

Produção de anti-soro para o vírus do mosaico da abóbora mediante imunização oral de coelhos¹

Production of antiserum specific to Squash mosaic virus by
rabbit oral immunization

Francisco de Assis Câmara Rabelo Filho², José Albérico de Araújo Lima³, Najara Frota Ramos⁴, Maria de Fátima Barros Gonçalves⁵ e Karina Fernandes Carvalho⁶

Resumo - Plantas de meloeiro (*Cucumis melo*) 'Hy Mark' foram utilizadas para a propagação do vírus do mosaico da abóbora (Squash mosaic virus, SqMV), família Comoviridae, gênero Comovirus, em condições de casa de vegetação. O vírus foi purificado a partir das plantas infetadas e a preparação viral, purificada na concentração de 10,00 mg/ml, em solução salina 0,15 M, foi usada para imunização de coelho por via oral. Dez doses de 1,0 ml cada foram administradas diariamente, em duas etapas. Outro coelho foi imunizado de forma semelhante, com extrato de folhas infetadas com o SqMV. Os extratos foram preparados em solução salina 0,15 M na proporção 1:1 e clarificados por centrifugação, sendo o sobrenadante usado na imunização oral. Os anti-soros obtidos foram avaliados por dupla difusão em Agar. O anti-soro do coelho imunizado com a preparação purificada reagiu com extratos de plantas infetadas pelo vírus, com o título de 1024, sem apresentar reação com extratos de plantas sadias. O anti-soro obtido do coelho imunizado com o extrato de planta infetada apresentou título de 4. Os resultados obtidos confirmam a eficiência da imunização oral na produção de anti-soro para diagnose de vírus de planta.

Termos para indexação: meloeiro, sorologia, imunologia, diagnose viral, Comovirus.

Abstract - Melon (*Cucumis melo*) plants 'Hy Mark' were used for propagation of *Squash mosaic virus* (SqMV), family *Comoviridae*, genus *Comovirus* in green house conditions. The virus was purified from young leaves of infected melon plants and the purified virus preparation, in the concentration of 10.00 mg/ml, in saline solution 0.15 M, was used for rabbit oral immunization. Ten doses of 1.0 ml each were given in two set of inoculation in two days interval. Another rabbit was immunized by a similar way using extracts obtained from infected melon plants. The extracts were obtained in saline solution 0.15 M and clarified by a low speed centrifugation at 10,000 g. The obtained antisera were evaluated by double diffusion tests in a gar medium. The antiserum obtained from the rabbit immunized with the purified virus preparation reacted with extracts from infected plants in a title of 1024 and did not present any reaction with extracts from healthy plants. The antiserum obtained from the rabbit immunized with extracts from infected plants presented a title of 4 with the extract from infected plant, but did not show reaction with the extracts from healthy plants. The results confirmed the efficiency of oral immunization for production of antiserum specific to plant viruses useful for virus diagnose.

Index terms: melon plants, serology, immunology, virus diagnosis.

¹ Recebido para publicação em 13/12/2004; aprovado em 03/06/2005.

² Eng. Agrônomo, bolsista do CNPq. Dep. de Fitotecnia, CCA/UFC, Bloco 806, Campus do Pici, 60451-970, Fortaleza, CE – Brasil, camara.filho@bol.com.br

³ Eng. Agrônomo, Ph. D, Prof. do Dep. de Fitotecnia, CCA/UFC, CE, albersio@ufc.br

⁴ Eng. Agrônoma, M. Sc., doutoranda do Curso de Fitotecnia do Dep. de Fitotecnia, CCA/UFC, CE, najaa@bol.com.br

