

# IMUNOGENICIDADE DE PROTEÍNAS DO CAPSÍDEO DO *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV)

## Capsid protein immunogenicity of *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV)

José Evando Aguiar Beserra Júnior<sup>1</sup>, Márcia Maria Mendes Marques<sup>2</sup>, Beatriz Meireles Barguil<sup>3</sup>,  
Carlos Alberto Furtado Lopes Junior<sup>4</sup>, Maria Izabel Florindo Guedes<sup>5</sup>

### RESUMO

A análise SDS-PAGE do *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) purificado revelou a migração de três frações protéicas estimadas em 43, 23 e 21 kDa, correspondentes às proteínas do capsídeo: denominadas proteína maior (43 kDa) e menor (23 kDa; intacta e 21 kDa; clivada). As proteínas do capsídeo, na sua forma nativa, foram utilizadas na imunização de camundongos pelas vias oral e nasal, durante 10 dias consecutivos. As frações protéicas de 43 e 23 kDa, em sua forma desnaturada, foram utilizadas para imunização subcutânea. A resposta imunológica da mucosa foi avaliada pela proliferação celular das placas de Peyer de camundongos imunizados pela via oral com o CPSMV purificado. Ficou demonstrado que o CPSMV induz resposta imunológica, evidenciada pela síntese de anticorpos séricos, quando administrado na sua forma nativa pelas vias oral e nasal ou através de suas proteínas do capsídeo desnaturadas, pela via subcutânea. Não foi necessário o uso de adjuvantes, quer por via oral quer por via nasal. As frações protéicas de 43 e 23 kDa mostraram-se responsáveis pela imunogenicidade do vírus, como foi evidenciado pela síntese de anticorpos específicos detectados por ELISA. A análise da proliferação celular da placas de Peyer revelou um aumento ( $r=0,88$ ) do número de leucócitos ao longo de 42 dias após a imunização. Esses resultados reforçam a possibilidade do uso do CPSMV como vetor seguro de antígenos de doenças humanas/animais pouco imunogênicos para produção de vacinas.

**Termos para indexação:** *Comovirus*, imunização nasal, imunização oral, vacina, vetor viral.

### ABSTRACT

SDS-PAGE analysis of purified *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) revealed the migration of three protein fractions of 43, 23 and 21 kDa, corresponding to the capsid protein called large protein (43 kDa) and small protein (23 kDa; intact and 21 kDa; cleaved). The capsid proteins, in their native form, were used to immunize mice through oral and nasal routes for ten consecutive days. The denatured form of the 43 and 23 kDa protein fractions were used for subcutaneous immunization. The mucosal immune response was detected by the cellular proliferation of the Peyer's patches of mice immunized by oral route with CPSMV. It was demonstrated that CPSMV induces immune response, evidenced by the synthesis of specific antibodies, when administered in the native form by the oral and nasal routes or with two denatured capsid proteins by the subcutaneous route. The use of adjuvants in the oral and nasal immunizations was not necessary. The 43 and 23 kDa protein fractions were responsible for the immunogenicity of the virus, evidenced by the synthesis of specific antibodies detected by ELISA test. The cellular proliferation analysis of the Peyer's patches revealed an increase ( $r=0.88$ ) of leucocytes along 42 days after immunization. The results reinforce the possibility of the use of CPSMV as a safe vector of antigens for human/animal diseases of low immunogenicity for the production of vaccines.

**Index terms:** *Comovirus*, nasal immunization, oral immunization, vaccine, viral vector.

(Recebido em 24 de julho de 2007 e aprovado em 8 de julho de 2008)

### INTRODUÇÃO

Vírus que infectam plantas não são patogênicos a vertebrados. Mas a indução da resposta imunológica, com conseqüente produção de anticorpos, por tais vírus, vem atraindo particular atenção pela crescente possibilidade

de usá-los como sistema de expressão de antígenos (PORTA & LOMONOSSOFF, 1998; STREATFIELD & HOWARD, 2003).

*Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), família *Comoviridae*, gênero *Comovirus*, é um vírus que infecta plantas, com genoma de ssRNA positivo, capaz de infectar

<sup>1</sup>Biólogo, Doutor em Fitopatologia – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal do Ceará/UFC – Campus do Pici – 60455-760 – Fortaleza, CE – evandojr@yahoo.com

<sup>2</sup>Engenheira Agrônoma, Doutoranda em Biotecnologia – Departamento de Nutrição – Universidade Estadual do Ceará/UECE – Campus do Itaperi – 60740-000 – Fortaleza, CE – marciammm2003@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Bióloga, Doutora em Fitopatologia – Departamento de Biologia – Universidade Federal do Ceará/UFC – Campus do Pici – 60455-760 – Fortaleza, CE – biabar@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Graduando em Ciências Biológicas – Departamento de Nutrição – Universidade Estadual do Ceará/UECE – Campus do Itaperi – 60740-000 – Fortaleza, CE – cjlopes@bol.com.br

<sup>5</sup>Engenheira Agrônoma, Doutora, Professora – Departamento de Nutrição – Universidade Estadual do Ceará/UECE – Campus do Itaperi – 60740-000 – Fortaleza, CE – florinfo@terra.com.br

naturalmente plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) através da transmissão por coleópteros, especialmente espécies da família *Chrysomelidae* (KIMATI et al., 1997).

O CPSMV é um vírus de morfologia isométrica, com diâmetro entre 28 e 30 nm. O capsídeo é formado por 60 cópias de uma proteína maior (43 kDa) e 60 cópias de uma proteína menor (23 kDa) (CHEN & BRUENING, 1992). Seu genoma é dividido em dois segmentos de RNA de fita simples (RNA-1 e RNA-2), os quais são separadamente encapsidados e possuem aproximadamente 6.0 e 3.5 kb, respectivamente. O RNA-1 codifica proteínas envolvidas na replicação do RNA viral, enquanto o RNA-2 codifica as proteínas do capsídeo e a proteína necessária para o movimento, célula a célula e a longa distância do vírus (GOLDBACH et al., 1980). Ambos os RNAs são necessários para que ocorra a infecção sistêmica na planta hospedeira.

Vírus que infectam plantas dotados de alta capacidade imunogênica podem ser usados como potenciais carreadores ou vetores de proteínas de menor poder imunogênico em sistemas conhecidos como apresentação de antígeno, nos processos de imunização (BRENNAN et al., 1999; GILLELAND JUNIOR et al., 2000; SOUZA et al., 2005; WAGNER et al., 2004). Dentre as vantagens do uso dos vírus vegetais para tal propósito pode-se destacar: os vetores podem ser multiplicados em casas de vegetação; rápida propagação do vírus na planta hospedeira (1-2 semanas); altos rendimentos das partículas virais (1-2 g/kg de tecido foliar); muitos vírus vegetais são termoestáveis (PORTA & LOMONOSSOFF, 1998) e, por não serem infecciosos para humanos e animais, constitui-se numa alternativa segura para processos de vacinação.

Alguns vírus que infectam vegetais, entre eles o CPSMV, quando administrados por vias mucosas têm a capacidade de induzir uma resposta imunológica evidenciada pela síntese de anticorpos séricos específicos (FLORINDO et al., 2002; KOPROWSKI & YUSIBOV, 2001; LIMA & NELSON, 2001), pois os compartimentos do sistema imune das mucosas são conectados entre si e com o restante do sistema imune (ABBAS et al., 1998).

Objetivou-se, no presente trabalho, estudar a resposta imune humoral de camundongos Swiss imunizados pelas vias oral e nasal com uma solução purificada do CPSMV e pela via subcutânea com duas proteínas constitutivas do capsídeo viral, e analisar a proliferação celular das placas de Peyer dos camundongos imunizados pela via oral com vírus purificado.

