

KARLOS HENRIQUE MARTINS KALKS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS BALB/c
IMUNIZADOS COM O PEPTÍDEO SBm7462[®], ANTI *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus*, EXPRESSO EM PLANTAS (*Arabidopsis thaliana*)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

KARLOS HENRIQUE MARTINS KALKS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS BALB/c
IMUNIZADOS COM O PEPTÍDEO SBm7462[®], ANTI *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus*, EXPRESSO EM PLANTAS (*Arabidopsis thaliana*)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 1 de abril de 2011.

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

Profa. Ana Paula Peconick

Profa. Marlene Isabel Vargas Vilorio
(Coorientador)

Prof. Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo
(Orientador)

*Para minha mãe, que me dá
forças para superar qualquer
desafio até hoje, e um dia, me
disse que gostaria de ter
trabalhado com química.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me acompanhar durante todos os momentos.

A minha família e amigos, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

A Sthefany Patareli por ser uma noiva paciente e carinhosa. A qual por vários momentos a conclusão deste trabalho dependeu exclusivamente dela.

A meu tio José Edson e família que me ajudaram a concluir mais esta fase de minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do curso.

Ao Departamento de Veterinária da UFV por contribuir na minha formação.

Ao Professor Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo, pela amizade, generosidade e atenção com que sempre me recebeu e por ter permitido o uso do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) e me deixar participar de sua equipe de trabalho.

A professora Marlene Isabel Vargas Vilorio por me co-orientar, além de permitir o uso do laboratório de Histopatologia Veterinária.

A professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes por permitir o uso do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP).

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Veterinária pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os funcionários do Departamento Veterinária.

A Márcio Mendes pela disposição em ajudar nas técnicas laboratoriais, pela amizade e paciência.

Aos meus amigos de laboratório, Fabrício Valente, Gabriel Tafur, Gabriel Carvalho, Ronny e Cristiane Zoratto, pela ajuda e ensinamentos na execução várias técnicas.

Aos colegas e amigos do LBCHV – Leandro, Isabela, Letícia, Mariana, Bairon, e Vitor.

A Janaína por dedicar seu tempo e trabalho para construção desta dissertação; além da amizade.

A Ana Paula Peconick por transformar de forma eficiente as sementes usadas neste experimento e pela amizade.

A todos meus amigos em Viçosa.

E a todas as outras pessoas cujos nomes não estão aqui, mas que estiveram presentes e contribuíram para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

KARLOS HENRIQUE MARTINS KALKS, filho de Carlos Alberto Kalks da Silva e Rosa Maria Martins Kalks, nasceu aos 16 dias do mês de abril, do ano de 1981, na cidade de Nova Era, no estado de Minas Gerais.

Concluiu o ensino fundamental (1º grau) em 1995 e o ensino médio (2º grau) em 1999 na Escola Novaerense, em Nova Era – MG.

Ingressou no curso de Bioquímica, pela Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG em março de 2004, finalizando em janeiro de 2009. Iniciou-se na pesquisa pelo projeto de iniciação científica intitulado: Produção de anticorpos monoclonais anti SBm7462[®]. Este sob orientação do prof. Joaquin H. Patarroyo S., no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/BIOAGRO/UFV.

Em março de 2009 ingressou no Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa, pelo Departamento de Medicina Veterinária, sob a orientação do professor Joaquin H. Patarroyo S.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE GRÁFICOS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1887).	3
2.2. O imunógeno sintético SBm7462 [®]	6
2.3. Plantas utilizadas para expressar e produzir subunidades vacinais...	10
2.4. Imunização por via oral.....	15
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo geral.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21

4.1. Local de realização e regulamentação do experimento.....	22
4.2. Obtenção e cultivo de material vegetal.....	22
4.3. Confirmação das plantas transformantes.....	24
4.3.1. Extração do DNA genômico das plantas.....	24
4.3.2. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	25
4.4. Caracterização da expressão do peptídeo recombinante.....	25
4.4.1. Extração de proteínas totais.....	25
4.4.2. Quantificação de proteínas totais.....	26
4.4.3. Quantificação do peptídeo recombinante.....	27
4.4.5. <i>SDS-Page</i>	28
4.4.6. <i>Western Blotting</i>	29
4.5. Animais experimentais.....	30
4.6. Imunização.....	31
4.7. Coleta do sangue	32
4.8. ELISA indireto.....	32
4.9. Preparo do material histológico.....	33
4.10. Imunohistoquímica.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
5.1. Obtenção e cultivo de material vegetal.....	36
5.2. Confirmação das plantas transformantes.....	39
5.3. Caracterização da expressão do peptídeo recombinante.....	40
5.4. Avaliação da imunização dos animais.....	46
6. CONCLUSÕES.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estrutura nucleotídica e aminoacídica da vacina sintética SBm7462®	9
Figura 2. Fase inicial de desenvolvimento de sementes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
Figura 3. Cultivo de plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> , após três meses de desenvolvimento.....	38
Figura 4. Corrida eletroforética em gel de agarose 1%.....	40
Figura 5. SDS-page de extratos de plantas transformadas.....	45
Figura 6. <i>Western blotting</i> das plantas transformadas.....	45
Figura 7. Corte histológico dos linfonodos dos animais dos grupos vacinais e controle 1, 2.....	51
Figura 8. Cortes histológicos destacando a região dos cordões medulares do linfonodo do camundongo 1, preparado com o ensaio de imunohistoquímica.....	52

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Expressão estável de antígenos vacinais em plantas (modificado de TIWARI <i>et al.</i> , 2009).....	14
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados.....	25
Tabela 3. Valores do peptídeo sintético para cada ponto da curva padrão.....	28
Tabela 4. Esquema de imunização.....	31
Tabela 5. Protocolo para inclusão de tecidos.....	33
Tabela 6. Concentração média de proteínas totais das plantas transformadas e não transformadas.....	41
Tabela 7. Curva padrão para o ELISA competitivo.....	42
Tabela 8. Porcentagem de peptídeo recombinante expressos nas folhas de plantas transformadas.....	43

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Curva padrão para o ELISA competitivo.....	42
Gráfico 2. Concentração de peptídeo recombinante em cada planta transformada.....	43
Gráfico 3. Análise da resposta humoral para cada camundongo imunizado durante 9 semanas.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: Microgramas
µL: Microlitros
µm: Micrômetros
µM: Micromolar
2FN: Segunda geração de plantas transformadas
2ST: Primeira geração de plantas transformadas
3FN: Quarta geração de plantas transformadas
AgNO₃: Nitrato de prata
B.O.D.: Estufa microprocessada
BIOAGRO: Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária
Bm86: Glicoproteína intestinal isolada de uma amostra de carrapato
Bm95: Proteínas similar a Bm86
Boophilus ssp: Qualquer espécie do gênero *Boophilus*
CG: Centro germinal
CNBS: Conselho Nacional de Biossegurança
CQB: Certificado de Qualidade em Biosegurança
CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DAB: Diaminobenzedina
dd: Deionizada
DNA: Ácido desoxirribonucléico
dNTPs: Dinucleotídeos
EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético
ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
F1, F2, F3: 2^a, 3^a e 4^a gerações dos vegetais, respectivamente
g: gramas
GALT: Tecido linfóide associado ao intestino
GFP: (*green fluorescent protein*)
h: Horas
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
IgG: Imunoglobulina G

kDa: Kilodaltons
KDEL: Sequência de retenção no retículo endoplasmático
KOZAC: Sequência nucleotídica encontrada em promotores fortes
LBCHV: Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores
MALT: Tecido linfóide associado à mucosa
mg: Miligrama
MgSO₄: Sulfato de magnésio
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
mL: Mililitros
mM: Millimolar
MS: Meio seletivo adaptado de Murashige e Shoog (1962)
Na₂CO₃: Carbonato de sódio
Na₂HPO₄: Fosfato de sódio monohidratado
Na₂S₂O₃: Tiosulfato de sódio
NaCl: Cloreto de sódio
NaH₂PO₄: Fosfato de sódio diidratado
NaHCO₃: Bicarbonato de sódio
ng: Nanogramas
NiCl₂: Cloreto de níquel
nm: Nanômetros
O. P. D.: *o*-fenildiaminobenzeno
°C: Graus centígrados
PAP: Peroxidase-anti-peroxidase
p/v: Peso por volume
pb: Pares de bases
PBS: Tampão fosfato de sódio
PCR: Reação em cadeia da polimerase
pH: Potencial hidrogeniônico
PLGA: Poliésteres derivados dos ácidos lático e glicólico
PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
PNB: Política Nacional de Biossegurança
PTM: Modificações pós-traducionais
PTS: Proteínas totais solúveis
PVDF: *Polyvinylidene fluoride*
q.s.p.: Quantidade suficiente para
r²: Coeficiente de correlação
rBm7462: Peptídeo recombinante derivado da SBm7462
RNase: Ribonuclease
SBm7462[®]: Vacina sintética derivada da proteína Bm86
SEKDEL: Sequência de retenção celular
seq2: *Gene responsável pela síntese do peptídeo rBm7462*
Tris: Hidroximetil aminometano
UCP: Unidade de Crescimento de Plantas
UFV: Universidade Federal de Viçosa
V: Volts
x g: Múltiplos da força da gravidade
TGF-β: Fator de Crescimento Tumoral Beta
IL-2, 4, 10: Interleucinas 2, 4 e 10, respectivamente
INF-γ: Interferon gama

RESUMO

KALKS, Karlos Henrique Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2011. **Avaliação da resposta imune de camundongos BALB/c imunizados com o peptídeo SBm7462[®], anti *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, expresso em plantas (*Arabidopsis thaliana*).** Orientador: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo. Coorientadoras: Marlene Isabel Vilória Vargas e Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Os prejuízos causados pela infestação de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tem sido estimada em bilhões de dólares nos países tropicais e subtropicais. As formas de combate mais utilizadas para este ectoparasita são baseadas principalmente no uso de químicos acaricidas. Buscando uma forma alternativa para o controle do parasita, foi desenvolvida a vacina sintética anti *R. (B.) microplus* (SBm7462[®]). A vacina sintética SBm7462[®] contém três epitopos imunogênicos (4822, 4824 e 4823) derivados da proteína Bm86. Análises genéticas demonstraram que o fragmento correspondente a SBm7462[®] é conservado em populações *R. (B.) microplus* de diferentes regiões na América do Sul. Contudo, a produção desta vacina em escala industrial tornaria seu custo muito elevado. Assim sendo, formas alternativas de produção estão sendo desenvolvidas. A utilização de plantas como bioreatores para produção de proteínas heterólogas é uma metodologia muito atrativa, visto que as plantas transgênicas constituem um dos sistemas mais econômicos para produção de proteínas em escala industrial. O objetivo deste trabalho foi estudar a resposta imunológica de camundongos, imunizados oralmente com *Arabidopsis thaliana* transgênicas, que expressam o peptídeo

recombinante rBm7462. Para isso, sementes transformadas em um trabalho anterior foram cultivadas até a quinta geração. Após confirmação da produção do peptídeo, 0,5g de folhas das plantas transformadas foram administradas oralmente a camundongos BALB/c, por três vezes (intercaladas por 3 semanas); assim como também 200µL de extrato de proteínas totais solúveis, inoculado por via subcutânea. Após 9 semanas, durante as quais foram feitas coletas sanguíneas dos animais, semanalmente, estes foram eutanasiados para a coleta dos linfonodos e íleo. Os resultados demonstraram que não foi possível detectar níveis de IgGs anti-rBm7462 em camundongos imunizados oralmente com folhas de plantas transgênicas expressando o peptídeo rBm7462, como também em camundongos imunizados com extratos de proteínas totais solúveis das mesmas plantas, quando a metodologia ELISA indireto foi utilizada. Contudo, os linfonodos dos animais imunizados apresentaram alterações microscópicas relacionadas à resposta imunológica e marcações, através da técnica de imunohistoquímica, para o peptídeo rBm7462. Estas observações levaram a conclusão que a dose de antígeno oferecida aos animais foi sub-antigênica o que pode ter estimulado mecanismos de tolerância ao antígeno. O que torna necessário um ajuste nas doses oferecidas aos animais. Sementes utilizadas derivadas da linhagem 2FN possibilitaram a obtenção da quinta geração de plantas transformadas, indicando que o gene *seq2*, responsável pela síntese do peptídeo rBm7462, provavelmente encontra-se em homozigose. O que indica a estabilidade genômica dele e a viabilidade em se produzir o antígeno em plantas transgênicas.

ABSTRACT

KALKS, Karlos Henrique Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, april, 2011. **Evaluation of the immune response of BALB/c mice immunized with the peptide SBm7462[®], anti Rhipicephalus (Boophilus) microplus, expressed in plants (*Arabidopsis thaliana*).** Advisor: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Co-Advisors: Marlene Isabel Vargas Vilória and Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

The damage due to infestation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* has been estimated at billions of dollars in the tropical and subtropical countries. The most commonly used forms of combat for this ectoparasite is mainly based on the use of chemical acaricides. Seeking an alternative way to control the parasite, the vaccine was developed synthetic anti *R. (B.) microplus* (SBm7462[®]). The synthetic vaccine SBm7462[®] contains three immunogenic epitopes (4822, 4824 and 4823) derived from the Bm86 protein. Genetic analysis showed that the fragment corresponding to SBm7462[®] is conserved across populations *R. (B.) microplus* from different regions in South America, however, the production of this vaccine on an industrial scale would cost very high. Therefore, alternative methods of production are being developed. The use of plants as bioreactors for production of heterologous proteins is a very attractive approach, since the transgenic plants are one of the most economical systems for protein production on industrial scale. The objective was to study the immune response of mice immunized orally with transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing the recombinant peptide rBm7462. For this, seeds processed in a previous work were grown until the fifth generation. After

confirmation of the production of the peptide, 0.5 g of leaves of transformed plants were administered orally to BALB/c, three times (interrupted by 3 weeks), as well as 200 μ L of total soluble protein extract, inoculated subcutaneously. After 9 weeks, during which blood samples were collected from animals, weekly, they were euthanized for collection of lymph nodes and ileum. The results showed that it was not possible to detect levels of IgG anti-rBm7462 in mice immunized orally with leaves of transgenic plants expressing the peptide rBm7462, as well as in mice immunized with total soluble protein extracts of these plants, while the indirect ELISA method was used. However, the lymph nodes of immunized animals showed microscopic changes related to immune response and markings, by immunohistochemistry, for the peptide rBm7462. These observations led to the conclusion that the antigen dose was given to the animals sub-antigenic which may have stimulated mechanisms of tolerance to the antigen. What makes a necessary adjustment in the doses given to animals. Seeds used strains derived from 2NF allowed for the preparation of the fifth generation of transformed plants, indicating that the gene seq2, responsible for the synthesis of peptide rBm7462 probably is homozygous. What it indicates the genomic stability and viability of producing the antigen in transgenic plants.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, os prejuízos causados pela infestação do gado por carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tem sido estimada em torno de 2 bilhões de dólares anuais, sendo um dos maiores problemas da pecuária na atualidade (GRISI *et al.*, 2002). As principais causas dessas perdas são atribuídas a intensa hematofagia, inoculação de toxinas das glândulas salivares, transmissão de uma variedade de patógenos, queda na capacidade produtiva do gado e depreciação do couro.

Os métodos de controle tradicionais existentes estão centrados no uso de químicos acaricidas, os quais têm levado a seleção de várias populações de carrapatos resistentes a muitas classes dessas substâncias. Além disso, o aumento da preocupação com o meio ambiente e com a saúde humana, tornou necessária a procura de formas alternativas de controle dos carrapatos (KUMAR *et al.*, 2009).

Buscando uma forma alternativa para o controle do parasita, foi desenvolvida a vacina sintética anti *R.(B.) microplus* (SBm7462[®]). Esta vacina contém determinantes imunogênicos da proteína do intestino do carrapato, a Bm86. Quando usada em conjunto com saponina e testada sobre gados de várias raças, este imunógeno alcançou uma eficácia de 81,05%, tendo como parâmetros redução no número e do peso de fêmeas adultas, redução do peso médio dos ovos e diminuição da fertilidade (PATARROYO, *et al.* 2002).

Contudo, existem no mundo poucos centros de produção química de peptídeos em escala industrial. Este fato dificultaria a distribuição dessa vacina e aumentaria seu custo.

A produção do imunógeno de forma recombinante em leveduras e plantas é um método que está sendo implementado pelos pesquisadores do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV), Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agrapecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa (UFV). Essa forma de produção pode ser estabelecida em diferentes localidades ou países, o que pode acarretar em um menor custo de produção e distribuição.

As plantas transgênicas constituem um dos sistemas mais econômicos para a produção em larga escala de proteínas para uso industrial e farmacêutico (CANÇADO, 2002; MA *et al.*, 2005; MEI *et al.*, 2006).

No Brasil, uma lei regulamenta e possibilita a exploração desta nova tecnologia sendo conhecida como lei de Biossegurança, Lei 11.105/05.

Este trabalho objetiva estudar a resposta imunológica de camundongos, imunizados oralmente com plantas *Arabidopsis thaliana* transgênicas, produzidas em um trabalho anterior, que expressam o peptídeo rBm7462[®]. A análise da resposta desenvolvida por esses animais é importante, visto que o conhecimento do ambiente imunológico no qual a resposta imune é processada é de vital importância no aprimoramento da eficiência da vacina e de sua produção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887)

De acordo com OLIVER (1989), existem no mundo cerca de 825 espécies de carrapatos. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, o carrapato comum dos bovinos, pode ser encontrado praticamente em todos os países compreendidos entre os paralelos 32º de latitude norte e 35º de latitude sul, onde é o principal ectoparasita na pecuária (NUÑEZ *et al.*, 1982). No Brasil, sua distribuição se dá com maior frequência nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e toda a costa brasileira (ESTRADA-PEÑA, 1999), devido às boas condições de umidade, temperatura e pela exploração pecuária mais intensa (PIMENTEL, 2002).

Taxonomicamente esse carrapato pode ser classificado da seguinte forma, conforme NUÑEZ *et al.* (1982):

Filo: Arthropoda
Classe: Arachnida
Ordem: Acari
Subordem: Metastigmata
Família: Ixodidae
Subfamília: Rhipicephalinae
Gênero: *Boophilus*
Espécie: *B. microplus*

Trabalhos moleculares para estudo de filogenia têm demonstrado que o gênero *Boophilus* é parafilético com os carrapatos do gênero *Rhipicephalus* o que leva alguns autores a proporem a mudança de classificação, passando de *Boophilus microplus* para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURREL *et al.*, 2000 e MURREL *et al.*, 2001).

O ciclo evolutivo de *R. (B.) microplus* exige um único hospedeiro para a sua evolução, no qual realiza todas as suas mudas; trata-se de um carrapato do tipo monoxênico. Este parasito tem o ciclo evolutivo dividido em duas fases, uma de vida livre e outra parasitária, uma fase ocorre no ambiente e outra no hospedeiro, respectivamente, sendo que a que ocorre no ambiente é a de postura de teleógena e de neolarvas. A dinâmica e viabilidade da fase de vida livre são fortemente influenciadas pelo micro clima ao redor do carrapato, principalmente as condições de umidade e temperatura (GONZALES, 1974; CORSON *et al.*, 2004; SUTHERST e BOURNE, 2006).

