

3.7.1.3 - Imunização oral com o extrato total de plantas de *Nicotiana bentamiana* sadia e infectada com o TMV

Grupos cinco camundongos "Swiss" foram imunizados por via oral, com doses dos extratos como descrito anteriormente, com o auxílio de uma sonda. Cada animal recebeu diariamente, uma dose de 0,2 mL do extrato contendo 100 µg de proteínas durante dez dias consecutivos. Os animais não receberam reforços. As amostras de sangue foram coletadas com pipeta Pasteur no plexo retro-orbital dos camundongos, com 7, 14, 28, 35 e 42 dias após o término da imunização.

Outro grupo de cinco camundongos "Swiss" (fêmeas com dois meses de idade) também foi imunizado por via oral através de uma sonda com extrato de planta sadia. Os animais receberam 0,2 mL do extrato contendo 100 µg de proteínas durante dez dias consecutivos. 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 infectada.

3.7.1.4 - Imunização oral com o TMV purificado

Camundongos "Swiss" (grupos de cinco fêmeas com dois meses de idade) foram imunizados pela via oral com dez doses de 200 µl de uma suspensão de vírus purificado, contendo 100 µg de proteínas do capsídeo viral, com o auxílio de uma sonda. As doses foram ministradas durante dez dias consecutivos. Não foi dado nenhum reforço. Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital, para obtenção dos anti-soros, com 7, 14, 21, 35 e 42 dias após o término da alimentação.

3.7.1.5 - Imunização oral com o TMV purificado termo-inativado

Camundongos "Swiss" (grupos de cinco fêmeas com dois meses de idade) foram imunizados pela via oral com dez doses de 200 µl de uma suspensão de vírus purificado, contendo 100 µg de proteínas do capsídeo viral. A suspensão viral foi previamente submetida à temperatura de 100°C por 10min para desnaturação e as alíquotas contendo 100 µg de proteínas do capsídeo viral foram administradas aos animais com o auxílio de uma sonda. As doses foram ministradas durante dez dias consecutivos. Não foi dado nenhum reforço. Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital, para obtenção dos anti-soros, com 7, 14, 21, 35 e 42 dias após o término da alimentação.

3.7.1.6 - Imunização nasal com o TMV purificado

Um grupo de cinco camundongos "Swiss" foi imunizado pela via nasal com o auxílio de uma seringa de Hamilton. Cada animal recebeu, durante 10 dias consecutivos, uma dose de 2,5 µL de uma suspensão de vírus purificado, contendo 10 µg de proteínas do capsídeo viral. Os animais foram sangrados nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42, a contar do início da imunização. Os animais não receberam doses de reforço.

3.7.2 - Imunizações com SqMV, CMV e CABMV

3.7.2.1 - Imunização oral com os vírus purificados: SqMV, CMV e CABMV

Três grupos de camundongos "Swiss", contendo cada grupo cinco fêmeas com dois meses de idade, foram imunizados pela via oral com dez doses de 200 µl de cada suspensão de vírus purificado (CMV, SqMV e CABMV), contendo 50µg (CABMV) e 100 µg (CMV e SqMV) de proteínas do capsídeo viral, com o auxílio de uma sonda. Cada grupo de cinco animais recebeu apenas um tipo de vírus. As doses foram ministradas durante dez dias consecutivos. Não foi dado nenhum reforço. Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital, para obtenção dos anti-soros, com 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após o término da alimentação.

3.7.2.2 - Imunização oral com os vírus SqMV e CMV purificados e termo-inativados

Camundongos "Swiss" (dois grupos de cinco fêmeas com dois meses de idade) foram imunizados pela via oral com dez doses de 200 µl de uma suspensão de vírus purificado (SqMV -grupo1 e CMV-grupo2), contendo 100 µg de proteínas do capsídeo viral em cada dose. A suspensão viral foi previamente submetida à temperatura de 100 °C por 10 min para desnaturação e as alíquotas contendo 100 µg de proteínas do capsídeo viral foram administradas aos animais com o auxílio de uma sonda. As doses foram ministradas durante dez dias consecutivos. Não foi dado nenhum reforço. Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital, para obtenção dos anti-soros, com 7, 14, 21, 35 e 42 dias após o término da alimentação.

3.7.2.3 - Imunização nasal com os vírus purificados: SqMV e CMV

Dois grupos de cinco camundongos swiss foram imunizados com os vírus SqMV e CMV pela via nasal, com o auxílio de uma seringa de Hamilton. Cada grupo recebeu, durante 10 dias consecutivos, uma dose de 2,5 µL de uma suspensão de vírus purificado, contendo 10 µg de proteínas do capsídeo

viral de apenas um dos dois vírus. Os animais foram sangrados nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias, a contar do início da imunização.

3.8 - Coleta dos Soros

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. A seguir, o soro foi recolhido e centrifugado a 3.000 g por 10 min para que ficasse livre de elementos figurados do sangue. Os soros obtidos foram armazenados a - 20 °C. Este procedimento foi adotado para todos os experimentos.

3.9 - Sorologia

3.9.1 - Imunodifusão em agar (OUCHTERLONY)

Os anticorpos obtidos das diferentes imunizações com os vírus TMV, SqMV, CMV e CABMV foram testados em testes sorológicos de dupla difusão em Agar (Ouchterlony, 1962). Os anti-soros obtidos das imunizações com TMV e SqMV foram testados em meio constituído por 0,85% de agar noble, 0,85% de cloreto de sódio (NaCl) e 0,05% de azida de sódio (NaN₃) (Almeida & Lima, 2001). Os anti-soros obtidos das imunizações com CMV e CABMV foram testados em meio constituído por 0,8% de agar noble, 1,0% de azida de sódio (NaN₃) e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS), seguindo a metodologia descrita por Purcifull & Bathcherlor (1977) e Almeida & Lima (2001).

Para a realização dos testes de dupla difusão em Agar, foram abertos orifícios em arranjo de forma hexagonal, constituído de um orifício central e seis periféricos em meio de Agar contido em placas de Petri, de modo que, nos orifícios externos fossem colocados: o extrato de planta infectada da espécie vegetal na qual o respectivo vírus foi purificado; o extrato de planta sadia e o vírus purificado dado aos animais e no centro o anti-soro obtido da imunização dos camundongos. As placas foram mantidas em câmara úmida à

temperatura de 37 °C por um período de 12 à 18 h em incubadora BDO e observadas quanto à presença de faixas de precipitação resultantes das combinações específicas de antígeno e anticorpo.

3.9.2 - ELISA

Os anticorpos específicos obtidos para os seguintes vírus: TMV, SqMV, CMV e CABMV foram submetidos a teste de ELISA indireto (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Para esses ensaios as placas (U96-POLYSORP - NUNC-IMMUNO PLATE BATCH 016181) foram sensibilizadas com extrato de planta sadia da espécie vegetal no qual o vírus foi purificado (EPS-10 µg/orifício), com extrato de planta infectada (EPI) com o respectivo vírus em análise (10 µg/orifício) e com o respectivo vírus purificado (6 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 à temperatura de 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS (NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄.12H₂O 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, oral e nasal) diluídos em tampão de bloqueio variando na faixa de (1:25 a 1:200) conforme a via de imunização utilizada. Em seguida as placas foram incubadas durante uma noite à temperatura de 4 °C. As placas foram novamente lavadas e em cada uma foi adicionado o conjugado de imunoglobulinas "anti-camundongo" (Dako nº P 260. DK-2600 Glostrup Denmark) ligadas à peroxidase, em uma diluição de 1:1000, por 2 h à temperatura de 37 °C. A seguir as placas foram lavadas com PBS - Tween. A reação foi desenvolvida por adição de orthophenyldiamine (OPD) após a placa ter sido incubada por 30 min à temperatura de 37 °C. A intensidade da reação foi avaliada espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 492 nm com um micro Elisa Labystems Multiskam MS.

Os títulos dos anticorpos foram determinados por ELISA e os resultados expressos como ELISA* (escores de ELISA*absorbância 492 nm) e obtidos pela multiplicação por 1000 dos valores das medias das leituras de

absorbância de cada grupo associados aos seus respectivos erros padrões para cada dia de coleta de antissoro, de acordo com a metodologia de VERDOLIN *et al.*, 2001. Os títulos dos anticorpos no soro dos animais não imunizados, usados como controle, praticamente, não sofreram alterações ao longo do período de 42 dias em que os animais imunizados foram sangrados e apresentaram escores de ELISA* com valores próximos de zero.

3.9.3 - Reações de anafilaxia cutânea passiva (PCA)

A determinação dos títulos de anticorpos da classe 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 ($D_{\text{máx.}}$) capaz de provocar uma reação cutânea passiva.

$$\text{Título de PCA} = \text{Log}_2 1/D_{\text{máx.}}$$

3.9.3.1 - Detecção de IgE por PCA em ratos

A determinação dos títulos dos anticorpos do tipo IgE foi feita com 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 na proporção de 1:2 com solução salina 0,15 M. Os anticorpos utilizados foram obtidos com animais imunizados pela via oral com cada um dos vírus purificados (TMV, CMV e SqMV), com o extrato de *N. benthamiana* contendo o TMV e com o extrato de *N. benthamiana* sadia. Já com os soros dos animais imunizados pela via subcutânea, foram utilizados aqueles obtidos quando o desencadeamento da resposta imune foi realizada com o TMV e com o TMV com adjuvante (Al(OH)₃). Todos os soros utilizados neste experimento foram coletados com 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias depois da sensibilização. Após um período de latência de 18 a 20h, cada rato recebeu por via endovenosa, na veia peniana, 1 mL de azul Evans a 0,5% em solução salina contendo 1 mg de proteína dos capsídeos viral dos vírus: TMV, CMV e

SqMV dependendo da sensibilização prévia com o anti-soro que cada um tinha recebido. Nas mesmas condições, outros ratos receberam, também na veia peniana, o extrato total de folhas de *N. benthamiana* infectada com o vírus e 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. As reações, quando existentes, são observadas através de manchas azuladas provocadas pelo extravasamento do corante nos locais das aplicações dos anticorpos.

3.10 - Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para verificar se os títulos de anticorpos apresentaram distribuição normal, e aos testes de Levene e de Bartlett para confirmar a existência de homogeneidade de variância (homocedasticidade) entre os tratamentos. Os dados não configuraram distribuição normal, nem mesmo quando submetidos a diversos tipos de transformação (logarítmica, angular e radicial), nem houve homocedasticidade entre os tratamentos. Desse modo, as duas premissas fundamentais para a realização de uma análise de variância não foram atendidas (Sampaio, 2002). Em virtude disso, os dados foram analisados através do teste não paramétrico de FRIEDMAN (SAS, 1999).

4 – RESULTADOS

4.1 – Sintomatologia Ocasionada pelos Vírus nas Hospedeiras Específicas Usadas para Multiplicação.

O TMV foi multiplicado em *N. benthamiana*, e os sintomas sistêmicos cinco dias após a inoculação, foram caracterizados por mosaico severo, necroses e murcha, seguido da morte das plantas (FIGURA 1).

Os sintomas sistêmicos do CMV em *C. pepo* manifestaram-se 15 a 18 dias após a inoculação na forma de mosaico severo, enrolamento das folhas, atrofia no desenvolvimento da planta, deformações foliares e bolhosidade (FIGURA 2).

O SqMV foi multiplicado em *C. melo* híbrido 'Hi Mark', na qual os sintomas sistêmicos manifestam-se, após 15 dias da inoculação, caracterizados por mosaico (FIGURA 3).

Os sintomas sistêmicos do CABMV em *V. unguiculata*, usada como hospedeira de multiplicação, foram caracterizados por: mosaico severo, deformações foliares, bolhosidades e atrofia no desenvolvimento da planta (FIGURA 4).

4.2 - Caracterização das Preparações Virais Purificadas

4.2.1 - Análise espectrofotométrica das preparações virais purificadas

O espectro de absorção ultravioleta da suspensão purificada do TMV apresentou características de nucleoproteínas, com o máximo de absorção a 260 nm ($A_{max} = 1,154$) com 3,85 mg/mL (FIGURA 5).

O espectro de absorção ultravioleta da suspensão purificada do

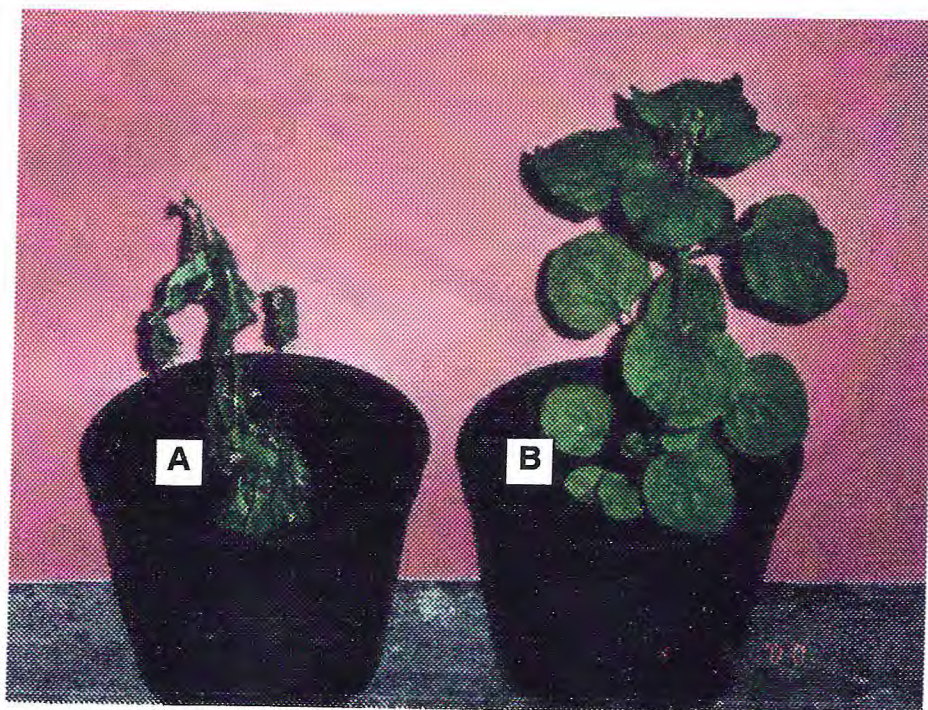


FIGURA 1 - A – *Nicotiana.benthamiana* infectada pelo TMV.
B - *N.benthamiana* sadia

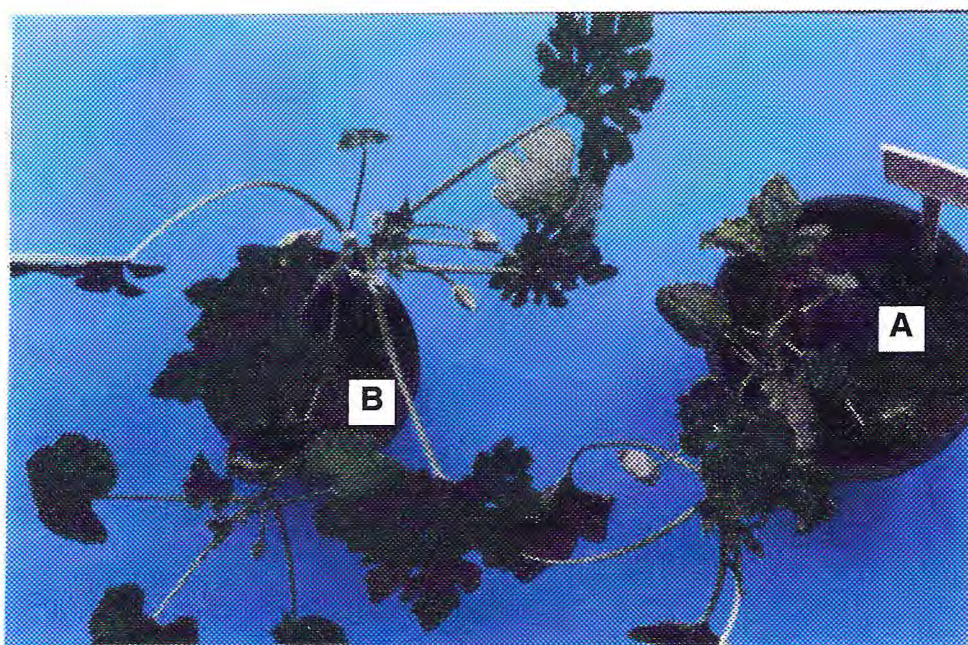


FIGURA 2 - A – *Cucurbita. pepo* cv caserta infectada pelo CMV
B - *C. pepo* cv caserta sadia



FIGURA 3 - A - *Cucumis melo* híbrido 'Hy Mark' infectada SqMV
B - *C. melo* híbrido 'Hy Mark' sadia



FIGURA 4 - A - *Vigna unguiculata* infectada pelo CABMV
B - *V. unguiculata* sadia

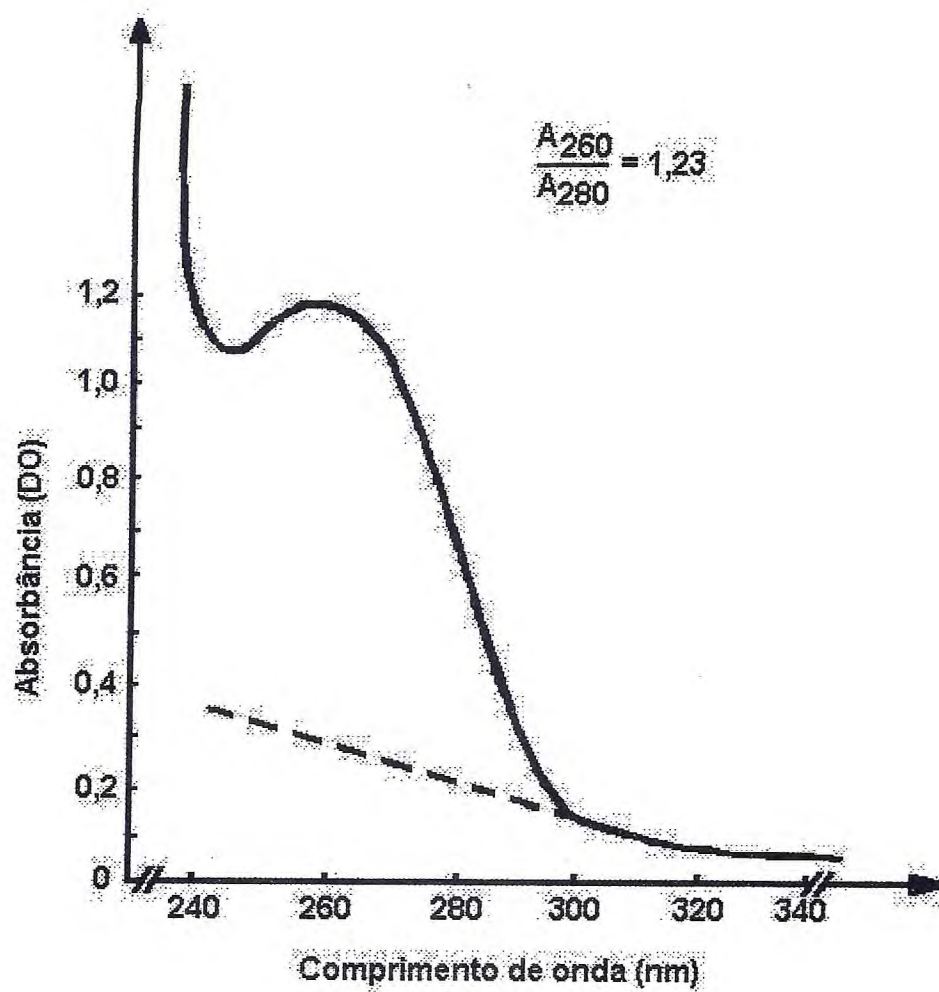


FIGURA 5 - Espectro de absorção ultravioleta de suspensão purificada de TMV

CMV, apresentou características de nucleoproteínas, com o máximo de absorção a 260 nm ($A_{max} = 0,407$) com 4,07 mg/mL (FIGURA 6).

O espectro de absorção ultravioleta da suspensão purificada do SqMV apresentou características de nucleoproteínas, com o máximo de absorção a 260 nm ($A_{max} = 1,608$) com 11,47 mg/mL (FIGURA 7).

O espectro de absorção ultravioleta da suspensão purificada do CABMV, apresentou características de nucleoproteínas, com o máximo de absorção a 260 nm ($A_{max} = 0,558$) com 9,85 mg/mL (FIGURA 8).

4.2.2 - Análise por eletroforese em sistema SDS-PAGE dos vírus nativos e termo-inativados.

O perfil eletroforético em SDS-PAGE das proteínas do capsídeo do TMV revelou a migração de uma única banda com massa molecular estimada em 17 kDa. O mesmo perfil eletroforético foi também revelado pelo TMV termo-inativado a 100 °C por 10 min (FIGURA 9).

O perfil eletroforético em SDS-PAGE das proteínas do capsídeo do CMV revelou a migração de uma única banda com massa molecular estimada em 29 kDa. O mesmo perfil eletroforético foi também revelado pelo CMV termo-inativado a 100 °C por 10 min (FIGURA 10).

O perfil eletroforético em SDS-PAGE das proteínas do capsídeo do SqMV revelou a migração de duas bandas com massas moleculares estimadas em 21 kDa e 43 kDa. O mesmo perfil eletroforético foi também revelado pelo SqMV termo-inativado a 100 °C por 10 min (FIGURA 11).

O perfil eletroforético em SDS-PAGE das proteínas do capsídeo do CABMV revelou a migração de uma única banda com massa molecular estimada em 35 kDa. O mesmo perfil eletroforético foi também revelado pelo SqMV termo-inativado a 100 °C por 10 min (FIGURA 12).