## MATERIALE MÉTODOS

### Material vegetal e procedimento de purificação

Plantas de feijão-caupi sadias foram inoculadas com extrato vegetal tamponado infectado com CPSMV e mantidas em casa de vegetação. O vírus foi purificado 10 dias após a inoculação a partir de folhas infectadas, pelo método de precipitação com polietilenoglicol (PEG 6000), após a clarificação do extrato foliar com n-butanol de acordo com Florindo et al. (2002). Para confirmação da pureza da solução viral purificada, amostras foram analisadas em gel de poli-acrilamida (PAGE), contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) de acordo com o método descrito por Laemmli (1979). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

### Procedimentos de imunização

Grupos de 10 camundongos Swiss fêmeas, com dois meses de idade, foram imunizados por três vias: *oral com proteínas do capsídeo nativas do CPSMV* - imunização via gavagem, durante 10 dias consecutivos, de 200 µl de uma solução de vírus purificado contendo 10 mg de proteínas do capsídeo viral; *nasal com proteínas do capsídeo nativas do CPSMV* - com o auxílio de uma seringa de Hamilton, os animais foram imunizados com doses de 2,5 µl de uma solução de vírus purificado, durante 10 dias consecutivos, contendo 2,5 mg de proteínas do capsídeo viral; *subcutânea com as proteínas de 43 e 23 kDa do capsídeo do CPSMV desnaturadas* - após SDS-PAGE, bandas correspondentes às subunidades protéicas de 43 e 23 kDa do capsídeo viral foram cortadas de géis de poli-acrilamida, maceradas separadamente em microtubos com auxílio de N<sub>2</sub> líquido, e posterior adição de NaCl 0,15M. Em seguida, dois grupos foram imunizados pela via subcutânea na região dorsal. O primeiro grupo recebeu uma dose de 200 µl, contendo 10 mg da subunidade protéica de 43 kDa. O segundo grupo recebeu uma dose equivalente da subunidade protéica de 23 kDa. Ambos os grupos foram co-inoculados com o adjuvante Marcol 52. Como controle, um terceiro grupo foi inoculado com o macerado de gel de poli-acrilamida suspenso em NaCl 0,15M, juntamente com Marcol 52. Doses de reforço foram dadas aos 21 e 35 dias após o início da imunização (DAI), com a exceção dos animais imunizados para o estudo da resposta mucosa.

### Obtenção dos anti-soros

Os anti-soros foram obtidos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias a contar do início da imunização por punção do plexo retro-orbital dos camundongos anestesiados. Os anti-soros foram armazenados a -20 °C até o momento do uso.

### ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

A resposta imune induzida pelo CPSMV íntegro e pelas subunidades protéicas 43 e 23 kDa do capsídeo foi quantificada pela determinação do teor de anticorpos específicos (ALMEIDA, 1995). Vírus purificado e extrato total de folhas infectadas pelo vírus foram usados como antígeno. Extrato de folhas não-infectadas foi usado como controle negativo. As reações foram medidas por absorbância com comprimento de onda de 492 nm em um micro ELISA Labsystems Multiskan MS.

### Extração e contagem das placas de Peyer

Os camundongos foram divididos em dois grupos: imunizados por via oral com vírus purificado (CPSMV) ou inoculados com água destilada. Nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42, após o término da alimentação, os camundongos foram sacrificados e três placas de Peyer foram cuidadosamente removidas e maceradas em 1 mL de NaCl 0,15M, com 5% de soro bovino fetal. Esse homogenato foi centrifugado a 2.500g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 3 mL de NaCl 0,15M e novamente centrifugado. Foram retirados 50 µL do homogenato das placas de Peyer para coloração com 450 µL do corante de Turk. Uma alíquota de 50 µL foi analisada em câmara de Neubauer, para contagem do número de células. O valor de cada contagem foi multiplicado por um fator de  $10^5$  para obtenção do valor total de leucócitos por mL, que foi utilizado para o cálculo da reta de regressão. O coeficiente de correlação e os erros padrões das médias dos leucócitos também foram calculados.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil eletroforético em SDS-PAGE das proteínas do capsídeo do CPSMV revelou a migração de três frações com massas moleculares estimadas em 43 (proteína maior do capsídeo), 23 (forma intacta da proteína menor do capsídeo) e 21 kDa (forma clivada da proteína menor do capsídeo) (Fig. 1). Embora os comovírus possuam apenas duas proteínas do capsídeo, a presença de uma terceira subunidade de baixo peso molecular em preparações virais purificadas é comum em membros desse gênero (BRIOSO et al., 1994).