⁵ Eng. Agrônoma, M. Sc., Técnica do Dep. Fitotecnia, CCA/UFC, CE

⁶ Eng. Agrônoma, karinafc@bol.com.br

Introdução

Cultivadas em praticamente todo o mundo, as espécies da família Cucurbitaceae estão inseridas em aproximadamente 80 gêneros, tendo o meloeiro (*Cucumis melo* L.) uma grande importância econômica e social dentro dessa família. De acordo com Lopes (1991), além do valor econômico e alimentar, o cultivo de cucurbitáceas tem, também, grande importância social na geração de empregos, pois demanda uma grande mão-de-obra desde o cultivo até a comercialização. No Brasil, esta olerícola é de grande importância econômica, sendo exportada para os mais importantes mercados consumidores da Europa, gerando divisas para o país. Entre as regiões produtoras, destaca-se o Nordeste brasileiro, o qual apresenta grande potencial de produção devido às condições edafo-climáticas favoráveis. No entanto, esta cultura que apresenta larga e crescente expressão econômica para a agricultura irrigada em vários estados do Nordeste pode ser naturalmente infetada por mais de 20 espécies de vírus, sendo mais importantes, dentre os identificados no Brasil, os pertencentes às seguintes famílias e gêneros: família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*, vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Costa et al.; 1972); família *Comoviridae*, gênero *Comovirus*: vírus do mosaico da abóbora (*Squash mosaic virus*, SqMV) (Lima e Amaral, 1985; Moura et al.; 2001); família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*: estirpe melancia do vírus da mancha anelar do mamoeiro (*Papaya ringspot virus*, type Watermelon, PRSV-W) (Rezende e Pacheco, 1997; Oliveira et al.; 2000; Moura et al.; 2001); vírus do mosaico da melancia (*Watermelon mosaic virus*, WMV) (Sá e Kitajima, 1991; Oliveira et al.; 2000) e vírus do mosaico amarelo do zucchini (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) (Vega et al.; 1995; Oliveira et al.; 2000; Moura et al.; 2001). O SqMV é transmitido por algumas espécies de insetos, bem como por sementes, sendo a indexação sorológica das sementes uma importante estratégia para seu controle (Lima e Amaral, 1985).

A identificação correta dos vírus é importante para o estabelecimento de estratégias, visando ao seu controle. Várias são as formas para se chegar a um diagnóstico correto e definitivo para uma doença ocasionada por vírus. Os métodos sorológicos são, atualmente, as formas mais usadas na identificação de vírus de plantas. A maior limitação para o uso das técnicas sorológicas na diagnose de viroses vegetais reside na dificuldade de se dispor de anti-soros específicos para os vírus. A produção de anti-soro de boa qualidade requer uma boa preparação viral purificada para ser usada na imunização de coelhos. A purificação química dos vírus é um processo caro e complicado, envolvendo muitos estágios desde a multiplicação do vírus em casa de vegetação até diferentes tipos de tratamento químicos e centrifugações diferenciais (Walkey, 1985). Os vírus podem ser perdidos durante o processo de purificação ou purificados em concentrações insuficientes para imunização do coelho.

O sucesso na produção de anti-soros para vírus de planta em diferentes laboratórios de pesquisa, inclusive no

Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal do Ceará, vem superando as dificuldades encontradas na diagnose de viroses vegetais. Os esquemas de imunização de coelhos para produção de anti-soros são extremamente variáveis e o Laboratório de Virologia Vegetal da UFC vem procurando adaptar o processo de imunização oral de coelhos com extrato de plantas infetadas ou com purificações virais parcialmente purificadas (Almeida e Lima, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da imunização de coelhos por via oral, como forma alternativa para a produção de anti-soro policlonal contra SqMV.

Material e Métodos

Na purificação parcial do vírus, a fonte de SqMV usada foi mantida em casa de vegetação do Laboratório de Virologia Vegetal da UFC. O vírus foi parcialmente purificado a partir de folhas de meloeiro híbrido HY-MARK (Figura 1), através do processo de clarificação com *n*-butanol e precipitação das partículas virais com polietilenoglicol 6.000 (PEG).