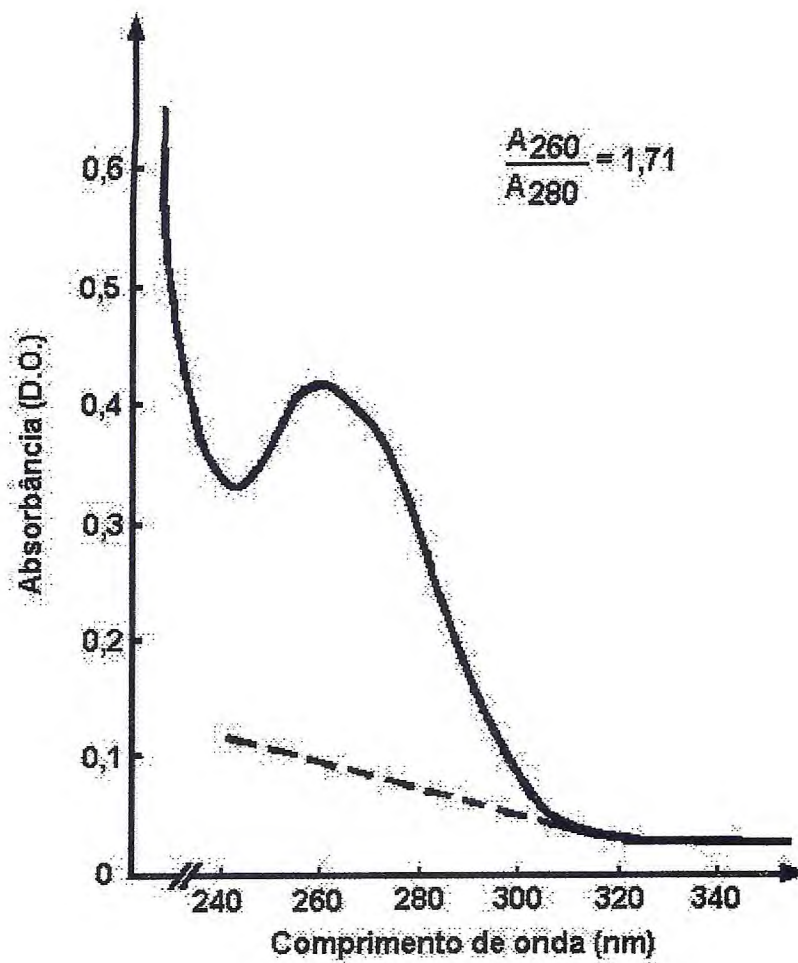


FIGURA 6 - Espectro de absorção ultravioleta de suspensão purificada de CMV

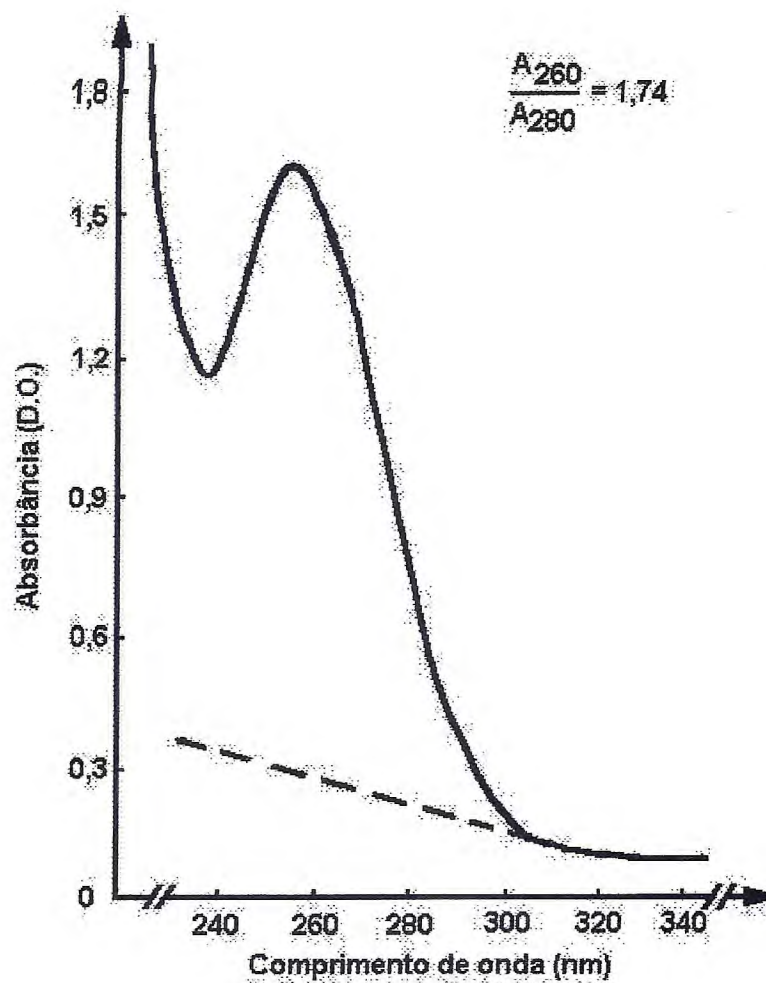


FIGURA 7 - Espectro de absorção ultravioleta de suspensão purificada de SqMV

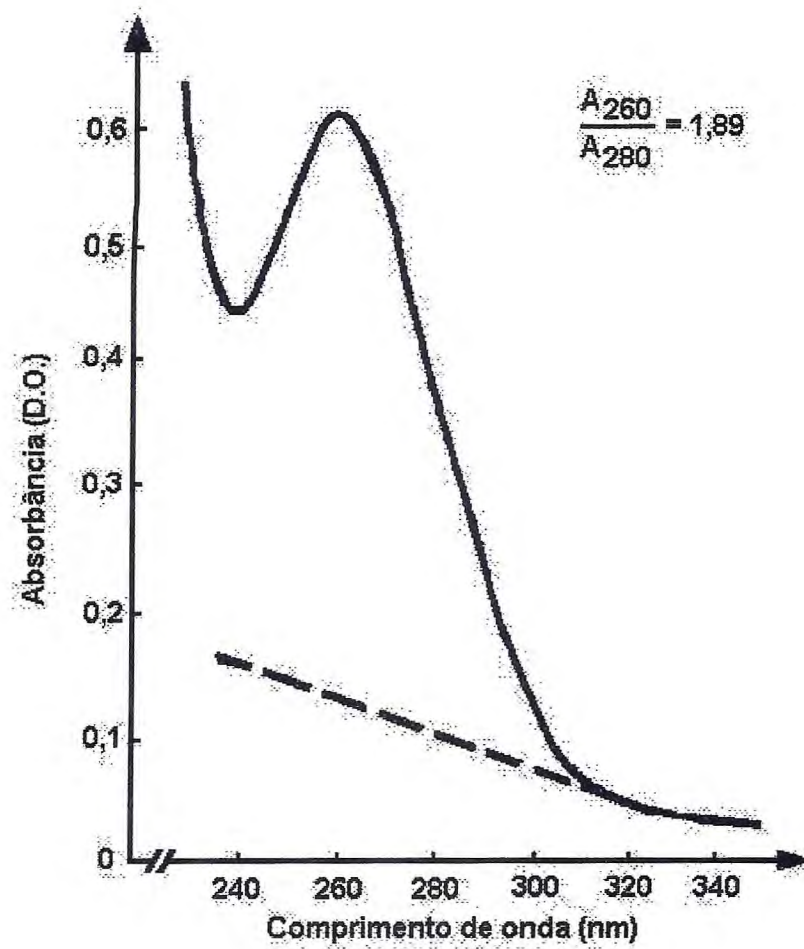


FIGURA 8 - Espectro de absorção ultravioleta de suspensão purificada de CABMV

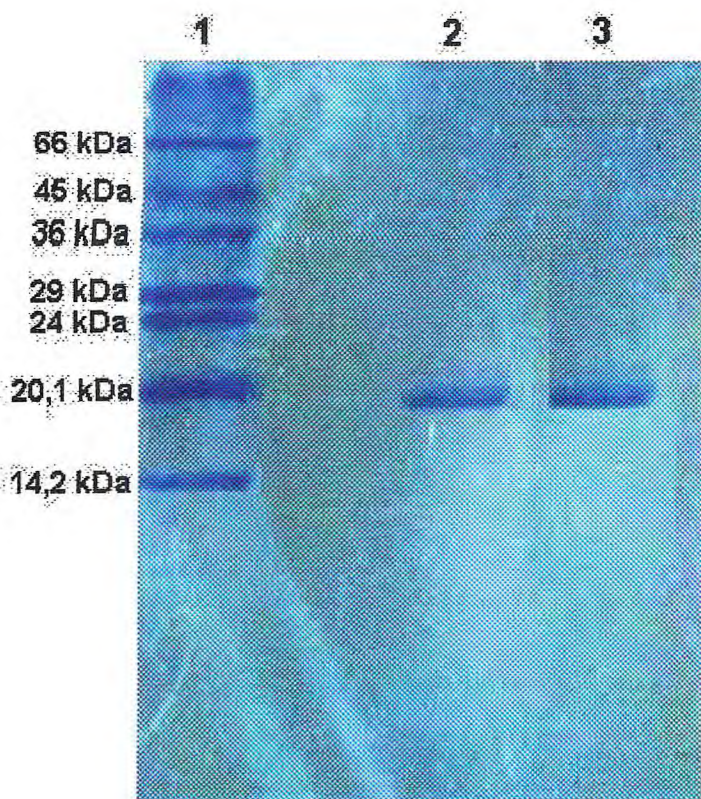


FIGURA 9 - Perfil eletroforético da subunidade protéica do capsídeo do TMV, em SDS-PAGE a 17%. Linhas: 1 – Padrões de massas moleculares aparentes, linhas: 2 – TMV purificado e linhas 3 – TMV purificado termo-inativado.

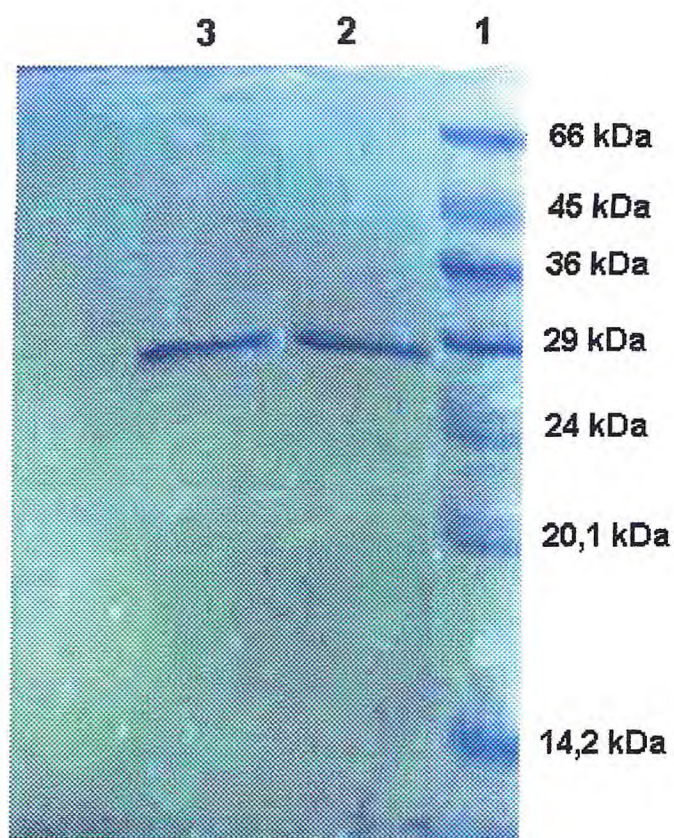


FIGURA 10 - Perfil eletroforético da subunidade protéica do capsídeo do CMV, em SDS-PAGE a 17%. Linhas: 1 – Padrões de massas moleculares aparentes, linha 2 – CMV purificado e linha 3 – CMV termo-inativado.

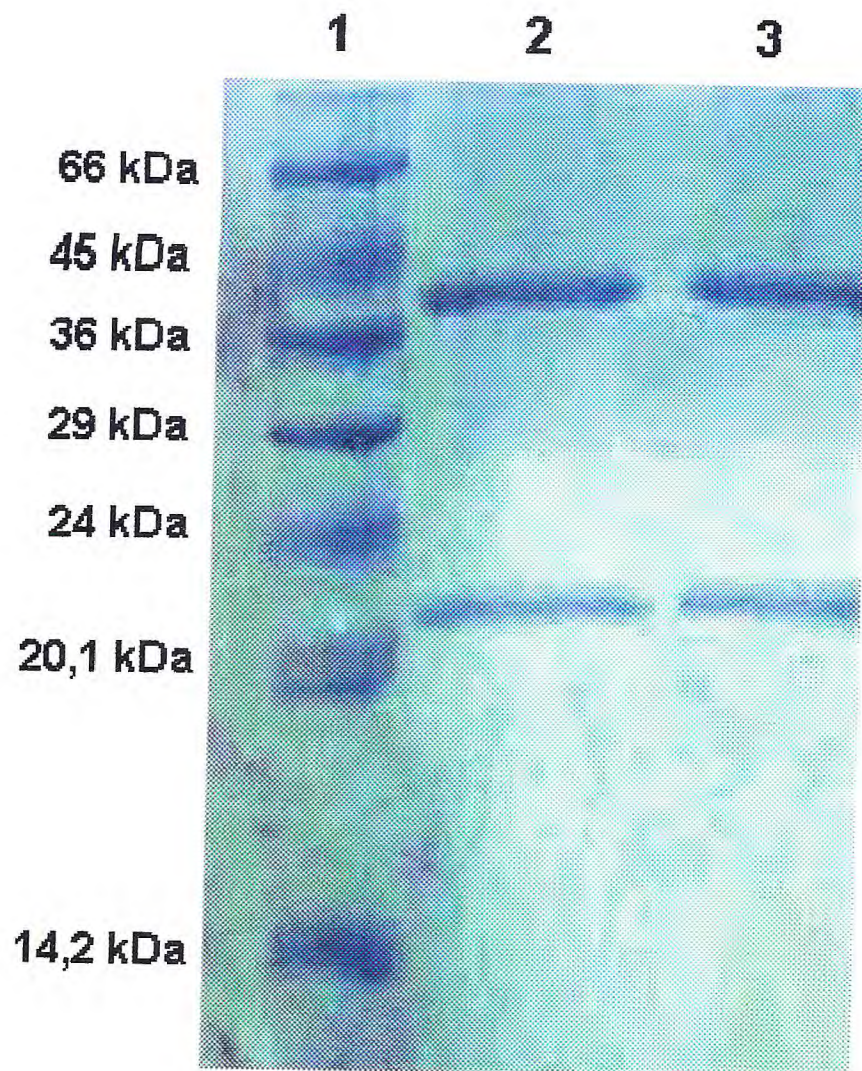


FIGURA 11 - Perfil eletroforético das subunidades protéicas dos capsídeos do SqMV, em SDS-PAGE a 17%. Linha: 1 – Padrões de massas moleculares, linha 2 – SqMV purificado e linha 3 – SqMV termo-inativado.

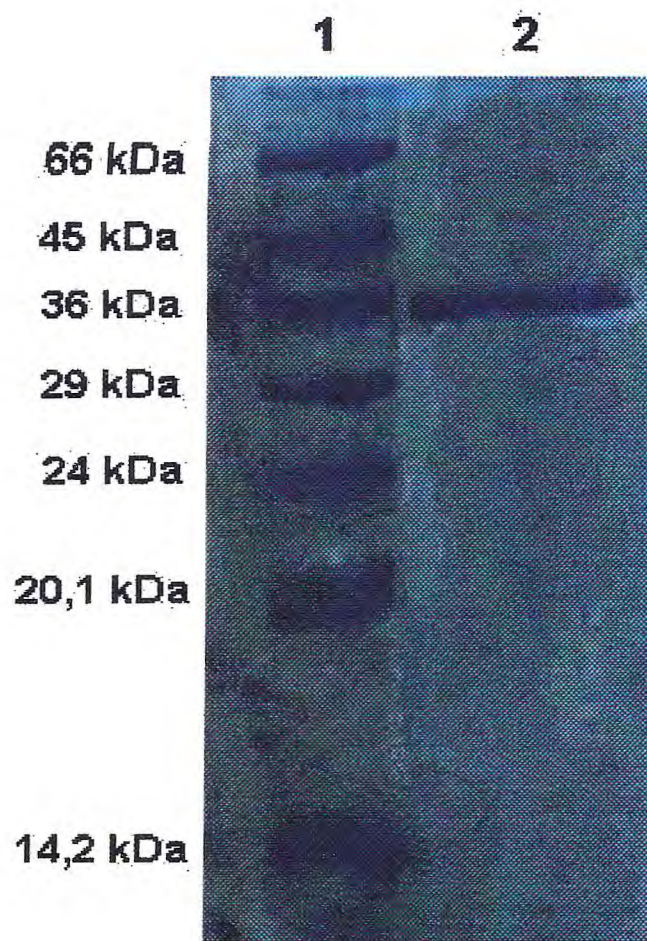


FIGURA 12 - Perfil eletroforético da subunidade protéica do capsídeo do CABMV, em SDS-PAGE a 17%. Linha: 1 – Padrões de massas moleculares aparentes e linha 2 – CABMV purificado.

4.2.3 - Análise da sintomatologia ocasionada pelos vírus nativos e termo-inativados

Os vírus purificados e inoculados, individualmente, em suas respectivas hospedeiras induziram o aparecimento dos sintomas sistêmicos característicos de cada vírus e inúmeras lesões necróticas locais quando inoculados em *C. amaranticolor*, mostrando que os mesmos, após os processos de purificação, não perderam sua capacidade infectiva. Após à termo-inativação, nenhum dos vírus induziu lesões necróticas locais em *C. amaranticolor*, indicando a perda da capacidade infectiva (FIGURA 13).

4.3 - Avaliação da Resposta Imunológica Humoral de Camundongos “Swiss” aos Vírus

4.3.1 - Avaliação por dupla difusão em agar da resposta imunológica de camundongos imunizados por diferentes vias

4.3.1.1 - Imunização por via subcutânea

Os anticorpos policlonais obtidos com a imunização dos camundongos com 100 µg de TMV purificado sem e com o adjuvante Al(OH)₃, por via subcutânea, apresentaram reatividade específica contra o vírus purificado e contra o extrato de planta infetada pelo mesmo. Nenhuma reação foi obtida contra o extrato de plantas sadias (FIGURA 14).

4.3.1 2 - Imunização por via oral com TMV nativo e termo-inativo

A reatividade qualitativa dos anticorpos policlonais de camundongos imunizados por via oral, contra o extrato de *N. benthamiana* infetada ou contra o TMV purificado, foi detectado apenas até a diluição 1:2 (FIGURA 15 A e B). Nenhuma reação foi observada contra o extrato de plantas sadias de *N. benthamiana* (FIGURA 15 C).

Nenhuma reatividade qualitativa do anticorpo policlonal de

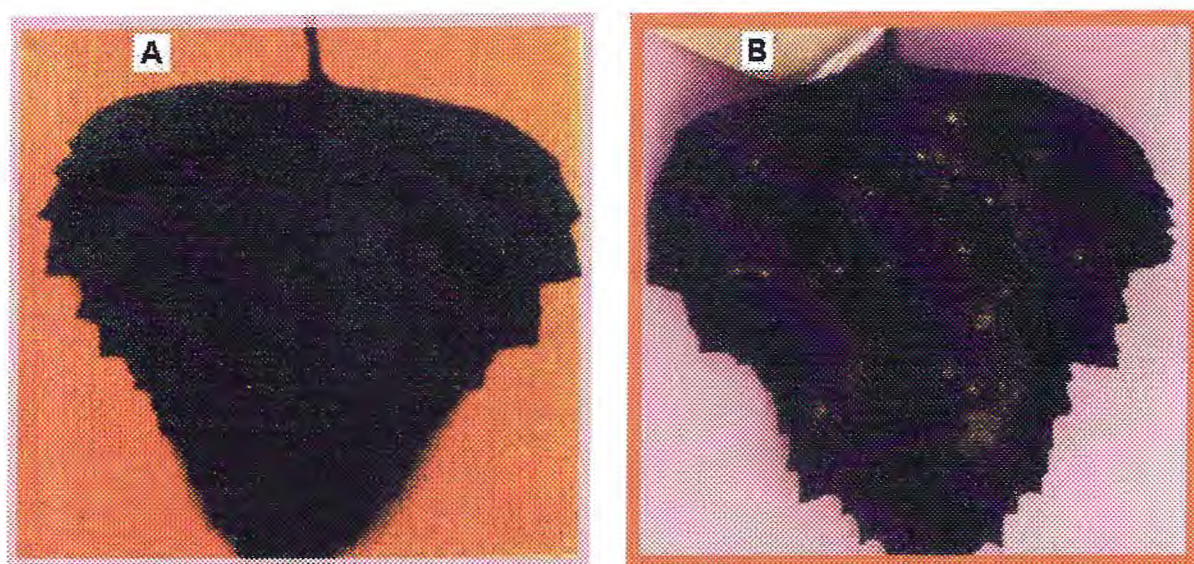


FIGURA 13 - Folhas de *Chenopodium amaranticolor*

A - inoculada com TMV termo-inativado

B – inoculada com TMV purificado

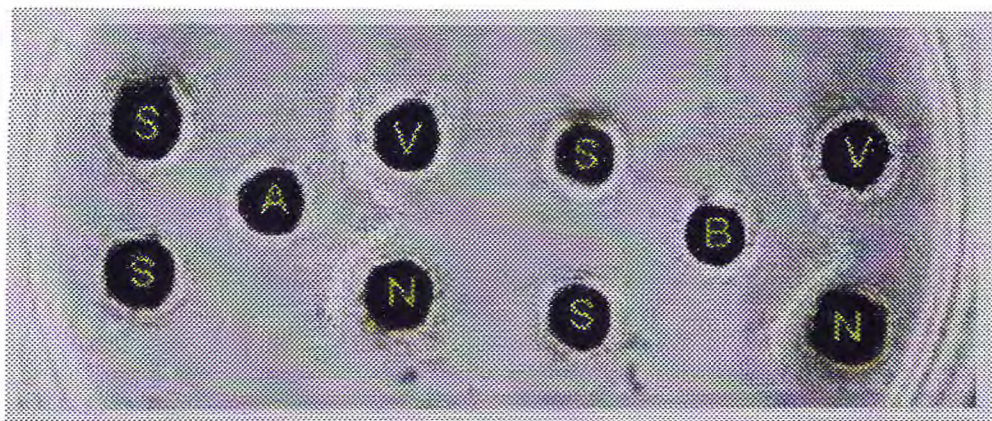


FIGURA 14 - Teste de imunodifusão dupla em meio de Agar demonstrando a especificidade dos antissoros obtidos de camundongos imunizados com TMV puro e com o TMV mais o adjuvante $Al(OH)_3$. Orifícios centrais: A- anticorpos específicos para o TMV obtidos de camundongos imunizados com 100 μg de proteínas do capsídeo viral sem diluição. B - anticorpos específicos para o TMV obtidos de camundongos imunizados com 100 μg de proteínas do capsídeo viral e $Al(OH)_3$ sem diluição. Orifícios periféricos: V - 5 μg de vírus purificado , N - Extrato de folhas de *N. benthamiana* infectada pelo vírus (1:2 p/v) e S - Extrato de folhas de *V. unguiculata* sadia (1:2 p/v).

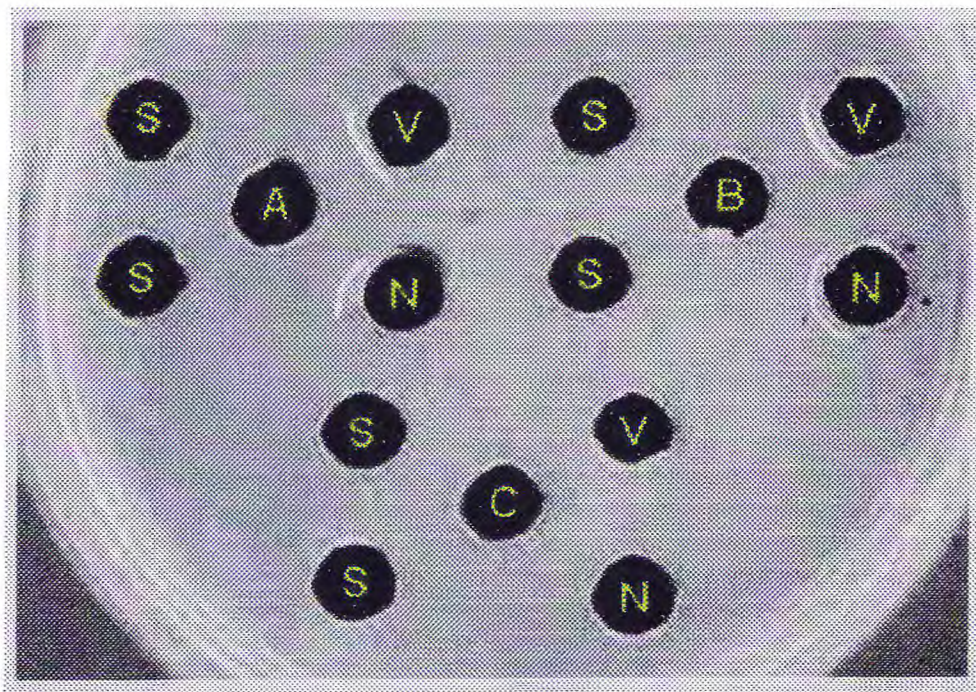


FIGURA 15 - Anticorpos específicos em soro de camundongos (28 dias após o término da imunização), detectados por teste de imunodifusão dupla em Agar sem SDS. Os orifícios centrais contêm 10 μ L de soro sem diluição: (A)-soro de camundongos imunizados por via oral com TMV purificado na diluição 1:2; (B)-soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de *N. benthamiana* infectada pelo TMV na diluição 1:2 e (C)-soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de *N. benthamiana* sadia. Os orifícios periféricos contêm os antígenos: (V) - 5 μ g de vírus purificado; (N) – extrato de folhas de *N. benthamiana* (1:2 p/v) infectada pelo vírus e (S) - extrato de folhas de *N. benthamiana* sadia (1:2 p/v).

camundongos imunizados por via oral com TMV inativado, contra o extrato de *N. benthamiana* infetada ou contra o TMV purificado, foi detectado.

4.3.1 3 - Imunização por via oral com CMV nativo e termo-inativo

A reatividade qualitativa dos anticorpos policlonais de camundongos imunizados por via oral, contra o extrato de *C. pepo* infetada ou contra o CMV purificado, foi detectado apenas até a diluição 1:2 (FIGURA 16 A e B). Nenhuma reação foi observada contra o extrato de plantas sadias *C. pepo* (FIGURA 16 C).

Nenhuma reatividade qualitativa de anticorpo policlonal de camundongos imunizados por via oral com CMV termo-inativado, contra o extrato de *C. pepo* infetada ou contra o CMV purificado, foi detectado.

4.3.1 4 - Imunização por via oral com SqMV nativo e termo-inativado

A reatividade qualitativa dos anticorpos policlonais de camundongos imunizados por via oral, contra o extrato de *C. melo* infetada ou contra o SqMV purificado, foi detectado apenas até a diluição 1:2 (FIGURA 17 A e B). Nenhuma reação foi observada contra o extrato de plantas sadias de *C. melo* (FIGURA 17 C).

Nenhuma reatividade qualitativa de anticorpo policlonal de camundongos imunizados por via oral com SqMV termo-inativado, contra o extrato de *V. unguiculata* infetada ou contra o SqMV purificado, foi detectado.

4.3.1 5 - Imunização por via oral com CABMV nativo

Nenhuma reatividade qualitativa do anticorpo policlonal de camundongos imunizados por via oral, contra o extrato de *V. unguiculata* infetada ou contra o CABMV purificado, foi detectado.