O CPSMV induziu resposta imunológica, evidenciada pela síntese de anticorpos séricos específicos, quando administrado através de sua forma intacta pelas vias oral e nasal (Fig. 2). Não foi necessário o uso de adjuvantes nos esquemas de imunização, quer pela via oral ou nasal. Yusibov et al. (1997) demonstraram que camundongos imunizados pela via intraperitoneal com *Alfalfa mosaic virus* recombinante contendo determinantes antigênicos para o vírus da raiva e

HIV, manifestaram efetiva resposta imune sem auxílio de adjuvantes. Imunização de camundongos com o peptídeo expresso no contexto da partícula do vírus vegetal parece ser mais imunogênico que a administração de uma quantidade equivalente do mesmo peptídeo, com o auxílio de adjuvantes (YUSIBOV et al., 2002).

Embora os animais imunizados pela via nasal tenham recebido doses quatro vezes menores que aqueles imunizados pela via oral, ambas as vias demonstraram eficácia na indução de síntese de anticorpos específicos contra o capsídeo viral, o que está de acordo com os resultados obtidos por Durrani et al. (1998) que estudaram a resposta imune de camundongos imunizados pelas vias oral e nasal com o CPMV expressando o peptídeo gp41 do HIV-1. As vias oral e nasal vêm sendo utilizadas para uma imunização eficiente em diversos sistemas utilizando vetores virais expressando peptídeos antigênicos. Karasev et al. (2005) alimentaram camundongos com folhas de espinafre infectadas com *Tobacco mosaic virus* (TMV) expressando a proteína Tat do HIV-1, em seu capsídeo. O procedimento de imunização induziu altos níveis de anticorpos contra a proteína Tat. Utilizando a mesma estratégia Yusibov et al. (2002) imunizaram camundongos através da via oral com os vírus vegetais *Alfalfa mosaic virus* (AIMV) e TMV expressando um determinante antigênico (proteína G) do vírus da raiva. Os autores foram além. Humanos que haviam sido imunizados contra o vírus da raiva por vacinação convencional responderam especificamente contra o peptídeo antigênico após ingestão de folhas de espinafre infectadas com vírus recombinante. Da mesma forma, humanos não-imunizados previamente contra o vírus da raiva apresentaram significativa titulação de anticorpos específicos após serem imunizados com o vetor viral, expressando o peptídeo antigênico. Nemchinov et al. (2000) conseguiram induzir a síntese de anticorpos contra diferentes variantes do vírus da hepatite C por meio da imunização nasal de camundongos com TMV, expressando o epítipo da sequência de uma região hipervariável (HVR 1). Interessantemente, o antígeno usado na imunização foi o extrato de folhas infectadas com o vetor recombinante, comprovando que mesmo pequenas quantidades do antígeno administrado por essa via é suficiente para induzir resposta imune.

A resposta imune de animais imunizados pela via subcutânea com a subunidade 43 ou 23 kDa do capsídeo do CPSMV, tendo Marcol 52 como adjuvante, revelou a especificidade dos anticorpos policlonais (Fig. 2). As frações protéicas de 43 e 23 kDa mostraram-se responsáveis pela imunogenicidade do vírus, como foi evidenciado através da síntese de anticorpos específicos detectados por ELISA até os 42 DAI (Fig. 2). Não foi detectada síntese de anticorpos específicos contra as proteínas da planta quando folhas de caupi não-infectadas foram usadas (dado não-mostrado).

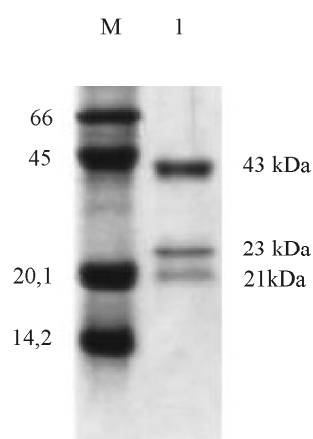


Figura 1 – Perfil eletroforético das subunidades protéicas purificadas do capsídeo do CPSMV em SDS-PAGE a 12%. Colunas: M - padrão de massa molecular (kDa), 1- Proteínas do capsídeo do CPSMV (30 µg).