Apesar de ser conhecido como carrapato de bovinos, o *R.(B.) microplus* pode utilizar outras espécies como hospedeiros acidentais, como ovelha, veado, cavalo, coelho, cães, cabras e o próprio homem (GONZALES, 1974; PRATA *et al.*, 1999).

R. (B.) microplus é um carrapato que provoca perdas econômicas, na ordem de 7 dólares por animal ao ano, na América Central, do Sul e na Austrália (MC COSKER, 1979). Segundo a FAO (*Food and Agriculture organization*), o prejuízo ultrapassa sete bilhões de dólares anuais no mundo. No Brasil, os prejuízos causados pela infestação do gado por carrapatos *R. (B.) microplus*, tem sido estimada em torno de 2 bilhões de dólares anuais, sendo um dos maiores problemas da pecuária na atualidade (GRISI *et al.*, 2002). Segundo JONSSON (2006), cada fêmea ingurgitada pode levar a uma redução de aproximadamente 1,37g de peso dos bovinos, além de levar a prejuízos pela perda do couro, baixa conversão alimentar, e transmissão de hematozoários. Esse autor ainda relata anemia, supressão do apetite e alteração no metabolismo como conseqüências da perda de produção devido à infestação de *R. (B.) microplus*. Estudos demonstram que os carrapatos provocam efeitos imunodepressores, o que pode facilitar a transmissão ou a

gravidade de babesioses e anaplasmoses (KASHINO *et al.*, 2005; JONSSON, 2006).

Entre os métodos utilizados para o controle do *R. (B.) microplus* estão o químico e o biológico. O primeiro é o mais utilizado atualmente, além de ser alternativa eficaz. Porém, este meio de combate aos carrapatos apresenta um alto custo de aquisição, além de necessitar instalações adequadas para seu manuseio, como também mão-de-obra especializada. Outra preocupação relacionada ao uso de acaricidas no combate aos carrapatos é associada à contaminação com resíduos químicos da carne e do leite, além da contaminação do ambiente através do solo e dos rios. Ainda que seja resolvido o problema da contaminação ambiental, outro problema ainda persiste com o uso de acaricidas: a seleção de populações de carrapatos resistentes a determinados princípios ativos. Sendo assim necessário muitas vezes, a utilização de vários acaricidas diferentes, ou então, formulações que são associações de princípios ativos diferentes. Tudo isso pode levar a um maior processo de seleções de populações mais resistentes ou resistentes a mais de um princípio ativo. Deve-se destacar que foi mostrado que o *B. (R.) microplus* pode apresentar resistência mais rapidamente que outros carrapatos, provavelmente, pelo menor período de tempo entre as gerações (FREITAS *et al.*, 2005).

O controle biológico dos carrapatos é baseado em diferentes metodologias. Entre estas, pode-se destacar o rodízio de pastagens e/ou cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das fases de vida livre do carrapato; seleção de raças menos sensíveis ao carrapato; a utilização de predadores naturais como a garça vaqueira, *Egretta ibis*; além do uso de parasitas dos carrapatos como bactérias, fungos e nematodos (SAMISH *et al.* 2004; FREITAS *et al.* 2005). Também existem as vacinas como método biológico para controle de carrapatos. Recentemente, têm sido desenvolvidas vacinas que induzem proteção imunológica de vertebrados contra infestações de carrapatos. A possibilidade do controle de infestações através da imunização de hospedeiros com antígenos selecionados foi demonstrado com o desenvolvimento de vacinas que reduzem infestações de *Boophilus ssp.* sobre o gado. O controle de carrapatos pela vacinação possui vantagens de

ser menos dispendioso, além de reduzir o risco da contaminação do ambiente e/ou dos produtos de origem animal, assim como também prevenir a seleção de populações de carrapatos resistentes aos químicos acaricidas (FUENTE et al., 2007). Contudo, é necessário lembrar, que carrapatos de diferentes regiões podem apresentar diferenças genéticas e fisiológicas, devido ao processo de isolamento geográfico. Sendo assim, o controle destes parasitas pelo método imunológico pode não ser tão eficiente. Atualmente existe uma busca crescente por um antígeno que seja universal a diferentes cepas de carrapatos, protegendo desta forma o rebanho (GARCÍA-GARCÍA et al., 1999).

2.2. O imunógeno sintético SBm7462®

Os danos causados ao ambiente pelo uso de métodos químicos para o controle do *R. (B.) microplus* e a exigência do mercado na busca de uma solução mais eficiente e menos poluidora, tem estimulado o estudo de outros métodos para o combate deste parasita. Neste contexto, insere-se a produção de uma possível vacina como forma alternativa de controle do carrapato (WILLADSEN et al., 1996, RODRIGUEZ et al., 1994, GARCÍA – GARCÍA et al., 2000, PATARROYO et al., 2002).

Em 1986, JOHNSTON et al. observaram que animais inoculados com extratos brutos de *R. (B.) microplus* apresentavam maior resposta imune ao carrapato do que os animais não inoculados. Ainda neste trabalho, os pesquisadores conseguiram confirmar que os anticorpos produzidos contra o carrapato atuavam no intestino do parasito.

WILLADSEN et al. (1989) isolaram uma glicoproteína intestinal de uma amostra de *R. (B.) microplus* australiana denominada Yeerongpilly. Essa glicoproteína recebeu a denominação de Bm86, estando presente em larvas, ninfas e adultos. Seu ponto isoelétrico foi estimado em 5,5 e massa molecular em 89kDa. Posteriormente, determinou-se a sequência de aminoácidos, sendo esta proteína formada por 650 aminoácidos com potenciais sítios de glicosilação. A sequência nucleotídica do gene da bm86 possui 2225 nucleotídeos e supõe-se que sua função seja vinculada com a endocitose (RAND et al., 1989; OLIVEIRA, 1998).

Em 1998, OLIVEIRA estabeleceu que a proteína Bm86 está localizada nas microvilosidades da membrana das células epiteliais do intestino, sendo muito encontrada próximo à membrana basal.

Vacinas constituídas com base na proteína Bm86 atuam principalmente pelo mecanismo protetor induzido pela produção de anticorpos anti-Bm86, sendo possível o envolvimento de mecanismos do sistema complemento, além de outros meios efetores. A resposta imunológica humoral atua diretamente sobre o intestino do carrapato reduzindo o número de teleóginas ingurgitadas, além do seu peso e fecundidade (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 1998; WILLADSEN, 2004; RUIZ *et al.*, 2007). HERNÁNDEZ *et al.* (1997) observaram que ocorrem alterações histológicas do trato digestivo de *R. (B.) microplus* pela ação de anticorpos anti-rBm86. Dentre as alterações observadas podem-se citar: destruição de células digestivas, secretoras e basófilas e extravasamento do conteúdo digestivo para a cavidade celomática provocado pela ruptura da parede intestinal.

Em 1994, na Austrália, foi autorizada a comercialização da primeira vacina contra o *R. (B.) microplus*, feita a partir da clonagem do gene *bm86* em uma bactéria (*Escherichia coli*) e produção da proteína recombinante (rBm86), que recebeu o nome de TickGARD[®] (SMITH *et al.*, 1995; WILLADSEN, 1997). Em 1996, foi lançada a TickGARD^{plus}[®], na qual junto com a Bm86 foi adicionada a proteína Bm95 além de um novo adjuvante, chamado Vaximax[®], o qual induziria a produção de títulos mais altos de anticorpos específicos. Esta vacina foi testada com sucesso em várias raças de bovinos na Austrália (WILLADSEN, 1997). Contudo, apesar de apresentar resultados satisfatórios quando avaliada sua eficiência na geração de uma resposta imune em bovinos; em relação às vacas *Holstein-Friesian*, baixos títulos de produção de anticorpos foi obtido, além destes apresentarem curta duração quando observada a resposta imunológica dos animais (JONSSON *et al.*, 2000).

Em Cuba, no ano de 1994, no Heber Biotec AS, Havana, através de recombinação do gene da glicoproteína Bm86 foi formulada a vacina GAVAC[®], e após mais estudos, foi produzida a vacina GAVAC plus[®], sendo esta produzida na levedura *Pichia pastoris* (GARCÍA-GARCÍA *et al.* 1998). Testes realizados sobre condições de campo mostraram que a vacina GAVAC[®]

reduziu o número de carrapatos e o peso das teleóginas ingurgitadas, como também a diminuição da postura e viabilidade dos ovos (RODRIGUEZ *et al.* 1994).

Segundo JONSSON *et al.*, (2000) a eficácia das vacinas cubana e australiana tem variado entre 50 e 91%, quando avaliados os parâmetros já citados.

Testes conduzidos com uma amostra Argentina de *R. (B.) microplus* (cepa A) demonstraram que a vacina cubana foi pouco eficiente no combate desta cepa. Este resultado levou ao isolamento, nesta amostra, de uma nova proteína muito similar à Bm86, denominada Bm95, que foi posteriormente expressa em *Pichia pastoris*. A proteína recombinante foi utilizada como antígeno vacinal, contudo também apresentou resultados variados na ação contra o parasita. Esta proteína apresenta função homóloga a Bm86 e possui 2225 nucleotídeos que codificam 569 resíduos de aminoácidos (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000).

Estudos de polimorfismo realizados por SOSSAI *et al.* (2005), demonstraram que populações de *R. (B.) microplus* originárias do Brasil, Argentina, Venezuela, Uruguai e Colômbia apresentaram polimorfismos de até 6,08%, quando analisado 40% do gene *bm86*. Populações de carrapatos de São Gabriel e Butiá, ambas do Rio Grande do Sul apresentaram polimorfismos na expressão de aa. de 4,18% e 3,42% com referência à Bm86 e 1,9% e 1,14% com referência à Bm95.

WILLADSEN *et al.* (1995) sugerem que divergências superiores a 2,8% da seqüência de aminoácidos seriam suficientes para conferir “resistência” vacinal.

Estudos realizados por HOOP & WOODS (1981) que consideram propriedades das proteínas como antigenicidade; em conjunto com os feitos por CHOU & FASMAN (1978), que avaliam a potencialidade alfa e beta hélice, beta *sheet*; somados aos realizados por KYTE & DOOLITTLE (1982), os quais ponderam sobre a hidrofobicidade e hidrofiliabilidade; possibilitaram a escolha de alguns peptídeos, a partir da estrutura primária da Bm86, como possíveis sítios antigênicos.

Três sequências peptídicas foram desenhadas por pesquisadores do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores – BIOAGRO na Universidade Federal de Viçosa, por análises de predição computacional. Essas sequências provenientes da Bm86 e dos estudos citados acima; foram denominadas 4822, 4823 e 4824 de acordo com a sua catalogação no livro de sequências do Instituto de Imunologia Del Hospital San Juan de Dios em Bogotá – Colômbia, onde foram sintetizadas. O imunógeno formado a partir dessas três sequências é denominado SBm7462[®], sua estrutura é demonstrada na figura um (PATARROYO *et al.* 2002).

Os epítomos imunogênicos da vacina SBm7462[®] demonstraram ser conservados em populações de carrapatos da América do Sul. Fato que corrobora com a idéia do imunógeno SBm7462[®] ser usado como vacina universal (PECONICK *et al.*, 2008).

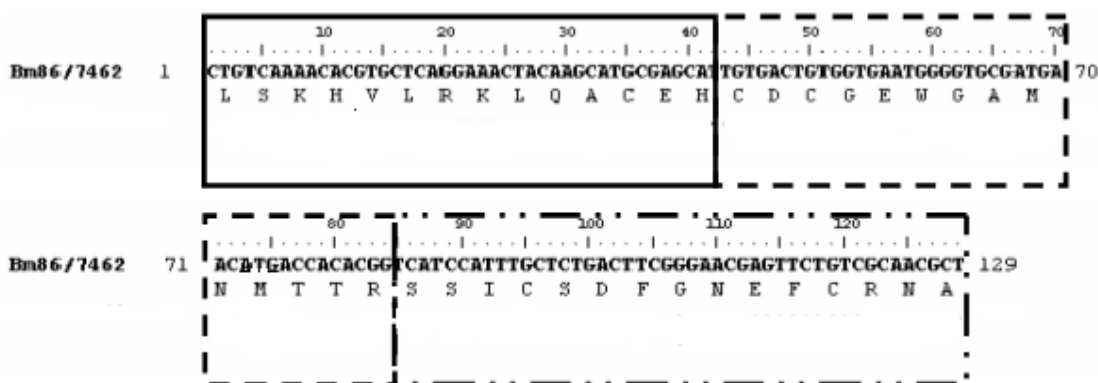


Figura 1. Estrutura nucleotídica e aminoacídica da vacina sintética SBm7462[®]. Em destaque pela linha cheia o peptídeo 4822, pela linha tracejada o peptídeo 4824, pela linha tracejada pontuada o peptídeo 4823.

O peptídeo SBm7462[®], provou estimular a produção de imunoglobulinas antígeno-específicas, sendo que o isotipo IgG1 mostrou-se estatisticamente predominante sobre o isotipo IgG2. Observando-se então que o SBm7462[®] é eficiente em induzir uma resposta imune antígeno-específica, GONZÁLEZ (2003).

A eficiência vacinal do peptídeo sintético SBm7462[®] com adjuvante saponina, em bovinos *Bos taurus taurus*, mantidos em estábulos próprios a

prova de artrópodes, alcançou 81,05% na redução do número de carrapatos de acordo PATARROYO *et al.* (2002).

Outros estudos, realizados por COUTO PIMENTEL (2002), demonstraram que o peptídeo sintético SBm7462[®] foi capaz de alcançar uma eficiência vacinal de 53,29% para o grupo vacinado com 2,0mg do peptídeo SBm7462[®] com o adjuvante saponina, quando os animais foram submetidos a condição de estresse. Neste estudo foram utilizados 30 bovinos *Bos taurus taurus*, da raça Holandesa, mantidos em pastagens previamente infestadas com larvas de *R. (B.) microplus*.

SALES-JUNIOR *et al.* (2005) avaliaram a resposta imune de bovinos vacinados com o peptídeo SBm7462[®], afim de testar um modelo de liberação lenta que utiliza microesferas biodegradáveis de PLGA (poliésteres derivados dos ácidos láctico e glicólico). Os resultados revelaram que o adjuvante saponina potencializa melhor resposta do imunógeno, provocando uma resposta mais precoce e que, as microesferas PLGA mostram-se viáveis ao serem utilizadas como sistema de liberação do peptídeo. Contudo, mais estudos são necessários para um desenvolvimento de um melhor processamento de encapsulação do peptídeo e que também seja viável economicamente.

2.3. Plantas utilizadas para expressar e produzir subunidades vacinais

Culturas de células de mamíferos, leveduras e insetos são úteis em produzir subunidades vacinais, devido sua possibilidade de processar proteínas recombinantes de uma maneira similar ao organismo nativo. Entretanto, meios de cultivos caros e passos posteriores de purificação são necessários para recuperar as proteínas recombinantes nestes organismos. Tudo isso leva a um grande custo de produção, o que restringe o uso deste tipo de vacinas nos países em desenvolvimento (RIGANO, *et al.*, 2005).

O uso de plantas transgênicas para a produção de antígenos virais e bacterianos tem sido frequentemente reportado nos últimos anos. Esta estratégia biotecnológica tem vantagem de não requerer sistemas de controle de fermentação sob estritas condições de biossegurança e esterilidade, o que

faz esta tecnologia particularmente atrativa pela sua simplicidade e baixo custo (SANTOS, *et al.*, 2005).

Entre os benefícios em utilizar plantas como bioreatores para produção de proteínas recombinantes encontram-se a possibilidade da produção em larga escala e o baixo custo. O custo unitário da produção por este método é apenas uma fração daqueles que utilizam bactérias, leveduras ou sistemas baseados sobre células de mamíferos (LAU, *et al.*, 2009).

Produção de vacinas em vegetais comestíveis possibilita a administração oral direta, eliminando a necessidade de processamentos caros como a extração e purificação do imunógeno. Custos inerentes ao procedimento tradicional de imunização também são eliminados, como a necessidade de reunião e contenção do rebanho, o que leva a um estresse animal adicional, além de perdas devido à quebra de agulhas, traumas do tecido, necessidade de um ambiente estéril, transporte e armazenamento sob refrigeração. Às vantagens anteriores, podem-se somar o baixo risco de contaminação das vacinas produzidas em plantas, pois nenhum patógeno humano ou animal conhecido se propaga por plantas (LEE *et al.*, 2008).

Antígenos vacinais podem ser produzidos em plantas usando dois diferentes sistemas: transformação genética estável e expressão transiente. A transformação estável produz uma linhagem genética que pode ser propagada por reprodução sexuada ou de maneira vegetativa. A transformação estável é obtida quando ocorre a integração de DNA (ácido desoxirribonucléico) exógeno ao genoma da planta alvo. A expressão transiente usa um vírus recombinante que carrega o gene da vacina para expressar o antígeno. A principal vantagem da expressão transiente consiste no fato de que o sistema de replicação do vírus amplifica o número de cópias do gene na planta. Isto contribui para uma maior expressão protéica quando comparado com o a expressão obtida pela transformação estável, entretanto a transformação estável pode ser atraente visto que neste modelo de inserção do gene, várias gerações de plantas transformadas podem ser obtidas, o que torna a produção da proteína heteróloga contínua por tempo indefinido (KOPROWSKI *et al.*, 2001; MASON *et al.*, 2002; MISHRA *et al.*, 2008).

Dentre vários métodos de transformação de plantas dois são mais utilizados: sistema carreador de plasmídeos/vetores, o qual utiliza o método da *Agrobacterium tumifaciens*; e o sistema de biobalística (bombeamento de microprojétil). *A. tumifaciens* é uma bactéria naturalmente encontrada no solo a qual é usada para transferir um pequeno fragmento de DNA para dentro do genoma da planta. A aplicação da transformação mediada por *Agrobacterium* primeiramente foi limitada ao tabaco e poucas espécies, as quais são alvos naturais desta bactéria, porém hoje, mais espécies têm sido transformadas, principalmente aquelas de interesse agrônomo incluindo gramíneas e leguminosas. Este fato contribui para novas perspectivas de desenvolvimento de vacinas comestíveis tanto para o uso humano quanto para o veterinário (MASON *et al.*, 2002; MISHRA *et al.*, 2008).

Na segunda alternativa de transformação, método de bombeamento, sequências de DNA selecionadas são precipitadas sobre micropartículas de metal. Posteriormente são injetadas por pressão através de uma pistola apropriada. As micropartículas penetram as paredes celulares e liberam o DNA exógeno dentro das células, onde eles poderão integrar ao genoma através de mecanismos ainda não bem estabelecidos (MISHRA *et al.*, 2008).

O método do bombeamento pode ainda possibilitar a integração do DNA exógeno ao genoma dos cloroplastos, já que estas organelas possuem DNA próprio. Sendo assim, este modelo de transformação torna-se uma alternativa interessante à transformação nuclear, visto que uma alta produção de proteínas pode ser alcançada (VAN ECK *et al.*, 2004). Embora a transformação de cloroplastos seja mais confiável para alta expressão de proteínas solúveis totais (0,5-1%), ela não é capaz de produzir proteínas glicosiladas (RIGANO *et al.*, 2005).