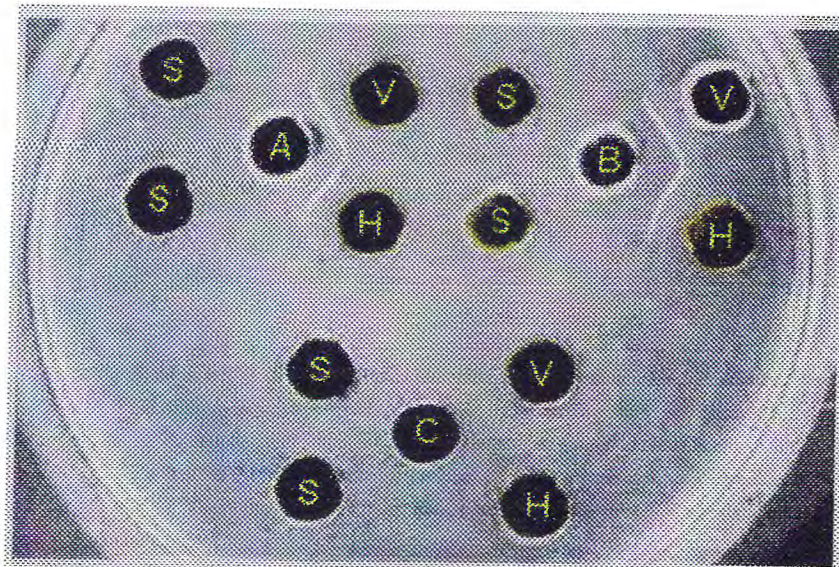


FIGURA 16 - Anticorpos específicos em soro de camundongos (35 dias após o término da imunização), detectados por teste de imunodifusão dupla em Agar sem SDS. Os orifícios centrais contêm 10 μ L de soro, na diluição 1:2: (A)-soro de camundongos imunizados por via oral com CMV purificado; (B)-soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de *C pepo* cv caserta infectada a pelo CMV e (C)-soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de sadia. Os orifícios periféricos contêm os antígenos: (V) -5 μ g de vírus purificado; (H) – extrato de folhas de *C pepo* cv caserta (1:2 p/v) infetada pelo vírus e (S) - extrato de folhas sadias de *C pepo* cv caserta (1:2 p/v).

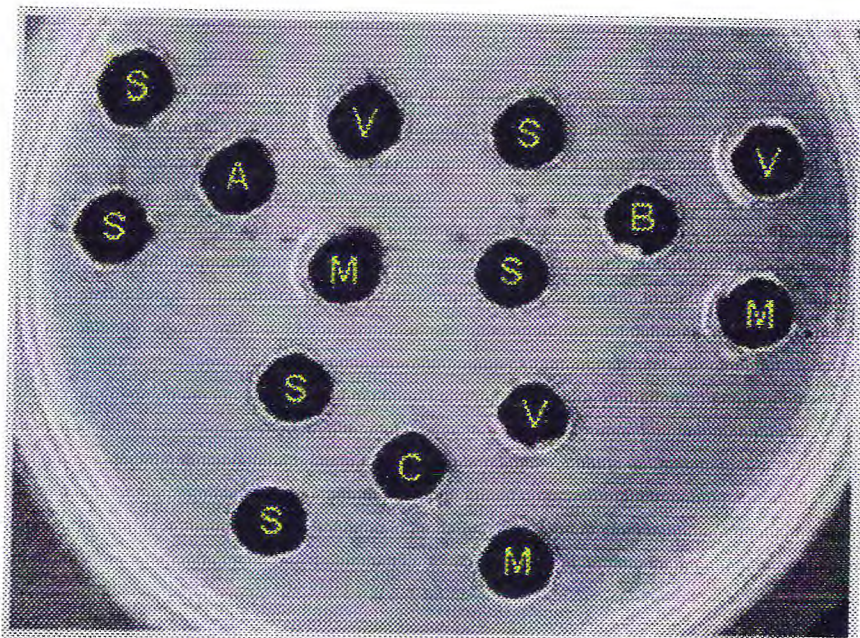


FIGURA 17 - Anticorpos específicos em soro de camundongos (28 dias após o termino da imunização), detectados por teste de imunodifusão dupla em Agar sem SDS. Os orifícios centrais contêm 10 μ L de soro, na diluição de 1:2: (A)-soro de camundongos imunizados por via oral com SqMV purificado; (B)-soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de *C. melo* híbrido 'Hy Mark' infectada pelo SqMV e (C)-soro de camundongos imunizados por via oral com extrato de *C. melo* híbrido 'Hy Mark' sadia. Os orifícios periféricos contêm os antígenos: (V) -5 μ g de vírus purificado; (M) – extrato de folhas de *C. melo* híbrido 'Hy Mark' (1/2 p/v) infetada pelo vírus e (S) - extrato de folhas de *C. melo* híbrido 'Hy Mark' sadia (1/2 p/v).

4.3.2 - Avaliação da resposta imunológica a diferentes tipos de vírus, por ELISA, com diferentes tipos de sensibilização da placa e diferentes vias de sensibilização

4.3.2.1 - Imunizações com TMV

As respostas imunes ao TMV purificado, ao extrato de planta infetada e ao extrato de planta sadia ministrados por via subcutânea foram testados com o uso das placas sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com o extrato de plantas sadias (FIGURAS 18, 19, 22 e 23; TABELAS 1, 2, 3 e 4).

4.3.2.1.1 - Imunização por via subcutânea: com 100 µg de TMV purificado, sem adjuvante testada em placa de ELISA sensibilizada com o vírus purificado

A cinética da síntese de anticorpos específicos quantificados por ELISA, mostrou uma produção de anticorpos específicos com títulos de ELISA* variando em absorbância entre 0,4 e 0,7. Houve um pequeno aumento nos dias 28 e 42 nos títulos ELISA*, provavelmente devido aos reforços dados nos dias 21 e 35. Como controle utilizou-se o soro pré-imune que apresentou valores em ELISA* com absorbância atingindo 0,1 (FIGURA 20).

4.3.2.1.2 - Imunização por via subcutânea: com 100µg de TMV purificado, associado ao adjuvante Al(OH)₃, testada em placa de ELISA sensibilizada com o vírus purificado

A cinética da síntese de anticorpos específicos quantificados por ELISA mostrou títulos de ELISA* variando em absorbância entre 0,3 e 0,6. Houve um pequeno aumento nos dias 28 e 42 nos títulos de ELISA*, provavelmente devido aos reforços dados nos dias 21 e 35. Como controle utilizou-se o soro pré-imune, que teve valores de ELISA* com absorbância em torno de 0,1 (FIGURA 20).

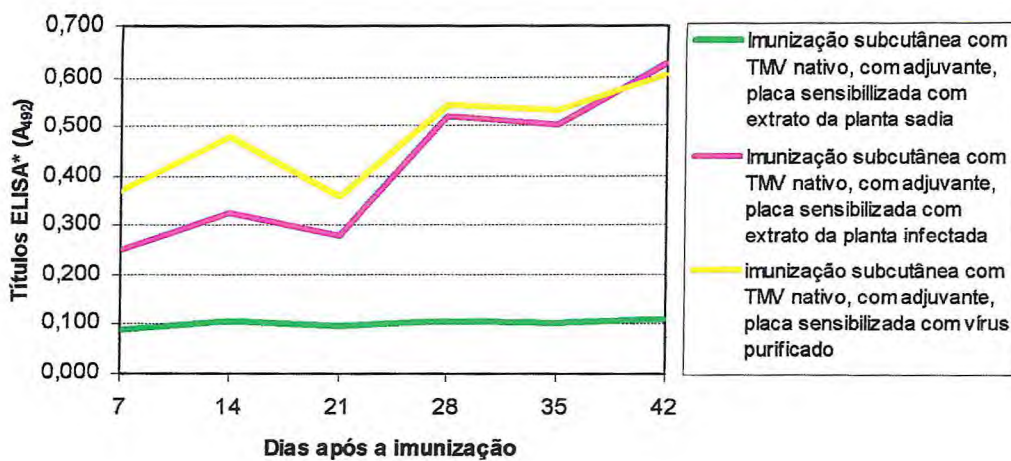


FIGURA 18 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com TMV nativo com adjuvante, de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

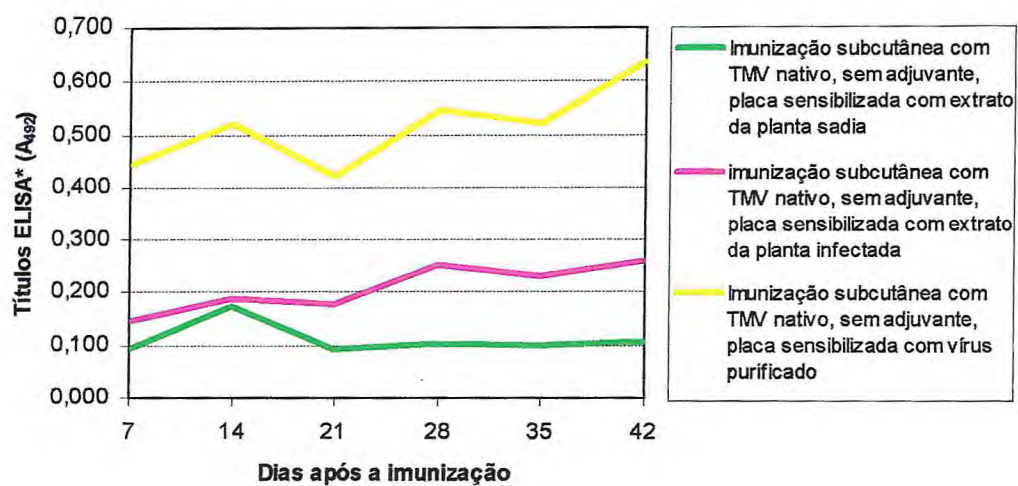


FIGURA 19 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com TMV nativo sem adjuvante, de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

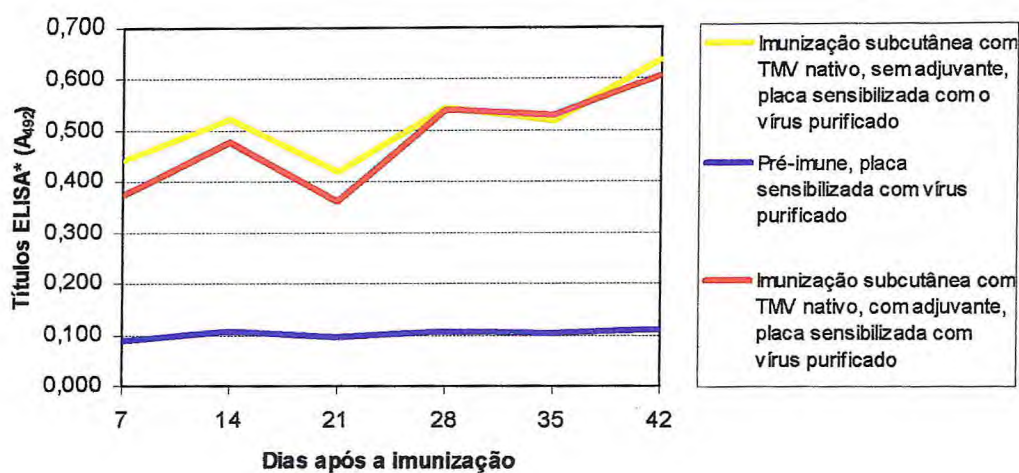


FIGURA 20 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com TMV nativo com e sem adjuvante, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado.

TABELA 1 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via subcutânea com TMV nativo sem adjuvante.

Anti-soro	Via	Sensibilização da placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
TMV	Subcutânea	EP Sadia	0,091±0,015g	0,091±0,014g	0,093±0,017g	0,101±0,020g	0,101±0,022g	0,106±0,023g
		EP Infectada	0,145±0,051ef	0,186±0,059de	0,178±0,056de	0,250±0,079d	0,228±0,076d	0,257±0,076d
		Vírus purificado	0,442±0,095bc	0,520±0,088abc	0,421±0,089c	0,544±0,083ab	0,519±0,082abc	0,638±0,080 ^a

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

TABELA 2 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via subcutânea com TMV nativo com adjuvante.

Anti-soro	Via	Sensibilização da placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
TMV+Al(OH) ₃	Subcutânea	EP Sadia	0,088±0,015g	0,104±0,021g	0,095±0,019g	0,106±0,018g	0,102±0,020g	0,110±0,022g
		EP Infectada	0,250±0,078f	0,323±0,080def	0,279±0,086ef	0,521±0,091c	0,501±0,093c	0,626±0,073a
		Vírus purificado	0,370±0,090d	0,477±0,085c	0,359±0,089de	0,540±0,092abc	0,530±0,090bc	0,604±0,084ab

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

TABELA 3 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via subcutânea com extrato de *N. benthamiana* infectada com o TMV.

Anti-soro	Via	Sensibilização da placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
E.P. Infectada	Subcutânea	EP. Sadia	0,147±0,058g	0,239±0,067ef	0,230±0,070f	0,298±0,082def	0,234±0,077ef	0,302±0,084cde
		EP. Infectada	0,264±0,071ef	0,372±0,075bc	0,714±0,101a	0,794±0,106a	0,703±0,094a	0,714±0,093a
		Vírus purificado	0,082±0,012g	0,231±0,064f	0,287±0,076def	0,416±0,051b	0,351±0,080bcd	0,361±0,102bcd

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

TABELA 4 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via subcutânea com extrato de *N. benthamiana* sadia.

Anti-soro	Via	Sensibilização da placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
E. P Sadia	Subcutânea	E.P. Sadia	0,138±0,055bcd	0,163±0,063abc	0,179±0,064abc	0,191±0,066ab	0,188±0,065abc	0,221±0,090a
		E.P. Infetada	0,137±0,054cde	0,161±0,059abc	0,170±0,062abc	0,163±0,064abc	0,171±0,062abc	0,211±0,090abc
		Vírus purificado	0,091±0,016e	0,098±0,016de	0,101±0,018de	0,100±0,023de	0,097±0,022de	0,099±0,017 ^{de}

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

4.3.2.1.3 - Imunização por via subcutânea: com 100 µg de TMV purificado, sem adjuvante testada em placa de ELISA sensibilizada com o extrato de *N. benthamiana* infetada com TMV

A cinética da síntese de anticorpos específicos quantificados por ELISA mostrou títulos de ELISA* com absorvância variando entre 0,1 e 0,3. Houve um pequeno aumento nos dias 28 e 42 nos títulos ELISA*, provavelmente devido aos reforços dados nos dias 21 e 35. Como controle utilizou-se o soro pré-imune, que teve valores de ELISA* com absorvância em torno de 0,1 (FIGURA 21).

4.3.2.1.4 - Imunização por via subcutânea: com 100 µg de TMV purificado associado ao adjuvante Al(OH)₃ testada em placa de ELISA sensibilizada com o extrato de *N. benthamiana* infetada com TMV

A cinética da síntese de anticorpos específicos, quantificados por ELISA, demonstrou produção de anticorpos específicos com títulos de ELISA* variando entre 0,2 e 0,7. Houve um grande aumento nos dias 28 e 42 nos títulos de ELISA*, provavelmente devido aos reforços dados nos dias 21 e 35. Como controle utilizou-se o soro pré-imune que teve valores de ELISA* com absorvância em torno de 0,1 (FIGURA 21).

4.3.2.1.5 - Imunização por via subcutânea: com 100 µg de extrato foliar infectado por TMV testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado

A cinética da síntese de anticorpos específicos quantificados por ELISA, demonstrou que houve baixa produção desses anticorpos com títulos de ELISA* variando em absorvância entre 0,1 e 0,4. Como controle utilizou-se o soro pré-imune que teve valores de ELISA* com absorvância variando entre 0,1 e 0,3 (FIGURA 24).

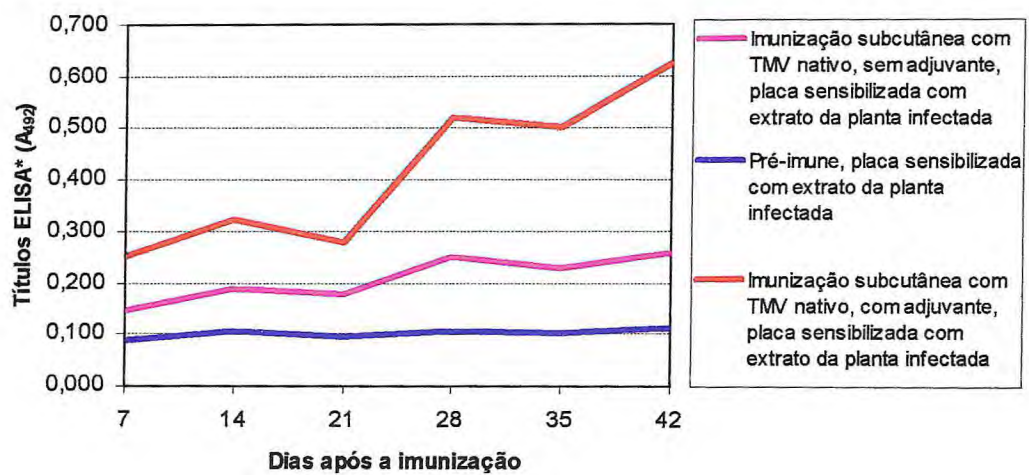


FIGURA 21 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com TMV nativo com e sem adjuvante, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada.

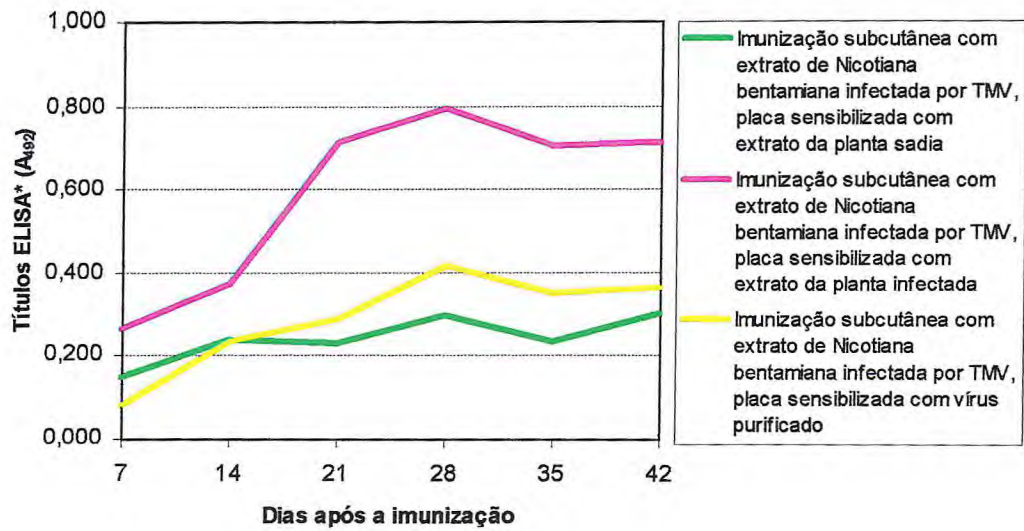


FIGURA 22 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com extrato de *Nicotiana benthamiana* infectada por TMV, sem adjuvante, de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

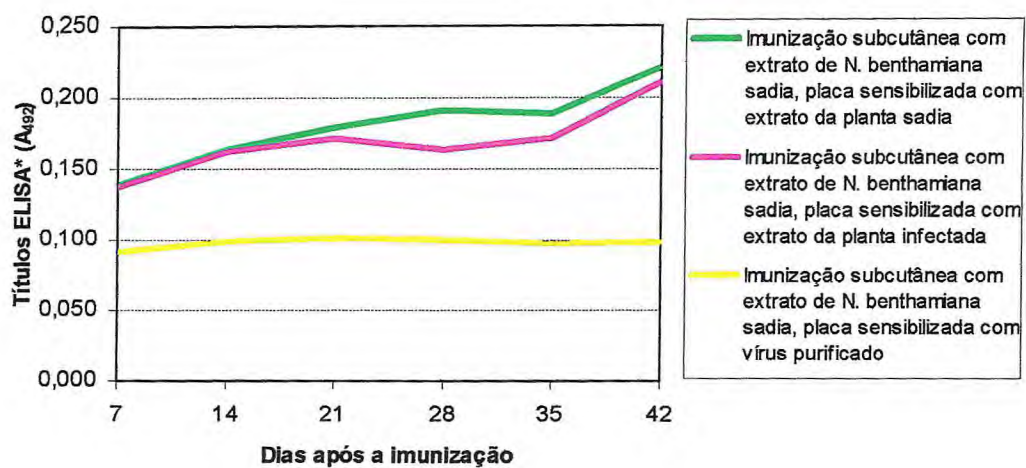


FIGURA 23 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com extrato de *Nicotiana benthamiana* sadia, sem adjuvante, de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

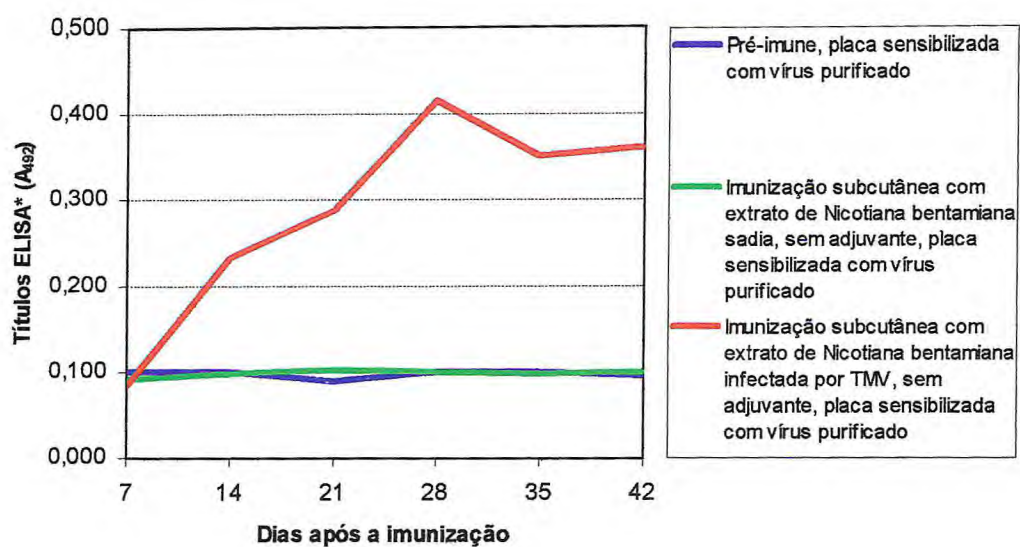


FIGURA 24 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com extrato de *Nicotiana benthamiana* sadia e infectada por TMV, sem adjuvante, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado.

4.3.2.1.6 - Imunização por via subcutânea: com 100 µg de extrato foliar infectado por TMV testada em placa de ELISA sensibilizada com o extrato de *N. benthamiana* infetada com TMV.

A cinética de síntese de anticorpos específicos induzidos pela imunização com 100 µg de extrato foliar infetado demonstrou alta especificidade para extrato foliar infetado com títulos de ELISA*, a partir do dia 14 variando em absorbância entre 0,3 e 0,8. Como controle foi utilizado o soro pré-imune que teve valores em absorbância em torno de 0,1 (FIGURA 25).

4.3.2.1.7 - Imunização por via subcutânea: com 100µg de extrato foliar sadio de *N. benthamiana* testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado

Não se observou síntese de anticorpos específicos durante os 42 dias após o início da imunização e os valores da absorbância ficaram em torno de 0,1. Como controle foi utilizado o soro pré-imune que apresentou valores de absorbância em torno de 0,1 (FIGURA 24).

4.3.2.1.8 - Imunização por via subcutânea: com 100µg de extrato foliar sadio de *N. benthamiana* testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de *N. benthamiana* infetada com o TMV.

Não se observou síntese de anticorpos específicos durante os 42 dias após o término da imunização e os valores da absorbância variaram de 0,1 a 0,2. Como controle foi utilizado o soro pré-imune que apresentou valores de absorbância em torno de 0,1 (FIGURA 25).

4.3.2.2 - Respostas imunes ao TMV purificado (nativo e termo-inativado), ao extrato de planta infetada e ao extrato de planta sadia ministrados por via oral foram testados testada em placas de ELISA sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com extrato de plantas sadias (FIGURAS 26,

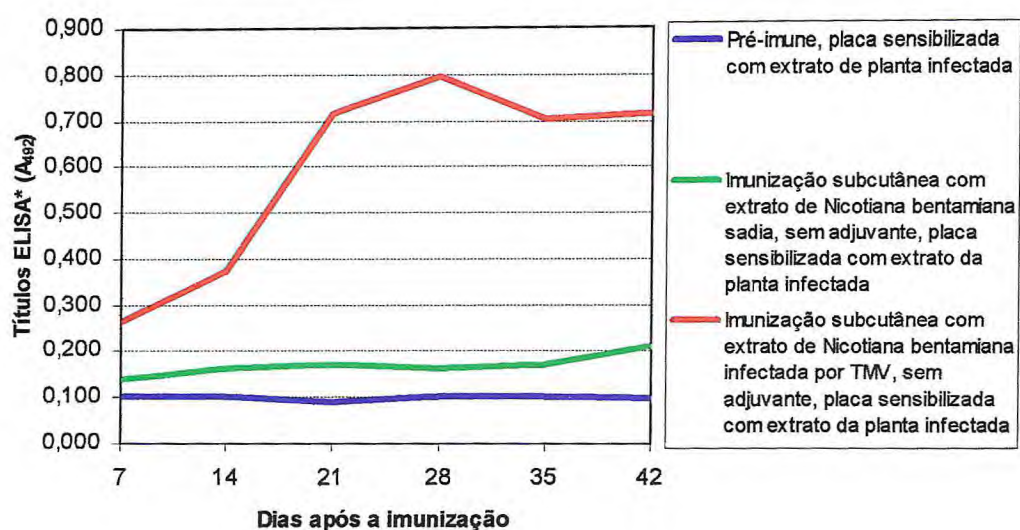


FIGURA 25 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via subcutânea com extrato de *Nicotiana benthamiana* sadia e infetada por TMV, sem adjuvante, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada.