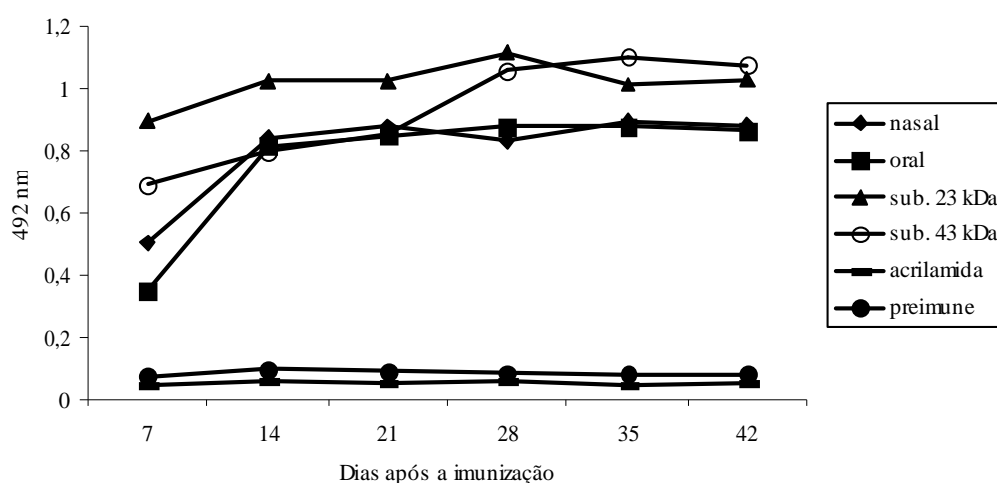


Figura 2 – Teste de ELISA revelando a cinética de acúmulo de imunoglobulinas totais específicas para o CPSMV em antisoro de camundongos imunizados com: (◆) 2,5 µg de partículas do CPSMV pela via nasal, (■) 10 µg de partículas do CPSMV pela via oral, (▲) 10 µg da proteína 23 kDa do capsídeo ou (○) 10 µg da proteína 43 kDa do capsídeo pela via subcutânea com Marcol 52. Como controle foram usados antisoros de camundongos não-imunizados (preimune) (●) e de animais inoculados pela via subcutânea com o macerado de gel de poliacrilamida (—). Extrato total de folhas infectadas foi usado como antígeno. As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

A resposta imune de camundongos Swiss imunizados por via oral com CPSMV purificado foi analisada indiretamente através da quantificação das células das placas de Peyer que, segundo Xu-Amano et al. (1992) são os maiores sítios de síntese de IgA em mamíferos. O número de células nas placas de Peyer aumentou em função do tempo após a imunização (Fig. 3, 4). Essas células provavelmente são linfócitos B

específicos para síntese de IgA, os quais se diferenciam em células plasmáticas produtoras de IgA (KIYONO et al., 1984). Essa resposta detectada ao nível das placas de Peyer mostra, pela primeira vez, um comprometimento do sistema mucoso induzido em camundongos pela ingestão de um vírus vegetal. Restaria ainda, determinar na superfície intestinal, a presença de IgA específica.

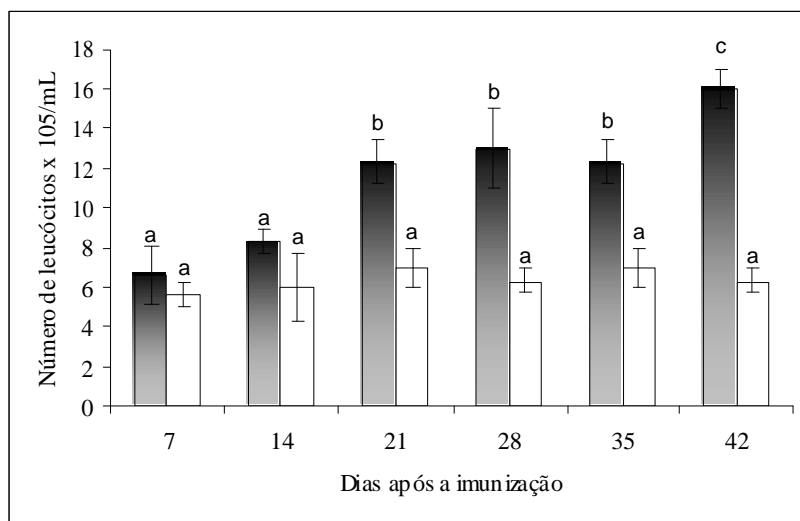


Figura 3 – Contagem de leucócitos das placas de Peyer obtidas de camundongos imunizados com o CPSMV purificado (■) e não imunizados (□). Tratamentos com a mesma letra não diferem pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Barras representam os desvios padrões.