Todos os sistemas de produção de plantas podem processar modificações pós-traducionais (PTM). As PTM de proteínas recombinantes são importantes para a manutenção da sua antigenicidade. Modificações protéicas por glicosilação são encontradas em todos os eucariotos superiores, e plantas contêm glicanos ligados por nitrogênio (-N) como também por oxigênio (-O). Complexos glicanos nativos podem ser completamente heterólogos, mas eles tendem a serem menores que complexos de mamíferos, além de diferirem no

resíduo terminal. Por apresentarem estas diferenças, proteínas recombinantes derivadas de plantas podem ter sua imunogenicidade aumentada (RIGANO *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2005).

Os peptídeos que são produzidos em plantas transgênicas podem ser estáveis e ainda manter seus níveis de antigenicidade e imunogenicidade (GIL *et al.*, 2007). Melhores resultados estão sendo alcançados para a expressão de peptídeos em plantas com o uso de genes sintéticos usando códons otimizados, uso de promotores fortes, que podem incluir a sequência KOZAC ou sinais de retenção celular, como a SEKDEL (DONG *et al.*, 2005). RIGANO *et al.* (2005), afirmam que proteínas que não possuem a sequência KDEL de retenção no retículo endoplasmático, acumulam-se entre a membrana celular e a parede celular.

Existem vários tipos de plantas utilizadas para a produção de proteínas e outros antígenos vacinais, entre elas: *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa* (alfafa), espinafre, batata, ervas aquáticas como a *Lemna ssp.*, entre outras. Muitas delas são escolhidas porque são livres de toxinas, repletas de nutrientes, podem ser consumidas cruas, além de serem palatáveis. Os antígenos podem ser expressos no citoplasma ou se localizarem em qualquer organela ou compartimento celular (MEI *et al.*, 2006; RYBICKI, 2009).

A expressão de antígenos em tecidos comestíveis é frequentemente conveniente por ser mais barato. Segundo TIWARI *et al.* (2009), a expressão de proteínas de interesse comercial no tecido foliar pode não ser uma boa estratégia pelas seguintes razões: o conteúdo protéico total nas folhas é baixo, as folhas apresentam alta atividade de proteases, a presença de pigmentos e compostos fenólicos faz a purificação de proteínas recombinantes das folhas mais difícil e cara, além de boas práticas de manufaturamento serem mais difíceis devido a necessidade de manusear grande volume e biomassa. Sendo assim, outros tecidos como raízes e sementes são muitas vezes selecionados.

Apesar do descrito acima, muitos trabalhos utilizam o tecido foliar como alvo para expressão protéica. A tabela um apresenta alguns exemplos. Resultados obtidos por DOROKHOV *et al.* (2007), indicam que a expressão transiente concomitante a tecnologia de supressão do gene responsável pela

defesa antiviral da planta, leva a uma rápida e grande expressão de proteína recombinante na folhas.

Planta/Tecido	Promotor	Patógeno	Doença	Proteína antigênica	Referência
Tabaco/Folha	CaMV35S	<i>V. cholerae</i>	Cólera	Subunidade B da toxina cólera	HEIN <i>et al.</i> (1996)
Batata/Folha e bulbo	CaMV35S	<i>E. coli</i>	Diarréia	LTB	MASON <i>et al.</i> (1998)
<i>Arabidopsis thaliana</i> /Folha	CaMV35S	<i>E. coli</i> – <i>M. tuberculosis</i> – <i>M. Bovis</i>	Diarréia e tuberculose	LTB e ESAT-6	RIGANO <i>et al.</i> (2004)
Cenoura/Folha e raiz	CaMV35S	<i>E. coli</i>	Diarréia	LTB	ROSALES – MENDOZA <i>et al.</i> (2008)
Banana/Folha e fruto	<i>ubq3</i> e Enzima formadora do Etileno	Vírus da hepatite B	Hepatite	HBsAg	KUMAR <i>et al.</i> (2005)
Alfafa/Folha	CaMV35S	Rotavírus	Gastroenterite viral	Rotavírus do grupo A humano PBsVP6	DONG <i>et al.</i> (2005)
Amendoim/Folha	CaMV35S	Vírus da peste bovina	Peste bovina	Proteína H do vírus da peste bovina	KHANDELWAL <i>et al.</i> (2003)

Tabela 1. Expressão estável de antígenos vacinais em plantas (modificado de TIWARI *et al.*, 2009).

Uma preocupação pertinente quando se desenvolve um trabalho envolvendo plantas transgênicas é relacionada à biossegurança. Segundo TEIXEIRA E VALLE (1996), biossegurança é o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, visando à saúde do homem, dos animais, a preservação do meio ambiente e a qualidade dos resultados. Os riscos inerentes a utilização dos organismos geneticamente modificados, como um potencial método de imunização, são então controlados através de medidas regulatórias apropriadas em todos os estágios de produção de distribuição (KIRK *et al.*, 2005). No Brasil, a lei número 11.105/2005 regulamenta a Política Nacional de

Biossegurança (PNB), cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, e reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio.

2.4. Imunização por via oral

Vacinas são desenhadas para eliciar a resposta imunológica sem causar a doença. Vacinas clássicas são compostas pelos agentes causadores das doenças atenuados ou mortos. Portanto, para estes modelos vacinais aspectos relacionados à segurança e produção devem ser estritamente controlados. A produção de vacinas recombinantes contorna em grande parte este problema, especialmente aquelas produzidas em plantas, as quais tornaram-se objetos de estudo em muitas linhas de pesquisa, como alternativa às metodologias tradicionais de produção de vacinas. Imunógenos que podem ser ingeridos, chamadas de “vacinas comestíveis”, estão entre as mais novas metodologias de administração de antígenos. Neste contexto, a idéia de vegetais comestíveis sendo utilizados para produzir antígenos vacinais, é hoje uma das mais inovadoras frentes de pesquisa envolvendo as ciências médicas e a biologia das plantas, objetivando a criação de fármacos eficazes e confortáveis no combate aos patógenos (TACKET *et al.*, 1999; GIL *et al.*, 2001; STREATHFIELD *et al.*, 2003; MISHRA *et al.*, 2008).

Existem muitas razões para a utilização da imunização que estimule a resposta nas mucosas para vacinação no lugar da rota parenteral. A primeira e mais importante é que a grande maioria dos patógenos invade o hospedeiro através das superfícies mucosas, necessitando assim que nestes locais ocorra a indução de uma resposta imunológica protetora (HOLMGREN *et al.*, 2003; CARVALHO, 2008). Existem também razões práticas para a utilização de vacinas orais em vez de parenterais na prevenção de infecções sistêmicas. Vacinas orais podem ser mais fáceis de administrar, além de apresentar menos riscos de transmissão de agentes infecciosos associados ao uso de vacinas injetáveis. Administração de vacinas orais pode também levar a simplificação da produção de vacinas nos países em desenvolvimento, já que não necessitam de cuidados especiais para transporte e conservação (HOLMGREN *et al.*, 2003).

Uma preocupação com vacinas orais está na degradação dos componentes protéicos no estômago (devido ao baixo pH – potencial hidrogeniônico, e enzimas gástricas) e no intestino antes delas poderem eliciar respostas imunes. Sendo assim, guardar o antígeno contra a degradação requer que uma grande quantidade do imunógeno seja administrada, favorecendo dessa maneira a possível presença deste nos locais de geração da resposta. Outra forma seria a proteção do antígeno da ação das enzimas e do baixo pH no estômago. Recentemente tem sido desenvolvida uma variedade de sistemas de entrega de antígenos nas superfícies mucosas, os quais possibilitam os antígenos persistir em e sobreviver aos hostis ambientes gástricos e entéricos. Dentre estes sistemas incluem-se microesferas de polilactanos/poliglicanos, lipossomos, proteossomos, partículas como vírus e complexos imunoestimulantes (TACKET *et al.*, 1999; STREATFILELD *et al.*, 2003; MISHRA *et al.*, 2008).

Plantas comestíveis podem ser usadas para entregar antígenos para imunização ativa ou entregar anticorpos monoclonais clonados para prover imunização passiva (MA *et al.*, 1995; MA *et al.*, 1998). Vacinas baseadas em plantas fornecem meios para entregar grande quantidade de antígeno em uma forma encapsulada, pois a rígida parede celular presente nas células das plantas podem prover proteção contra a degradação entérica (STREATFILELD, 2006).

Imunização por via mucosa fornece uma grande resposta imunológica para um patógeno no sítio de invasão sendo a primeira linha de defesa a combater a infecção (STREATFIELD, 2006). Além disso, a vacinação direta sobre a superfície da mucosa pode não só induzir uma resposta imune local como também uma resposta imune sistêmica (AIZPURUA & RUSSELLJONES, 1988; MCGHEE & KIYONO, 1993; MCGHEE & KIYONO, 1998; RUDIN *et al.*, 1998; BERGQUIST *et al.*, 1997; KOGA *et al.*, 2000; JOHANSSON *et al.*, 2001).

O sistema imune de mucosas pode ser encontrado em uma grande diversidade de locais anatômicos. Nestes lugares ocorrem os contatos entre o ambiente externo e o hospedeiro, o que demonstra a importância destes sítios para a proteção do organismo, envolvendo para isso uma rede de mecanismos imunológicos e não–imunológicos. (ACHESON & LUCCIOLI, 2004).

O MALT (tecido linfóide associado à mucosa) representa um sistema imunológico altamente compartimentalizado com funções essencialmente independentes do aparato do sistema imune. Ele é composto pelos microcompartimentos como as placas de Peyer, os nódulos mesentéricos linfáticos, o apêndice e os folículos solitários no intestino, além das tonsilas e adenóides no trato aéreodigestivo. Ele contém grandes números de células linfóides no parênquima dos órgãos mucóides, nos quais formam sítios efetores onde a resposta imune pode ser manifestada (HOLMGREN & CZERKINSKY, 2005). Estas superfícies mucosas apresentam um grande número de APCs (células apresentadoras de antígenos), especialmente células dendríticas, que são responsáveis pela captação de antígenos e estimulação das células T (LIU & MACPHERSON, 1991; LIU & MACPHERSON, 1993; BAUCHEREAU & STEINMAN, 1998). Vasos linfáticos por onde as células do sistema imune e os antígenos são transportados estão presentes no MALT. Destes vasos, componentes apresentados ganham acesso aos linfonodos regionais, onde a resposta é amplificada (BRANDTZAEG & PABST, 2004).

De acordo com as localizações anatômicas, as estruturas do MALT podem ser subdivididas em (BRANDTZAEG & PABST, 2004):

- Tecido linfóide associado à conjuntiva (*conjunctiva-associated lymphoid tissue* - CALT);
- Tecido linfóide associado ao canal lacrimal (*lacrimal drainage-associated lymphoid tissue* - LADLT);
- Tecido linfóide associado às glândulas salivares (*salivary gland-associated lymphoid tissue/duct-associated lymphoid tissue* - SALT/DALT);
- Tecido linfóide associado às narinas/nasofaringe (*nose or nasopharynx-associated lymphoid tissue* - NALT);
- Tecidos linfóides do anel de Waldeyer;
- Tecido linfóide associado à laringe e traquéia (*larynx and trachea-associated lymphoid tissue* - LTALT);
- Tecido linfóide associado aos brônquios (*bronchus-associated lymphoid tissue* – BALT);

- Tecido linfóide associado à mucosa gástrica (*gastric mucosa-associated lymphoid tissue - Gastric MALT*);
- Tecido linfóide associado ao intestino (*gut-associated lymphoid tissue - GALT*).

Segundo CARVALHO (2008), o GALT é a parte do MALT que tem sido mais bem estudada, por ser uma importante via de entrada para muitos antígenos e agentes infecciosos. Ele compreende as placas de Peyer, os nódulos mesentéricos e um grande número de células espalhadas por toda a lâmina própria. As placas de Peyer têm uma semelhança anatômica com os órgãos linfóides secundários, com áreas claramente definidas de células T e B (MOWA & VINEY, 1997).

O objetivo de uma vacina oral é estimular imunidade sistêmica e de mucosa contra os patógenos. Vacinas comestíveis quando administradas oralmente passam pelo processo de mastigação e a maioria da degradação das células vegetais ocorre no intestino como resultado da ação de enzimas digestivas ou bacterianas. Placas de Peyer tem o potencial de estimular respostas imunológicas, consistindo estas de 30 a 40 nódulos linfáticos sob a superfície externa do intestino. Quando a quebra da vacina oral ocorre próxima a estes folículos, estes atuam como locais onde o antígeno penetra no epitélio do intestino, acumulando o imunógeno dentro de uma estrutura linfóide organizada. O antígeno então é colocado em contato com as células M. Onde ele entra em contato no lúmen com um grande processo membranoso que contém uma invaginação profunda na membrana plasmática basolateral. Este local é rico em grupos de células B, T e macrófagos, que podem iniciar o processo de resposta imunológica. Estas células M também expressam moléculas de MHC da classe II podendo apresentar o antígeno as células efectoras (MISHRA *et al.*, 2008).

Exposição oral a antígenos têm várias conseqüências potenciais, incluindo indução de hiporesponsividade sistêmica imunológica (tolerância), ativação imunológica sistêmica, e/ou indução de resposta (IgA) secretória local na ausência de resposta imune sistêmica mensuráveis. Antígenos solúveis administrados por via oral, mais frequentemente levam a tolerância sistêmica (STROBEL & MOWAT, 1998).

Tolerância oral é uma resposta imunológica ativa supressora a qual previne o desenvolvimento de respostas imunes para muitos antígenos ingeridos pelo hospedeiro, incluindo organismos comensais e proteínas alimentares. A tolerância é uma resposta imune específica iniciada após a tomada do antígeno pelas células M e é mediada pela geração de células T supressoras, as quais secretam citocinas e pela indução da deleção clonal ou anergia (TACKET & MASON, 1999).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar a resposta imunológica de camundongos BALB/c imunizados via oral com plantas *Arabidopsis thaliana* transgênicas expressando o peptídeo rBm7462.

3.2 Objetivos específicos

- Cultivar plantas transgênicas *Arabidopsis thaliana* e não transgênicas (tipo selvagem);
- Caracterizar a expressão de peptídeo recombinante;
- Imunizar via oral camundongos com plantas transgênicas expressando o peptídeo rBm7462;
- Determinar a resposta imune humoral em camundongos BALB/c imunizados com plantas transgênicas por via oral;
- Estudar a dinâmica das alterações microscópicas dos folículos linfóides e centros germinais nos linfonodos dos animais imunizados.
- Identificar a presença do antígeno nos linfonodos e intestino dos animais imunizados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local de realização e regulamentação do experimento

Diversos locais foram utilizados para a realização de todo o experimento. Para a manipulação das sementes e plantas transgênicas foi utilizado o Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, no Instituto de Biotecnologia Aplicada À Agropecuária - BIOAGRO - da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a responsabilidade da professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes. O cultivo das plantas foi feito na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), setor do departamento de Biologia Vegetal, também sob a orientação da mesma professora. Os laboratórios citados acima estão autorizados para trabalharem na linha proposta e possuem o denominado Certificado de Qualidade em Biosegurança (CQB) concedido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio); o CQB vigente é de número 0024/97.

Os animais utilizados durante o experimento foram mantidos no biotério, do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores, anexo ao setor de reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

A preparação dos cortes histológicos realizados neste experimento, foram realizados no Laboratório de Histopatologia Veterinária, do Departamento de Medicina Veterinária, gentilmente cedido pela professora. Marlene Isabel Vargas Vilória.

Os demais procedimentos laboratoriais foram executados no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores – LBCHV, também no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, sob orientação do professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo.

Este experimento foi autorizado ser executado segundo as normas do comitê de ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa para trabalho com animais experimentais e de acordo com as normas do CTNBio (protocolo: 01200002610/94-04). O número de registro do projeto é 50554257568.

4.2. Obtenção e cultivo de material vegetal

Para o experimento foram utilizadas sementes de plantas *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia, previamente transformadas em estudo anterior e estocadas sob refrigeração à 4°C, em ambiente livre de umidade, no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores. Também foram utilizadas sementes da mesma espécie, porém não transformadas, estas utilizadas como controle.

As primeiras sementes transformadas utilizadas neste experimento consistiam na segunda (F1) e terceira geração (F2) das plantas transformadas, rotuladas como 2ST e 2FN, respectivamente. Uma quinta geração de plantas (F4) foi obtida durante o experimento. Sementes obtidas dessas plantas rotuladas como 4FN e estocadas no LBCHV como descrito acima.

Foram realizados dois procedimentos de esterilização das sementes para posterior cultivo. Em um dos procedimentos, as sementes foram submetidas à desinfecção seguindo-se o protocolo descrito por KAGALE *et al.* (2007). As sementes estocadas em tubos de centrífuga de 1,5mL foram submetidas a um banho (1 minuto) em álcool etílico 75%, sendo posteriormente lavadas em água deionizada autoclavada duas vezes. Após este passo, foram submetidas a um banho de hipoclorito de sódio a 1,05% por vinte minutos. Terminado o tempo, foram lavadas com água deionizada autoclavada por cinco vezes, sendo que, após a última lavagem não foi retirada toda a água, deixando-se um pouco desta de modo que as sementes continuassem imersas.

No outro procedimento de esterilização, as sementes foram separadas em pequenas porções em microtubos contendo o suficiente para semear uma placa. Posteriormente foi adicionado 1mL de etanol 75% acrescido de 0,05% de *Triton X-100*. Procedeu-se com uma agitação lenta dos microtubos durante cinco minutos, seguida do descarte do álcool. Neste ponto, 1mL de álcool absoluto foi adicionado para cada tubo, deixando-os repousar por 1 minuto. Passado o tempo, todo o álcool foi retirado. Todo procedimento descrito foi repetido duas vezes. Após a repetição os microtubos foram deixados abertos até a completa secagem das sementes. Todos os dois procedimentos de esterilização foram realizados em capela de fluxo previamente esterilizada.

Para a quebra da dormência, os tubos das sementes deixadas imersas em água foram envoltos por filme plástico e levados à geladeira (4°C). Foram deixados nesta condição por 6 dias. Passado este período as sementes foram semeadas sobre placas de cultivo contendo o meio apropriado. Já as sementes que foram esterilizadas pelo segundo protocolo descrito, após secas, foram semeadas sobre placas de cultivo previamente preenchidas com o meio de cultivo apropriado e deixadas a 4°C, no escuro, por três dias.

Todas as placas com as sementes já inoculadas, após o período de quebra de dormência, foram levadas para câmara de crescimento, a 22°C, sob condições 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

As placas de cultivos para as sementes transformadas foram preparadas contendo meio seletivo MS ½ força (adaptado de Murashige e Shoog, 1962), 0,4% (p/v) de fitogel, pH ajustado para 5,8 com Kanamicina 100 µg/mL. As sementes não transformadas foram semeadas em placas de cultivo contendo o mesmo meio, porém na ausência de Kanamicina. Uma variante do meio também foi utilizada para o cultivo das sementes. Nesta variante foi utilizado ágar a 1,5% no lugar do fitogel, como forma de solidificar o meio.