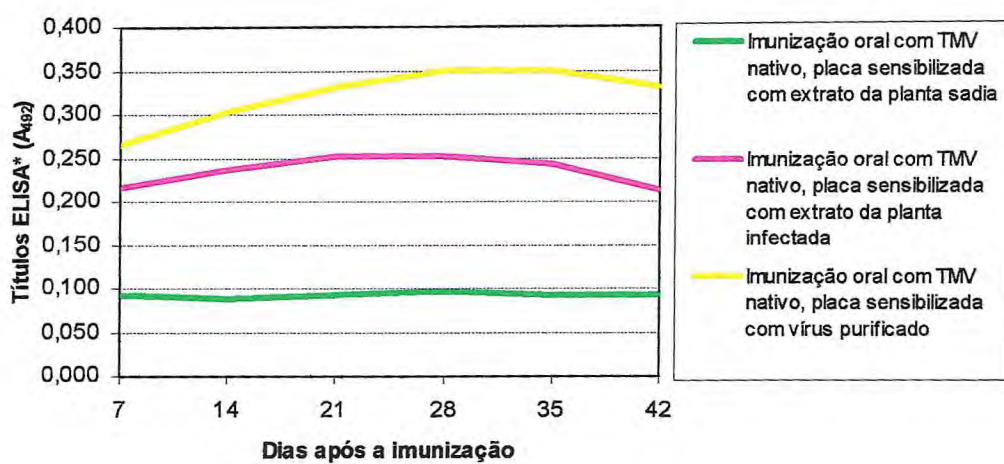


FIGURA 26 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com TMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

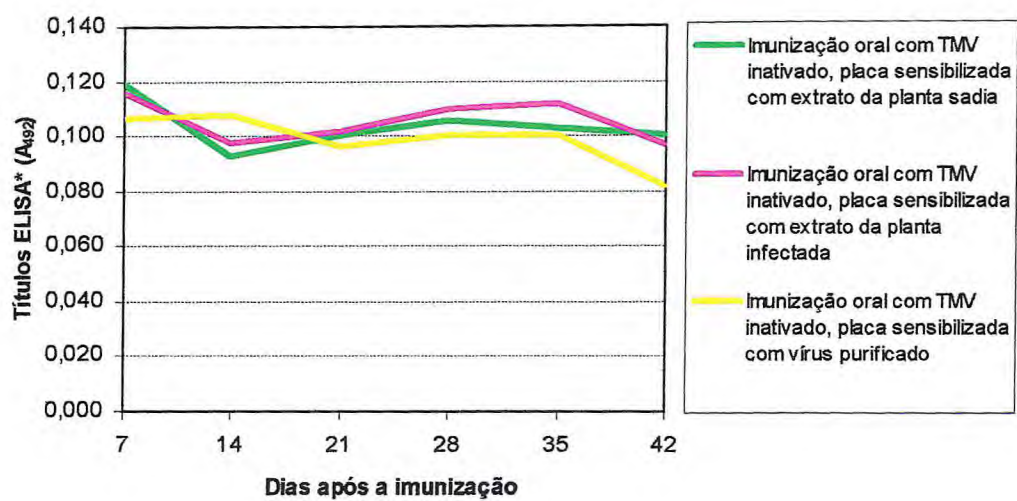


FIGURA 27 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com TMV inativado de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

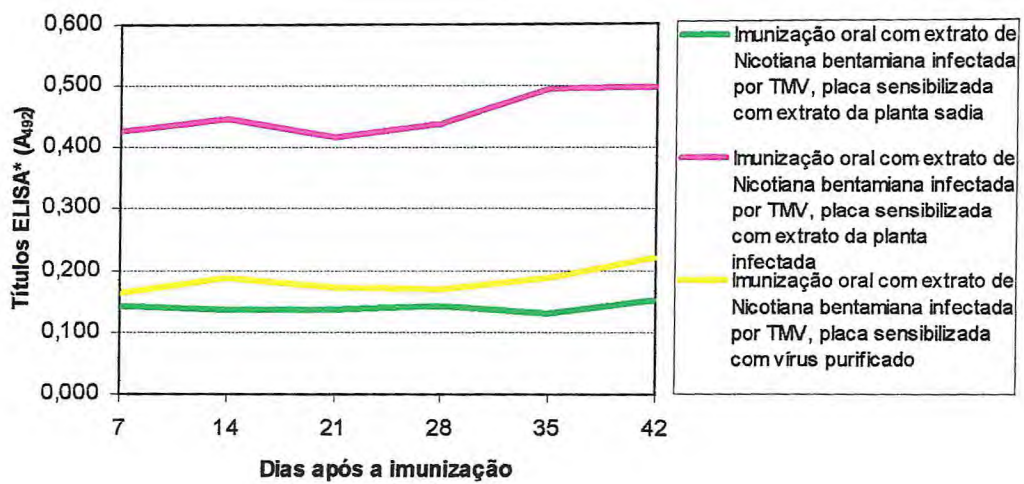


FIGURA 28 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com extrato de *Nicotiana benthamiana* infetada por TMV de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

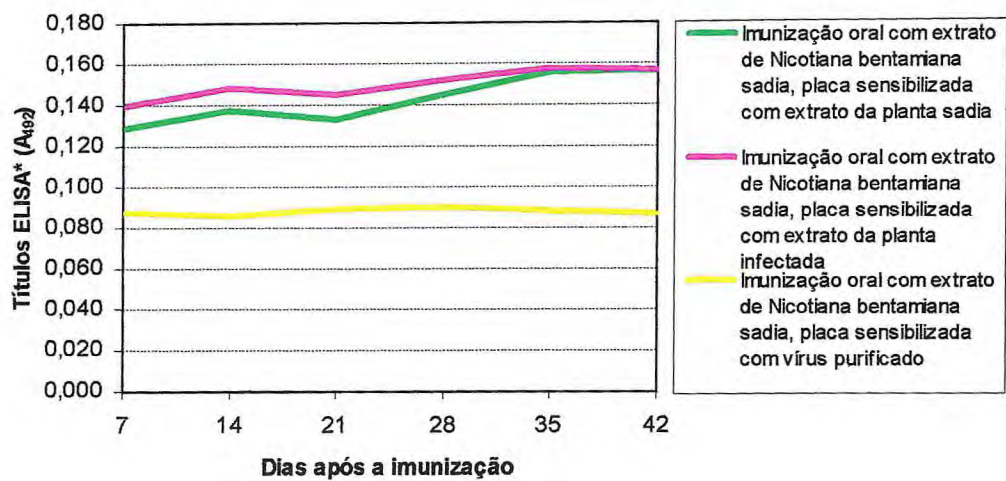


FIGURA 29 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com extrato de *Nicotiana benthamiana* sadia de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

TABELA 5 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com TMV nativo.

Anti-soro	Via	Sensibilização da placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
TMV Nativo	Oral	EP.Sadia	0,091±0,019e	0,088±0,016e	0,091±0,016e	0,095±0,018e	0,091±0,017e	0,092±0,017e
		EP.Infectada	0,214±0,045d	0,237±0,071cd	0,250±0,062bcd	0,251±0,083bcd	0,243±0,080cd	0,212±0,076cd
		Vírus purificado	0,264±0,063bc	0,302±0,071ab	0,330±0,085a	0,349±0,089a	0,349±0,085a	0,330±0,092 ^a

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

TABELA 6 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com TMV inativado.

Anti-soro	Via	Sensibilização da placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
TMV Inativado	Oral	EP.Sadia	0,119±0,022a	0,093±0,020de	0,100±0,017abcd	0,105±0,017abcd	0,102±0,018abcd	0,100±0,020bcd
		EP.Infectada	0,116±0,022ab	0,097±0,019bcde	0,102±0,022abcd	0,110±0,018abc	0,112±0,021abc	0,097±0,015cde
		Vírus purificado	0,106±0,018abcd	0,108±0,026abcd	0,096±0,024cde	0,100±0,018abcd	0,100±0,023bcd	0,082±0,014e

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

TABELA 7 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com extrato de *N. benthamiana* infetada com o TMV.

Anti-soro	Via	Sensibilização da placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
E.P. Infetada	Oral	EP.Sadia	0,141±0,062de	0,136±0,067e	0,136±0,051de	0,140±0,052de	0,131±0,054e	0,150±0,053cde
		EP.Infetada	0,424±0,142a	0,446±0,149a	0,416±0,123a	0,438±0,133a	0,496±0,148a	0,498±0,142a
		Vírus purificado	0,162±0,054bcde	0,188±0,067bc	0,173±0,061bcd	0,168±0,061bcde	0,186±0,068bc	0,221±0,091b

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

TABELA 8 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com extrato de *N. benthamiana* sadia.

Anti-soro	Via	Sensibilização da placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
E.P. sadia	Oral	EP.Sadia	0,128±0,059abcd	0,137±0,060ab	0,133±0,061abc	0,145±0,065a	0,155±0,066a	0,157±0,064a
		EP.Infectada	0,139±0,065a	0,148±0,064a	0,145±0,068a	0,152±0,070a	0,157±0,065a	0,157±0,064a
		Vírus purificado	0,087±0,025d	0,085±0,024d	0,089±0,027cd	0,090±0,027bcd	0,088±0,026cd	0,087±0,026cd

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

27, 28 e 29; TABELAS 5, 6,7 e 8).

4.3.2.2.1.- Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de TMV nativo testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado

A cinética de síntese de anticorpos específicos mostrou títulos de ELISA* com absorvância variando entre 0,250 e 0,350. Como controle foi utilizado o soro pré-imune que teve valores de absorvância em torno de 0,1 (FIGURA 30).

4.3.2.2.2 - Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de TMV nativo testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de *N. benthamiana* infetada com o TMV

A cinética de síntese de anticorpos específicos mostrou títulos de ELISA* com absorvância variando entre 0,200 e 0,250. Como controle foi utilizado o soro pré-imune que teve valores de absorvância em torno de 0,1 (FIGURA 31).

4.3.2.2.3 - Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de TMV termo-inativado testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de *N. benthamiana* infetada com o TMV

Não se observou síntese de anticorpos específicos nos animais imunizados com TMV termo-inativado e os valores de absorvância variaram entre 0,80 e 0,120. Como controle foi utilizado o soro pré-imune com absorvância atingindo valores em torno de 0,1 (FIGURA 31).

4.3.2.2 4 -Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de TMV termo-inativado testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de *N. benthamiana* infetada com o TMV

Não se observou síntese de anticorpos específicos nos animais

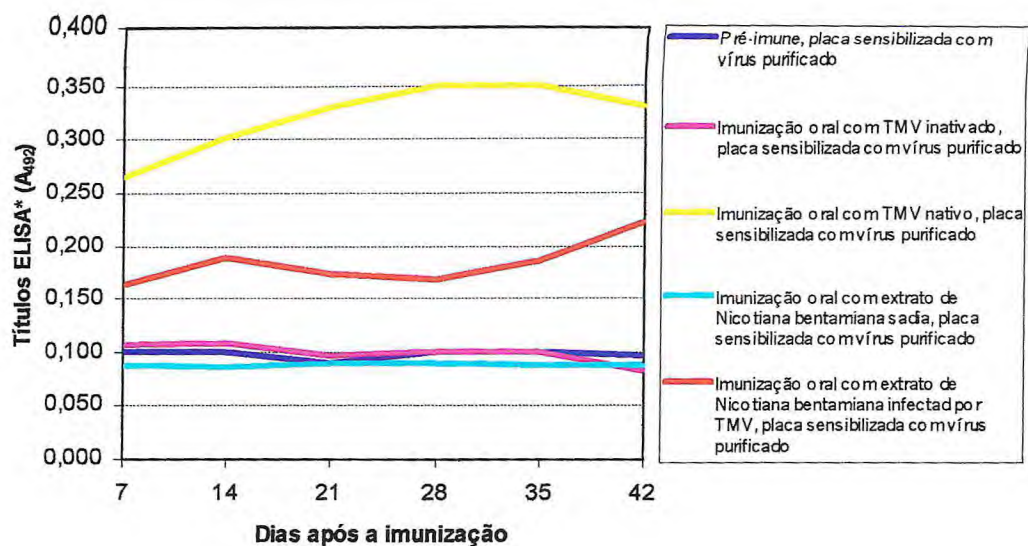


FIGURA 30 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com: TMV nativo e inativado, com extrato de *Nicotiana benthamiana* sadia e infectada por TMV, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado.

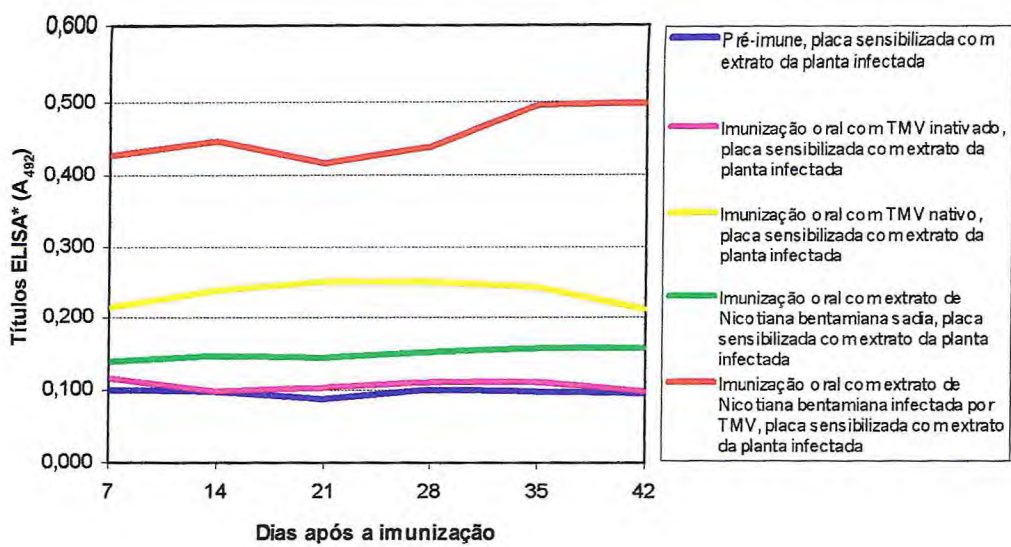


FIGURA 31 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com: TMV nativo e inativado, com extrato de *Nicotiana benthamiana* sadia e infectada por TMV, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada.

imunizados com TMV termo-inativado e os valores de absorvância variaram entre 0,090 e 0,120. Como controle foi utilizado o soro pré-imune que teve valores de absorvância em torno de 0,1 (FIGURA 31).

4.3.2.2.5 - Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de extrato foliar infectado com TMV testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado

Observou-se síntese de anticorpos específicos nos animais imunizados com extrato foliar infectado com TMV, cujos títulos de ELISA* tiveram uma variação entre 0,150 e 0,200 quando estes resultados foram comparados com os títulos de ELISA* com absorvância em torno de 0,080 dos animais imunizados com extrato foliar sadio, que foi inferior ao controle, com títulos de ELISA* em torno de 0,1 (FIGURA 30).

4.3.2.2.6 - Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de extrato foliar infectado com TMV testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de *N. benthamiana* infectada com o TMV

Observou-se síntese de anticorpos específicos nos animais imunizados com extrato foliar infectado com TMV, cujos títulos ELISA* tiveram uma variação de absorvância entre 0,400 e 0,500 quando estes resultados foram comparados com os títulos de ELISA* com absorvância variando em torno de 0,140 e 0,160 dos animais imunizados com extrato foliar sadio, que foi inferior ao controle, com valores de absorvância variando em torno de 0,1 (FIGURA 31).

4.3.2.2.7 - Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de extrato foliar sadio de *N. benthamiana* testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado

Não se observou síntese de anticorpos específicos e os valores de absorvância foram inferiores 0,1 (FIGURA 30).

4.3.2.2.8 - Imunização por via oral: com 1 mg (10 doses de 100 µg) de extrato foliar sadio de *N.benthamiana* testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de *N. benthamiana* infetada com TMV

Não se observou síntese de anticorpos específicos contra extrato foliar sadio de *N.benthamiana* que apresentou valores de absorvância entre 0,140 e 0,160, próximos ao controle que teve valores de absorvância em torno de 0,1. Esses resultados foram aproximadamente 3 vezes inferiores quando comparados com os títulos ELISA*, com absorvância variando em torno de 0,400 e 0,500, nos animais imunizados com extrato foliar infetado, que foram bem superiores ao controle.(FIGURA 31).

4.3.2.3 - As respostas imunes ao TMV purificado, ministrados por via nasal foram testados com placas sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com o extrato de plantas sadias (FIGURA 32; TABELA 9).

4.3.2.3.1 - Imunização Nasal: com 100µg (10 doses de 10 µg) de TMV testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado

Observou-se síntese de anticorpos específicos demonstrada através dos títulos de ELISA* a partir do 14 dias após a imunização e que ficaram em torno de 0,250. Estes resultados foram comparados com o controle. Os valores da absorvância do controle foram em torno de 0,1 (FIGURA 33; TABELA 9).

4.3.2.3.2 - Imunização Nasal: com 100 µg de TMV testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato da planta de *N. benthamiana* infetada com o TMV

Observou-se síntese de anticorpos específicos mostrados através de títulos ELISA* que tiveram absorvâncias com valores próximos de 0,250. Estes

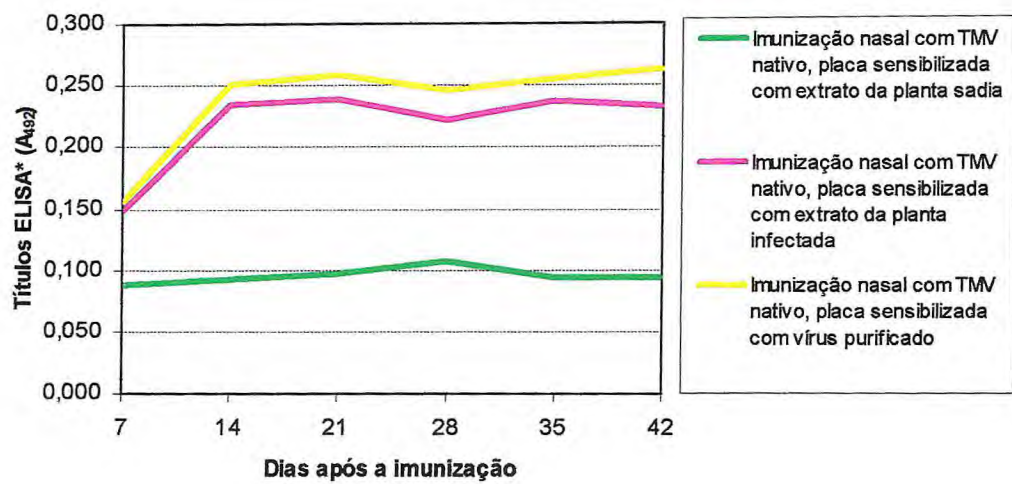


FIGURA 32 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com TMV de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

TABELA 9 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via nasal com TMV nativo.

Anti-soro	Via	Sensibilização da placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
TMV Nativo	Nasal	EP.Sadia	0,088±0,015d	0,092±0,015d	0,097±0,020d	0,106±0,019cd	0,093±0,023d	0,094±0,022d
		EP.Infectada	0,147±0,052bc	0,233±0,070a	0,238±0,067a	0,222±0,066a	0,236±0,065a	0,233±0,067 ^a
		Vírus purificado	0,155±0,055b	0,250±0,073a	0,258±0,068a	0,246±0,067a	0,255±0,067a	0,263±0,068 ^a

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

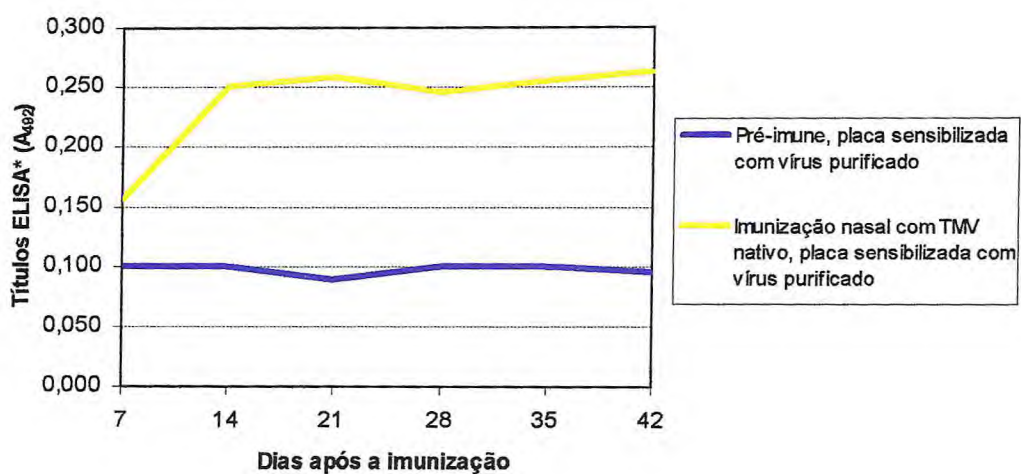


FIGURA 33 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com TMV, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado

resultados foram comparados com o controle. Os títulos ELISA* do controle tiveram absorvância em torno de 0,1 (FIGURA 34).

4.3.2.4 - Comparação das respostas imunes induzidas pelo TMV pelas vias oral e nasal

As respostas imunes de camundongos imunizados pelas vias oral e nasal testadas com placas sensibilizadas com vírus purificado foram mais elevadas que as respostas testadas com a placa sensibilizada com extrato de planta infetada. Não houve diferença da resposta imune quando os animais foram imunizados pela via nasal e testados com as placas sensibilizadas com vírus puro e extrato de planta infetada. A resposta por via oral com TMV com placa sensibilizada com vírus puro foi mais elevada que as demais (FIGURA 35).

4.3.2.5 - Imunizações com CMV

4.3.2.5.1 - As respostas imunes ao CMV purificado (nativo e termo-inativado) ministrado por via oral foram testados com o uso das placas sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com o extrato de plantas sadias (FIGURAS 36 e 37; TABELAS 10 e 11)

4.3.2.5.1.1 - Imunização oral: com 1mg de CMV nativo (10 doses de 100 µg), testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado

A cinética de síntese de anticorpos específicos demonstrou elevada especificidade para o CMV com títulos de ELISA* em torno de 1,0. Os títulos de ELISA* foram nove vezes maiores quando foram comparados com os títulos de ELISA* dos animais que foram imunizados pela via oral com o vírus inativado (FIGURA 38).