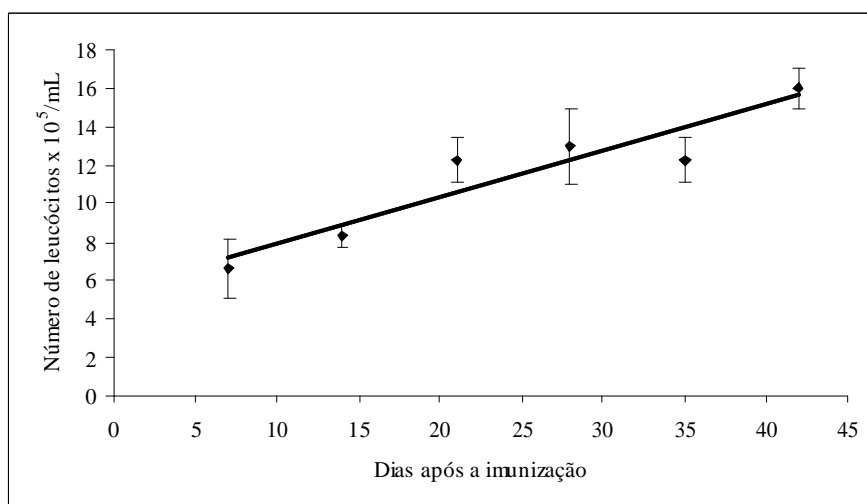


Figura 4 – Reta de regressão obtida a partir de contagens de leucócitos das placas de Peyer de camundongos imunizados com o CPSMV purificado.

Esses resultados demonstram o potencial do uso do CPSMV como vetor seguro de anígenos de doenças humanas/animais pouco imunogênicos para a produção de vacinas. Um reforço a essa afirmação é o trabalho de Souza et al. (2005), os quais acoplaram covalentemente partículas do CPSMV à molécula p28 do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV). Esse conjugado foi eficiente em induzir uma resposta imune contra a proteína p28.

## CONCLUSÕES

O CPSMV induz resposta imunológica quando administrado como vírus purificado pelas vias oral e nasal, ou através de duas de suas proteínas do capsídeo desnaturadas, pela via subcutânea.

Nas imunizações pelas vias oral e nasal não se faz necessário o uso de adjuvantes.

As proteínas do capsídeo 43 e 23 kDa são responsáveis pela imunogenicidade da partícula viral do CPSMV.

Ocorre aumento do número de leucócitos das placas de Peyer de camundongos imunizados pela via oral com partículas purificadas do CPSMV, ao longo de 42 dias após a imunização.