Após o período de um mês, sob as condições de cultivo descritas, as sementes desenvolveram-se em plântulas, as quais então foram transferidas para vasos de cultivo preenchidos com substrato para hortaliças. Sendo então, mantidos a 22°C, sob condições de dia longo (16 horas de luz e 8 horas de escuro).

4.3. Confirmação das plantas transformantes

4.3.1. Extração do DNA genômico das plantas

As extrações do DNA genômico das plantas transformadas e não transformadas (controle negativo) foram realizadas utilizando o *Wizard® Genomic DNA Purification kit* (Promega) e seguiram-se as recomendações do fabricante. Para isso, as folhas das plantas foram congeladas em nitrogênio líquido, em microtubos, e com auxílio de pistilos de vidro procedeu-se com a maceração do material congelado.

Após a maceração de cerca de 30mg de extrato vegetal, foi acrescentado 600 μ L de solução de lise nucléica, sendo então incubada a 65 °C por 15 minutos. A cada amostra foi acrescentado 3 μ L de solução de RNase e, posteriormente incubou-se por mais 15 minutos, a 37 °C. Em seguida, cada amostra foi deixada a temperatura ambiente por 5 minutos.

Para a precipitação de proteínas e re-hidratação do DNA foram primeiramente adicionados aos tubos 200 μ L de solução de precipitação protéica, seguida de uma centrifugação a 14.000 x g por 3 minutos. Após isso, foi realizada transferência do sobrenadante para um novo microtubo com 600 μ L de isopropanol a temperatura ambiente. Depois de misturar suavemente por inversão, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por mais um minuto. O álcool foi então retirado e adicionou-se a solução de re-hidratação do DNA. Ele então foi submetido a temperatura de 4 °C *overnight*, antes de ser estocado no freezer -20 °C para uso posterior.

O DNA extraído de cada amostra foi quantificado e qualificado por visualização em gel de agarose 1%, depois de corado com brometo de etídeo, após corrida eletroforética em cuba apropriada a uma tensão de 100V.

4.3.2. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para confirmação da presença do gene *seq2* responsável pela produção do peptídeo recombinante rBM7462, foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) do material genético extraído das folhas das plantas. A PCR foi realizada utilizando-se os *primers* 2/3F e 2STR (tabela 2).

Cada reação foi constituída de 90ng de DNA, 10X de PCR *buffer*, 2,5mM MgSO₄, 0,3mM dNTPs, 3U de *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen®), 10µM de cada *primer* e água Deionizada esterilizada completando o volume para 25µL. A reação foi realizada em termociclador NYX Technik ATC401 segundo o seguinte protocolo: desnaturação a 94°C por 1 minuto, 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 68°C por 45 segundos, e extensão final a 62°C por 7 minutos. Como controle das reações foi utilizado o DNA extraído da planta não transformada (selvagem) como controle negativo e controle branco (utilizando-se água no lugar do DNA extraído), verificando-se possíveis erros ou contaminações.

Após a PCR foi realizada a corrida eletroforética das amostras amplificadas em gel de agarose 1%, a 100V, para confirmação do fragmento de interesse.

	Sequencia 5'-3'	Coordenadas	Fragmento amplificado
2/3F	AAAAAGCAGGCTTCACATGGCTTGTCTTAGCA	<i>Forward</i>	462pb
2STR	AGAAAGCTGGGTCTCACACAAGCGTTTCTACA	<i>Reverse</i>	

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados.

4.4. Caracterização da expressão do peptídeo recombinante

4.4.1. Extração de proteínas totais

As extrações de proteínas totais das plantas transformadas e não transformadas foram executadas de acordo com o protocolo estabelecido por DONG *et al.* (2005).

A extração iniciou-se com a coleta e pesagem das folhas das plantas. Para a extração de cada planta, 0,5g de folhas foram pesadas em um

microtubo e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido. Logo após, elas foram maceradas com o auxílio de um pistilo de vidro até formar um pó bem fino. Depois foi adicionado 1mL do tampão de extração. O tampão de extração era composto por 10mM de tampão fosfato (pH 7,2; 105mM NaCl; 0,05% Tween 20; 40mM ácido ascórbico, 20mM EDTA - ácido etilenodiamino tetraacético, e 1mM PMSF- *Phenylmethylsulfonyl fluoride*). Após adição do tampão, as amostras foram homogeneizadas por um minuto, posteriormente mantendo-as em banho de gelo para que não esquentassem. Terminado este passo, elas foram centrifugadas a 14000 x g e 4°C, por meia hora. Então, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20°C até os ensaios posteriores. O precipitado restante foi descartado.

4.4.2. Quantificação de proteínas totais

Os teores de proteínas totais para cada planta cultivada foram determinados conforme descrito por Bradford (1976). Para esta técnica, 100µL de cada extração protéica total foram misturados a 900µL do reagente de Bradford previamente preparado. Posteriormente foi realizada a leitura da absorvância de cada extração em espectrofotômetro a 595nm, sendo o resultado comparado com uma curva-padrão para a definição da concentração protéica total de cada amostra.

O reagente de Bradford foi preparado conforme protocolo existente na LBCHV. Para isso, 100mg de *Comassie Brilliant Blue* foi diluído em uma mistura de 50mL de etanol e 100mL de ácido fosfórico 85%. Após a completa solubilização, o volume foi completado para 1000mL sendo a solução resultante filtrada em papel filtro de 8µm.

Para a construção da curva-padrão foi utilizada uma solução-mãe do peptídeo SBm7462[®] com a concentração de 2mg/mL. Os volumes utilizados da solução mãe para cada ponto da curva padrão foram calculados de maneira a se obter concentrações decrescentes do peptídeo, totalizando 9 pontos para a curva. Foram utilizadas três repetições para cada ponto da curva.

4.4.3. Quantificação do peptídeo recombinante

Para a quantificação do peptídeo recombinante foi utilizada a metodologia ELISA competitivo. O protocolo seguido foi o descrito por SALES-JUNIOR (2003) com algumas modificações, pois este já estava padronizado para detecção do peptídeo SBm7462[®].

A placa de ELISA foi sensibilizada com uma solução de tampão carbonato pH 9,6 (0,159g Na₂CO₃; 0,293g NaHCO₃; H₂O deionizada q.s.p. 100mL), na qual o antígeno foi diluído na quantidade de 1µg/poço, deixando-se adsorver a temperatura ambiente por um tempo médio de 12h. Decorrido este período, a placa foi lavadas duas vezes com tampão de lavagem (9,0g de NaCl; 0,5mL Tween 20, H₂O dd q.s.p. 1000mL), sendo em seguida armazenada em geladeira. Posteriormente, a placa foi retirada da geladeira e, após atingir a temperatura ambiente, foi adicionada a solução de bloqueio – caseína 2% em PBS pH 7,6 (4,25g NaCl; 0,64g Na₂HPO₄; 0,068g NaH₂PO₄.H₂O; H₂O deionizada q.s.p. 500mL) por uma hora à temperatura ambiente. A placa foi lavada duas vezes e, posteriormente, adicionou-se 100µl/poço de uma solução contendo 10µl da solução de extração de proteínas totais da planta, 89µl de tampão de incubação (87,5 mL de PBS pH 7,6; 12,5 mL de caseína 2% em PBS pH 7,6; 50µL de Tween 20) e 1µL de IgGs de camundongo anti-SBm7462. Então, deixou-se a placa incubar por duas horas à temperatura ambiente. Após o passo anterior, a placa foi lavada seis vezes com tampão de lavagem e procedeu-se a incubação, por duas horas, à temperatura ambiente, do anticorpo secundário – IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (Sigma[®] título 1:8.000), diluída em tampão de incubação, no volume de 100µL/poço. A placa foi lavada seis vezes com tampão de lavagem e adicionou-se a solução reveladora no volume de 100µL/poço, composta de 20mL de tampão substrato (7,19g Na₂HPO₄, 5,19g ácido cítrico e H₂O milli Q q.s.p. 1000mL), 4mg de O. P. D. (*o*-fenildiaminobenzeno) e 2,5µL de H₂O₂, por um período de 20 minutos em local escuro. A reação foi paralisada com 30µL/poço de ácido sulfúrico 1:20. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 492nm.

Para se obter os valores das concentrações dos peptídeos recombinantes nas soluções de extração de proteínas totais foi elaborada uma curva padrão de forma a obter uma relação entre absorvância e a concentração do peptídeo recombinante. Portanto, foram estabelecidos dez pontos para curva, onde utilizaram-se soluções do peptídeo sintético SBm7462[®], diluídos em tampão de extração protéica, com concentrações conhecidas (tabela 3). Cada ponto foi determinado em triplicata.

Conc.peptídeo SBm7462 [®] (µg/mL)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Alíquota retirada	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL
µg de peptídeo no meio reagente para cada ponto da curva	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9

Tabela 3. Valores do peptídeo sintético para cada ponto da curva padrão.

Feita a leitura da absorvância para cada concentração, com os dados obtidos, foi elaborada a equação da reta através do cálculo da regressão linear dos pontos. Assim foi possível determinar a concentração dos peptídeos recombinantes para cada amostra de solução de extração de proteínas totais para cada planta.

4.4.5. SDS-Page

Esta técnica foi realizada com o objetivo de identificar em cada extrato protéico, exceto o da planta não transformada, bandas no gel de poliacrilamida com a massa molecular igual à esperada para o peptídeo recombinante, além de ser o primeiro passo para a realização da técnica de *Western Blotting*.

Para tal objetivo, foram preparados dois géis de poliacrilamida contendo 15% de *Bis-Acrilamida* para sua porção separadora e 4%, dos mesmos reagentes, na empilhadora. As amostras foram preparadas colocando-as em tampão de amostra (6X) na proporção 6:1, sendo posteriormente banhadas em

água fervente por 4 minutos. Feito isso, cada extrato protéico foi aplicado em uma canaleta de cada gel, sendo então, submetidas à corrida eletroforética a 100V por cerca de 3 horas e meia. Também foi aplicado em cada gel um padrão de massa molecular. Após a corrida, os géis foram retirados da cuba eletroforética e submetidos cada um a uma técnica de coloração diferente.

Na coloração que se utiliza o reagente *Coomassie Blue* G-250, o gel foi colocado em uma solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 10%, acetato de amônio 100mM) por 30 minutos, sendo em seguida incubado na solução corante por 12 horas (0,1% *Coomassie Blue* G-250, 25% metanol, 5% ácido acético). Passado este período, o gel foi colocado em uma solução descorante (ácido acético 10%) até que a visualização das bandas fosse possível.

Para a coloração com prata, o gel foi incubado na solução fixadora utilizada pelo outro método com o mesmo tempo. Passado este passo, o gel foi lavado duas vezes com água ultra pura. Em seguida, o gel foi sensibilizado com uma solução contendo 0,005% de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) por 30 minutos, e posteriormente com 0,1% AgNO_3 pelo mesmo tempo. Após novamente lavar com água ultra pura foi adicionada a solução reveladora (0,036% formaldeído, 2% carbonato de sódio) por 2 minutos. A reação de revelação foi paralisada com ácido acético.

4.4.6. Western Blotting

Para esta técnica, o gel corado com *Coomassie Blue* foi submetido a um procedimento de retirada total do corante com uma solução composta de 50% metanol e 50mM hidrogênio carbonato de amônio, seguido de várias lavagens com água ultra pura. Feito isso, o gel foi colocado em tampão de transferência (25mM Tris, 192mM glicina, 35%metanol) para equilibrá-lo.

Uma membrana de PVDF (*polyvinylidene fluoride*, 0,2 μm) foi previamente sensibilizada em metanol por 15 segundos. Posteriormente, a mesma foi lavada 2 vezes em água ultra pura, sendo colocada em tampão de transferência em conjunto com o aparato para transferência. Após montagem da cuba, esta foi levada para geladeira a 4°C onde foi deixada para a troca das

proteínas do gel para a membrana. Para isso, a fonte foi ajustada de forma a fornecer uma tensão de 30V por 12 horas.

Passado o tempo para transferência, a membrana foi fixada em metanol por 20 segundos, sendo em seguida lavada em água ultra pura durante 5 minutos por 2 vezes. O corante Ponceau foi então utilizado para corar as proteínas transferidas para a membrana. Após confirmação da transferência das proteínas, o corante foi retirado totalmente com lavagens seriais em água ultra pura.

Para a imunodeteção do peptídeo recombinante fixado na membrana foi utilizado o *SNAP i.d. Protein Detection System* (Millipore®). Neste sistema, a membrana é colocada sobre um suporte apropriado onde ela primeiramente é bloqueada com uma solução tampão (10 mM fofato de sódio, pH 7.2, 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20) contendo caseína 1%. Após o despejo desta solução o sistema é ligado e por meio da formação de vácuo a solução atravessa a membrana instantaneamente. Posteriormente, anticorpos primários anti-SBm7462 diluídos em tampão fosfato na proporção 1:100, pH7.2, foram acrescentados ao sistema. Passados 10 minutos para incubação o sistema foi novamente ligado até a completa secagem da membrana. Um passo de lavagem com o tampão fosfato foi então realizado, para que em seguida fosse adicionada a solução contendo o anticorpo secundário marcado com peroxidase anti-anticorpo primário na proporção 1:8000. Após a incubação por 10 minutos uma nova lavagem foi realizada. Então a membrana foi retirada do maquinário para que se fosse colocada em banho com a solução reveladora (10mg DAB, 10mL Tris 0,05M pH 7,6, 1mL NiCl₂ 0,3% e 10µL H₂O₂ 30%). A reação de revelação foi corrida até que a marcação pudesse ser visualizada. A reação foi parada com a adição de água ultra pura.

4.5. Animais experimentais

Foram utilizados 20 camundongos BALB/c fêmeas, com cerca de 7 semanas de idade. Os animais foram obtidos no Biotério do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Eles foram mantidos em gaiolas revestidas com serragem autoclavada em sala climatizada no biotério

do LBCHV, no Departamento de Veterinária. Foi fornecida água filtrada e ração peletizada, padronizada para animais de laboratório, ambos *ad libitum*.

Os animais foram marcados com ácido pícrico, sendo a marcação diferencial para cada animal. Foram, dessa forma, designados por números de um a vinte.

4.6. Imunização

Para o procedimento de imunização os camundongos foram divididos em 4 grupos de acordo com a imunização que receberam (tabela 4). As imunizações ocorreram a cada 21 dias, sendo o número total de doses igual a 3. O preparo das doses vacinais que eram constituídas de folhas de plantas foi realizado de acordo com o seguinte procedimento. Após pesagem de 500mg de folhas estas foram submetidas ao processo de congelamento em nitrogênio líquido sendo então posteriormente maceradas até formarem um pó bem fino. Então, foi adicionado para cada dose 200µL de uma solução de sacarose a 10% gelada, obtendo assim uma pasta homogênea. Esta foi mantida em banho de gelo até a vacinação. Desta forma, tentou-se evitar a degradação protéica pelas proteases endógenas. Com auxílio de uma pequena haste de ponta arredondada, a dose vacinal de cada camundongo foi administrada até seu completo consumo.

Grupos	Vacinal 1	Vacinal 2	Controle 1	Controle 2
Nº de animais	8	4	4	4
Via vacinal	Oral	Subcutânea	Oral	-
Animais	1 - 8	9 - 12	13 - 16	17 - 20
Vacina	Folhas das plantas transformadas J4, J5 e J6	Extrato de proteínas totais das plantas transformadas	Folhas das plantas não transformadas	-
Dose	500mg de folhas	200µL de extrato protéico	500mg de folhas	-

Tabela 4. Esquema de imunização.

4.7. Coleta do sangue

A coleta sanguínea foi realizada de acordo com a técnica utilizada por GOMEZ (2007). Os animais foram anestesiados em câmara de éter, onde permaneciam por cerca de um minuto. Após este procedimento, realizou-se a coleta através do plexo retro-orbital com o auxílio de uma pipeta de Pauster com ponta fina, que possibilitava a perfuração do mesmo. A pipeta era preenchida com sangue por capilaridade.

A coleta procedeu-se antes da primeira imunização e a intervalos periódicos até duas semanas após a terceira inoculação (uma vez por semana). As amostras de sangue foram coletadas sem uso de anticoagulante e depois centrifugadas em tubos de 1,5mL para a separação do soro, o qual foi armazenado a -20°C até a realização do ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) indireto para detecção de IgGs anti-peptídeos.

4.8. ELISA indireto

Para avaliação dos níveis de anticorpos contra o rBm7462 no soro dos camundongos, foram realizados testes ELISA indireto, como citado por GÓMEZ (2007), seguindo as técnicas descritas por SANTOS (1995), LIMA (1998) e BARROS (2001).

As placas de ELISA foram sensibilizadas e bloqueadas da mesma maneira com descrito no item 4.3.5. Após o bloqueio as placas foram lavadas duas vezes e, posteriormente, adicionou-se 200 μL /poço dos soros dos animais do experimento diluídos 1:100 em tampão de incubação (87,5 mL de PBS pH 7,6; 12,5 mL de caseína 2% em PBS pH 7,6; 50 μL de Tween 20), deixando-se incubar por duas horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem e procedeu-se a incubação, por duas horas, à temperatura ambiente, do anticorpo secundário – IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (Sigma[®] título 1:8.000), diluída em tampão de incubação, no volume de 100 μL /poço. As placas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem e adicionou-se a solução reveladora no volume

de 100 μ L/poço, composta de 20mL de tampão substrato (7,19g Na₂HPO₄, 5,19g ácido cítrico e H₂O deionizada Q q.s.p. 1000mL), 4mg de O. P. D. (θ -fenildiaminobenzeno) e 2,5 μ L de H₂O₂, por um período de 20 minutos em local escuro. A reação foi parada com 30 μ L/poço de ácido sulfúrico 1:20. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 492nm.

Para discriminar o ponto de corte entre positivo e negativo para a resposta sorológica mensurada no teste de ELISA, foi usada a adição de dois desvios padrões à média dos controles negativos.

4.9. Preparo do material histológico

Após a última coleta sanguínea, os animais foram eutanasiados. Em seguida, foram submetidos ao procedimento de extração dos linfonodos inguinal, braquial e axilar, além de uma porção do intestino delgado (íleo).

O material coletado foi então submetido ao procedimento para inclusão em paraplast[®]. Este procedimento foi realizado utilizando-se o processador de tecido automático, Leica[®] TP1020, de acordo com a tabela 5.

Etapa	Reagente - solução	Equipamento	Temperatura	Tempo
1. Fixação	Paraformaldeído 4% p.H 7,4	Geladeira	4°C	24 horas
	Álcool 70%	Geladeira	4°C	indeterminado
2. Desidratação	Álcool 70%	TP1020	TA°C	1 hora
	Álcool 70%		TA°C	1 hora
	Álcool 80%		TA°C	1 hora
	Álcool 90%		TA°C	1 hora
	Álcool 100%		TA°C	1 hora
	Álcool 100%		TA°C	1 hora
3. Diafanização	Xilol 1		TA°C	30 min
	Xilol 2		TA°C	30 min
4. Inclusão	Paraplast 1		60°C	30 min
	Paraplast 2		60°C	30 min

Tabela 5. Protocolo para inclusão de tecidos.

Terminado o procedimento de inclusão, o material foi então processado para a montagem de lâminas que seriam submetidas a técnica de imunohistoquímica.