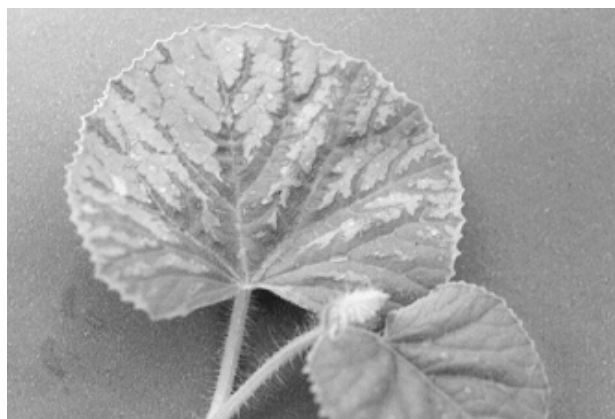


Figura 1 - Folhas de meloeiro (*Cucumis melo*) exibindo sintomas típicos de infecção pelo *Squash mosaic virus* (SqMV).

A purificação química do SqMV foi realizada segundo o roteiro simples utilizado por Lima e Amaral (1985). Procedeu-se à extração do vírus a partir de tecido infetado com cerca de 30 dias após a inoculação. Todo material foi macerado na presença de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5; na proporção de 1:2 (p/v), acrescido de sulfato de sódio na proporção de 0,5%. Após a maceração, o extrato obtido foi filtrado em gaze dupla e submetido a uma clarificação com 8% de *n*-butanol, sob agitação lenta e constante por aproximadamente 8 horas. Em seguida, a mistura foi submetida a uma centrifugação de 10.000 g, durante 10 min, em centrífuga Sorvall RC-513. Ao sobrenadante, foram adicionados 8% de polietilenoglicol-6000 (PEG) e 4% de cloreto de sódio (NaCl) homogeneizados em agitação lenta e constante, por um período de 1 hora. A mistura foi submetida a uma nova centrifugação de 10.000 g, por 10 minutos, para a precipitação do vírus, que foi ressuspenso em tampão de fosfato 0,02 M pH 8,2, passando por uma agitação de 30 min,

seguida de uma centrifugação de 10.000 g por 10 min. Após cinco etapas de precipitação do vírus com PEG, depois de clarificação, o produto final foi usado na imunização oral do coelho. A concentração do vírus na preparação final foi avaliada através do espectrofotômetro de luz violeta, Variant DMS-70, com faixa de comprimento de onda de 240 a 320 nm. A infectividade do vírus foi avaliada através da inoculação mecânica em plantas de meloeiro sadias.

Uma alíquota de 100 µl do vírus purificado foi misturada com 900 µl de solução salina 0,15 M e a mistura foi usada para imunização de coelho da raça Nova Zelândia Branca, por via oral. Como forma alternativa, 1 g de folha infetada com SqMV foi macerado na presença de 1 ml de solução salina e o extrato obtido foi utilizado na imunização oral de outro coelho.

O esquema de imunização foi de dez doses para cada tratamento, em duas etapas de cinco dias, com intervalo de dois dias entre as etapas. Decorridos 15 dias, foi feita a primeira coleta de sangue para posterior fracionamento e a clarificação do anti-soro.

Os anti-soros foram avaliados através de testes sorológicos de dupla difusão em Agar, para determinação do título, da qualidade e da especificidade dos anti-soros. Os testes de dupla difusão em Agar foram realizados usando-se amostras de tecidos foliares de plantas infetadas com SqMV, PRSV-W, WMV e ZYMV, bem como de plantas sadias de meloeiro. Os extratos foram obtidos a partir da maceração, em presença de água destilada, na proporção 1:2 (p/v), seguido de uma filtração em gaze dupla. Em seguida, alíquotas de 100 µl dos extratos foram distribuídas nos orifícios periféricos do gel de agar [0,8% de agar Noble e 1,0% de azida de sódio (NaN_3)] e testados contra os anti-soros obtidos através das imunizações orais dos coelhos.