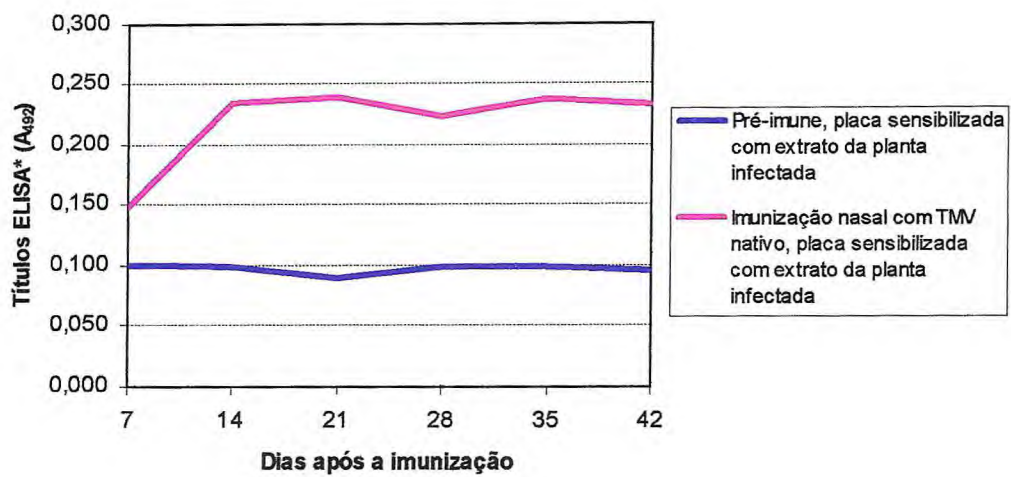


FIGURA 34 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com TMV, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada

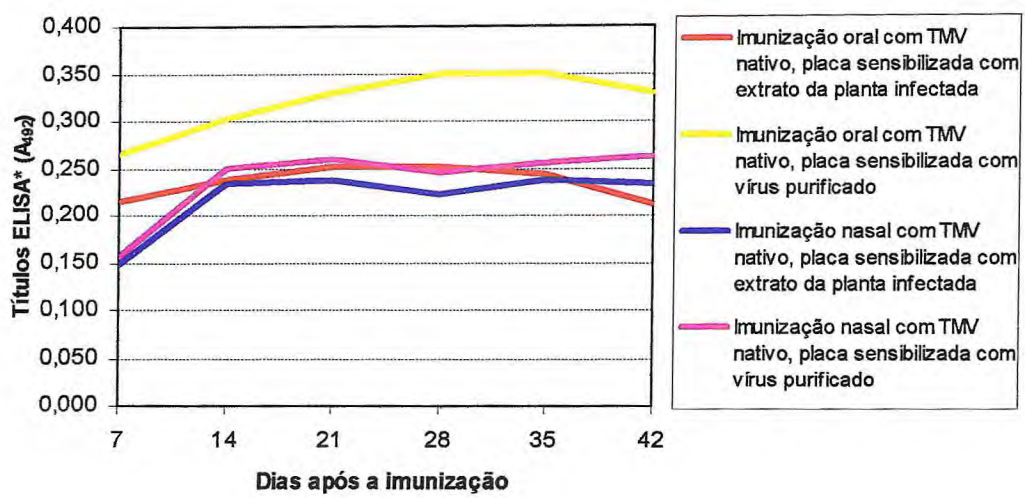


FIGURA 35 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral e nasal com TMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

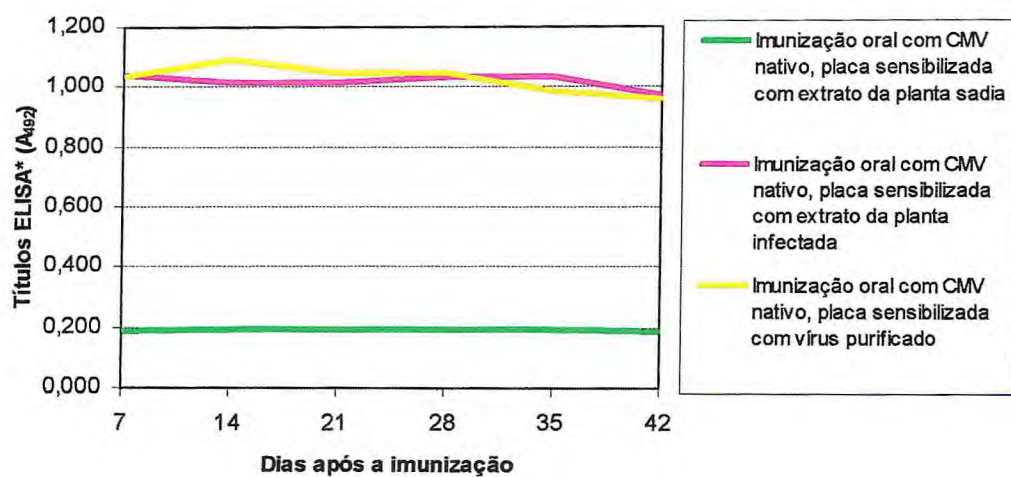


FIGURA 36 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

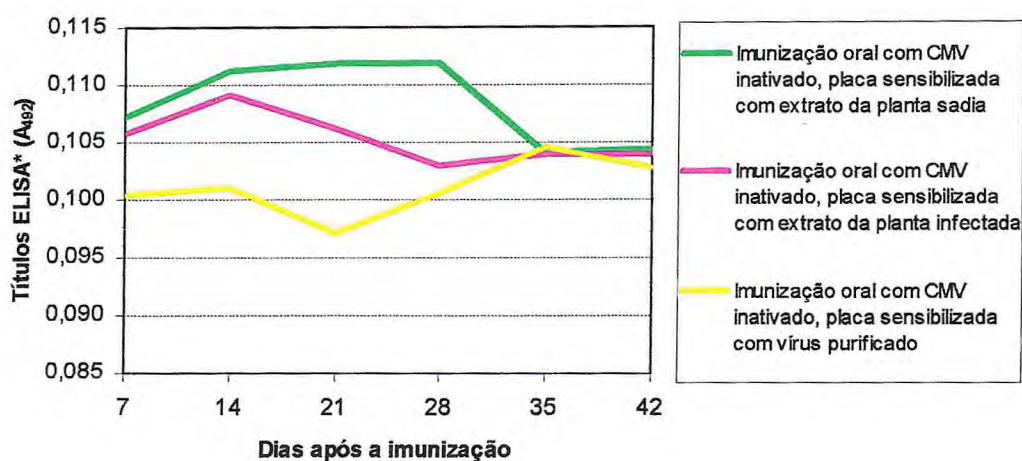


FIGURA 37 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CMV inativado de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

TABELA 10 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com CMV nativo.

Anti-soro	Via	Sensibilização da placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
CMV Nativo	Oral	EPSadia	0,186 ± 0,036c	0,194 ± 0,045c	0,191 ± 0,057c	0,192 ± 0,061c	0,189 ± 0,043c	0,184 ± 0,047c
		EPInfectada	1,038±0,411ab	1,017± 0,395ab	1,012±0,367ab	1,036±0,430ab	1,034±0,427ab	0,970±0,369ab
		Vírus purificado	1,033±0,366ab	1,087± 0,396a	1,046±0,392ab	1,044±0,405ab	0,985±0,381b	0,961± 0,362b

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

TABELA 11 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com CMV inativado sem adjuvante.

Anti-soro	Via	Sensibilização da placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
CMV Inativado	Oral	EPSadia	0,107 ± 0,026	0,111 ± 0,026	0,112 ± 0,027	0,112 ± 0,027	0,104 ± 0,025	0,104 ± 0,024
		EPInfectada	0,106 ± 0,024	0,109 ± 0,025	0,106 ± 0,026	0,103 ± 0,025	0,104 ± 0,026	0,104 ± 0,024
		Vírus purificado	0,100 ± 0,021	0,101 ± 0,023	0,097 ± 0,023	0,100 ± 0,019	0,104 ± 0,022	0,103 ± 0,022

Não houve diferença significativa entre as médias

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

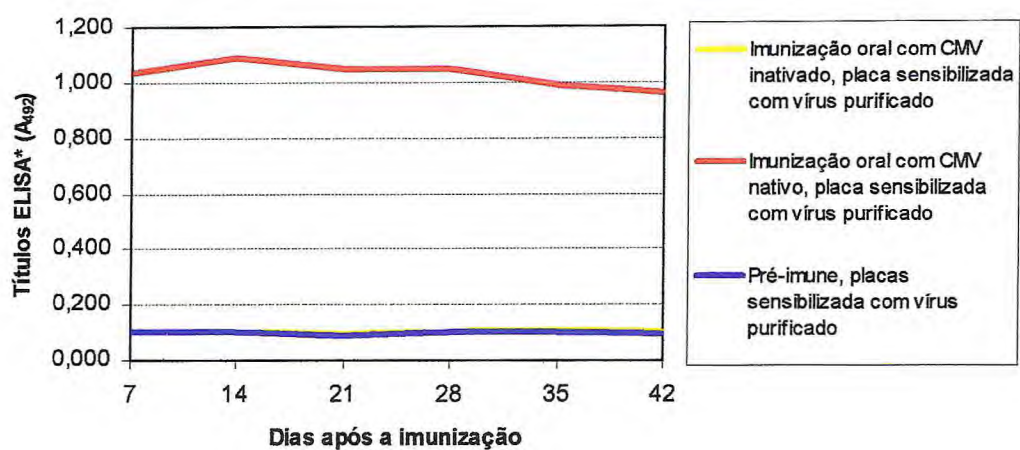


FIGURA 38 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CMV nativo e inativado, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado.

4.3.2.5.1.2 - Imunização oral: com 1mg de CMV nativo (10 doses de 100 µg), testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato de *C. pepo* infetada com CMV

A cinética de síntese de anticorpos específicos demonstrou elevada especificidade para o CMV revelando títulos de ELISA* com absorvância em torno de 1,0. Os títulos ELISA* foram, aproximadamente, oito vezes maiores quando foram comparados com os títulos de ELISA* dos animais que foram imunizados oralmente com o vírus inativado (FIGURA 39).

4.3.2.5.1.3 - Imunização oral: com 1mg de CMV termo-inativo testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado

Não se observou síntese de anticorpos específicos e os valores de absorvância variaram entre 0,95 e 0,105. Como controle foi utilizado o soro pré-imune que teve valores de absorvância em torno de 0,1 (FIGURA 38).

4.3.2.5.1.4 - Imunização oral: com 1mg de CMV termo-inativo testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato de *C. pepo* infetada com CMV

Não se observou síntese de anticorpos específicos nos animais imunizados com CMV termo-inativado e os valores de absorvância variaram entre 0,100 e 0,110. Como controle foi utilizado o soro pré-imune que teve valores de absorvância em torno de 0,1 (FIGURA 39).

4.3.2.5.2 - As respostas imunes ao CMV purificado (nativo e termo-inativado), ministrados por via nasal foram testadas com placas sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com o extrato de plantas sadias (FIGURA 40).

4.3.2.5.2.1 - Imunização nasal: com 100 µg de CMV testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado

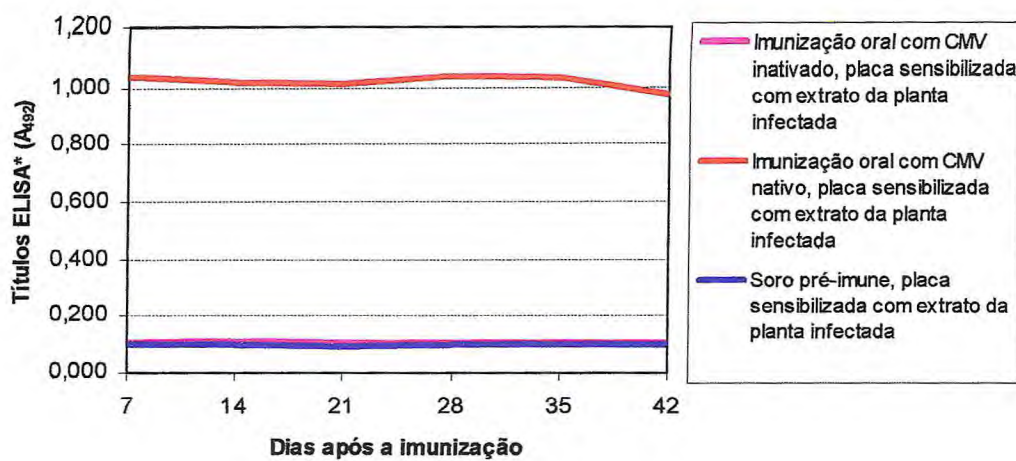


FIGURA 39 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CMV nativo e inativado, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada.

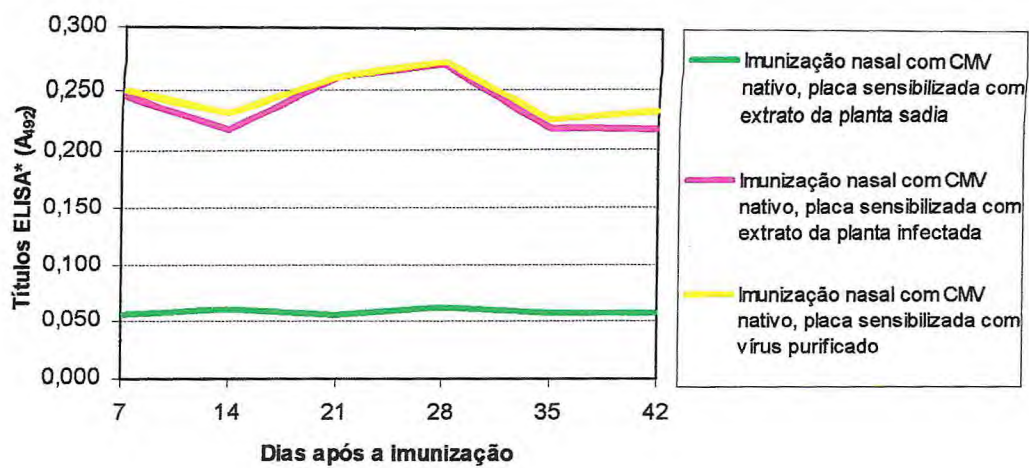


FIGURA 40 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com CMV de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

A cinética de síntese de anticorpos específicos mostrou a produção de anticorpos específicos contra o CMV. Como controle foi utilizado o soro pré-ímune, que teve valores de absorvância em torno de 0,1 (FIGURA 41; TABELA 12)

4.3.2.5.2 - Imunização nasal: com 100 µg de CMV testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato de *C. pepo* infetada com CMV

A cinética de síntese de anticorpos específicos revelou a produção desses anticorpos. Como controle foi utilizado o soro pré-ímune com valores de absorvância em torno de 0,1 (FIGURA 42).

4.3.2.5.3 - Comparação das respostas imunes induzidas pelo CMV ministrado pelas vias oral e nasal testadas em placa de ELISA sensibilizada com CMV purificado

As respostas imunes de camundongos imunizados pela via oral foram superiores às respostas por via nasal e não houve diferença com relação ao tipo de sensibilização da placa. (FIGURA 43).

4.3.2.6 - Imunizações com SqMV

4.3.2.6.1 - As respostas imunes ao SqMV purificado (nativo e termo-inativado) ministrados por via oral foram testados com placas de ELISA sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com o extrato de plantas sadias (FIGURAS 44 e 45; TABELAS 13 e 14).

4.3.2.6.1.1 - Imunização oral: com 1mg (10 doses de 100 µg) de SqMV nativo testada em placas de ELISA sensibilizada com vírus purificado

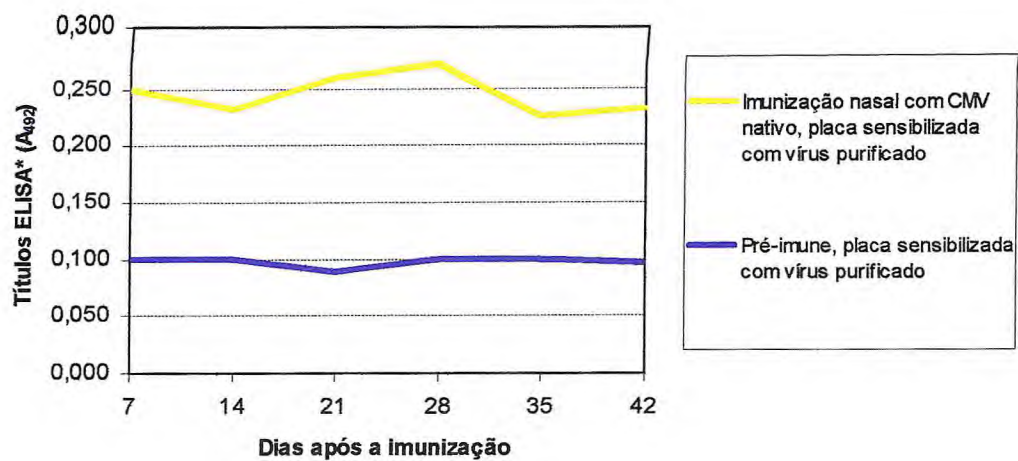


FIGURA 41 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com CMV, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado.

TABELA 12 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via nasal com CMV nativo.

Anti-soro	Via	Sensibilização da placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
CMV Nativo	Nasal	EPSadia	0,055±0,008 b	0,060±0,007b	0,056±0,005b	0,062±0,005b	0,057±0,008b	0,057±0,010b
		EPInfectada	0,246±0,73a	0,218±0,078a	0,259±0,059a	0,269±0,084a	0,218±0,065a	0,217±0,064a
		Vírus purificado	0,249±0,078a	0,232±0,080a	0,259±0,062a	0,271±0,076a	0,225±0,067a	0,231±0,065a

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

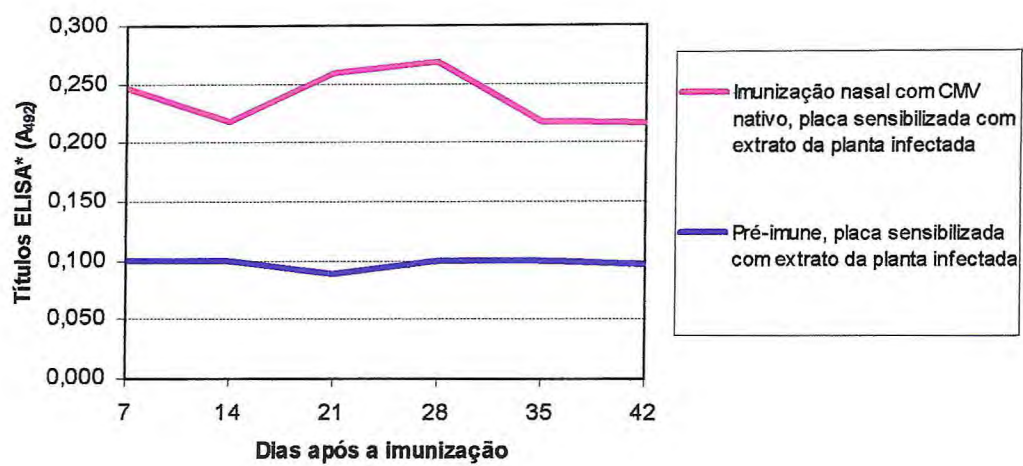


FIGURA 42 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com CMV, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada.

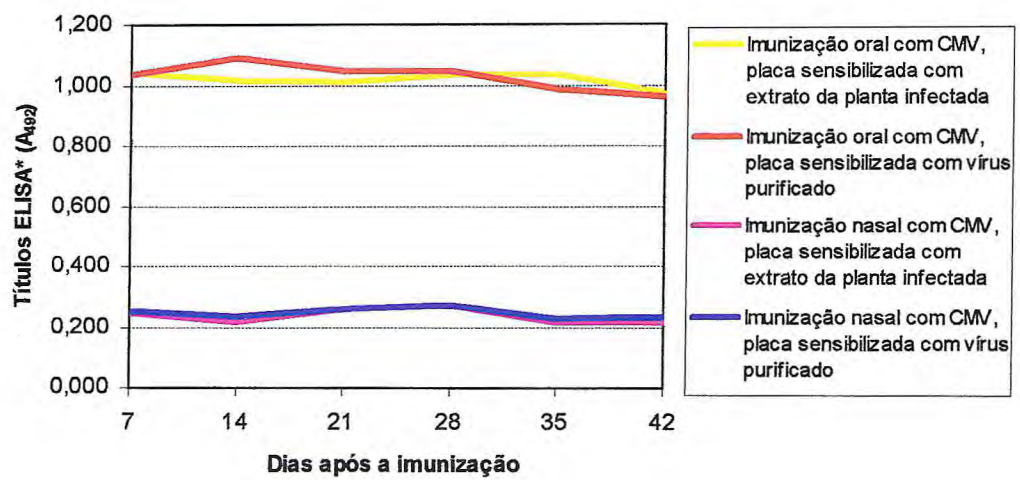


FIGURA 43 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral e nasal com CMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

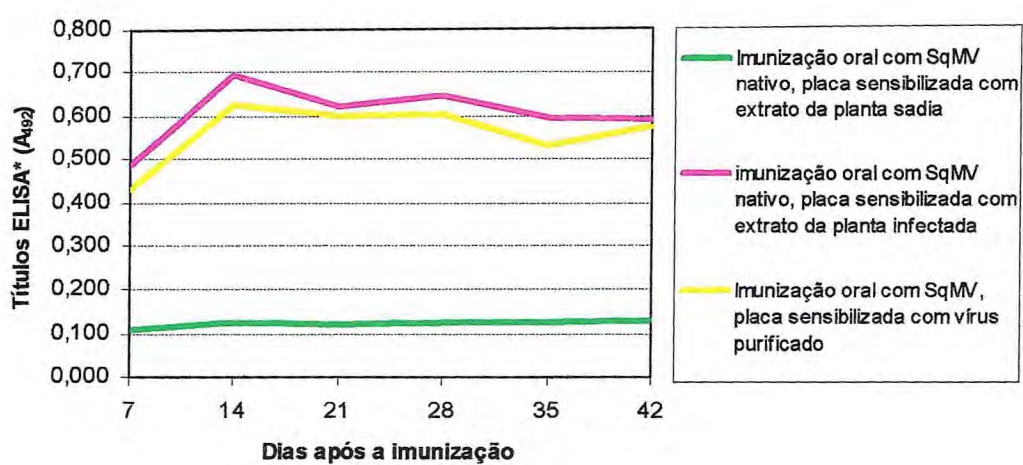


FIGURA 44 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com SqMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

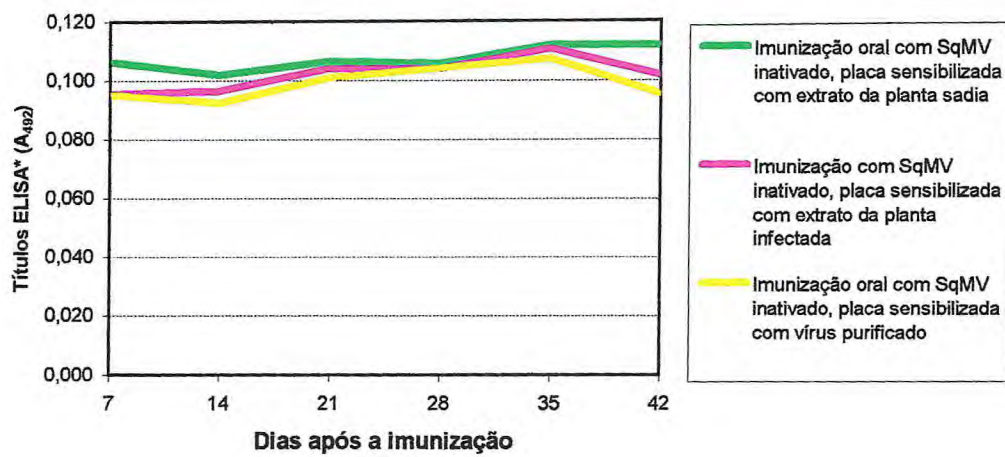


FIGURA 45 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com SqMV inativado de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

TABELA 13 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com SqMV nativo.

Anti-soro	Via	Sensibilização placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
SqMV Nativo	Oral	EPSadia	0,107±0,013e	0,122±0,019e	0,122±0,022e	0,123±0,021e	0,125±0,011e	0,128±0,018e
		EPIfectada	0,427±0,118d	0,626±0,187ab	0,598±0,155abc	0,604±0,171ab	0,529±0,156bc	0,574±0,173abc
		Vírus purificado	0,483±0,160cd	0,692±0,216a	0,622±0,168a	0,647±0,182ab	0,593±0,169abc	0,592±0,188abc

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

TABELA 14 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com SqMV inativado.

Anti-soro	Via	Sensibilização placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
SqMV Inativado	Oral	EPSadia	0,106±0,023	0,102±0,022	0,106±0,026	0,106±0,027	0,112±0,028	0,112±0,035
		EPInfectada	0,095±0,017	0,096±0,019	0,104±0,023	0,104±0,025	0,111±0,029	0,102±0,028
		Vírus purificado	0,095±0,022	0,092±0,021	0,101±0,017	0,104±0,024	0,107±0,026	0,095±0,022

Não houve diferença significativa entre as médias

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

A cinética de síntese de anticorpos específicos demonstrou elevada especificidade para o SqMVe os títulos de ELISA* apresentaram absorvância variando de 0,500 a 0,700. Estes títulos foram, aproximadamente, 4 a 6 vezes maiores quando foram comparados com os dos animais que foram imunizados com o vírus inativado (FIGURA 46).

4.3.2.6.1.2 - Imunização oral: com 1mg de SqMV nativo testado em placa de ELISA sensibilizada com extrato de *C melo* híbrido 'Hi Mark' infetada

A cinética de síntese de anticorpos específicos demonstrou elevada especificidade para o SqMV, e os títulos de ELISA* apresentaram absorvância variando em torno de 0,400 a 0,600. Esses títulos de ELISA* foram, aproximadamente, 4 vezes maiores quando comparados com os obtidos por sensibilização de animais imunizados com o vírus inativado (FIGURA 47).

4.3.2.6.1.3 - Imunização oral: com 1mg (10 doses de 100 µg) de SqMV termo-inativado, testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado

Não se observou síntese de anticorpos específicos nos animais imunizados com SqMV termo-inativado e os valores de absorvância variaram entre 0,080 e 0,120. Como controle foi utilizado o soro pré-imune que mostraram valores de absorvância em torno de 0,1 (FIGURA 48).

4.3.2.6.1.4 - Imunização oral: com 1mg (10 doses de 100 µg) de SqMV termo-inativado, testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato de *C melo* híbrido 'Hi Mark' infetada

Não se observou síntese de anticorpos específicos e os valores de absorvância variaram entre 0,080 e 0,120. Como controle foi utilizado o soro pré-imune que mostraram valores de absorvância em torno de 0,1 (FIGURA 47).