4.10. Imunohistoquímica

Para a detecção do antígeno vacinal *in situ* foi utilizada a técnica de Peroxidase-anti-Peroxidase – PAP (PROPHET *et al.*, 1992). Sendo assim, o meio de inclusão foi retirado colocando-se o material em estufa a 70°C por 35 minutos e, em seguida, banhados em xilol, no qual o material permaneceu imerso por 30 minutos, duas vezes. Posteriormente, os cortes histológicos foram sendo reidratados em soluções alcoólicas decrescentes (100% I e II, 90%, 80% e 70%) por 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado pela imersão dos cortes em peróxido de hidrogênio metanólico 3% durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem do material por duas vezes de 5 minutos cada, com PBS pH 7,4 (1,48g de Na₂HPO₄, 0,43g de NaH₂PO₄, 7,2g de NaCl e água deionizada q.s.p. 1000mL). Foi feita a digestão enzimática dos cortes utilizando-se tripsina 1mg/mL em PBS pH 7,4 durante 10 minutos a 37°C.

Para o bloqueio de sítios inespecíficos, os cortes foram cobertos com soro normal de cabra diluído 1:10 em PBS pH 7,4 e incubados em câmara úmida durante 45 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, o excesso de soro foi retirado tomando-se o cuidado para que não ocorresse a secagem dos cortes. Então, foi adicionado o anticorpo primário (soro de coelho anti-SBm7462[®]), diluído 1:20 em PBS pH 7,4. Os cortes foram então incubados durante 24 horas em câmara úmida em B.O.D. a 4°C. Passado este período, os cortes foram lavados três vezes com PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada e, em seguida, cobertos com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho), diluído 1:10 em PBS 7,4, sendo colocados a 37°C em câmara úmida por 45 minutos.

Após a incubação, os cortes foram novamente lavados três vezes, por 5 minutos, com PBS pH 7,4; e após nova retirada do excesso do soro, eles foram cobertos com o complexo PAP produzido em coelho (SIGMA), diluído 1:200. Então, imediatamente eles foram incubados em câmara úmida, durante 45 minutos a 37°C.

Passados os 45 minutos, os cortes foram novamente lavados novamente PBS pH 7,4 durante 10 minutos sendo neles acrescentado rapidamente a solução reveladora (25mg de DAB, 200 μ L de H₂O₂ 30%, em 100 mL de PBS pH 7,4) preparada momentos antes. Após 5 minutos os cortes foram lavados por mais 5 minutos em PBS pH 7,4 e contra corados com Hematoxilina de Harris 1:10 em PBS pH 7,4 durante 1 minuto e 20 segundos, sendo em seguida desidratados em soluções alcoólicas de concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 100% e 100%) por 5 minutos em cada e diafanizados em xilol; para posterior montagem das lâminas com a resina *Entellan*[®].

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Obtenção e cultivo de material vegetal

Para o início do trabalho foi necessário obter o material vegetal (plantas transformadas e não transformadas) para que se pudessem ser realizadas as imunizações e posteriormente, análise da resposta imunológica dos camundongos imunizados oralmente. Então, sementes de plantas *Arabidopsis thaliana* previamente transformadas por PECONICK (2010) foram utilizadas. De acordo com a mesma pesquisadora, existem várias vantagens em se trabalhar com *A. thaliana*, dentre elas, pode-se destacar que esta planta é bem conhecida, sendo muito utilizada como organismo modelo e, conseqüentemente, existem muitos protocolos já padronizados para a pesquisa com este vegetal (LIJSEBETTENS E CLARKE, 1998, BURSSSENS *et al.*, 1998; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; WALBOT, 2000; HAYS 2002; COELHO *et al.*, 2007).

Primeiramente foram escolhidas sementes que dariam origem a quarta geração de plantas transformadas, sendo estas provenientes das sementes rotuladas como 2FN. A escolha de sementes com maior grau de gerações para o início da pesquisa foi feita com interesse em analisar se ocorria estabilidade

genômica (homozigose) para o transgene que estas plantas carregavam, como LI *et al.* (2006) observaram em seu trabalho, quando eles analisaram a imunogenicidade das plantas transformadas até a quinta geração.

Estas sementes foram colocadas para crescer sobre o meio específico utilizando-se ágar como forma de solidificar o meio. Este procedimento foi realizado como forma alternativa ao cultivo que utiliza o reagente fitogel (apropriado a espécie), que naquele momento encontrava-se indisponível no laboratório. Apesar de este procedimento ser utilizado como forma rotineira para outras espécies de plantas no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, o resultado obtido não foi muito satisfatório, pois apenas duas sementes conseguiram desenvolver, transformando-se em plântulas. Observou-se que apesar de todas as sementes começarem a apresentar pequenas folhas no início do desenvolvimento (figura 2), apenas duas sementes conseguiram aprofundar suas raízes no meio de cultivo e desenvolveram-se bastante, para que pudesse ser feita a transferência para vasos de cultivo contendo substrato de hortaliças onde elas poderiam desenvolver em plantas adultas.

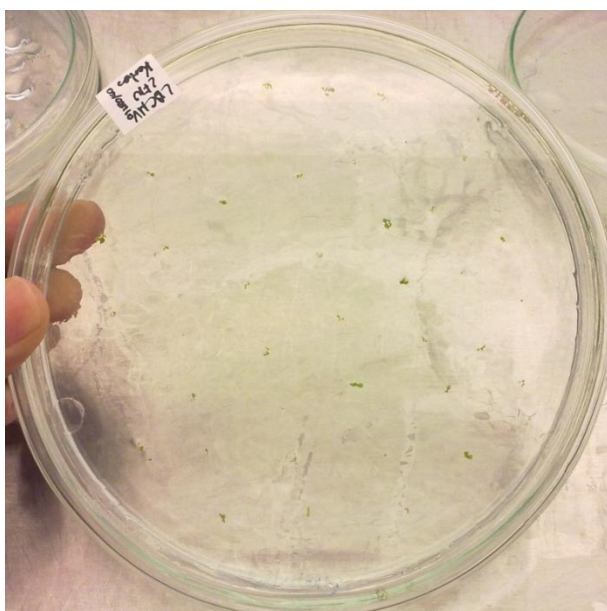


Figura 2. Fase inicial de desenvolvimento de sementes de *Arabidopsis thaliana*.

A expressão de proteínas heterólogas em folhas de plantas transgênicas é relativamente baixa (TIWARI *et al.*, 2009). Sendo assim, duas plantas adultas

não forneceriam material vegetal suficiente para dar continuidade ao trabalho. Então, estas plantas desenvolveram-se até que fornecessem sementes, as quais foram cultivadas em meio apropriado, dando origem a quinta geração de plantas. Ao mesmo tempo, sementes da primeira geração de plantas transformadas (2ST) foram utilizadas para o cultivo. Estas foram semeadas em placas contendo o meio apropriado e posteriormente transferidas para vasos, onde puderam se desenvolver em plantas adultas. Assim, foi possível obter 36 plantas provenientes de sementes 2ST e 8 plantas de sementes 3FN (figura 3).

É importante lembrar, como cita PECONICK (2010), que *Arabidopsis thaliana* são vegetais muito sensíveis. Mesmo pequenas variações na umidade e/ou temperatura durante seu cultivo podem influenciar negativamente para seu desenvolvimento. Sendo assim, foi difícil obter um grande número de plantas, já que o cultivo destas ocorreu em um espaço comum para vários experimentos. Favorecendo desta forma o desenvolvimento precoce de muitas plantas, assim como também, o ataque de pragas (como o pulgão). Muitas plantas morreram logo que retiradas do cultivo em placas e transplantadas para o vaso com terra.



Figura 3. Cultivo de plantas *Arabidopsis thaliana*, após três meses de desenvolvimento.

5.2. Confirmação das plantas transformantes

O primeiro passo para a análise da expressão antigênica foi estabelecer se o gene responsável pela síntese do rBM7462 (*seq2*) estava presente nas linhagens das plantas transformadas utilizadas durante a pesquisa. De acordo com PECONICK (2010), a amplificação deste segmento de DNA gera um fragmento com aproximadamente 462 pares de bases. Vários trabalhos utilizaram a técnica de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para a confirmação da presença de um inserto (GÓMEZ *et al.*, 2000; WIGDOROVITZ *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004; LINDH *et al.*, 2008). Sendo assim, foi realizada a PCR para confirmação da presença do gene.

Como se pode observar na figura 4, apenas as plantas derivadas da linhagem das sementes 2FN apresentavam bandas próximas a 462pb no gel de agarose. Nenhuma das plantas originadas das sementes 2ST apresentou qualquer banda. Isso indicou que estas plantas não possuíam o gene de interesse, o que demonstra que para esta linhagem não foi conseguida a estabilidade genômica.

LINDH *et al.* (2008) descrevem, em sua publicação, que de 20 plantas submetidas ao mesmo processo de transformação, o qual também foi realizado por PECONICK (2010), foram obtidas 18 plantas transformadas das quais apenas 4 linhagens apresentaram características de ocorrência de homozigose para o gene inserido. Fato este que demonstra a dificuldade em se obter estabilidade genômica para o inserto. Mesmo assim, a obtenção de uma quinta geração contendo o gene de interesse pode indicar o sucesso do procedimento de transformação e, principalmente, pode ser um grande indicativo da obtenção de homozigose (estabilidade gênica) para o gene *seq2* em plantas *Arabidopsis thaliana*.

Em um estudo com batatas transgênicas, LI *et al.* (2006) lembram que a estabilidade genômica de um gene estranho é buscada, pois quando utilizamos plantas para obter a produção de um antígeno é importante que a característica de expressão de uma proteína heteróloga possa ser mantida por várias gerações, mantendo assim a capacidade de produzir por muito tempo (indefinido) o imunógeno.

Plantas não transformadas (selvagens) também foram submetidas a análise para presença do gene *seq2*. Contudo, como esperado para estas plantas, não foi detectado nenhuma amplificação quando executado a PCR para os DNAs extraídos destes vegetais (dados não mostrados). Fato que comprova a utilização de folhas destas plantas com imunógeno para o grupo vacinal controle negativo.

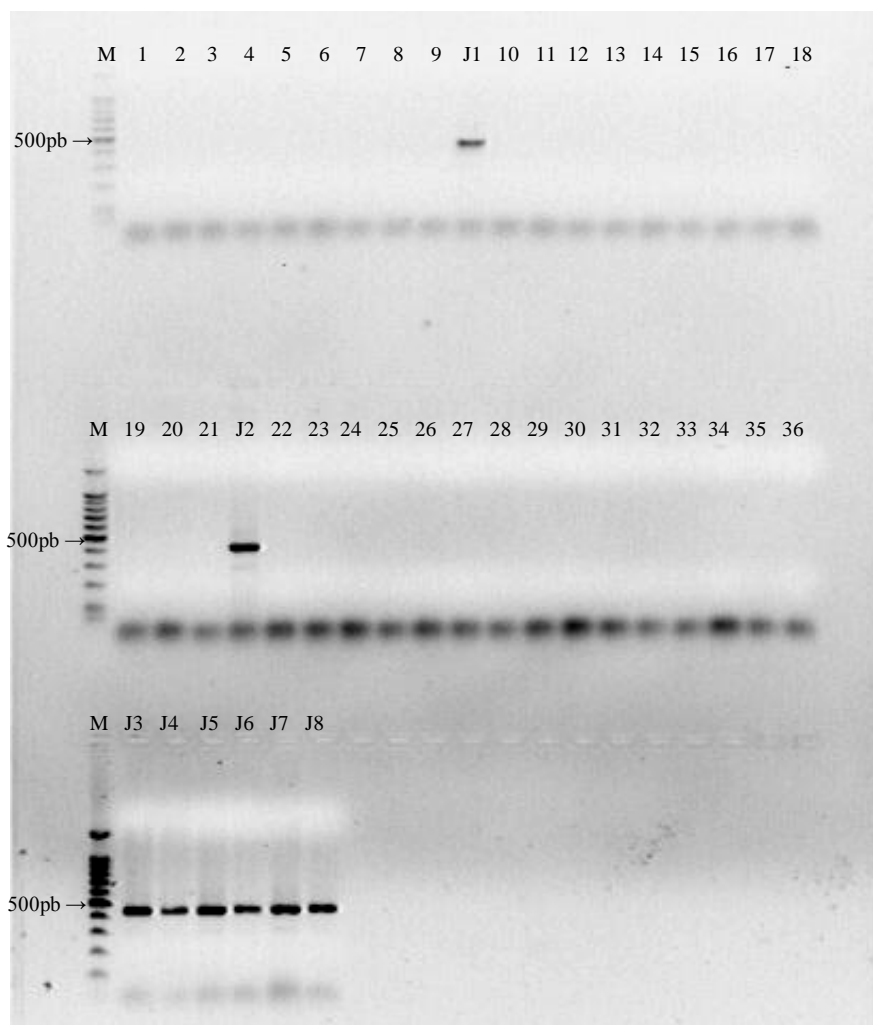


Figura 4. Corrida eletroforética em gel de agarose 1%. M – marcador molecular 100pb; 1 a 36 – amostras das plantas provenientes da linhagem 2ST; J1 a J8 – amostras das plantas provenientes da linhagem 4F. Gel corado com brometo de etídeo.

5.3. Caracterização da expressão do peptídeo recombinante

Folhas das plantas transformadas foram submetidas à técnica de quantificação de proteínas totais definida por Bradford (1976). Para isso, foi

construída uma curva padrão onde concentrações conhecidas do peptídeo SBm7462[®] foram relacionadas com a absorvância obtida para cada ponto da curva. Assim sendo, foi estipulada a seguinte equação da reta, por meio do cálculo de regressão linear, para a curva padrão:

$$\text{concentração protéica}(\mu\text{g/mL}) = 5152,2266 \times \text{Absorvância} + 185,0037$$

onde o r^2 foi igual a 0,9912, o que indica que a proporção da variabilidade nos valores da concentração pode ser explicada pelos valores das absorvâncias. Um valor de R ao quadrado muito próximo de um, indica uma forte relação entre as duas variáveis (PEREIRA, 1999).

Sendo assim, para cada planta confirmadamente transformada foram obtidos os seguintes valores de concentração de proteínas totais solúveis, demonstrados na tabela 6. Vários trabalhos utilizaram esta técnica como método de determinação de proteínas totais solúveis presentes em folhas das plantas transformadas (LINDH *et al.*, 2009; YAN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2006; GRECO *et al.*, 2007).

	Absorvância	Concentração protéica $\mu\text{g/mL}$
Selvagem	977,1791	2931,537
J1	1294,0205	3882,062
J2	1136,8829	3410,649
J3	766,4838	2299,451
J4	1104,0162	3312,049
J5	987,4779	2962,434
J6	820,9173	2462,752
J7	1085,0659	3255,198
J8	1232,7142	3698,143

Tabela 6. Concentração média de proteínas totais das plantas transformadas e não transformada.

A metodologia ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) competitivo foi utilizada para a confirmação da expressão do peptídeo recombinante, além

de quantificar essa produção. Outros trabalhos utilizaram variações diferentes desta metodologia como ELISA de captura, *sandwich* e indireto (PEETERS *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2006).

Foi necessário então, primeiramente, construir uma curva padrão relacionando absorvância e concentração de peptídeo. Para isso, durante o passo no qual era acrescentado o anticorpo anti-peptídeo, em conjunto era adicionado o peptídeo na forma solúvel. Dessa forma, uma competição pelo anticorpo primário ocorreria entre o peptídeo em solução e o peptídeo fixado na placa. Assim, era esperado uma relação inversa entre a absorvância obtida e a concentração de peptídeo solúvel na reação, como se pode observar na tabela 7, a qual apresenta os resultados dessa curva padrão. O gráfico 1 expõe a equação da reta e o valor do R ao quadrado para os dados obtidos. Dessa forma, foi possível determinar o valor da concentração do peptídeo expresso para cada planta (gráfico 2), como também correlacionar estes valores com as concentrações de proteínas totais solúveis - PTS (tabela 8).

Concentração de Ptn (µg/mL)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Absorvância	0,537	0,531	0,514	0,505	0,498	0,492	0,489	0,486	0,478	0,466
Desvio Padrão	0,019	0,019	0,017	0,021	0,011	0,022	0,001	0,010	0,012	0,007

Tabela 7. Curva padrão para o ELISA competitivo.

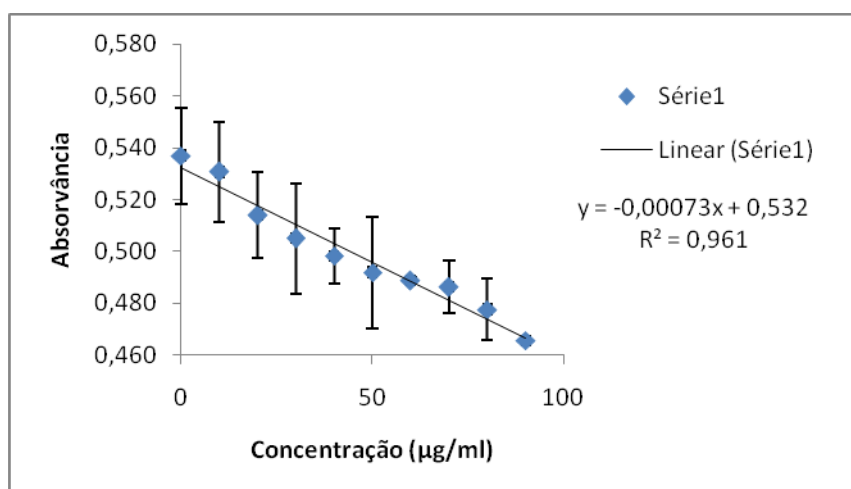


Gráfico 1. Curva padrão para o ELISA competitivo.

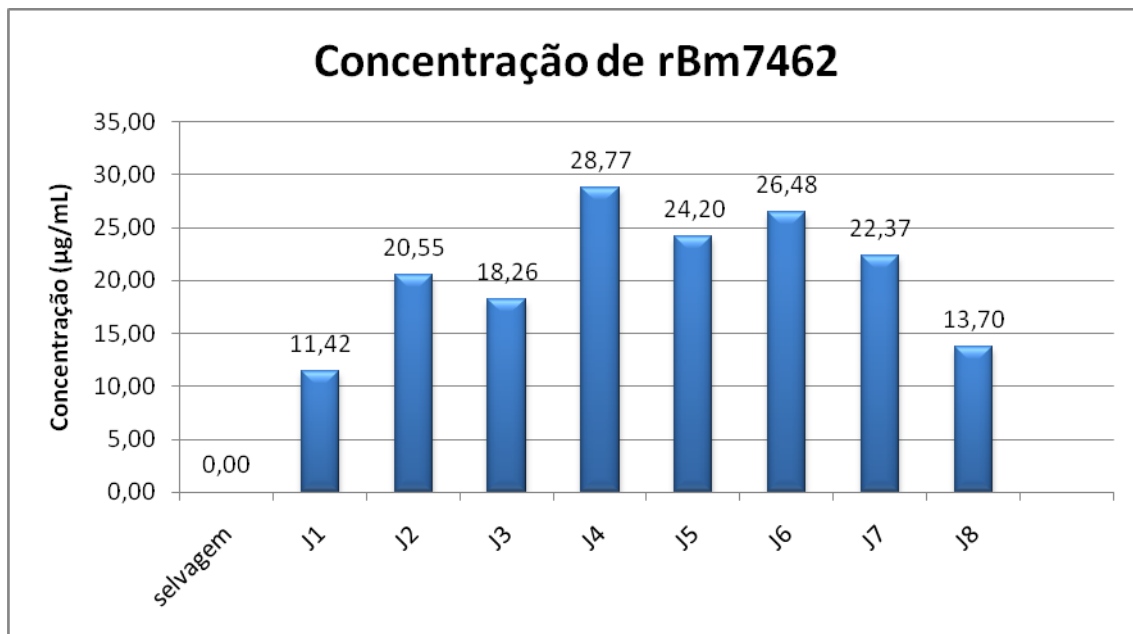


Gráfico 2. Concentração de peptídeo recombinante em cada planta transformada.