Resultados e Discussão

A análise da preparação viral purificada no espectrofotômetro ultravioleta revelou um espectro de absorção típico de vírus poliédrico, com absorção em 280 nm de 0,980 e em 260 nm de 1,612. A razão de absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) e a razão de absorbância máxima e mínima ($A_{\text{máx}}/A_{\text{mín}}$) foram de 1,645 e 1,4038, respectivamente, semelhantes ao obtido por Lima e Amaral (1985). A concentração viral foi estimada em 21,6 mg de vírus/ml de preparação purificada. As plantas de meloeiro inoculadas com o vírus purificado apresentaram sintomas típicos de mosaico induzido pelo SqMV 10 dias após a inoculação (Figura 1).

As alíquotas dos anti-soros recolhidos dos coelhos imunizados apresentaram reações nítidas, em dupla difusão em agar, com extratos de plantas infetadas com SqMV e não apresentaram nenhuma reação com extratos de plantas sadias (Figura 2).

O teste em dupla difusão em agar revelou um título de 1:1024 para o anti-soro obtido de imunização oral com

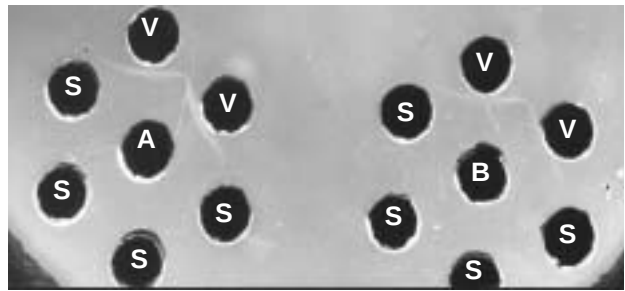


Figura 2 - Teste de dupla difusão em agar demonstrando a especificidade dos anti-soros obtidos para *Squash mosaic virus* (SqMV) pela imunização oral de coelhos. A – anti-soro contra SqMV purificado; B – anti-soro contra extrato de meloeiro (*Cucumis melo*) infetado com SqMV; V - Extrato de planta de meloeiro infetado com SqMV e S – Extrato de planta sadia.

vírus purificado. De outra parte, o título do anti-soro obtido através da imunização oral com extrato de plantas infetadas foi de apenas 1:4. Os testes sorológicos realizados contra outros vírus que infetam cucurbitáceas (PRSV-W, WMV e ZYMV) apresentaram resultados negativos, confirmando a especificidade dos anti-soros para o SqMV.

Os resultados dessa pesquisa permitem confirmar a eficiência da imunização oral de coelhos desenvolvida em camundongos por Guedes et al. (2002) e adaptada para coelhos por Lima et al. (2001), com a produção de anti-soro de qualidade para SqMV e seu uso em diagnose laboratorial e indexação de sementes. Trata-se de um método simples, rápido e barato para produção de anti-soro específico para vírus de plantas quando comparado com os métodos tradicionais, que envolvem a injeção de animais com preparações purificadas dos vírus (Almeida e Lima, 2001). A rota oral de imunização é eficiente na vacinação de humanos, uma vez que a maioria dos patógenos inicia o processo de infecção pela mucosa oral quando da ingestão de alimentos. De acordo com Magistris (1998), o aspecto prático da imunização oral fundamenta-se no fato de se tratar de um método natural não invasivo. De outra parte, pequenas quantidades de proteínas, oralmente administradas, escapam das enzimas digestivas no intestino e são absorvidas como antígenos intactos (Strobel e Mowat, 1998). Por essa razão, estudos para aumentar a absorção de antígenos e evitar sua degradação são considerados de grande importância (Mestecky et al.; 1997).