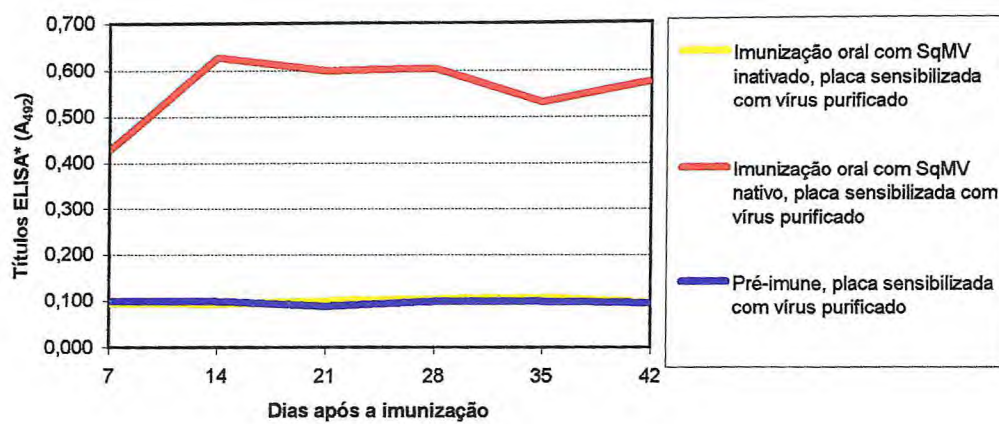


FIGURA 46 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com SqMV nativo e inativado, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado.

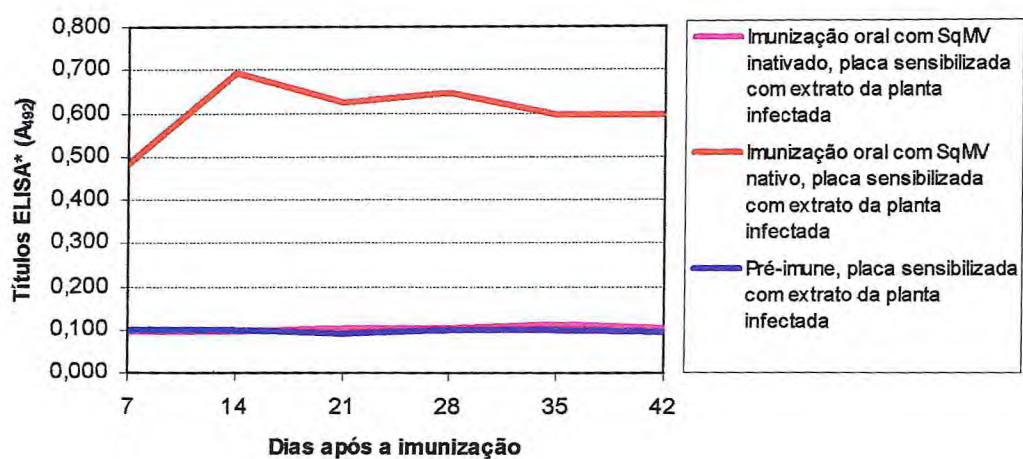


FIGURA 47 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com SqMV nativo e inativado, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada.

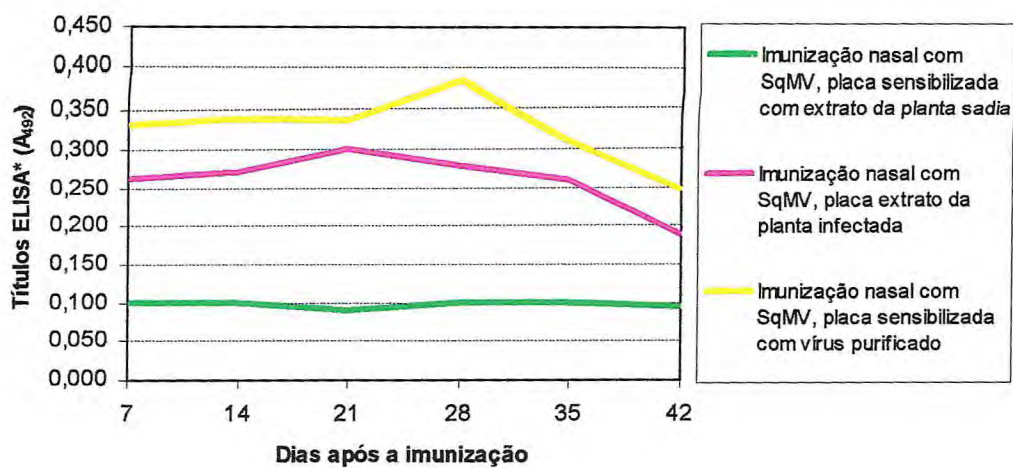


FIGURA 48 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com SqMV de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

4.3.2.6.2 - As respostas imunes ao SqMV purificado nativo ministrado por via nasal, foram testadas em placas de ELISA sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com o extrato de plantas sadias (FIGURAS 48; TABELA 15).

4.3.2.6.2.1 - Imunização nasal: com 100µg de SqMV testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado

A cinética de síntese de anticorpos específicos mostrou títulos de ELISA* com absorvância variando entre 0,250 e 0,400. Como controle foi utilizado o soro pré-imune cujos valores de absorvância ficaram em torno de 0,1 (FIGURA 49).

4.3.2.6.2.2 - Imunização nasal: com 100µg de SqMV testada em placa de ELISA placa sensibilizada com extrato de *C melo* híbrido 'Hi Mark' infetada

A cinética de síntese de anticorpos específicos revelou títulos de ELISA* com absorvância variando entre 0,200 e 0,300. Como controle foi utilizado o soro pré-imune cujos valores em absorvância ficaram em torno de 0,1 (FIGURA 50).

4.3.2.6.3 - Comparação das respostas imunes induzidas pelo SqMV ministrado pelas vias oral e nasal testada com placas de ELISA sensibilizadas com sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas.

As respostas imunes de camundongos imunizados pela via oral foram superiores às respostas por via nasal e não houve diferença com o tipo de sensibilização da placa (FIGURA 51).

4.3.2.7 - Imunizações com CABMV

TABELA 15 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via nasal com SqMV nativo.

Anti-soro	Via	Sensibilização placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
SqMV Nativo	Nasal	EPSadia	0,100±0,018d	0,099±0,014d	0,089±0,023d	0,099±0,024d	0,099±0,025d	0,096±0,025d
		EPInfectada	0,261±0,088bc	0,271±0,081bc	0,300±0,088ab	0,279±0,089ab	0,258±0,088bc	0,189±0,076c
		Vírus purificado	0,331±0,133ab	0,338±0,099ab	0,335±0,110ab	0,381±0,114a	0,310±0,085ab	0,246±0,081bc

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

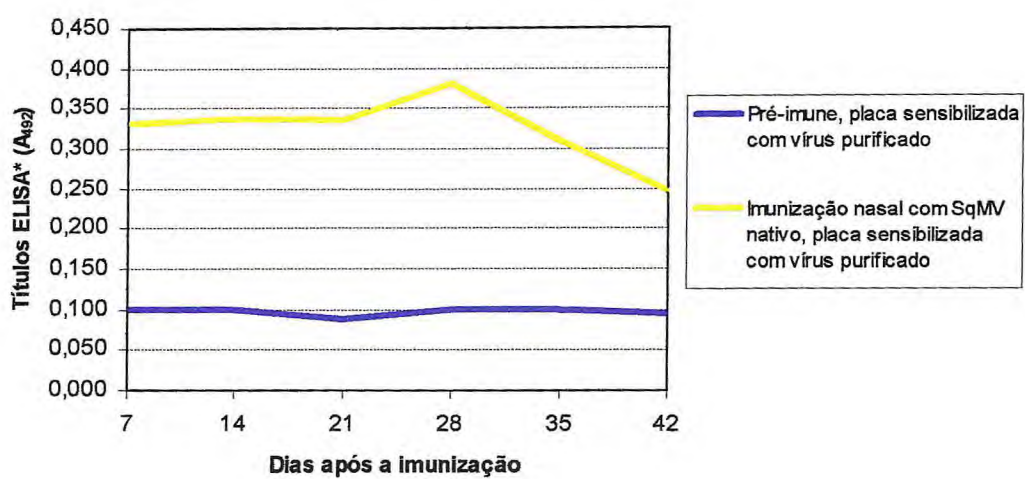


FIGURA 49 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com SqMV, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado.

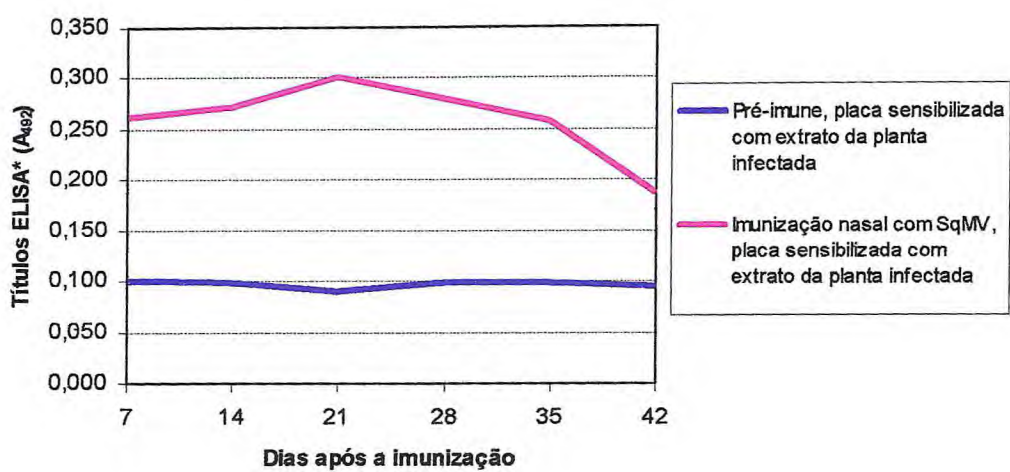


FIGURA 50 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via nasal com SqMV, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada.

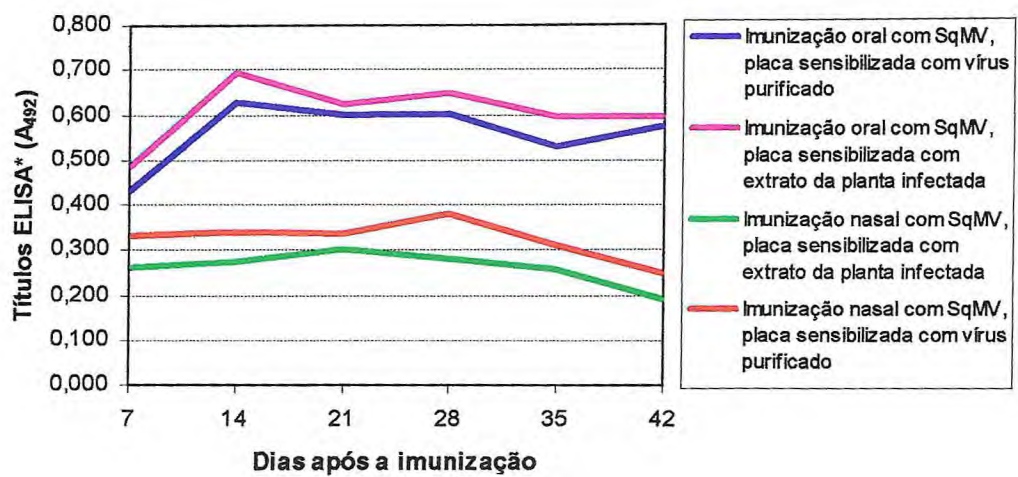


FIGURA 51 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral e nasal com SqMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

4.3.2.7.1 - As respostas imunes ao CABMV purificado ministrado por via oral foram testadas com placas de ELISA sensibilizadas com vírus purificado, com extrato de plantas infetadas e com o extrato de plantas sadias (FIGURAS 52; TABELA 16).

4.3.2.7.1.1 - Imunização oral: com 0,5 mg (10 doses de 50 µg) de CABMV nativo, testada em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado

Não se observou síntese de anticorpos específicos nos animais imunizados com CABMV e os valores de absorvância variaram entre 0,070 e 0,080. Como controle foi utilizado o soro pré-imune com valores de absorvância em torno de 0,090 (FIGURA 53).

4.3.2.7.1.2 - Imunização oral: com 0,5 mg (10 doses de 50 µg) de CABMV nativo testada em placa de ELISA sensibilizada com extrato de *V. unguiculata* infetada

Não se observou síntese de anticorpos específicos nos animais imunizados com CABMV e os valores de absorvância variaram entre 0,070 e 0,080. Como controle foi utilizado o soro pré-imune com valores de absorvância em torno de 0,090 (FIGURA 54).

4.3.2.8 - Comparações das respostas imunes induzidas pelo: TMV, CMV, SqMV e CABMV pela via oral, testadas com placas de ELISA sensibilizadas com cada vírus purificado e com os extratos de plantas infetada por cada vírus.

As melhores respostas imunes de camundongos imunizados pela via oral, comparando-se todos os vírus, foram obtidas com os animais que receberam o CMV, tanto com a placa sensibilizada com extrato da planta infetada quanto com a placa sensibilizada com o vírus purificado. O SqMV, testado com placa sensibilizada com vírus purificado e com extrato da planta infetada, apesar de ter sido inferior ao CMV foi praticamente duas vezes maior

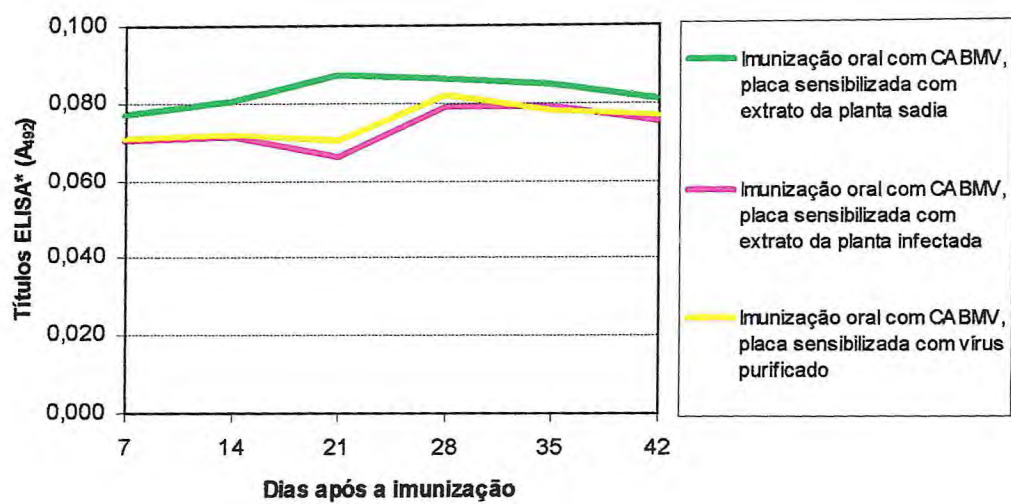


FIGURA 52 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CABMV nativo de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

TABELA 16 - Resposta imunológica humoral de camundongos 'Swiss' imunizados por via oral com CABMV nativo.

Anti-soro	Via	Sensibilização placa	Títulos de anticorpos					
			Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
CABMV nativo	Oral	EPSadia	0,077±0,0150abcde	0,081±0,014abcd	0,087±0,008a	0,086±0,011ab	0,085±0,015abc	0,081±0,015abcd
		EPInfectada	0,070±0,012de	0,071±0,012de	0,066±0,012e	0,079±0,010abcd	0,079±0,016abcd	0,075±0,015cde
		Vírus purificado	0,071±0,012de	0,072±0,013cde	0,070±0,013de	0,082±0,011abcd	0,078±0,013abcd	0,076±0,013bcde

Letras diferentes representam valores que são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de FRIEDMAN, comparados simultaneamente os tipos de sensibilização da placa e os dias de coletas de soro.

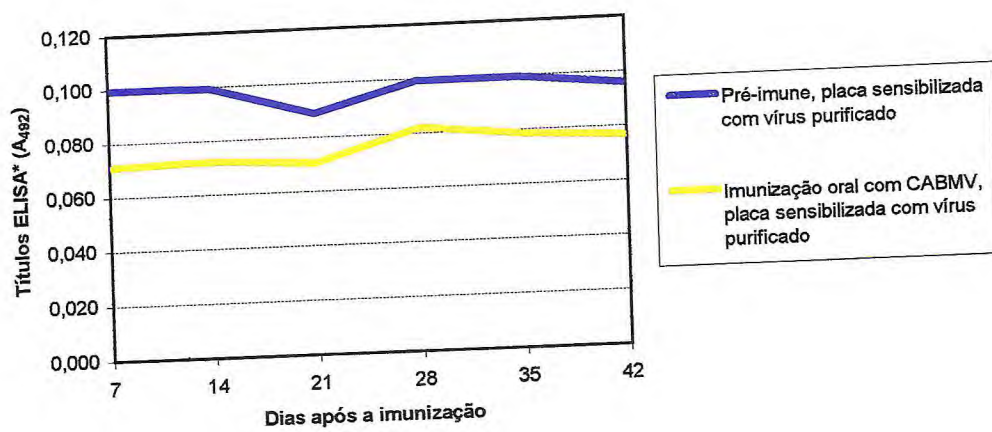


FIGURA 53 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CABMV nativo, através de placas sensibilizadas com o vírus purificado.

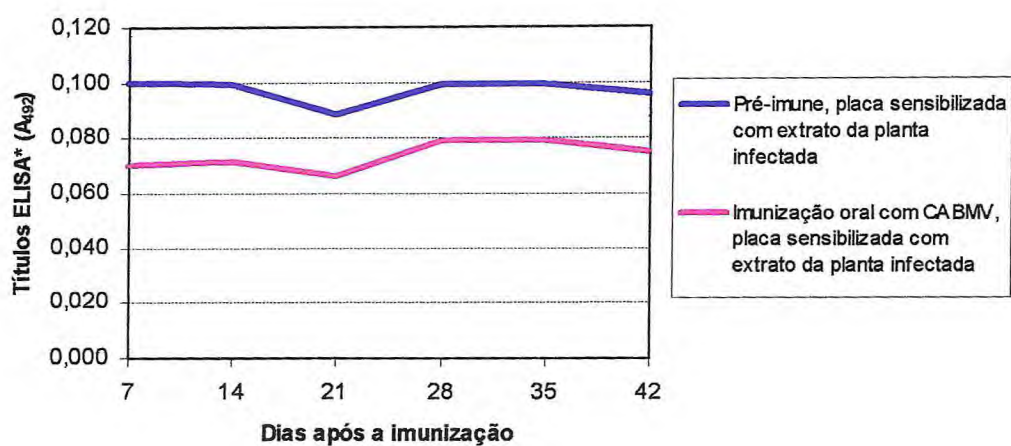


FIGURA 54 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com CABMV nativo, através de placas sensibilizadas com o extrato da planta infectada.

que o TMV. O TMV apresentou os menores valores de títulos de ELISA*. O CABMV não foi capaz de estimular resposta imune nos camundongos e por isso não foi incluído na comparação (FIGURA 55).

4.3.2.9 - Comparações das respostas imunes induzidas pelo: TMV, CMV, SqMV e CABMV pela via nasal, testadas com placas de ELISA sensibilizadas com cada vírus purificado e com os extratos de plantas infetada com cada vírus.

As melhores respostas imunes de camundongos imunizados pela via nasal, comparando-se todos os vírus, foram obtidas com os animais que receberam o SqMV, testadas tanto com a placa sensibilizada com o vírus purificado quanto com a placa sensibilizada com extrato da planta infetada. Os títulos de ELISA* do SqMV testados com placa sensibilizada com o vírus purificado foram maiores, que os testados com placa sensibilizada com extrato de planta infetada. A resposta ao CMV, testada com placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado e com extrato da planta infetada, apesar de ter sido inferior ao SqMV, teve inicialmente títulos de ELISA* um pouco superior ao TMV até 14 dias após o final da imunização. A partir daí a comparação das respostas imunes entre os dois vírus (CMV e TMV) mostrou respostas praticamente iguais (FIGURA 56).

4.3.3 - Avaliação da Resposta Imunológica IgE Específica em camundongos imunizados pela via subcutânea com TMV purificado (sem ou com adjuvante) e com extrato de *N. benthamiana* sadia ou infetada com TMV e imunizados pela via oral com os vírus purificados: TMV, CMV e SqMV.

Não foi observada síntese de IgE específica em camundongos imunizados por nenhuma das duas vias, seja com extrato de *N. benthamiana* infetada com TMV e TMV purificado pela via subcutânea ou com TMV, CMV e SqMV purificados pela via oral.

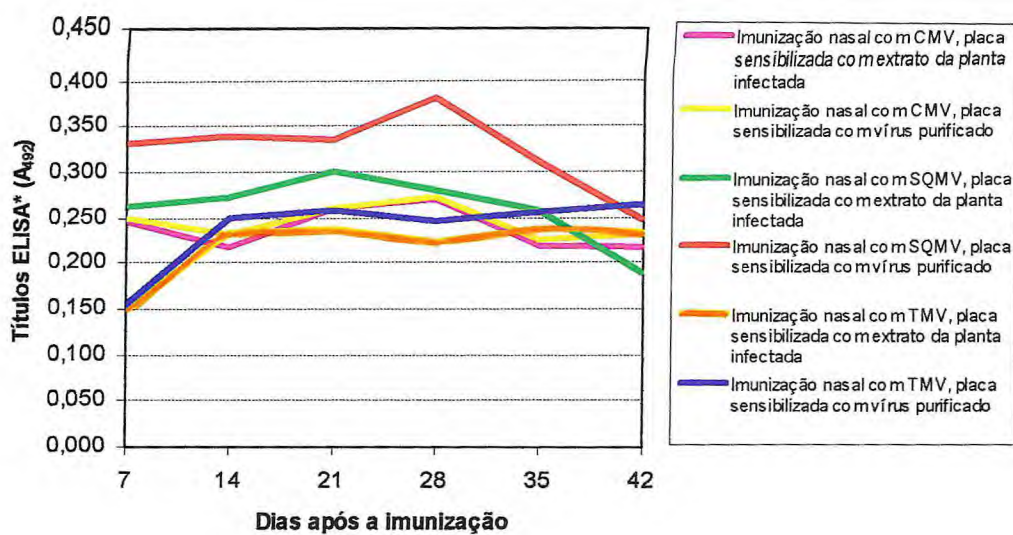


FIGURA 55 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com os vírus: TMV, CMV, SqMV e CABMV nativos de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

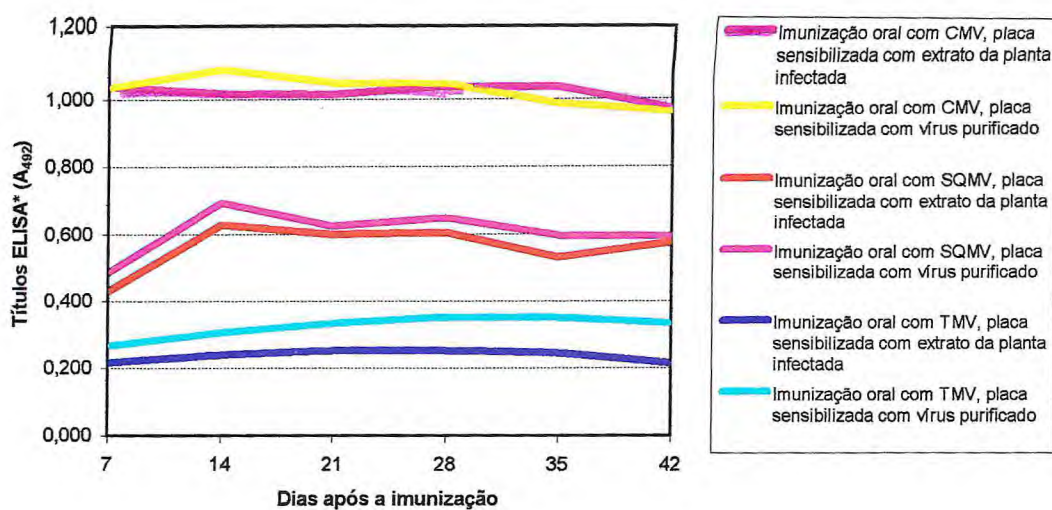


FIGURA 56 - Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados por via oral com os vírus: TMV, CMV e SqMV nativos de acordo com o tipo de sensibilização da placa.