Pode-se observar que existe uma variação entre os valores obtidos para a extração de proteínas totais solúveis para cada planta, assim como também para as concentrações de peptídeos recombinantes. Variações para estes valores também foram encontradas por outros pesquisadores (WU *et al.*, 2004; YAN *et al.*, 2010). Entretanto, WU *et al.* (2004) cita que apesar desta variância na expressão de proteínas recombinante pelas plantas, elas ainda constituem meio de produção ímpar para obtenção de antígenos vacinais. Pois elas podem ser produzidas em larga escala com várias vantagens sobre outros métodos heterólogos de produção.

Planta	Selvagem	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8
$\frac{Conc.rBm7462}{Conc.PTS}$ (%)	0,00	0,003	0,006	0,008	0,009	0,008	0,011	0,007	0,004

Tabela 8. Porcentagem de peptídeo recombinante expressos nas folhas de plantas transformadas.

Considerando que na extração de proteínas foi utilizado 0,5g de folhas de plantas por mililitro de tampão de extração, pode-se concluir que foram obtidas concentrações de 22,84 a 57,54µg de peptídeo recombinante por

grama de folhas. Valores estes que são semelhantes aos obtidos por LINDH *et al.* (2006), quando eles utilizaram *Arabidopsis thaliana*, para produzir a proteínas p24 do capsídeo do subtipo C do HIV-1, utilizando-se a sequência SEKDEL. Os valores encontrados para porcentagem de peptídeo recombinante expressos nas folhas das plantas transformadas também foram parecidos aos encontrados por YAN *et al.* (2010), quando estes expressaram o gene *pp150* do citomegalovirus humano em *Vicia faba*.

As soluções de proteínas totais solúveis das plantas transformadas e não transformadas foram submetidas à corrida eletroforética no ensaio *SDS-page*. O objetivo deste teste foi tentar avaliar visualmente bandas, no gel de poliacrilamida, proporcionais a massa molecular teórica esperada para o peptídeo rBm7462, além de ser o primeiro passo para a identificação protéica pelo método *Western blotting*. Como esperado, pode-se observar a presença de uma banda na região de 15kDa. Dados estes condizentes aos encontrados por SOSSAI (2009), que produziu a proteína rBm7462 a partir do gene *seq2* em levedura *P. pastoris.*, e por PECONICK (2010) a qual realizou a transformação das plantas *Arabidopsis thaliana* com o mesmo gene. Duas técnicas de coloração do gel foram aplicadas para a visualização do perfil protéico, contudo, a metodologia que utiliza o corante *Coomassie Blue* não possibilitou uma boa visualização de bandas na região de interesse, fato este que pode ter ocorrido, pela menor sensibilidade desta metodologia.

O gel corado com *Coomassie Blue* foi descorado completamente para que se fosse feita a eletrotransferência das proteínas nele existentes para uma membrana de PVDF. Após o término da técnica de *western blotting* foi possível visualizar pequenas regiões mais escuras na membrana para as plantas com maiores concentrações de rBm7462, coincidentes com as posições esperadas para as bandas do peptídeo rBm7462 no gel de poliacrilamida. O forte *background* resultante na membrana deveu-se ao tempo necessário para que pudesse demarcar as bandas, já que as concentrações do peptídeo recombinante foram baixas (figura 6). O reconhecimento do rBm7462 através desta técnica também foi obtido por SOSSAI (2009), quando este expressou o peptídeo em *P. pastoris*. Outros trabalhos também observaram a marcação de

proteínas heterólogas produzidas em plantas. LINDH *et al.* (2009) citam a detecção da proteína recombinante p24 produzida em *Arabidopsis thaliana*, assim como WU *et al.* (2004), observaram a presença de marcação para proteína heteróloga VP2, do vírus da doença infecciosa bursal, quando esta foi expressa no mesmo modelo vegetal.

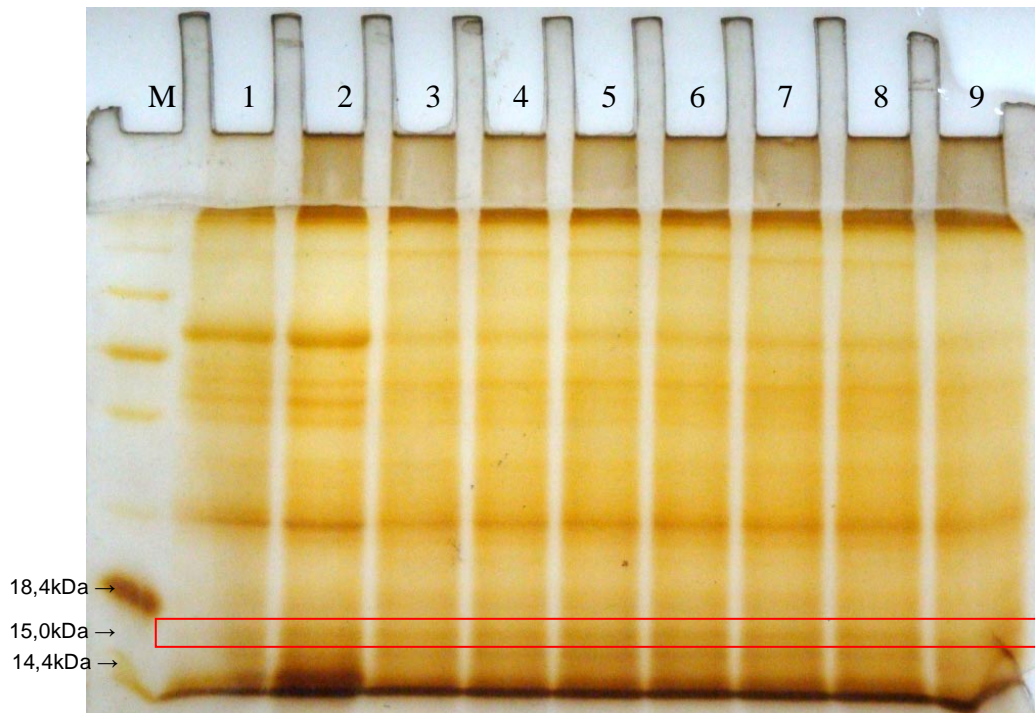


Figura 5. SDS-page de extratos de plantas transformadas. M – marcador molecular (*Unstained Protein Molecular Weight Marker* - Fermentas®); 1 a 8 - extratos das plantas J1 a J8, 9 – Controle negativo, extrato de planta não transformada. Gel de poliacrilamida 15% corado com nitrato de prata.

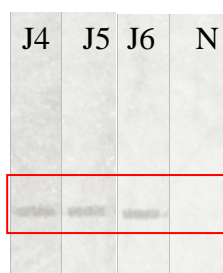


Figura 6. *Western blotting* das plantas transformadas. Em destaque, a marcação obtida para as plantas J4, J5 e J6. Em N a região da membrana na mesma altura em que foi encontrada a marcação, porém para extrato obtido de planta não transformada. Para as demais plantas transformadas não foi possível visualizar a marcação pela fotografia da membrana.

5.4. Avaliação da imunização dos animais

A primeira etapa para avaliação da resposta imunológica nos camundongos imunizados foi, a avaliação dos soros dos camundongos para cada coleta sanguínea, objetivando observar a cinética de anticorpos anti-rBm7462 após a vacinação com este imunógeno produzido em plantas.

Sendo assim, foi realizada a metodologia ELISA indireto, como também a fizeram SOSSAI (2009), utilizando rBm7462 produzido em *Pichia pastoris*; MEDEIROS (2008), SALES-JUNIOR *et al.* (2005), quando imunizaram camundongos com o peptídeo sintético SBm7462[®].

Como se pode observar no gráfico 3, apesar de serem realizadas 3 imunizações, não houveram diferenças entre as respostas obtidas, para o qualquer grupo vacinal e controle. No ensaio, somente seria considerado como uma resposta positiva, picos de absorvância que ultrapassassem o valor de 0,092. Este valor foi estipulado, calculando-se o ponto de corte, através da média dos valores de absorvância dos soros dos animais sabidamente negativos e nela acrescentando 3 vezes o valor obtido do desvio padrão. Como controle positivo foi utilizado soro de um animal sabidamente positivo, sendo que para este, a média de absorvância foi de 0,160.

Era esperado que após a segunda e terceira imunizações, os animais respondessem com um pico de produção de IgGs anti-antígeno, como relatou SOSSAI (2009) quando imunizou camundongos com 50µg de peptídeo sintético oxidado, ou como descreveram MEDEIROS (2008); GONZALES-LOMBANA (2003); PATARROYO *et al.* (2002); PORTELA (2000); COUTO-PIMENTEL (2002) e SALES-JUNIOR *et al.* (2005); após a vacinação com o peptídeo não oxidado.

Um fator que pode ter influenciado na ausência da geração de IgGs foi a concentração de peptídeo rBm7462 entregue pela via oral. Como para imunizações orais do grupo vacinal 1 foram utilizados 0,5g de folhas das plantas J4, J5 e J6 para cada animal experimental, em média, a quantidade de peptídeo por dose foi de 26,48µg.

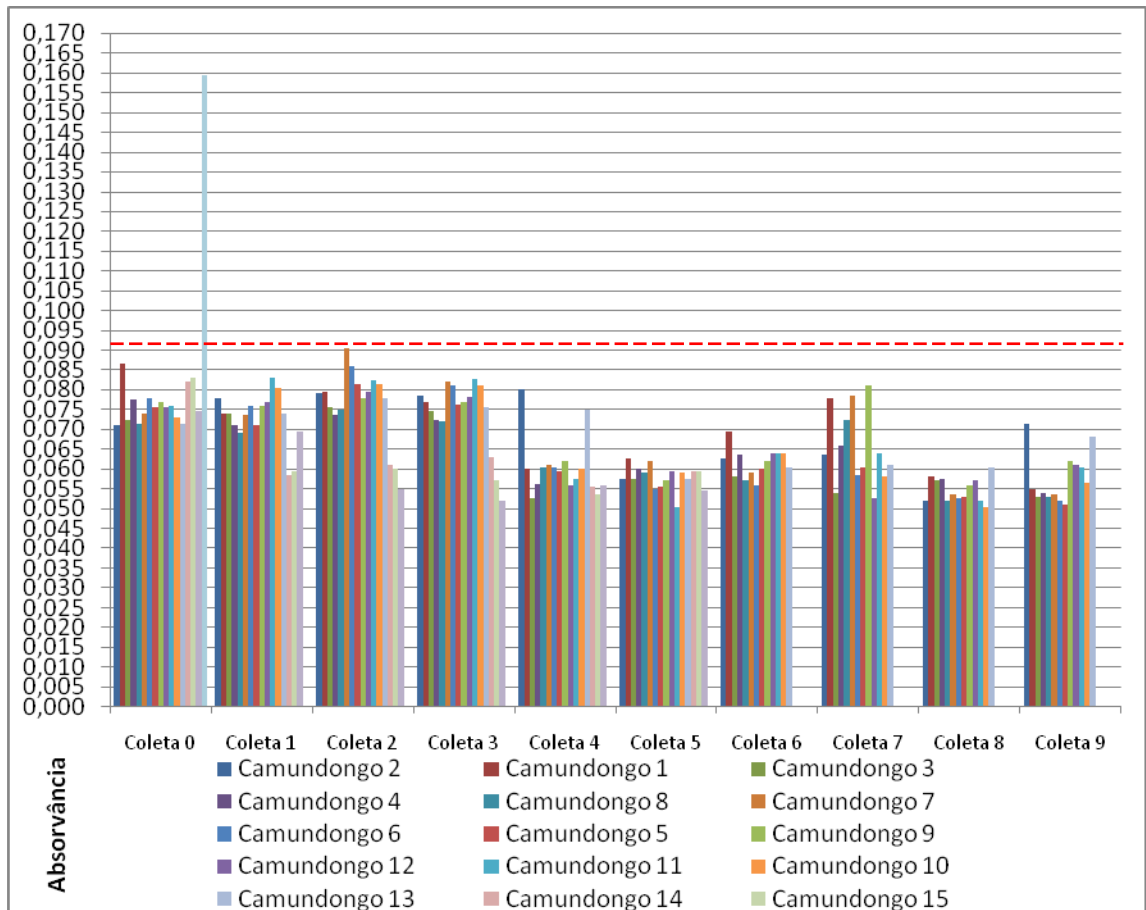


Gráfico 3. Análise da resposta humoral para cada camundongo imunizado durante 9 semanas. Linha vermelha tracejada – limiar do ponto de corte.

STREATFIELD E HOWARD (2003) citam que vacinação oral utilizando plantas, pode necessitar de uma grande quantidade de material vegetal para que se possa alcançar a mesma quantidade do imunógeno, que seria oferecida caso fosse realizada a vacinação por métodos tradicionais, como pela via parenteral. Outros autores sugerem que a via oral de imunização requer doses maiores e várias repetições, devido à instabilidade dos antígenos e o ambiente proteolítico e ácido do estômago (HIRABAYASHI *et al.*, 1990).

FREYTAG e CLEMENTS (2005) sugerem que o uso de adjuvantes apropriados, em vacinações que utilizam plantas recombinantes como imunógeno, pode iniciar e suportar a transição da resposta imune inata para a adaptativa. Dessa forma, auxiliando a imunogenicidade de antígenos entregues oralmente, que usualmente podem ser pouco imunogênicos. Sendo assim, a ausência de um adjuvante nas imunizações realizadas pode ter contribuído para a não detecção da produção de IgGs pelos animais.

Durante este estudo, era sabido que normalmente o nível de expressão de proteínas heterólogas em folhas de plantas é baixo, quando se comparado a produção em outros tecidos (TIWARI *et al.*, 2009). Contudo, muitos trabalhos têm demonstrado que é possível estimular uma resposta imunológica humoral sistêmica através da imunização oral de camundongos com o tecido foliar (LINDH *et al.*, 2008; GÓMEZ *et al.*, 2008; WIGDOROVITZ *et al.*, 2004).

LIANG *et al.* (2006) desenvolveram uma vacina oral contra a diarreia suína causada por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). Em estudos realizados com camundongos, estes pesquisadores conseguiram obter produção de IgGs e IgAs após 4 doses de extrato de proteínas totais solúveis, contendo 15µg de proteína recombinante; quando o intervalo entre as imunizações eram de uma semana.

É interessante lembrar também, que a espécie alvo para esta vacina possui um complexo sistema digestivo capaz de digerir grande quantidade de material fibroso, pois nos bovinos, os micróbios existentes no rúmen suprem as enzimas necessárias para a quebra da parede celular das plantas (ROUNDS e HERD, *The cow's digestive system*). Camundongos como outros mamíferos possuem um sistema digestivo menos complexo. Portanto, a ausência da quebra da parede vegetal nesse modelo animal pode, também, ter contribuído para uma menor exposição do antígeno produzido pelas plantas transformadas. Isso, levando-se em consideração que a localização de acúmulo do antígeno produzido pelas plantas ocorre nas células da epiderme da *Arabidopsis thaliana*, região do apoplasto. Fato este observado por PECONICK (2010) que ao trabalhar com a transformação destes vegetais com o gene *seq2* associado a uma cauda GFP (*green fluorescent protein*) conseguiu determinar a localização de acúmulo do peptídeo rBm7462 através da maior taxa de fluorescência observada, por microscopia confocal, nestas regiões.

Outro problema associado à baixa estimulação antigênica é relacionado aos mecanismos da resposta imunológica que levam a tolerância. Ela é determinada pela dose, pelo esquema de vacinação e pelas propriedades do antígeno. Baixas doses do antígeno favorecem a geração de supressão ativa ou tolerância dirigida por células regulatórias, enquanto altas doses implicam

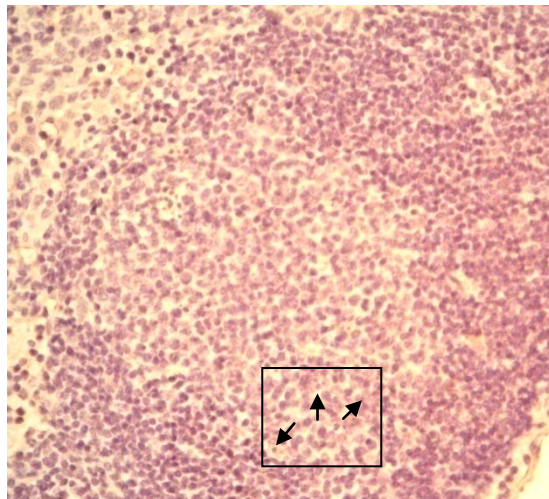
no mecanismo de clonal anergia ou deleção (TACKET e MASON, 1999; WEINER, 2001). De acordo com WEINER (2001) baixas doses de antígeno resultam na geração de células regulatórias após a apresentação do antígeno pelas células apresentadoras associadas ao intestino nas placas de Peyer. Como a apresentação preferencialmente induz células regulatórias, estas secretam a citocina supressora TGF- β (Fator de crescimento tumoral beta). Em adição, a mucosa intestinal tem altos níveis basais de IL-4 (interleucina -4), IL-10 e TGF- β , sendo que após uma pequena administração de antígeno, a produção destas citocinas é ainda mais estimulada. Este microambiente de citocinas pode ser crucial na indução de respostas Th2 ou Th3. Quando a resposta Th3 é prevalente, células regulatórias antígeno-específicas migram para os órgãos linfóides e suprimem as respostas imunológicas pela inibição da geração de células efetoras.

Quando avaliada a produção de IgGs anti-rBm7462 em camundongos imunizados com o extrato de proteínas totais solúveis por via subcutânea, observou-se também que não houve uma produção de IgGs passível de detecção pela metodologia aplicada. Como apenas 200 μ L de extrato foi inoculado em cada animal, a quantidade de rBm7462 entregue foi muito baixa, cerca de 10,59 μ g, o que pode explicar a não detecção de IgGs anti-peptídeo. Fatores como a liberação de proteases endógenas das células das plantas, após a maceração destas, também podem ter contribuído para a inoculação de uma menor dose ainda. Pesquisas anteriores comprovaram que uma dose de 100 μ g de peptídeo sintético, associado ao adjuvante saponina, entregue pela via subcutânea, é capaz de gerar uma boa resposta imune humoral (MEDEIROS, 2008; GONZALES-LOMBANA, 2003; PATARROYO *et al.*, 2002; PORTELA, 2000; COUTO-PIMENTEL, 2002 e SALES-JUNIOR *et al.*, 2005).