#### AGRADECIMENTOS

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

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1998.
- ALMEIDA, A. M. R. **Noções de sorologia aplicadas a fitovirologia**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1995. 105 p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRENNAN, F. R.; JONES, T. D.; LONGSTAFF, M.; CHAPMAN, S.; BELLABY, T.; SMITH, H.; XU, F.; HAMILTON, W. D. O.; FLOCK, J. L. Immunogenicity of peptides derived from a fibronectin-binding protein of *S. aureus* expressed on two different plant viruses. **Vaccine**, v. 17, p. 1846-1857, 1999.
- BRIOSO, P. S. T.; SAYÃO, F. A. D.; LOURO, R. P.; KITAJIMA, E. W.; OLIVEIRA, D. E. Vírus do mosaico severo do caupi–infecção natural em mungo verde, *Vigna radiata*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 420-429, 1994.
- CHEN, X.; BRUENING, G. Nucleotide sequence and genetic map of cowpea severe mosaic virus RNA2 and comparisons with RNA2 of other comoviruses. **Virology**, v. 187, p. 682-692, 1992.
- DURRANI, Z.; MCLNERNEY, T. L.; MCLAIN, L.; JONES, T.; BELLARBY, T.; BRENNAN, F. R.; DIMMOCK, N. J. Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide from HIV-1 gp41 stimulates better mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. **Journal of Immunology Methods**, v. 220, p. 93-103, 1998.
- FLORINDO, M. I.; ARAGÃO, M. E. F.; SILVA, A. C. M.; OTOCH, M. L.; MELO, D. F.; LIMA, J. A.; LIMA, M. G. 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.
- GILLELAND JUNIOR, H. E.; GILLELAND, L. B.; STACZEK, J.; HARTY, R. N.; GARCÍA-SASTRE, A.; PALESE, P.; BRENNAN, F. R.; HAMILTON, W. D. O.; BENDAHMANE, M.; BEACHY, R. N. Chimeric animal and plant viruses expressing epitopes of outer membrane protein F as a combined vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 27, p. 291-297, 2000.
- GOLDBACH, R.; REZELMAN, R.; KAMMEM, A. van. Independent replication and expression of B-component RNA of cowpea mosaic virus. **Nature**, London, v. 294, p. 773-776, 1980.
- KARASEV, A. V.; FOULKE, S.; WELLENS, C.; RICH, A.; SHON, K. J.; ZWIERZYNSKI, I.; HONE, D.; HILARY, K.; REITZ, M. Plant based vaccine candidate: tat protein produced in spinach. **Vaccine**, v. 23, p. 1875-1880, 2005.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. Campinas: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 233-234.
- KIYONO, H.; COOPER, M. D.; KEARNEY, J. F.; MOSTELLER, L. M.; MICHALEK, S. M.; KOOPMAN, W. J.; MCGHEE, J. R. Isotype-specificity of helper T-cell clones: peyer's patch Th cells preferentially collaborate with mature IgA ab cells for IgA responses. **Journal Experimental Medicine**, v. 159, p. 798-805, 1984.
- KOPROWSKI, H.; YUSIBOV, V. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. **Vaccine**, v. 19, p. 2735-2741, 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680, 1979.
- LIMA, J. A. A.; NELSON, M. R. Production of pliclonal antisera specific to plant viruses by rabbit oral immunization. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 774-777, 2001.

- NEMCHINOV, L. G.; LIANG, T. J.; RIFAAT, M. M.; MAZYAD, H. M.; HADIDI, A.; KEITH J. M. Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against hepatitis C virus. **Archives of Virology**, v. 145, p. 2557-2573, 2000.
- PORTA, C.; LOMONOSSOFF, G. P. Scope for using plant viruses to present epitopes from animal pathogens. **Review of Medical Virology**, v. 8, p. 25-41, 1998.
- SOUZA, F. J. S.; OLIVEIRA, M. R.; ALMEIDA, N. C.; MARTINS, M. G.; ARAGÃO, M. E. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; GUEDES, M. I. F. Vírus do mosaico severo do caupi-CPSMV como molécula carreadora para a p28 do vírus da artrite-encefalite caprina-CAEV. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1363-1367, 2005.
- STREATFIELD, S. J.; HOWARD, J. A. Plant-based vaccines. **International Journal of Parasitology**, v. 33, p. 479-493, 2003.
- WAGNER, B.; FUCHS, H.; ADHAMI, F.; MA, Y.; SCHEINER, O.; BREITENEDER, H. Plant virus expression system for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*. **Methods**, v. 32, p. 227-234, 2004.
- YUSIBOV, V.; HOOPER, D. C.; SPITSIN, S. V.; FLEYSH, N.; KEAN, R. B.; MIKHEEVA, T.; DEKA, D.; KARASEV, A.; COX, S.; RANDALL, J.; KOPROWSKI, H. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. **Vaccine**, v. 20, p. 3155-3164, 2002.
- YUSIBOV, V.; MODESLKA, A.; STEPLEWSKI, K.; AGADJANYAN, M.; WEINER, D.; HOOPER, D. C. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against virus and HIV-1. **Immunology**, v. 94, p. 5784-5788, 1997.
- XU-AMANO, J.; AICHER, W. K.; TAGUCHI, T.; KIYONO, H.; MCGHEE, J. R. Selective induction of Th2 cells in murine Peyer's patches by oral immunization. **International Immunology**, v. 4, n. 4, p. 433-445, 1992.