5 – DISCUSSÃO

5.1 - A Infecção Por TMV e a Caracterização das Proteínas do Capsídeo Viral

O TMV ocasionou sintomas sistêmicos caracterizados por mosaico severo, necroses e murcha quando inoculado mecanicamente em folhas de *N. benthamiana*, em apenas quatro a cinco dias após a inoculação (FIGURA 1A), indicando alta concentração viral, que após três ou quatro dias leva à morte da planta. Observou-se grande diferença quando a mesma é comparada com as folhas da planta sadia (FIGURA 1B). O fato dessa hospedeira com apenas quatro a cinco dias de inoculada ter permitido uma boa purificação do vírus não é de comum de ocorrência. Segundo Lima & Chagas (1974), fumo e tomateiro inoculadas com o TMV levam aproximadamente 15-18 dias para que o vírus atinja uma boa concentração que possibilite sua purificação. Outras espécies vegetais inoculadas com outros vírus levam, em média, 17 dias após inoculação para possibilitarem uma purificação com alta concentração viral (Bezerra *et al.*, 1985). Este fato foi também confirmado com os demais vírus utilizados nesse trabalho, como o CMV em *C. pepo*, SqMV em *C. melo* e CABMV em *V unguiculata*, os quais levaram 15 a 18 dias, após a inoculação para manifestarem sintomas sistêmicos e possibilitarem uma purificação com adequada concentração viral.

A suspensão purificada do TMV, obtida através do método de purificação adotado, mostrou um espectro de absorção ultravioleta, típico de vírus em bastonete (morfologia cilíndrica alongada), com as relações de absorção entre 260 e 280 nm ($A_{260}/A_{280} = 1,23$) e a razão da absorção máxima pela mínima (A_{max}/A_{min}) foi de 1,10 (FIGURA 5). A suspensão viral apresentou-se homogênea e límpida, o que sugere a eficiência do método utilizado para a purificação do mesmo vírus. A concentração do vírus na suspensão, estimada pelo teor de proteína no espectrofotômetro, foi de 3,56 mg/mL (FIGURA 5), sendo um pouco maior que os 3,3 mg/mL já obtidos por

LIMA & Chagas (1974) em processo de purificação do mesmo vírus. Esse melhor rendimento pode, provavelmente, ser explicado pelo uso de hospedeira diferente, *N. tabacum* ao invés de *N. benthamiana*, no processo de purificação.

O perfil eletroforético da suspensão purificada de TMV apresentou a migração de apenas uma banda protéica de massa molecular estimada em 17 kDa (FIGURA 9). Esse resultado está de acordo com o descrito por Van Regenmortel *et al.* (2000). A suspensão viral mantida a 100°C por 10 min mostrou o mesmo perfil eletroforético, não demonstrando fragmentação da proteína do capsídeo viral. Porém, houve uma inativação do vírus, uma vez que não apareceu nenhuma lesão necrótica em folha de *C. amaranticolor* após este tratamento térmico (FIGURA 13). Os mesmos resultados foram também obtidos pelo CMV e SqMV, quando termo-inativados. Estes resultados sugerem que as estruturas tridimensionais do capsídeo viral dos vírus de plantas exercem um papel fundamental na preservação da integridade funcional dos ácidos nucleicos dos vírus que causam doenças nas plantas infectadas.

5.2 - Resposta Imunológica Induzida por TMV Ministrado pelas Vias: Subcutânea, Oral e Nasal

A resposta imunológica de camundongos imunizados com TMV pela via subcutânea foi avaliada qualitativamente por dupla difusão em Agar, usando os soros obtidos de animais imunizados com 100 µg de TMV sem e com Al(OH)₃, como adjuvante. Observou-se que os animais imunizados com TMV sem e com Al(OH)₃ tiveram resposta imune comprovada pela síntese de anticorpos específicos (FIGURA 14), revelando assim as atividades imunogênicas do vírus. A resposta imune dos camundongos imunizados com TMV foi detectada apenas quando foram usados como antígenos, na placa de Agar, o próprio TMV purificado e o extrato de plantas infectadas pelo mesmo. Nenhuma reação foi observada contra as proteínas da planta sadia (FIGURA 14). Não foi possível detectar nenhuma diferença de efeito exercida pelo adjuvante nos dois anti-soros testados, uma vez que eles foram utilizados nas mesmas condições, isto é, sem diluição e todos os antígenos na diluição 1:2.

Quantitativamente a resposta imunológica de camundongos

imunizados com TMV pela via subcutânea foi avaliada por ELISA. Essa avaliação mostrou a existência de síntese de anticorpos específicos anti-TMV, estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando o TMV foi inoculado com e sem o adjuvante, $Al(OH)_3$ (FIGURAS 18 e 19).

Não foram observadas diferenças entre as respostas imunes ao TMV para a imunização feita pela via subcutânea estando o vírus associado ou não a $Al(OH)_3$, quando a avaliação da síntese de anticorpos foi feita com a placa de ELISA sensibilizada com TMV purificado (FIGURA 20). Esses resultados *concordam* com o que já foi observado com o vírus do mosaico da alfafa (Alfafa mosaic vírus, AMV) recombinante, que não requereu o uso de adjuvante pela via intraperitoneal para uma efetiva imunização (Yusibov *et al.*, 1997). Contudo, a avaliação da resposta imunológica ao TMV em placa de ELISA sensibilizada com extrato foliar infetado mostrou um aumento no título em ELISA*, a partir do dia 28, em animais sensibilizados com o adjuvante $Al(OH)_3$ (FIGURA 21). Aparentemente, a explicação dessa variação não detectada quando a placa de ELISA foi sensibilizada com o vírus purificado (FIGURA 20), estaria na sensibilização da placa de ELISA com extrato foliar infetado, que conteria suficiente quantidade de antígeno (TMV), em uma faixa não saturante, como aparentemente foi o caso das placas sensibilizadas com vírus purificado, para detectar o aumento causado na resposta imune induzida pelo vírus administrado com adjuvante. No caso da sensibilização da placa com vírus puro, o antígeno já estaria em dose máxima o que não permitiu ver a distinção do efeito do adjuvante (FIGURA 20). Com esses resultados, detectados através das medidas de anticorpos, obtidos com placas de ELISA sensibilizadas com TMV purificado (FIGURA 20) e sensibilizadas com extrato foliar infectada (FIGURA 21), podemos sugerir que o efeito do adjuvante sobre a resposta imune induzida pelo TMV deve ser exaustivamente explorado para que se possa discriminar a ação do adjuvante, procurando estabelecer uma correlação com a dose do antígeno (TMV) usada na sensibilização da placa de ELISA. Esses dados adquirem relevância no caso do emprego de adjuvantes para estimular a resposta imune periférica, caso o TMV seja empregado como carreador de antígenos patogênicos. O argumento que os vírus de plantas prescindem do uso dos adjuvantes (Modelska *et al.*, 1998) deve ser

corretamente avaliado

Não houve síntese de anticorpos séricos anti-extrato foliar sadio quando o mesmo foi administrado em uma dose de 100 µg pela via subcutânea e testado com qualquer tipo de sensibilização da placa de ELISA (FIGURAS 23, 24 e 25), mostrando uma seletividade do vírus em induzir uma resposta imune quando essa resposta é comparada à das demais proteínas dos extratos foliares. Esse fato já havia sido observado em relação ao CPSMV (Florindo *et al.*, 2002). Quando o extrato foliar infectado foi usado para imunização dos animais na mesma dose que o extrato foliar não infectado (FIGURA 22), ocorreu uma resposta imune secundária, aos 21 dias, que foi mais fortemente detectada em placa sensibilizada com o extrato de planta infetada (FIGURA 25) do que com as placas sensibilizadas com TMV (FIGURA 24). A resposta imune manteve-se com os reforços dados nos dias 21 e 35. Pode ser especulado que, a maior intensidade da resposta imune detectada com as placas de ELISA sensibilizadas com o extrato foliar infectado estaria na ocorrência de uma resposta imune tanto para o capsídeo viral quanto para as três proteínas não estruturais codificadas pelo genoma do TMV, uma vez que não houve resposta dos anticorpos para os antígenos do extrato foliar sadio.

De acordo com os resultados apresentados, pode ser sugerido que quando da administração do extrato foliar infectado pelo TMV, para aumentar a resposta contra o capsídeo do vírus seria indicado o uso de adjuvante. Este dado confirma os achados de Wigdorovitz *et al.* (1999), que ministraram extrato foliar infectado com TMV recombinante expressando uma proteína imunogênica de FMDV (VP1) associado ao adjuvante completo e incompleto de Freund. Isso possibilitou inclusive a proteção dos animais, quando postos em contacto com FMDV virulento.

As respostas imunes, induzidas pelo vírus purificado nativo e pelo extrato foliar infetado ministrados pela via oral, revelaram síntese de anticorpos específicos estatisticamente significativo ($p < 0,05$) e não mostraram produção dos mesmos quando os animais foram imunizados com extrato foliar sadio e com vírus termo-inativado tanto em placa de ELISA sensibilizada com vírus purificado, quanto com a placa sensibilizada com extrato de planta infectada (FIGURAS 30 e 31). Os resultados positivos podem ser explicados pela

presença do TMV tanto na suspensão viral quanto no extrato foliar infectado. Já o fato do TMV termo-inativado não ter induzido produção de anticorpos sugere que as estruturas tridimensionais das proteínas do capsídeo viral, além de serem importantes na capacidade infectiva do mesmo, exerceram um papel fundamental na indução da produção de anticorpos nos camundongos.

As respostas imunes ao TMV nativo, ministrado por via nasal, estatisticamente significativo ($p < 0,05$), iniciaram a partir de 7 dias após a imunização, testadas tanto com placa de ELISA sensibilizada com extrato de *N. benthamiana* infectada com o TMV, quanto com a placa sensibilizada com o vírus purificado (FIGURAS 33 e 34).

Foram observadas diferenças nos resultados comparados entre a via oral e nasal (FIGURA 35) só com TMV purificado e testado somente com placa sensibilizada com vírus purificado, confirmando alguns estudos que têm demonstrado que a imunização pela via nasal é capaz de induzir uma resposta imune igual ou superior à resposta pela via oral (Brenan, *et al.*, 1999; Durrani *et al.*, 1999; Beserra Jr., 2001). Porém, empregando TMV como antígeno, a imunização nasal não estimula uma resposta imune mais precoce nem maior que a induzida pela via oral, contradizendo estudos de Wu *et al.* (1997).

Para o extrato foliar sadio (FIGURA 29) e para o extrato foliar infectado (FIGURA 28) administrados por via oral foram observados comportamentos semelhantes aos da via subcutânea, no que diz respeito à cinética de anticorpos. Ocorreu síntese de anticorpos contra extrato foliar infectado em testes com placa sensibilizada com extrato foliar infectado, mas não contra o mesmo extrato quando as placas foram sensibilizadas com extrato foliar sadio e com TMV purificado. Já quando extrato foliar sadio foi administrado, não ocorreu síntese de anticorpos específicos. Possivelmente pelas mesmas razões invocadas para explicar o que aconteceu com a via subcutânea, ocorrendo síntese de anticorpos contra as proteínas da capa protéica do capsídeo (17-18 kDa) e as proteínas não estruturais do TMV (126-129 kDa, 183-187 kDa e 28-31 kDa), uma vez que as últimas estão presentes no extrato foliar infectado (van Regenmortel *et al.*, 2000) e ausentes na suspensão viral purificada, como pode ser comprovado através do perfil eletroforético (FIGURA 5).

Apesar da via subcutânea ter apresentado títulos de anticorpos

séricos superiores aos observados pela vias oral e nasal quando o TMV foi administrado como antígeno, a via parenteral apenas estimula a resposta imune periférica (Mestecky, 1987). As vias nasal e oral estimulam tanto a resposta imune periférica quanto a resposta mucosa, promovendo uma resposta imune sistêmica, sem a necessidade do uso de adjuvantes (Nugent *et al.*, 1998). Isso provavelmente se deve ao fato de os vários compartimentos do sistema imune mucoso estarem interligados entre si, através do tráfego de linfócitos (Davis, 2001). Em termos de dose, a via nasal parece ser mais vantajosa do que a oral por requerer uma dose 10 vezes menor de imunógeno, ocasionando títulos de anticorpos séricos contra TMV semelhantes aos da via oral, quando a placa foi sensibilizada com extrato da planta infectada.

A explicação para a ligação do TMV às células epiteliais da mucosa (em especial as células M) e sua conseqüente internalização pode estar associada com a conformação estérica de seu capsídeo viral, pelo fato de sua forma termo-inativada não ter promovido síntese de anticorpos quando administrada via oral (Figura 27). Isso mostra, mais uma vez que existe uma correlação entre as atividades imunogênicas e a infectividade viral. Explicação baseada também na estrutura do capsídeo viral tem sido invocada para o caso de outros vírus de planta, como o CPMV, que tem uma estrutura icosaédrica de seu capsídeo e isso influenciaria a sua capacidade imunogênica pela via mucosa (Brennan *et al.*, 1999).

5.3 - Infecção Por CMV e a Caracterização das Proteínas do Capsídeo Viral

O CMV ocasionou, após cerca de 15 dias da inoculação nas folhas de *C. pepo* cv Caserta, sintomas sistêmicos caracterizados por mosaico severo, enrolamento das folhas, atrofia no desenvolvimento da planta, deformações foliares e bolhosidade (FIGURA 2A), quando comparadas com folhas de plantas sadias da mesma idade (FIGURA 2B). Sintomas semelhantes foram obtidos por Lima *et al.* (1995) com inoculações do mesmo vírus.

A suspensão purificada do CMV, obtida através do método de purificação adotado, mostrou um espectro de absorção ultravioleta, típico de vírus da família *Bromoviridae*, com as relações de absorção entre 260 e 280

nm ($A_{260}/A_{280} = 1,71$) e a razão da absorção máxima pela mínima (A_{max}/A_{min}) de 1,33 (FIGURA 6). A suspensão viral apresentou-se homogênea e límpida, sugerindo a eficiência do método utilizado para a purificação do vírus. A concentração de proteína viral na suspensão foi estimada espectrofotometricamente em 4,07 mg/mL (FIGURA 6), confirmando o anteriormente obtido por Lima *et al.* (1995). O perfil eletroforético da suspensão de CMV apresentou a migração de apenas uma banda protéica de massa molecular aparente estimada em 29 kDa (FIGURA 10). Esse resultado foi igual ao obtido por Lima *et al.* (1995) e por Brioso (1986) para um isolado do CMV. A suspensão viral mantida a 100 °C por 10 min mostrou o mesmo perfil eletroforético, não demonstrando fragmentação da proteína do capsídeo viral. Porém, o vírus perdeu sua capacidade infectiva, uma vez que não provocou o aparecimento de nenhuma lesão necrótica em folhas de *C. amaranticolor* inoculadas com o vírus termo-inativado. Os mesmos resultados foram também obtidos com TMV e SqMV quando termo-inativados e a explicação possível é a mesma utilizada para o TMV, ou seja, a de que as estruturas tridimensionais do capsídeo viral dos vírus de plantas exercem um papel fundamental na preservação da integridade do ácido nucléico e, conseqüentemente, na capacidade do vírus causar doença nas plantas infetadas.

5.4 - Resposta Imunológica Induzida por CMV Ministrado pelas Vias Oral e Nasal

As respostas imunes induzidas pelo vírus purificado nativo administrado pela via oral mostraram síntese de anticorpos específicos, mas não houve produção de anticorpos quando a imunização dos animais foi feita com vírus termo-inativado, quando a síntese de anticorpos específicos foi testada tanto com a placa sensibilizada com vírus purificado, quanto com a placa sensibilizada com extrato de planta infectada (FIGURAS 38 e 39). Os resultados positivos, estatisticamente significativos ($p < 0,05$), podem ser explicados pela presença do CMV tanto na suspensão viral quanto no extrato foliar infectado. O fato do CMV termo-inativado não ter induzido produção de anticorpos confirma a suposição feita anteriormente de que as estruturas tridimensionais do capsídeo viral dos vírus de plantas, além de serem

importantes para preservar a capacidade dos mesmos de causar infecção nas plantas, também exercem papel fundamental na indução de anticorpos específicos nos camundongos.

As respostas imunes de camundongos imunizados pela via oral tenderam a ser superiores às respostas induzidas pela via nasal e não houve diferença quando os títulos de anticorpos específicos foram testados com os diferentes tipos de sensibilização das placas de ELISA (FIGURA 43). Porém, o uso do CMV na imunização nasal não estimulou uma resposta imune mais precoce nem maior que a induzida pela via oral, contradizendo estudos de Wu *et al.* (1997). Esse resultado possivelmente explicaria o fato de que foram usadas doses dez vezes menores de proteína para a via nasal que para a via oral, e essa menor quantidade de proteína na dose foi capaz de imunizar através de uma região muito vascularizada como a nasal, mas não foi capaz de igualar ou superar os elevados valores alcançados pela imunização oral.

5.5 - A Infecção por SqMV e a Caracterização das Proteínas do Capsídeo Viral

O SqMV após cerca de 15 dias da inoculação ocasionou nas folhas de *C. melo* híbrido 'Hi Mark, sintomas sistêmicos caracterizado por mosaico (FIGURA 3A), quando comparada com os das folhas de plantas saudáveis da mesma idade (FIGURA 3B). Sintomas semelhantes foram obtidos por Lima & Amaral (1985) em inoculações do mesmo vírus. A suspensão purificada do SqMV obtida através do método de purificação adotado mostrou um espectro de absorção ultravioleta, típico de vírus da família *Comoviridae*, com as relações de absorção entre 260 e 280 nm ($A_{260}/A_{280} = 1,74$) e de absorção máxima pela mínima (A_{max}/A_{min}) de 1,48 (FIGURA 11), com valor aproximado ao obtido por Lima & Amaral (1985), que foi de 1,6. A suspensão viral apresentou-se homogênea e límpida, o que sugere a eficiência do método utilizado na purificação. A concentração de proteína viral na suspensão foi estimada espectrofotometricamente (FIGURA 7) em 11,47 mg/mL. O perfil eletroforético da suspensão do SqMV apresentou a migração de duas bandas protéicas, com massas moleculares aparentes estimadas em 21 e 43 kDa (FIGURA 11). Segundo van Regenmortel *et al.* (2001), os *Comovirus* e os *Fabavirus* têm duas

proteínas nas suas capas protéicas com massas moleculares aparentes estimadas em 40-45 kDa e 21-27 kDa. A suspensão viral mantida a 100°C por 10 min mostrou o mesmo perfil eletroforético, não demonstrando fragmentação da proteína do capsídeo viral. Contudo, o SqMV perdeu sua capacidade infectiva, uma vez que não apareceu nenhuma lesão necrótica em folhas de *C. amaranticolor* inoculadas. Os mesmos resultados foram também obtidos pelos demais vírus (TMV, SqMV e CABMV), quando termo-inativados e as explicações possíveis são as mesmas utilizadas para o TMV e o CMV.

5.6 - Resposta Imunológica Induzida por SqMV Ministrado pelas Vias: Oral e Nasal.

As respostas imunes induzidas pelo vírus purificado nativo ministrado pela via oral mostraram síntese de anticorpos específicos estatisticamente significativo ($p < 0,05$) detectados tanto quando se utilizou placa sensibilizada com vírus purificado, quanto com placa sensibilizada com extrato de planta infectada (FIGURAS 44 e 46). Já quando os animais foram imunizados com o vírus termo-inativado não houve síntese de anticorpos específicos testados com as placas em idênticas condições (FIGURAS 45 e 46). Os resultados positivos podem ser explicados pela presença do SqMV tanto na suspensão viral quanto no extrato foliar infectado. O fato do SqMV termo-inativado não ter induzido produção de anticorpos sugere que as estruturas tridimensionais do capsídeo viral dos vírus de plantas, além de serem importantes na preservação da capacidade dos mesmos de causar infecção nas plantas, exercem também, papel fundamental na capacidade dos mesmos de induzir produção de anticorpos específicos em camundongos.

De uma maneira geral, as respostas imunes de camundongos imunizados pela via oral tenderam a ser superiores às da via nasal e não houve diferença quando a avaliação foi feita com diferentes tipos de sensibilização da placa (FIGURA 51).

5.7 – A Infecção por CABMV e a Caracterização das Proteínas do Capsídeo Viral

O CABMV, após cerca de 15 dias da inoculação nas folhas de *V. unguiculata*, ocasionou sintomas sistêmicos caracterizados por mosaico severo, enrolamento das folhas, atrofia no desenvolvimento da planta, deformações foliares e bolhosidade (FIGURA 4A), quando comparadas com as folhas de plantas sadias da mesma idade (FIGURA 4B).

A suspensão purificada do CABMV obtida através do método de purificação adotado, mostrou um espectro de absorção ultravioleta, típico de vírus da família *Potyviridae* (Lima *et al.*, 1979), com as relações de absorção entre 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) de 1,89 e de absorção máxima pela mínima (A_{max}/A_{min}) de 1,4 (FIGURA 8). A suspensão viral apresentou-se homogênea e límpida, sugerindo a eficiência do método utilizado na purificação do vírus. A concentração de proteína viral na suspensão foi estimada espectrofotometricamente em 9,85 mg/mL (FIGURA 8). O perfil eletroforético da suspensão de CABMV apresentou a migração de uma banda protéica de massa molecular aparentemente estimada em 35 kDa (FIGURA 12). Lin *et al.* (1989) constataram um único tipo de proteína com 36 kDa no capsídeo de um potyvirus, em análise de eletroforese em gel de poliácridamida. Outros autores encontraram duas bandas, mas justificaram como uma degradação enzimática da proteína capsidial de 35-36 kDa durante o processo de purificação e estocagem do vírus (Lima *et al.*, 1979; Bezerra *et al.*, 1995).

5.8 - Resposta Imunológica Induzida por CABMV Ministrado por Via Oral

Apenas a suspensão viral do CABMV nativo não submetida a terminativação foi usada para imunização por via oral, uma vez que a forma nativa, nas condições testadas, não foi imunogênica na concentração de proteína utilizada. Não foi demonstrada síntese de anticorpos específicos nem pelo teste de dupla difusão, nem pelo teste de ELISA independente do tipo de sensibilização da placa (FIGURAS 52, 53 e 54).

5.9 - Comparação da Intensidade da Resposta Imunológica Induzida pelos Diferentes Vírus pela Via Oral

Numa comparação global das respostas imunes induzidas com os diferentes vírus através da imunização pela via oral foi aquela obtida com o CMV, como antígeno, a que apresentou tendência mais acentuada, tanto quando a síntese de anticorpos específicos, avaliada com a placa sensibilizada com o extrato de planta infectada quanto com a placa sensibilizada com o vírus purificado. A resposta imune ao SqMV testada em placa sensibilizada com vírus purificado e com extrato de planta infectada, apesar de ter sido inferior à do CMV tendeu a ser duas vezes superior à resposta ao TMV. O TMV apresentou os menores valores nos títulos de ELISA*. O CABMV por não ter sido capaz de estimular resposta imune nos camundongos não foi incluído na comparação (FIGURA 55). Isso ocorreu possivelmente porque foi utilizada uma dose (500 µg) inferior à utilizada com os outros vírus (1000 µg ou 1 mg). Florindo *et al.* (2002) obtiveram resultados positivos utilizando o CpSMV por via oral com a mesma dose (500 µg), uma possível explicação seria o fato do CpSMV ser um vírus mais estável, com proteínas do capsídeo de massas moleculares aparentes estimadas em 43, 23 e 21 kDa e o CABMV com massa molecular aparente estimada em 35-36 kDa pertencente ao gênero dos *Potyvirus*, que são considerados altamente instáveis.

5.10 - Comparação da Intensidade da Resposta Imunológica Induzida pelos Diferentes Vírus pela Via Nasal

Numa comparação global das respostas imunes induzidas com os diferentes vírus através da imunização pela via nasal foi aquela obtida com o SqMV usado como antígeno que apresentou tendência mais acentuada, tanto quando a síntese de anticorpos específicos foi avaliada com a placa sensibilizada com o extrato de planta infectada quanto com a placa sensibilizada com o vírus purificado. A resposta imune, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), avaliada com placas de ELISA sensibilizada com SqMV purificado apresentou maior valor nos títulos de ELISA* do que aquela apresentada quando a avaliação foi feita com placas de ELISA sensibilizadas com extrato de planta infectada, também estatisticamente significativo ($p <$

0,05). A resposta imune induzida pelo CMV, estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando avaliada com placa sensibilizada com vírus purificado e com extrato de planta infectada, apesar de ter tido tendência inferior à do SqMV, apresentou resposta inicial com títulos em ELISA* com tendência superior à do TMV até 14 dias após o início da imunização e, a partir de então as respostas aos dois vírus (CMV e TMV) apresentaram tendência a intensidades praticamente iguais (FIGURA 56).

Uma vez que não se detectou síntese específica de anticorpos IgE quando os camundongos foram imunizados com TMV pela via subcutânea, e com CMV e SqMV pela via oral, essa seria uma vantagem adicional para o uso desses vírus como vetores de antígenos uma vez que, aparentemente, não induzem síntese de IgE com potencial resposta anafilática.

Embora os antígenos reconhecidos como de alta capacidade imunogênica sejam aqueles de maior massa molecular (Tizard, 1998), o capsídeo viral do TMV, apesar de apresentar uma proteína de apenas 17 kDa, mostrou ser capaz de imunizar através de todas as vias de imunização estudadas, inclusive desenvolvendo imunidade periférica quando administrado em doses relativamente baixas de antígeno pelas vias oral e nasal (via oral: 100 $\mu\text{g}/\text{dose}$; via nasal: 10 $\mu\text{g}/\text{dose}$), possivelmente devido ser um vírus altamente estável. Aparentemente, no caso do TMV, outros fatores, que não apenas a massa molecular, influenciaram sua capacidade imunogênica.