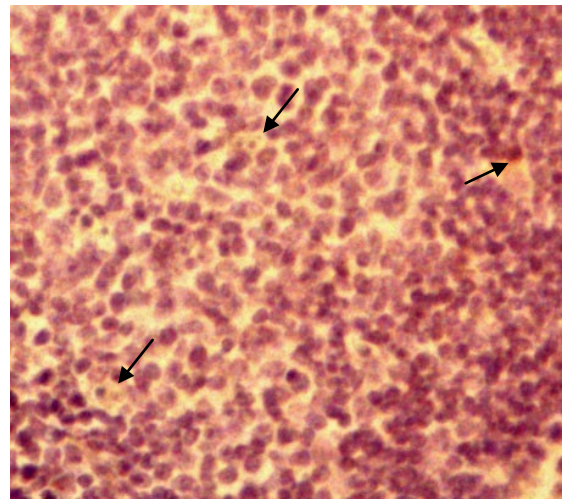
De acordo com ALLEN *et al.* (2007), é conhecido que a formação de centros germinais (CGs) é associada com respostas de anticorpos T dependentes. Além do mais, evidências indicam que os CGs são o principal sítio no qual células do plasma de alta-afinidade secretoras de anticorpos e células B de memória são geradas. Observações dos linfonodos periféricos dos animais pertencentes ao grupo vacinal 1, quando estes foram submetidos ao

ensaio de imunohistoquímica, revelaram a presença da formação de centros germinativos nos quais é possível identificar algumas células marcadas positivamente para presença do antígeno rBm7462 (figura 7B), enquanto para os animais pertencentes aos grupos controle 1 e 2 não foi observável a mesma marcação (figura 7C e D, respectivamente). Apesar de ser identificável centros germinais para os animais imunizados com folhas de *Arabidopsis thaliana* não transformada (figura 7E), este fato não ocorreu para aqueles camundongos não imunizados (figura 7F). Também são observáveis fortes marcações nas regiões dos cordões medulares dos camundongos imunizados com plantas transformadas (figura 8A e B) e discretas marcações para aqueles animais vacinados com extratos de proteínas totais solúveis de plantas transformadas (não mostrado).

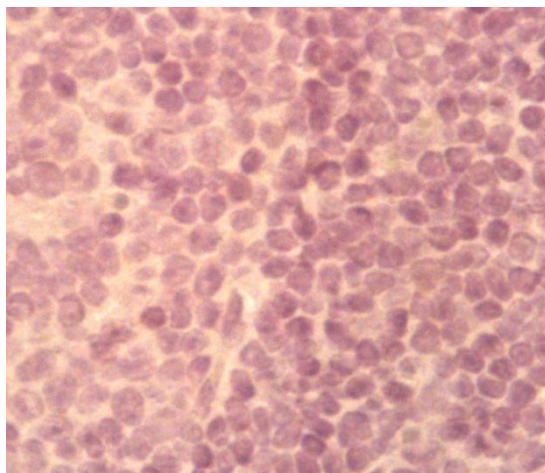
Dados os resultados, era esperado que acontecessem formações de centros germinativos nos animais imunizados, devido ao grande conteúdo protéico existente nas doses vacinais. Apesar de não haver uma resposta humoral detectável, ocorreu marcação para o peptídeo rBm7462 nos linfonodos. Uma possível explicação para este fato encontra-se baseada na geração de mecanismos de tolerância como já citado anteriormente. PAPE *et al.* (1997), demonstraram que quando células T expressando um receptor específico para um peptídeo da ovalbumina são transferidas para camundongos normais, os linfonodos dos animais são corados com um anticorpo que reconheça as células T específicas. Quando linfonodos de animais não tratados (*náive*) são submetidos ao ensaio, poucas células T foram encontradas nos linfonodos. Nos animais submetidos a um tratamento no qual uma grande dose (tolerogênica) de antígeno é fornecida, pode-se encontrar mais células T que o animal *náive*, porém bem menos células que aquelas encontradas no animal imunizado com a dose correta. Sendo que as células T encontradas para o animal tolerante situavam-se principalmente fora dos folículos linfóides ricos em células B. Estas observações corroboram com os resultados obtidos neste experimento, pois poucas células marcadas foram encontradas nos centros germinativos, enquanto mais células foram encontradas nas regiões dos cordões medulares.



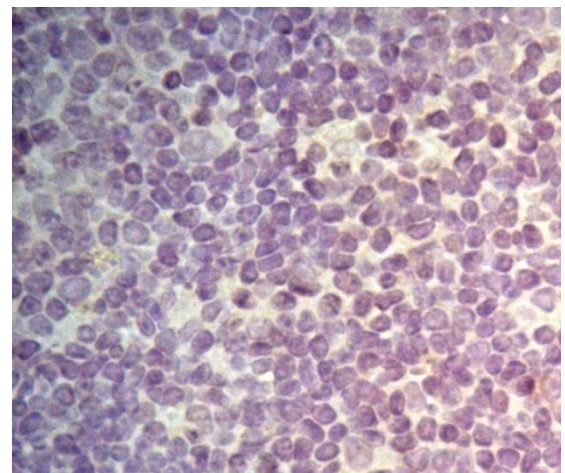
7A



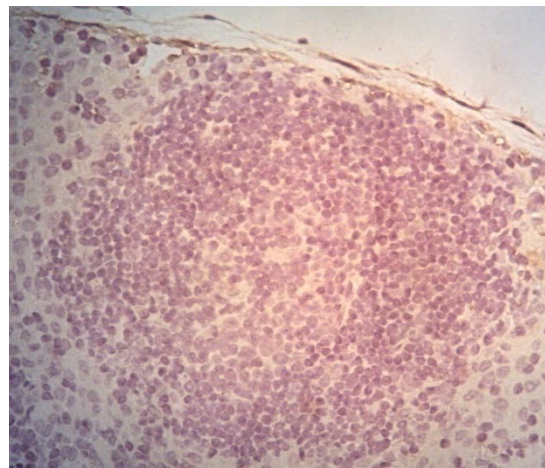
7B



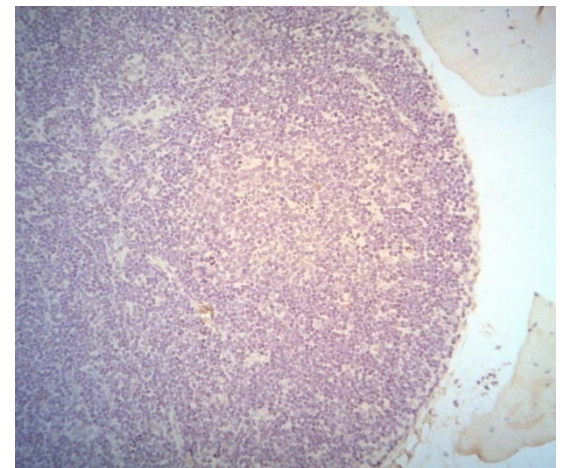
7C



7D

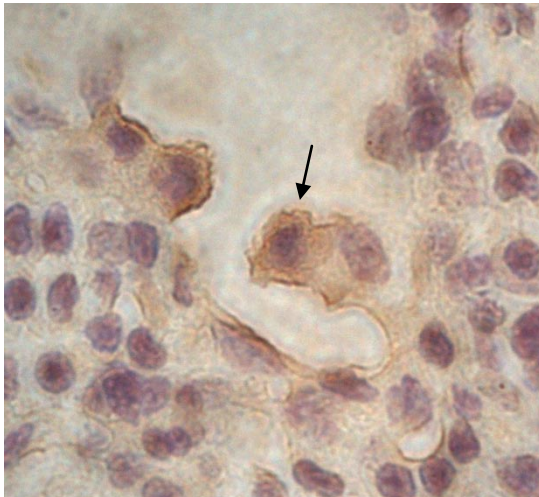


7E

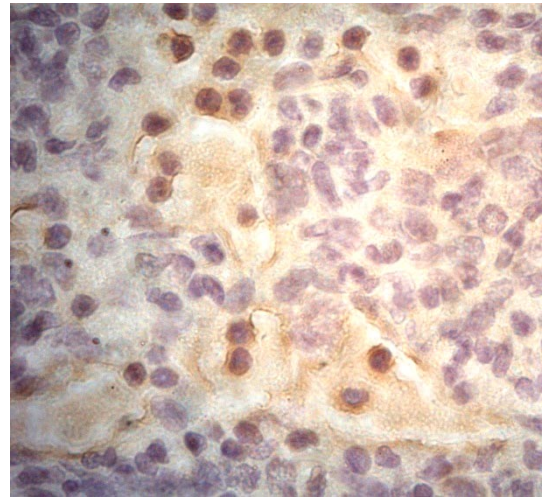


7F

Figura 7. Corte histológico dos linfonodos dos animais dos grupos vacinais e controle 1, 2. 7A – Grupo vacinal 1, ampliação 400X (setas indicam células marcadas através de imunohistoquímica para rBm7462). 7B – Ampliação da área em destaque em 7A, 1000x. 7C e D – Grupos controles 1 e 2, respectivamente (nenhuma marcação observável), ampliação 1000x. 7E – Formação de centro germinal em camundongo do grupo controle 1, ampliação 400x. 7F – Ausência de formação de centros germinais nos linfonodos de camundongos do grupo controle 2, ampliação 400x.



8A



8B

Figura 8. Cortes histológicos destacando a região dos cordões medulares do linfonodo do camundongo 1, preparado com o ensaio de imunohistoquímica. 9A – Destaque de uma célula dendrítica positiva (seta) para metodologia aplicada (1500X); 9B – Região demonstrado algumas células marcadas(1000X).

Como neste trabalho, marcação nos linfonodos bovinos para peptídeos recombinantes derivados do SBm7462[®] foram encontradas por GÓMEZ (2011) quando este utilizou a técnica imunohistoquímica para marcar as regiões onde o peptídeo se encontrava, o que demonstra a viabilidade de utilizar esta metodologia para detecção do imunógeno recombinante.

PAPE *et al.* (1997) também destacam que adjuvantes ou citocinas inflamatórias tem um papel chave na regulação da localização anatômica, expansão clonal e sobrevivência de células T antígeno-estimuladas. E que se estes componentes são ausentes as células T sobreviventes são produtoras ineficientes de IL-2 e INF- γ (interferon gama). Sendo assim, a ausência de adjuvantes nas imunizações também pode ter contribuído para a não detecção da resposta imune humoral.

Durante o estudo realizado, não foi possível, com as técnicas realizadas, identificar nos animais vacinados regiões no intestino relacionadas ao tecido linfóide, marcadas diferencialmente para a presença do peptídeo recombinante rBm7462.

Como neste trabalho não foi possível avaliar eficientemente a resposta imunológica humoral de camundongos imunizados oralmente com plantas *Arabidopsis thaliana* transgênicas, expressando o peptídeo rBM7462, abaixo são sugeridas algumas modificações na metodologia que podem contribuir para o sucesso de trabalhos posteriores:

- Como no trabalho realizado por LINDH *et al.* (2008), folhas das plantas que são administradas oralmente, como dose vacinal, podem ser congeladas e liofilizadas, desta forma possibilitando a entrega de uma maior concentração de antígeno por dose;
- Outras espécies vegetais podem ser escolhidas para transformação, já que é conhecido o fato de que outros tecidos, como o tubérculo e sementes, podem acumular mais proteínas heterólogas (MISHRA *et al.*, 2008);
- Também pode ser alterado a metodologia de vacinação, aumentando o número de doses entregues aos animais como realizado por GÓMEZ *et al.* (2008);
- Aos extratos de proteínas totais usados como imunógeno pode ser acrescentado um adjuvante (YOUM *et al.*, 2007).

6. CONCLUSÕES

- Plantas transformadas (quinta geração) mostraram-se capazes de produzir o peptídeo recombinante rBm7462, o que sugere o gene *seq2* provavelmente encontra-se em homozigose.
- Não foi possível detectar níveis de IgGs anti-rBm7462 em camundongos imunizados oralmente com 0,5g folhas de plantas transgênicas expressando o peptídeo rBm7462; ou seja, 26µg peptídeo recombinante/dose, como também em camundongos imunizados com 200µL extratos de proteínas totais solúveis das mesmas plantas;
- A dose de antígeno oferecida aos animais foi sub-antigênica o que pode ter estimulado mecanismos de tolerância ao antígeno;
- Não foi possível identificar a presença do antígeno no intestino dos animais imunizados;
- Linfonodos dos animais imunizados apresentaram alterações microscópicas relacionadas à resposta imunológica e marcações para o peptídeo rBm7462. Isso indica que um acerto na dose de antígeno entregue deve ser realizada para o sucesso da vacinação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHESON, D. W. K., LUCCIOLI, S. 2004. Mucosal immune responses. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. 18 (2): 387-404.
- AIZPURUA, H. J., RUSSELL-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.
- ALLEN, C. D. C., OKADA, T., CYSTER, J. G. 2007. Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. **Cell Press Immunity**. 27: 190-202.
- BARROS, D. M. 2001. ELISA e dot-ELISA, para detecção de anticorpos para o vírus da doença infecciosa bursal. 59f. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- BAUCHEREAU, J., STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**. 392: 245-252.
- BERGQUIST, C., JOHANSSON, E-L., LAGERGÅRD, T., HOLMGREN, J., RUDIN, A. 1997. Intranasal Vaccination of Humans with Recombinant Cholera Toxin B Subunit Induces Systemic and Local Antibody Responses in the Upper Respiratory Tract and the Vagina. **Infection and Immunity**. 65(7): 2676-2684.

- BRANDTZAEG, P., PABST, R. 2004. Let's go mucosal: communication on slippery ground. **Trends Immunology**. 25: 570-577.
- BURSENS, S. MONTAGU, M. V., INZÉ, D. 1998. The cell cycle in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**. 36: 9-19.
- CAMBELL, N. A., REECE, J. B. 2002. **Biology**. California: Benjamin Cummings. p. 753-754, 2002.
- CANÇADO, L. J. 2002. Utilização de sementes de tabaco transgênico como biorreatores para a produção de um fragmento scFv de um anticorpo monoclonal. 92f. **Dissertação (Mestrado)**. Unicamp, Campinas, São Paulo.
- CARVALHO, G. D. 2008. Estudo “*in vitro*” da apoptose induzida em linfócitos de camundongos BALB/c imunizados com o peptídeo sintético anti-carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SBm7462) por via oral e nasal. 137f. **Dissertação (Mestrado)**. UFV, Viçosa, Minas Gerais.
- CHOU, P. Y., FASMAN, G. D. 1978. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Advances in Enzymology Related Areas Molecular Biology**. 47: 45 – 148.
- COELHO, S. M., PETERS, A. F., CHARRIER, B., ROZE, D., DESTOMBE, C., VALERO, M., COCK, J. M. 2007. Complex life cycles of multicellular eukaryotes: New approaches based on the use of model organisms. **Gene**. 406: 152–170.
- CORSON M. S., TEEL, T. D., GRANT, W. E. , 2004. Microclimate influence in a physiological model of cattle-fever tick (*Boophilus* spp.) population dynamics. **Ecological Modelling**. 180: 487-514.
- COUTO-PIMENTEL, J. 2002. A Vacina Sintética SBm7462 no Controle do Carrapato *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887) em Animais Estabulados e a Campo. 77f. **Dissertação (mestrado)**. UFV, Viçosa, Minas Gerais.
- DONG J. L., LIANG B. G., JIN Y. S., ZHANG W. J., WANG T. 2005. Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. **Virology**. 339:153–63.

DOROKHOV, Y. L., SHEVELEVA, A. A., FROLOVA O. Y., KOMAROVA T. V., ZVEREVA A. S., IVANOV, P. A., ATABEKOV, J. G. 2007. Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves. **Tuberculosis**. 87: 218–224.

ESTRADA-PEÑA, A. 1999. Geostatistics and remote sensing using NOAA-AVHRR satellite imagery as predictive tools in tick distribution and habitat suitability estimations for *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**. 81: 73-82.

FREITAS, D. R. J.; POHL, P. C.; VAZ JR., I. S. 2005. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**. 33(2): 109-117.

FUENTE, J.; KOCAN, K.M.; BLOUIN, E. F. 2007. Tick Vaccines and the Transmission of Tick-Borne Pathogens. **Veterinary Research Communications**. 31: 85–90.

GARCÍA-GARCÍA, J. C., MONTERO, C., REDONDO, M., VARGAS, M., CANALES, M., BOUÉ, O., RODRÍGUEZ, M., JOGLAR, M., MACHADO, H., GONZÁLES, I. L., VALDÉZ, M., MÉNDEZ, L., DE LA FUENTE, J. 2000. Control of Ticks resistant to the immunization with BM86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *R. (B.) microplus*. **Vaccine**. 18: 2275-2287.

GARCÍA-GARCÍA, J. C., GONZÁLEZ, I. L., GONZÁLEZ, D. M., VALDÉS, M., MÉNDEZ, L., LAMBERTI, J., D'AGOSTINO, B., CITRONI, D., FRAGOSO, H., ORTIZ, M., RODRÍGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. 1999. Sequence variations in the *R. (B.) microplus*Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Experimental & Applied Acarology**. 23: 883–895.

GARCIA-GARCIA, J. C., SOTOT, A., NIGRO, F., MAZZA, M., JOGLAR, M., HECHEVARRIA, M., LAMBERTI, J., DE LA FUENTE, J. 1998. Adjuvant and immunostimulating properties of the recombinant Bm86 protein expressed in *Pichia pastors*. **Vaccine**. 16: 1053 – 1055.

GIL, F., BRUNA, A., WIGDOROVITZ, A., CATALÁ, R., MARTÍNEZ-TORRECUADRADA, J. L., CASAL, I., SALINAS, J., BORCA, M. V.,

- ESCRIBANO, J. M. 2001. High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. **Federation of European Biochemical Societies Letters**. 488: 13-17.
- GIL, F., REYTOR, E., PÉREZ-FILGUEIRA, D. M., ESCRIBANO, J. M. 2007. Multimerization of peptide antigens for production of stable immunogens in transgenic plants. **Journal of Biotechnology**. 128: 512–518.
- GÓMEZ, E., ZOTHA, S. C., CARRILLOA, E., ROUX, M. E., BERINSTEINA, A. 2008. Mucosal immunity induced by orally administered transgenic plants. **Immunobiology**. 213: 671–675.
- GÓMEZ, G. A. T. 2011. Imunização de bovinos com dois peptídeos recombinantes derivados do peptídeo sintético Sbm7462: resposta imune celular e alterações histopatológicas do carrapato *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887). 81f. **Dissertação (Mestrado)**. UFV, Viçosa, Minas Gerais.
- GÓMEZ, N., WIGDOROVITZ, A., CASTAÑÓN, S., GIL, F., ORDÁS, R., BORCA, M. V., ESCRIBANO, J. M. 2000. Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus. **Archives of Virology**. 145: 1725–1732.
- GÓMEZ, S. Y. M. Produção de clones secretores de anticorpos (IgG) contra o vírus da doença infecciosa bursal. 2007. 68f. **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV.
- GONZALES, J. C. 1974. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 101p.
- GONZÁLEZ-LOMBANA, C. Resposta imune de bovinos vacinados com peptídeo sintético SBm7462® com vistas ao controle do *B. microplus* (CANESTRINI,1887), 2003, 77p. **Dissertação (mestrado)**. UFV, Viçosa, Minas Gerais.
- GRECO, R., MICHEL, M., GUETARD, D., CERVANTES-GONZALEZ, M., PELUCCHI, N., WAIN-HOBSON, S., SALA, F., SALA, M. 2007. Production of recombinant HIV-1/HBV virus-like particles in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants for a bivalent plant-based vaccine. **Vaccine**. 25: 8228–8240.

- GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**. 21(125): 8-10.
- HAYS, J. B. 2002. *Arabidopsis thaliana*, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. **DNA Repair**. 1: 579–600.
- HEIN M. B., YEO T., WANG F., STURTEVANT A. 1996. Expression of cholera toxin subunits in plants. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 792: 50–6.
- HERNÁNDEZ, C. M., MASSARD, C. L., SOARES, C. O., FONSECA, A. H. 1997. Alterações histológicas do trato digestivo de *Boophilus microplus* pela ação de anticorpos anti rBm 86. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 6(1): 33-37.
- HIRABAYASHI, Y., KURATA, H., FUNATO, H., NAGAMINE, T., AIZAWA, C., TAMURA, S., SHIMADA, K., KURATA, T. 1990. Comparison of intranasal inoculation of influenza HA vaccine combined with cholera toxin B subunit with oral or parenteral vaccination. **Vaccine**. 8:243-248.
- HOLMGREN J. & CZERKINSKY C. 2005. Mucosal immunity and vaccines. **Nature medicine supplement**. 11(4): 45-53.
- HOLMGREN, J., CZERKINSKY, C., ERIKSSON, K., MHARANDI, A. 2003. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. **Vaccine**. 21(2): 89–95.
- HOOP, T. P., WOODS, K. R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (U.S.)**. 78(6): 3824 – 3828.
- JOHANSSON, E. L., WASSEN, L., HOLMGREN, J., JERTBORN, M., RUDIN, A. 2001. Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. **Infection and Immunity**. 69: 7481-7486.
- JOHNSTON, L. A., KEMP, D. H., PEARSON, R. D. 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female

ticks: effects of induced immunity on ticks populations. **International Journal for Parasitology**. 16(1): 27-34.

JONSSON, N. N. 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**. 137: 1-10.

JONSSON, N. N.; MATSCHOSS, A. L.; PEPPER, P.; GREEN, P. E.; ALBRECHT, M. S.; HUNGERFORD, J.; ANSELL, J.; 2000. Evaluation of tickGARD(-PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein–Friesian cows. **Veterinary Parasitology**. 88: 275–285.

KAGALE, S., DIVI U. K. , KROCHKO, J. E., KELLER, W. A., KRISHNA, P. 2007. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. **Planta**. 225(2):353-64.

KASHINO, S. S., RESENDE, J., SACCO, A. M. S., ROCHA, C., PROENÇA, L., CARVALHO, W. A., FIRMINO, A. A., QUEIROZ, R., BENAVIDES, M., GERSHWIN, L. J., DE MIRANDA-SANTOS, I. K. F. 2005. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. . **Experimental Parasitology**. 110: 12-21.

KHANDELWAL A., SITA G. L., SHAILA M. S. 2003. Oral immunization of cattle with hemagglutinin protein of rinderpest virus expressed in transgenic peanut induces specific immune responses. **Vaccine**. 21:3282–9.

KIRK, D. D., MCLINTOSH, K., WALMSLEY, A. M., PETERSON, R. K. 2005. Risk analysis for plant-made vaccines. **Transgenic Research**. 14: 449–462.

KITE, J., DOOLITTLE, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**. 157(1): 105-132.

KOGA, T.; MCGHEE, J. R.; KATO, H.; KATO, R.; KIYONO, H.; FUJIHASHI, K. 2000. Evidence for early aging in the Mucosal Immune System. **The Journal of Immunology**. 165: 5352–5359.

KOPROWSKI, H., YUSIBOV, V. 2001. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. **Vaccine**. 19: 2735–2741.

KUMAR G. B. S., GANAPATHI T. R., REVATHI C. J., SRINIVAS L., BAPAT V. A. 2005. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. **Planta**. 222:484–93.

KUMAR, A.; GARG, R.; YADAV, C.L.; VATSYA, S.; KUMAR, R. R.; SUGUMAR, P.; CHANDRAN, D.; MANGAMMOORIB, L. N.; BEDARKAR, S.N. 2009. Immune responses against recombinant tick antigen, Bm95, for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in cattle. **Veterinary Parasitology**. 165: 119–124.

LAU, O. S., SUN, S. S. M. 2009. Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. **Biotechnology Advances**. 27: 1015–1022.

LEE, R. W. H., CORNELISSE, M., ZIAUDDIN, A., SLACK, P. J., HODGINS, D. C., STROMMER, J. N., SHEWEN, P. E., LO, R. Y.C. 2008. Expression of a modified *Mannheimia haemolytica* GS60 outer membrane lipoprotein in transgenic alfalfa for the development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis. **Journal of Biotechnology**. 135: 224–231.

LI, J-T., FEI, F., MOU, Z-R., WEI, J., TANG, Y., HE, H-Y., WANG, L., WU, Y-Z. 2006. Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. **Virology**. 356: 171–178.

LIJSEBETTENS, M. V., CLARKE, J. Leaf development in *Arabidopsis*. 1998. **Plant Physiology and Biochemistry**. 36: 47-60.

LIMA A.M.C. Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos ELISA e dot-ELISA para detecção de anticorpos antipneumovirus aviário. 1998, 47f. **Dissertação (Mestrado)**. UFV, Viçosa, Minas Gerais.

LINDH, I., KALBINA, I., THULIN, S., SCHERBAK, N., SAËVENSTRAND, H., BRÅVE, A., HINKULA, J., STRID, Å., ANDERSSON, S. 2008. Feeding of mice with *Arabidopsis thaliana* expressing the HIV-1 subtype C p24 antigen gives rise to systemic immune responses. **Acta Pathologica, Microbiologica. et Immunologica Scandinavica**. 116: 985-994.

LINDH, I., WALLIN, A., KALBINA, I., SAËVENSTRAND, H., ENGSTROM, P. ANDERSSON, S., STRID, Å. 2009. Production of the p24 capsid protein from

HIV-1 subtype C in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota* using an endoplasmic reticulum-directing SEKDEL sequence in protein expression constructs. **Protein Expression and Purification**. 66: 46–51.

LIU, L. M., MACPHERSON, G. G. 1991. Lymph-borne (veiled) dendritic cells can acquire and present intestinally administered antigens. **Immunology**. 73:281.

LIU, L. M., MACPHERSON, G. G. 1993. Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo. **Journal of Experimental Medicine**. 177:1299-1307.

MA J. K. C., HIATT A., HEIN M., VINE N. D., WANG F., STABILA P., VAN DOLLEWEERD C., MOSTOV K., LEHNER T. 1995. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. **Science**. 268: 716–719.

MA J. K. C., HIKMAT B. Y., WYCOFF K., VINE N. D., CHARGELEGUE D., YU L., HEIN M. B., LEHNER T. 1998 . Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody in preventive immunotherapy in humans. **Nature Medicine**. 4: 601–606.

MA, J. K-C., DRAKE, P. M. W., CHARGELEGUE, D., OBREGON, P., PRADA, A. 2005. Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production. **Vaccine**. 23: 1814-1818.

MASON H. S., HAQ T. A., CLEMENTS J. D., ARNTZEN C. J. 1998. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. **Vaccine**. 16:1336–43.

MASON, H. S., WARZECHA, H., MOR, T. C., ARNTZEN, J. 2002. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. **TRENDS in Molecular Medicine**. 8 (7): 324-329.

Mc COSKER, P.J.1979. The global importance of babesiosis. In: **Ristic, M., Kreier, J.P. (Eds.)**, Babesiosis. Academic Press, New York, pp. 2–19.

MCGHEE, J. R., KIYONO, H. 1993. New perspectives in vaccine development: mucosal immunity to infections. **Infection Agents Disease**. 2:55.

MCGHEE, J. R., KIYONO, H. 1998. **Mucosal immunology**. In: Fundamenta

Immunology. PAUL, W. E. ed. Academic Press, San Diego. p.909.

MEDEIROS, C. L. 2008. Vacina de DNA Utilizando Genes Sintéticos Derivados do Peptídeo SBm7462 Contra o Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E Avaliação Da Resposta Imune em Camundongos Balb/c. 56f. **Dissertação (mestrado)**. UFV, Viçosa, Minas Gerais.

MEI, H., TAO, S., YUAN-GANG, Z., ZHI-GANG, A. 2006. Research Advances on Transgenic Plant Vaccines. **Acta Genetica sinica**. 33(4): 285 – 293.

MISHRA, N., GUPTA, P. N., KHATRI, K., GOYAL, A. K., VYAS, S. P. 2008. Edible vaccines: A new approach to oral immunization. **Indian Journal of Biotechnology**. 7: 283-294.

MOWA, A. MCL. T & VINEY, J. L. 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. **Immunological Review**. 156: 145-166.

MURRELL, A., CAMPBELL, N.J.H. AND BARKER, S.C. 2000. Phylogenetic analyses of the rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 16: 1–7.

MURRELL, A., CAMPBELL, N.J.H. AND BARKER, S.C. 2001. A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 21: 244–258.

NUÑEZ. J. L., MUÑOZ, C. M. E., MOLTEDO, H. L. 1982. *B. microplus*: La Garrapata Común del Ganado Vacuno. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 184p.

OLIVEIRA, R. C. 1998. Avaliação experimental do peptídeo sintético 4912 como imunógeno para o controle de carrapato *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887). 72f. **Dissertação (mestrado)**. UFV, Viçosa, Minas Gerais.

OLIVER J.H. 1989. Biology and systematics of ticks (Acari:Ixodidae). **Annual Review of Ecology and Systematics**. 20: 397-430.

PAPE, K. A., KEARNEY, E. R., KHORUTS, A., MONDINO, A., MERICA, R., CHEN, Z-M., INGULLI, E., WHITE, J., JOHNSON, J. G., JENKINS, M. K. 1997. Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cells for the study of T-cell activation *in vivo*. **Immunological Reviews**. 156: 67-78.

PATARROYO, J. H., PORTELA, R. W., DE CASTRO, R. O., COUTO PIMENTEL, J., GUZMAN, F., PATARROYO, M. E., VARGAS, M. I., PRATES, A. A., DIAS MENDES, M. A. 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *B. microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 88: 163–172.

PECONICK A. P., SOSSAI S., GIRÃO F. A., RODRIGUES M. Q. R. B., SOUZA E SILVA C. H., GUZMAN Q. F., PATARROYO V. A. M., VARGAS M. I., PATARROYO J. H. 2008. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South América. **Experimental Parasitology**. 119: 37–43.

PECONICK, A. P. 2010. Expressão do peptídeo vacinal SBm7462[®] anti-carrapato *Rhipicephalus microplus* em plantas transgênicas (*Arabidopsis thaliana*). 93f. **Tese (Doutorado)**. UFV, Viçosa, Minas Gerais.

PEETERS, K., WILDE, C. D., DEPICKER, A. 2001. Highly efficient targeting and accumulation of a Fab fragment within the secretory pathway and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. **European Journal of Biochemistry**. 268: 4251-4260.

PEREIRA, J. C. R. **Análise de dados qualitativos – Estratégias metodológicas para as Ciências da Saúde, Humanas e Sociais**. 3ª Edição. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo. 155p. 1999.

PIMENTEL, J., GUZMAN, F., PATARROYO, M. E., VARGAS, M. I., PRATES, A. A., DIAS MENDES, M. A. 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *B. microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 88: 163 – 172.

PORTELA, R. W. D. 2000. Comparação experimental de três peptídeos sintéticos como imunógeno no controle do carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI,1887). 78f. **Dissertação (Mestrado)**. UFV, Viçosa, Minas Gerais.

PRATA, M. C. A., FACCINI, J. L. H., DAEMON, E. 1999. Biologia da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) de origem caprina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 8(2): 107-111.

PROPHET, E.B., MILLS, B., ARRINGTON, J.B., SOBIN, L.H. 1992. **Laboratory Methods in hystotechnology**. Armmed Forces Institute of Pathology. Washington, 274p.

RAND, K. N., MOORE, T., SRISKANTHA, A., SPRING, K., TELLAM, R., WILLADSEN, P., COBON, S. 1989. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proceedings of the national academy of sciences**. 86 (24):9657-9661.

RIGANO M. M., ALVAREZ M. L., PINKHASOV J., JIN Y., SALA F., ARNTZEN C. J. 2004. Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**. 22:502–8.

RIGANO, M.M.; WALMSLEY, A.M. 2005. Expression systems and developments in plant-made vaccines. **Immunology and Cell Biology**. 83: 271–277.

RODRÍGUEZ, M., RUBIERA, R., PENICHET, M., MONTESINO, R., CREMATA, J., FALCÓN, V., SÁNCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOBÉS, C., VALDÉS, M., LEONART, R., HERRERA, L., DE LA FUENTE, J. 1994. High-level expresión of the *Boophilus microplus* BM86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal of Biotechnology**. 33: 135-146.

ROSALES-MENDOZA S., SORIA-GUERRA R. E., LÓPEZ-REVILLA R., MORENO-FIERROS L., ALPUCHE-SOLÍS A. G. 2008. Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge. **Plant Cell**. 27:79–84.

ROUNDS, W. and HERD, D. B. **The cow's digestive system**. Beef cattle nutrition. Texas Agricultural Extension Service. Retirado em <http://animalscience.tamu.edu/academics/beef/publications/index.htm>.

RUDIN, A., JOHANSSON, E. L., BERGQUIST, C., HOLMGREN, J. 1998. Differential Kinetics and Distribution of Antibodies in Serum and Nasal and Vaginal Secretions after Nasal and Oral Vaccination of Humans. **Infection and Immunity**. 66(7): 3390-3396.

- RUIZ, L. M.; ORDUZ,S.; LOPEZ, E.D; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E.; ARMENGOL, G. 2007. Immune response in mice and cattle after immunization with a *Boophilus microplus* DNA vaccine containing bm86 gene. **Veterinary Parasitology**. 144: 138–145.
- RYBICKI, E. P. 2009. Plant-produced vaccines: promise and reality. **Drug Discovery Today**.14: 16-24.
- SALES-JUNIOR, P. A., GUZMAN, F., VARGAS, M. I., SOSSAI, S., PATARROYO, A. M. V., GONZÁLEZ, C. Z. L., PATARROYO, J. H. 2005. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* synthetic vaccine SBm742. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 107: 281 – 290
- SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. 2004. Biological control of ticks. **Parasitology**. 129: 389–403.
- SANTOS, B.M. Paramixovírus aviário, estudos sorológicos e histopatológicos das amostras la Sota e VG/GA. 1995, 94f. **Tese (Doutorado)**. UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- SANTOS, M.J.; WIGDOROVITZ, A. 2005. Transgenic plants for the production of veterinary vaccines. **Immunology and Cell Biology**.83: 229–238.
- SMITH, D. R., HUNGERFOD, J., WILLADSEN, J. 1995. The development of TickGard – a commercial vaccine against the cattle tick *R. (B.) microplus*. **Indooroopilly: Biotec Australia-CSIRO**. 17 p.
- SOSSAI, S., PECONICK, A. P., SALES-JUNIOR, P. A., MARCELINO, F. C., VARGAS, M. I., NEVES, E. S., PATARROYO, J. H. 2005. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental & Applied Acarology**. 37: 199–214.
- STEPHEN J. STREATFIELD. 2006. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. **Methods**. 38: 150–157.
- STREATFIELD, S. J., HOWARD, J. A. 2003. Plant-based vaccines. **International Journal for Parasitology**. 33: 479–493.

STROBEL, S. & MOWAT, A. MCI. 1998. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. **Immunology today**. 19(4): 173 – 181.

SUTHERST, R. W., BOURNE, A. S. 2006. The effect of desiccation and low temperature on the viability of eggs and emerging larvae of the tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Ixodidae). **International Journal for Parasitology**. 36: 193–200.

TACKET, C. O., MASON, H. S. 1999. A review of oral vaccination with transgenic vegetables. **Microbes and Infection**. 1: 777–783.

TEIXEIRA, P. E VALLE, S. 2010. **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. 2 ed. Editora Fiocruz., Rio de Janeiro. 442p.

The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v.408 p. 796-816, 2000.

TIWARI, S., VERMA, P. C., SINGH, P. K., TULI, R. 2009. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. **Biotechnology Advances**. 27: 449–467.

VAN ECK, J., WALMSLEY, A. M., DANIELL, D. 2004. Tomato transformation – the nuclear and chloroplast genomes. **Transgenic Crops of the World**. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 405–23

WALBOT, V. 2000. A green chapter in book life. **Nature**. 408: 794-795.

WIGDOROVITZ, A., MOZGOVOJ M., SANTOS, M. J. D., PARREÑO, V., GÓMEZ, C., PÉREZ-FILGUEIRA, D. M., TRONO, K. G., RÍOS, R. D., FRANZONE, P. M., FERNÁNDEZ, F., CARRILLO, C., BABIUK, L. A., ESCRIBANO, J. M., BORCA, M. V. 2004. Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants. **Journal of General Virology**. 8: 1825–1832.

WILLADSEN, P. 1997. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**. 71: 209-222.

WILLADSEN, P. 2004. Anti-tick vaccines. **Parasitology**. 129: 367-387.

WILLADSEN, P., RIDING, G. A., MCKENNA, R. V., KEMP, D. H., TELLAM, R.

- L., NIELSEN, J. N., LAHNSTEIN, J., COBON, G. S., GOUGH, J. M. 1989. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *B. microplus*. **Journal of Immunology**. 143(4): 1346-1351.
- WILLADSEN, P., BIRD, P., COBON, G. S., HUNGERFORD, J., 1995. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**. 110: 43–50.
- WILLADSEN, P., SMITH, D., COBON, G., MCKENNA, R. 1996. Comparative vaccination of cattle against *B. microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. **Parasitology Immunology**. 18: 241-246
- WU, H., SINGH,N.K., LOCY, R.D., SCISSUM-GUNN, K., . GIAMBRONE, J.J. 2004. Expression of immunogenic VP2 protein of infectious bursal disease virus in *Arabidopsis thaliana*. **Biotechnology Letters**, 26: 787–792.
- YAN, H., YAN, H., LI, G., GONG, W., JIAO, H., CHEN, H., JI., M. 2010. Expression of human cytomegalovirus pp150 gene in transgenic *Vicia faba* L. and immunogenicity of pp150 protein in mice. **Biologicals**. 38: 265–272.
- YOUMA, J.-W., WON, Y.-S., JEON, J. H., RYUC, C. J., CHOI, Y.-K., KIMB, H.-C., KIME, B.-D., JOUNG, H., KIM, H. S. 2007. Oral immunogenicity of potato-derived HBsAg middle protein in BALB/c mice. **Vaccine**. 25: 577–584.