Conclusões

Os resultados dessa pesquisa permitem emitir as seguintes conclusões sobre o processo de imunização oral de coelhos:

- 1- A imunização oral de coelhos constitui um eficiente método para a produção de anti-soros de qualidade para o SqMV e seu uso em diagnose viral em condições de laboratório;

- 2 - A imunização oral de coelhos trata-se de um método simples, rápido e barato para produção de anti-soro específico para vírus de plantas, quando comparado com os métodos tradicionais que envolvem a injeção de animais com preparações purificadas dos vírus;
- 3 - O aspecto prático da imunização oral fundamenta-se no fato de se tratar de um método natural não invasivo e sem danos físicos e fisiológicos para os animais;
- 4 - O processo de imunização oral para produção de anti-soros específicos para vírus de planta, tem funcionado para vírus estáveis e de elevada concentração nas células das plantas infectadas, como é o caso dos vírus pertencentes à família *Comoviridae*.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. Técnicas sorológicas aplicadas à fitovirologia. In: ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. (Eds.) **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em Fitovirologia**. Fortaleza: SBF, 2001. p.33-62.
- COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; NAGAI, H. Alguns vírus que afetam pepino (*Cucumis sativus* L.) em São Paulo. **Revista Brasileira de Olericultura**, v.12, p.100-101, 1972.
- GUEDES, M. I. F.; ARAGÃO, M. E. F.; SILVA, A. C. M.; OTOCH, M. L.; MELO, D. F.; LIMA, J. A. A.; LIMA, M. G. S. Immune Response Induced In Mice By Oral Immunization With Cowpea Severe Mosaic Virus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.827-835, 2002.
- LIMA, J. A. A.; AMARAL, M. R. G. Purificação e sorologia de “squash mosaic virus” isolado de melancia. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, p.605-611, 1985.
- LIMA, J. A. A.; LIMA, R. C. A.; ÇONÇALVES, M. F. B. Production of policlonal antisera specific to plant viruses by rabbit oral immunization. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.4, p.774-777, 2001.
- LOPES, J. F. I Simpósio Brasileiro Sobre Cucurbitáceas. **Horticultura Brasileira**, v.9, p.98-99, 1991.
- MAGISTRIS, M. T. Mucosal adjuvant effect of genetically modified cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin derivatives. **Research Immunology**, v.149, p.33-35, 1998.
- MESTECKY, J.; MICHALECK, S. M.; MOLDOVEANU, Z.; RUSSEL, M. W. Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune response in humans. **Berhing Institute Metteilunge**, v.98, p.33-43, 1997.
- MOURA, M. C. C. L.; LIMA, J. A. A.; OLIVEIRA, V. B.; GONÇALVES, M. F. B. Identificação sorológica de espécies de vírus que infetam cucurbitáceas em áreas produtoras do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.1, p.90-92, 2001.
- OLIVEIRA, V. B.; LIMA, J. A. A.; VALE, C. C.; PAIVA, W. O. Caracterização biológica e sorológica de isolados de potyvirus obtidos de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.4, p.628-636, 2000.
- RESENDE, J. A. M.; PACHECO, D. A. Estabilidade de isolados fracos premunizantes do vírus do mosaico do mamoeiro-estirpe melancia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 64-68, 1997.
- SÁ, P. B. de; KITAJIMA, E. W. Characterization of an isolate of watermelon mosaic virus 2 (WMV-2) from Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, n.3, p.217-233, 1991.
- STROBEL, S.; MOWAT, A. M. C. L. Immune responses to dietary antigens: Oral tolerance. **Immunology Today**, v.19, p.173-181, 1998.
- VEGA, J.; REZENDE, J. M. A.; YUKI, Y. A. Detecção do vírus do mosaico amarelo da abobrinha de moita no Brasil: caracterização parcial de um isolado encontrado em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.72-79. 1995.
- WALKEY, D. G. **A Applied plant virology**. London: William Heinemann Ltd., 1985. 329 p., ill.