Diante dos resultados obtidos, pode-se sugerir que, por sua capacidade de induzir respostas imunes periférica pela via subcutânea, mesmo sem o uso de adjuvantes, pela via oral e pela via nasal (com doses relativamente baixas para estas vias), o TMV pode ser privilegiado na escolha como vetor de antígenos patogênicos em procedimentos de vacinação. Da mesma forma, pode-se dizer que CMV e SqMV também são dotados de capacidade imunogênica, confirmando estudos feitos com outros vírus de planta para o mesmo propósito (Brennan *et al.*, 1999; Yusibov *et al.*, 1997; Koo *et al.*, 1999; Langeveld *et al.*, 2001, Florindo *et al.*, 2002). Contudo, o CMV pela via oral e o SqMV pela via nasal seriam provavelmente as escolhas mais adequadas (FIGURAS 55 e 56), como vetores patogênicos em procedimentos de vacinação/imunização. Quanto à capacidade imunogênica do CABMV ela

necessita ainda experiências complementares para uma avaliação conclusiva.

6 - CONCLUSÕES

1. O vírus, TMV induziu resposta imune em camundongos Swiss imunizados pelas vias subcutânea, oral e nasal. A imunização por via subcutânea em presença de $Al(OH)_3$ revelou o efeito adjuvante dependendo do método de avaliação dos títulos de anticorpos específicos;
2. Os vírus CMV, SqMV, na forma nativa, induziram resposta imune em camundongos imunizados pelas vias nasal e oral;
3. TMV, CMV e SqMV perderam as capacidades infectantes e imunogênicas após termo-inativação;
4. Não foi detectada resposta imune contra as proteínas do extrato de folhas de *N. benthamiana*, planta-hospedeira do TMV. Apesar de ter sido detectada resposta imune ao TMV quando foi utilizado o extrato de folhas infectadas para induzir imunização nos camundongos pelas vias subcutânea e oral;
5. Não foi detectada síntese de IgE específica em camundongos imunizados pelas vias subcutânea e oral com TMV nativo e com extrato de folhas infectadas por este vírus. Igualmente não houve síntese de IgE específica quando os camundongos foram imunizados pelas vias oral e nasal com CMV e SqMV.
6. Os resultados da avaliação da capacidade imunogênica do CABMV não foram conclusivos;
7. O TMV, por suas características parece ser um vírus de escolha para imunização quer pela via subcutânea, quer pela oral, quer pela nasal;
8. O CMV tem tendência a induzir melhor resposta imunológica por via oral e o SqMV pela via nasal
9. A capacidade imunogênica dos vírus vegetais aparentemente está relacionada com a estrutura dos vírus, mas essa possibilidade necessita

ainda de experiências complementares;

10. Os vírus vegetais parecem ser dotados de propriedades especiais que os tornam alvo de uso potencial em procedimentos de imunização/vacinação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN A. H. & POBER, J.S. (2000) **Imunologia Celular e Molecular**. 3ª ed. Livraria e Editora Revinter Ltda. 486p..
- AIZPURUA H.J. & RUSSEL-JONES G.J. (1988). Oral vaccination. Identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. **Journal of Experimental Medicine**, 167:440-451.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J.D. (1997). **Biologia Molecular da Célula**. 3ª ed. Ed. Artes Médicas. Porto Alegre, RS. 1294p.
- ALMEIDA, A.M.R. & LIMA, J.A.A. (2001) **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja / Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia. 186p.
- ANDERSON, A. O. (1999). Peripheral and Mucosal Immunity: Critical Issues for Oral Vaccine Design. **US Army Research Institute of Infectious Diseases**. 21702-5011.
- ARORA, P.; SHARMA, S. & SANJAY G. (2002). Permeability issues in nasal drug delivery. **Drug Discovery Today**. **7 (18)**: 967-975.
- 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. **Journal of Virology**. 72: 1345-1353.
- BAWDEN, F. C. & PIRIE, N. W. (1937). The isolation and some properties of liquid crystalline substances from *solanaceous* plants infected with three strains of tobacco mosaic virus. **Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.** 123: 274-320
- BEIJERINK, M. W. (1898) **Vesl. Gewone Vergard**. Wis NatuurK. Afd. K. Acad. Wet. Amsterdam 7: 229-235.
- BESERRA Jr., J.E.A. (2001). Resposta imunológica humoral de camundongos imunizados com as proteínas do capsídeo do Cowpea Severe Mosaic Virus (CPSMV) pelas vias orais, nasais e subcutâneas. **Monografia de Bacharelado**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.
- BEZERRA, D. R., FEIJÓ, D. F., GONÇALVES, M. F. B. , RAMOS, F. N., SILVA, A. C. M., LIMA, J. A. A. & LIMA, M.da G. S. (2002). **Oral Immunization of Mice with Plant Infecting Viruses: Cucumber mosaic**

vírus (CMV) and Squash mosaic virus (SqMV). VI Reunião Regional da SBBq – Nordeste.

- BEZERRA, D. R., FEIJÓ, D. F., SILVA, A. C. M., LIMA, J. A. A. & LIMA, M. G. S (2002). Resposta Imunológica Humoral em Camundongos Imunizados Pela Rota Oral com o Vírus Tobacco Mosaic Vírus (TMV). FeSB.
- BEZERRA, D. R.; LIMA, J.A.A. & XAVIER-FILHO (1995). Purificação e caracterização de um isolado cearense do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 20: 553-560.
- BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. and DIEFENBACH, A. (2000). The Role of Nitric Oxide in Innate Immunity. **Immunological Reviews**, 173: 17-26.
- BOREL, J.F. & HIESTAND, P.C. (1999). Immunomodulation: Particular Perspectives. **Transplantation Proceedings**, 31: 1464-1471.
- BRADFORD M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle for protein dye bimoling. **Analytical Biochemistry**. 72: 248-254.
- BRENNAM, 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. **Journal of Virology**. 73: 930-938.
- BRIOSO, P. S. T. (1986). **Caracterização biológica, físico-química e sorológica de isolados dos vírus do mosaico do pepino (cucumber mosaic virus) no Brasil**. Universidade de Brasília. 121 p. (Tese de Mestrado).
- BRISSON, N; PASZOWSKI, 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.
- BRUENING, G. (1978). **Comovirus group. Descriptions of Plant Viruses** N°199. Commonw Micol. Inst., Assoc. Appl. Biol., Kew Surrey, England. 5p.
- BRUNT, A.A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A.J.; WATSON, L. & ZURCHER, E.J. (1996). **Plant Viruses Online: Descriptions and List from the VIDE Database**. URL: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MÊS/vide/> Versão: 16/01/1996.
- CARRINGTON, J.C. & FREED, D.D. (1990). Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. **Journal of Virology**. 64:1590-1597.
- CARRINGTON, J.C., KASSCHAU, K.D., MAHAJAN, S.K. & SCAAD, M.C. (1996) Cell-to-cell and long-distance movement of viruses in plants. **Plant Cell**. 8: 1669-1681.

- CARTER III, J. E. & LANGRIDGE, W. H. R. (2002). Plant-based vaccines for protection against infectious and autoimmune diseases. **Critical Reviews in Plant Science**, 21(2): 93-109.
- CHEN & 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, H. (2000) Recent advances in mucosal vaccine development. **Journal of Controlled Release**. 67: 117-128.
- COLARICCIO, A., CHAGAS, C.M., MIZUKI, M., VEJA, J. & CEREDA, E. (1987). Infecção natural do maracujá amarelo pelo vírus do mosaico do pepino no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**. 12:254-257.
- DAVIS, S.S. (2001). Nasal vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 51: 21-42.
- DUARTE, L.M.L., ALEXANDRE, M.A.V., RIVAS, E.B. & OLIVEIRA, J.M. (1992). **Infecção natural de *Catharantus roseus* (L) G. Don. por vírus**. 5^a Reunião Anual do Instituto Biológico. (Abstract).
- DURRANI, Z.; McINERNEY, T.L.; McLAIN, L.; JONES, T.; BELLABY, T.; BRENNAN, F.R. & DIMMOCK, N.J. (1999). 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. of Immunol. Methods**. 220: 93-103.
- DUSI, A.N., ZAMBOLIM, E.M., GAMA, M.I.C.S., ÁVILA, A.C., GIORDANO, L.B. & SANTOS, J.R.M. (1992). Ocorrência e caracterização do vírus do mosaico do pepino (CMV) em ervilha. **Fitopatologia Brasileira**. 17:286-291.
- EDWARDSON, J.R., CHRISTIE, R.G., PURCIFULL, D.E., PETERSEN, M.A. (1993). **Inclusions in diagnosing plant virus disease**. In: MATTHEWS, R.E.F. *Diagnosis of plant virus disease*. Boca Raton: CRC. Cap. 5, p. 101-128.
- ESPINHA, L.M. & GASPAR, J.O. (1997). Caracterização parcial do vírus do mosaico do pepino ("cucumber mosaic virus", CMV) isolado de *Catharantus roseus*. **Fitopatologia Brasileira**. 22:209-212.
- FENNER, F. (1976). Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. **Intervirology** 7:1-116.
- FITCHEN, J.; BEACHY, R.N. & HEIN, M.B. (1995). Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitopes elicits autoantibody responses. **Vaccine**. 13: 1051-1057.
- FLORINDO, M.I. (1999). **Resposta imunológica humoral em camundongos imunizados com o vírus do mosaico severo do caupi**

(CPSMV). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.

- FLORINDO, M.I.; ARAGÃO, M. E.F; SILVA, A.C.M; OTOCH, M.L.; FERNANDES DE MELO, D.; LIMA, J.A.A & SILVA LIMA, M.G. (2002). Immune response induced in mice by oral immunization with cowpea severe mosaic virus. **Brazilian J. of Medical and Biological Research**. 35: 827-835
- FRANCKI, R. I. B., MOSSOP, D. W., HATTA, T. (1979) **Cucumber mosaic virus. Description of plant viruses**. n°213. Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England 6p.
- FRENCH, R.; JANDA, M. & AHLQUIST, P. (1986). Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus: efficient expression in monocotyledonous plant cells. **Science**. 231: 1294-1297.
- FREY, A. & NEUTRA, M.R. (1997). Targeting of mucosal vaccines to Peyer's patch M cells. **Behring Institute Mitt**. 98: 376-389.
- GARCÍA-ARENAL, F., ZAITLIN, M. & PALUKAITIS, P. (1987). Nucleotide sequence analysis of six satellite RNAs of cucumber mosaic virus. Primary sequence and secondary structure alterations do not correlate with differences in pathogenicity. **Virology** 158:339-347.
- GIBBS, A. J. & HARRISON, B. D. (1976). **Plantvirology, the principles**. Edward Arnold: London.
- GIRER, A. & SCHRAMM, G. (1956). Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. **Nature**. 177: 702.
- GOODING, G. V & HEBERT, T.T. (1967). A simple technique for purification for tobacco mosaic virus in large quantities. **Phytopathology**. 57: 1285.
- 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.
- HADIDI, A, KHETARPAL, R. K. & .KOGANEZAUJA, H. (1998) **Plant Virus Disease Control**.
- HAN, A. D., LIU, Y. L., XIAO, L., KANG., L. Y., ZHANG, Y. M., LI, D. T., TIAN, B. (2000). Expression of human hepatitis C virus core antigen in tobacco plants by tobacco mosaic virus-based vector system. **Chinese Science Bulletin** 45:(1) 44-48.
- HERSHEY, A. D. & CHASE, M. (1952). **F.gen. physiol**. 36:39.
- HINRICHS, J.; BERGER, S. & SHAW, J.G. (1997). Induction of antibodies to plant viral protein by DNA-based immunization. **J. of Virol. Methods**. 66: 195-202.

- HOLLAND, S.M & VIZI, S. (2002). Immunomodulation. Editorial overview. **Current Opinion in Pharmacology 2**: 425-427
- HOLMES, F. O. (1929). Local lesions in tobacco mosaic. **Bot. Gaz.** 87:39-55.
- INOUE, T. & OSAKI, T. (1981). **The earliest record of a possible plant virus disease.** Abst. P. 22/05, 5th. Int. Cong. of Virology, Stranbourg, p. 238.
- IVANOWSKI, D. (1892). St petersb. **Acad. Imp. Sci. Bull.** 37:67. (phytopathological Classic 7, 27).
- JOELSON, T.; AKERBLUM, L.; OXELFELT, P.; STRANDBERG, B.; TOMENIUS, K. & MORRIS, T. (1987). Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bush stunt virus. **J. Gen. Virol.** 78: 1213-1217.
- JOHNSON, J.; LIN, T. & LOMONOSSOF, G.P. (1997). Presentation of heterologous peptides on plant virus: genetics, structure and function. **Annu. Ver. Phytopathol.** 35: 67-86.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. (1995) **Histologia Básica.** 8^o edição. Editora Guanabara Koogan. São Paulo-SP. 433p.
- KADEN, V. & LANGE, B. (2001). Oral immunisation against classical swine fever (CSF): Onset and duration of immunity. **Veterinary Microbiology** 82: 301-310.
- KAPER, J.M. & WATERWORTH, H.E. (1981). **Cucumoviruses.** Pages: 257-332. In: Handbook of Plant Virus Infection. E. Kurstak, ed. North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- KOO, M.; BENDAHMANE, M.; LETTIERI, G.A.; PAOLETTI, A.D; LANE, T.E.; FITCHEN, J.H.; BUCHMEIER, M.J. & BEACHY, R.N. (1999). Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope. **Proc. Natl. Academ. Scie. U.S.A.** 96: 7774-7779.
- KUPER, C.F.; KOORNSTRA, P.J.; HAMELEERS, D.M.; BIEWENGA, J.; SPIT, B.J.; DUIJVESTIJN, A.M.; Van BREDA VRIESMAN, P.J. & SMINIA, T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. **Immunology Today.** 13: 219-224.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly for the bacteriophage T4. **Nature (Lond).** 227: 680.
- LANGEVELD, J.P.M.; BRENNAN, F.R.; MARTINEZ-TORRECUADRADA, J.L.; JONES, T.D.; BOSHUIZEN, R.S.; VELA, V.; CASAL, J.I.; KAMSTRUP, S.; DALSGAARD, K.; MELOEN, R.H.; BENDIG, M.M. & HAMILTON, W.D.O. (2001). Inactivated recombinant plant virus protects dogs from lethal challenge with canine parvovirus. **Vaccine.** 19: 3661-3670.

- LAVELLE, E. C.; GRANT, G.; PUSZTAI, A., PFULLER, U. & O'HAGAN, D.T. (2001). Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. **Immunol.** **102**: 77-86.
- LIMA, J. A. A. & SANTOS, C. D.G. (1985). Infecção natural de *Phaseolus lunatus* por uma estirpe, de Cucumber mosaic vírus no Ceará. **Fitopatol. bras.** **10** (2):304.
- 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. & CHAGAS, J.M.F. (1974). Sorologia de "Tobacco Mosaic Virus" constatado em *Nicotiana tabacum* L. e *Lycopersicum esculentum* Mill., no Estado do Ceará. **Fitossanidade.01 (01)**: 23-25.
- LIMA, J.A.A., LIMA, R. C.A. & GONÇALVES, M. F. B. (2001). Production of policlonal antisera specific to plant viruses by rabbit oral immunization. **Fitopatologia Brasileira** **26**: 774-777.
- LIMA, J.A.A.; PURCIFULL, D.E. & HIEBERT, E. (1979) Purification, partial characterization and serology of blackeye cowpea mosaic virus. **Phytopatology** **68**: 262. 1979.
- LIN, N.S., CHEN, Y.K. & HSU, U.H. (1989). Immunological detection of passionfruit woodiness virus. **Botanical Bulletin of Academic Scenica.** **30**: 31-37.
- LOEFFLER, F. and FROSCH, P. (1898). Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. **1**, **23**: 371.
- LOMONOSSOFF, G.P. & JOHNSON, J.E(1991). The synthesis and struture of comovirus capsids. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, **55**:107-137.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E., CARVALHO, M.G. & MATSUOKA, K. (1990). Caracterização parcial do vírus do mosaico do pepino isolado de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*). **Fitopatologia Brasileira** **15**:220-225.
- MÄKELÄ. P.H. (2000). Vaccines, coming of age after 200 years. **FEMS Microbiology Reviews.** **24**: 9-20.
- MALHOTRA, R., Merry, T. and Ray, K.P. (2000). Innate immunity: a primitive system in humans. **Immunology Today**, **21** (2): 68-70.
- MAYER, A. (1886). **Ueber die mosaikkrankheit des tabaks.** Landwirtsch Vers Stn **32**: 451-467.
- 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.

- MESTECKY, J. (1987). *The common mucosal immune system and current strategies for immune responses in external secretions.* **J. Clin. Immunol.** **07** (4): 265-276.
- MILNER, J.J. (1998). Tobacco mosaic virus: the first century. **Trends in Microbiology** 6:466.
- 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): 2481-2485.
- MOTA & WONG, D. (1969). Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse anti-sera during the course of immunization. **Life Science.** 8: 913-820.
- MURANT, A.F., RACCAH, B. & PIPONE, T.P. (1988). Transmission by vectors. In: *The plant viruses.* New York. **Plenum Press.** 237 – 273pp.
- 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.** Sixty Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, New York. 586pp.
- NAIRN, R & HELBERT, M (2002). *Immunology for Medical Students.* **Mosby International Ltd.** 326p.
- NUGENT, J.; PO, A.L. & SCOTT, E.M. (1998). Design and delivery of non-parenteral vaccines. **J. Clin. Pharm. Ther.** 23(4): 257-285.
- OLZEWSKA W. & STEWARD, M. W. (2001). Nasal delivery of epitope based vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews,** **51:**1-3:161-171.
- OUTCHTERLONY, O. (1962). Diffusion in gel methods for immunological analysis II. **Prog. Allergy.** 6:30-154.
- OVARY, Z. (1958). Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. **J. Immunol.** **81:** 355-358.
- PALUKAITIS, P., ROOSSINCK, M.J., DIETZGEN, R.G. & FRANCKI, R.I.B. (1992). Cucumber mosaic virus. **Advances Virus Research** 41:281-348.
- PEREIRA, M.R.P. (2000). Resposta imunológica humoral em camundongos "swiss" alimentados com proteínas de sementes de *Lablab purpureus* (L.) sweet (Mangalô). **Monografia de bacharelado.** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.
- PRIYANKA, A., SHRINGI, S & SANJAY, G (2002). Permeability issues in nasal drug delivery. **Drug Discovery Today.** **7:** 967-973.

- PROVOUST-DANON, A., SILVA, M. & JAVIERRE, M.Q. (1966). Active anaphylactic reaction in mouse peritoneal mast cell in vitro. **Life Sci.** **5**: 289-297.
- PURCIFULL, D.& BATCHELOR, D.L. (1977). Immunodifusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS) – treated plant viruses and plant viral inclusions. Gainesville. **Florida Agric. Stn. Tech. Bull** 788:1-39.
- PURCIFULL, D.& HIEBERT, E. (1979). Serological distinction of watermelon mosaic virus isolates. **Phytopathology** 69:112-116.
- PURDY, H. A. (1929). Immunologic reactions with tobacco mosaic virus. **J Exp Med** **49**: 919-935.
- RAMOS, F.N. (2002). Estudo da Interação entre vírus e avaliação do comportamento dos genótipos de meloeiro e melancia. **Tese de mestrado**. Fortaleza-CE.
- RIECHMANN, J.L., LAIN, S. & GARCIA, J.A. (1991). Identification of the initiation codon of plum pox potyvirus genomic RNA. **Virology** **185**:544-552.
- RIECHMANN, J.L., LAIN, S. & GARCIA, J.A. (1989). The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of plum pox potyvirus. **Journal of General Virology** 70:2785-2789.
- ROITT, I. M; BROSTOFF, J; MALE, D. K. (1997). *Imunologia* 4ª ed. 319p.
- RYBICKI, E.P. Bromoviridae. In: MURPHY, F.A.,FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JAVIS, W., MARTELLI, G.P., MAYO, M.A. & SUMMERS, H.D.(Ed.) (1995). *Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses Springer-Verlag, Wien*. 450-457pp.
- SAMPAIO, I.B.M..(2002). **Estatística Aplicado à Experimentação Animal**. 2ª ed. Belo Horizonte. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 265 p.
- SAS. (1999). *Statistical Analysis Systems. User's guides*. STAT Cary: South SAS Institut.
- SCHEIBNER, V. (1993). *Vaccination 100 years of orthodox research*. **New Atlantean Press**.Santa Fé, NM.
- 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.
- SHUKLA, D.D., WARD, C.W. & BRUNT, A.A. (1994). **The Potyviridae**. Wallingford, CAB International.

- SMINIA T. & KRAAL, G. (1999). Nasal associated lymphoid tissue. In: OGRA, P.L.; LAMM, M.E.; BIENESTOCK J.; MESTECKY, J.; STROBER, W. & McGHEE, J.R. (Eds.), 2nd Edition, **Mucosal Immunology**. Academic Press, London. P. 357-364.
- SMITH, D. B. & DAVIS, R.F. (1986). Identification of cucumber mosaic virus from *Vinca minor* in New Jersey. **Plant Disease** 70: 1056-1059.
- SPRINGGS, M.K., (1996). One Step Ahead of the Game: Viral Immunomodulatory molecules. **Ann .Rev.Immunol.** 14: 101-130.
- STACE-SMITH, R. & TREMAINE, J.H. (1980). Purification and composition of a potato virus Y. **Phytopathology** 60: 1785-1789.
- STACZEK, J.; BENDAHMANE, M.; GILLELAND, L.B.; BEACHY, R. N. & Jr, H.E.G. (2002). Immunization with a chimeric tobacco mosaic virus containing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* provides protection against challenge with *P. aeruginosa*. **Vaccine**. **18:21**: 2266-2274.
- STANLEY, W. M. (1934). **Phytopathology**, 24, 1055.
- STANLEY, W. M. (1935). Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco mosaic virus. **Sci.**, 81: 644-645.
- SURADHAT, S., INTRAKAMHAENG, M. & DAMRONGWATANAPOKIN, S. (2001). The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 83: 177-189.
- TAKAHASHI, W.N. & RAWINS, T.E. (1932). **Proc. Soc.Exp. Biol. Med.** 30, 155.
- TIZARD, R.I. (1998). **Imunologia Veterinária Uma Introdução**. 5^o edição, editora Rocca, São Paulo-SP. 545p.
- TRINDADE, D.R., POLTRONIERI, L.S., ALBUQUERQUE, F.C., BENCHIMOL, R.L. & AMORIM, A.M. (1998). Ocorrência do vírus do mosaico do pepino em bananeira no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira** 23:185.
- TURPEN, T.H.; REINL, S.J.; CHAROENVIT, Y.; HOFFMAN, S.L.; FALLARME, V. & GRILL, L.K. (1995). Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. **Biotechnology (N.Y.)**. **13**: 53-57.
- Van REGENMORTEL, M.H.V.; ALTSCHUH, D. & ZEDERLUTZ. (1993). Tobacco mosaic virus: A model antigen to study virus-antibody interactions. **Biochimie**. **75**: 731 – 739.
- Van REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; McGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R. & WICKNER, R.B. (2000). **Virus**

Taxonomy. The Classification and Nomenclature of Viruses. *Virus Taxonomy*, VIIth report of the ICTV. Academic Press, San Diego. 1167p.

- VECCHIONE, A., CATCHPOLE, B., D'MELO, F., KANELLOS, T., HAMBLIN, A. (2002). Modulating immune responses with dendritic cells: an attainable goal in veterinary medicine? **Veterinary Immunology and Immunopathology** 87: 215-221.
- VERDOLIN, B.A.; FICKER, S.M.; FARIA, A.C.M.; VAZ, N.M. & CARVALHO, C.R. (2001). Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 34: 211-219.
- WALKER, R. I. (1994). New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. **Vaccine** 12 (5): 387-400.
- WALKEY, D.G.A. (1985). **Applied Plant Virology**. 1a. Ed. London. 329p
- WIGDOROVITZ, A., FILGEIRA, D.M.P.; ROBERTSON, N.; CARRILO, C.; SADIR, A.M.; MORRIS, T.J. & BORCA, M.V. (1999). Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with leaf extracts from infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. **Virology**. 264: 85-91.
- WILLINK, J. & Van KAMMEN, A. (1989). Cell-to-cell Transport of cowpea mosaic virus requires both the 58K/48K proteins and capsid proteins. **J. Gen. Virol.** 70: 2279-2286.
- WU, H. Y.; NGUYEN, H.H. & RUSSEL, M. W. (1997). Nasal lymphoid tissue (NALT), as a mucosal immune inductive site. **Scand. J. Immunol.** 46:506-513.
- YUSIBOV, V.; MODELSKA, A.; STEPLEWSKI, K.; AGADJANYAN, M.; WEINER, D.; HOOPER, D.C. & KOPROWSKI, H. (1997). Antigen produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunized against rabies virus and HIV-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. 94: 5784-788.