

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Adriano Santos Cloves

**ESTUDO DA AÇÃO PROBIÓTICA DAS LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae*
UFMG A-905 E *Saccharomyces boulardii* NO TRATAMENTO DA INFECÇÃO
INDUZIDA PELO *Rotavirus* EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO**

Belo Horizonte

2015

Adriano Santos Cloves

**ESTUDO DA AÇÃO PROBIÓTICA DAS LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae*
UFMG A-905 E *Saccharomyces boulardii* NO TRATAMENTO DA INFECÇÃO
INDUZIDA PELO *Rotavirus* EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia como requisito final para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Edel Figueiredo
Barbosa Stancioli

Co-orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos
Martins

Belo Horizonte

2015

043

Cloves, Adriano Santos.

Estudo da ação probiótica das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 e *Saccharomyces boulardii* no tratamento da infecção induzida pelo rotavírus em modelo experimental murino [manuscrito] / Adriano Santos Cloves. – 2015.

119 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli. Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli; Co-orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Rotavírus. 3. Diarreia. 4. Probióticos. 5. *Saccharomyces boulardii*. 6. *Saccharomyces cerevisiae*. 7. Osteopontina. I. Nicoli, Jacques Robert. II. Stancioli, Edel Figueiredo Barbosa. III. Martins, Flaviano dos Santos. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE ADRIANO SANTOS CLOVES

Nº REGISTRO: 2011709150

Relatora e Suplente: Profa. Sílvia Beleza de Moura

Suplente externo: Dra. Andréa Marçal da Silva

Às 13:30 horas do dia 21 de dezembro de 2015, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelo Dr. José Carlos de Magalhães (UFSJ/Campus Ouro Branco), pela Dra. Jaqueline Gontijo de Souza (UNIPAC/Bom Despacho), pelo Prof. Flávio Guimarães da Fonseca (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), pela Profa. Elizabeth Neumann (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) e o Prof. Jacques Robert Nicoli - Orientador, para julgar o trabalho final "Estudo da ação probiótica das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 e *Saccharomyces boulardii* no tratamento da infecção induzida pelo Rotavirus em modelo experimental murino", do aluno Adriano Santos Cloves, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Paulo César Peregrino Ferreira - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 21 de dezembro de 2015.

Dr. José Carlos de Magalhães

Dra. Jaqueline Gontijo de Souza

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca

Profa. Elizabeth Neumann

Prof. Paulo César Peregrino Ferreira
Coordenador

**À minha esposa e aos meus filhos, pelo
companheirismo, apoio e compreensão
acerca das falhas e ausências.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me sustentou durante todos estes anos.

Ao meu orientador, Prof. Jacques Robert Nicoli, pelo apoio e compreensão e pela orientação pontual e dedicada. Aquele que soube compreender minhas limitações e exaltar meus acertos em cada momento deste trabalho.

À minha co-orientadora, prof^a. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, pela dedicação e paciência durante toda a realização deste trabalho, sempre me mostrando caminhos e possibilidades a seguir, demonstrando cada vez mais confiança em meu desenvolvimento.

Ao meu co-orientador, Prof. Flaviano dos Santos Martins, pelo apoio em pontos importantes do projeto.

À Tania Mara Pinho, grande colega e companheira durante praticamente todo o período de doutorado. Que me fez muitas vezes chegar ao ICB junto com os porteiros. Por seu auxílio e dedicação, pois sem sua ajuda, sempre pontual, o caminho seria muito mais árduo.

Aos meus pais e irmãos, pela confiança e apoio, em especial minha mãe, que mesmo sem entender muito o significado do que eu faço, sabe que o faço com amor e que alcancei um dos meus grandes objetivos de vida.

Às psicólogas Daniela França Campello e Jackeline Figueiredo Barbosa Gomes e aos médicos Cláudia Maciel e Antônio Viegas por me darem o suporte quando estive perto de desistir, e trabalharam com ética e empenho para que eu pudesse prosseguir e chegar até aqui.

Aos professores da Pós-graduação em Microbiologia, em especial aos professores Elizabeth Neumann, Sílvia Beleza de Moura e Flávio Guimarães da Fonseca e Carlos Augusto Rosa.

Aos colegas Bruna Nascimento, Thiago Leão e Sávio Sandes, pela presteza durante experimentos importantes para conclusão de meu trabalho.

À Prof^a. Milene Alvarenga Rachid, pelas análises e colaboração.

Ao Dr. Alexandre da Costa Linhares do Instituto Evandro Chagas, Fiocruz, PA e Dra. Alice Alfieri da Universidade Estadual de Londrina, por prontamente disponibilizarem as amostras de *Rotavirus* SA11.

À Dra. Alzira Batista Cecílio, da Fundação Ezequiel Dias - FUNED, MG, e sua aluna, Bárbara Reis Silvestrini por gentilmente disponibilizar as células MA104.

Aos colegas e companheiros do LEFM e LABIO que em algum momento do doutorado estiveram juntos, apoiando de algum modo, a minha caminhada: Mário Abatemarco, Léo Acúrcio, Carol Araújo, Camila Nair, Luciana, Kelly Grillo, Silvia Pietra, Katarina, Flávio,

Suelen, Anna Carolina, Yasmin, Amanda, Clarice, Felipe Bambilra, Yngrid, Felipe, Maria Cecília, Carine, Tainá, Karine Rodrigues, Maira, Bruno, Samir Elian, Tássia Souza, Fabiana Tiago, Ariane Martins, Elisa Paz, Sílvia, Patrick, Bianca Seridan, Rafael Wesley, Raphael Steinberg, Lílian, Érica Lorena, Jéssica, Késia, Tati, Thais, Luciana Mara, Bárbara Abranches, Rafaela Avelar e tantos outros que por aqui passaram. Ao colega Sávio do LGMPP do Departamento de Biologia Geral/Genética e Felipe Sant'Anna da Escola de Veterinária. E também a todos aqueles que me acompanharam no cafezinho de cada dia. Espero não ter me esquecido de ninguém.

Aos colegas que me ajudaram no pontapé inicial deste trabalho, mas que seguiram seus caminhos longe do ICB: Camila Pacheco, Rodrigo Gonçalves e Jaqueline Gontijo.

Aos colegas que me acolheram no LVBA e que em algum momento estiveram prontos a ajudar: Tânia Mara, Thiago, Alice, Elton, Ana Paula, Silvinha Gianatasio, Luís Adam, Matheus, Gabriela, Anderson e Iracema.

Aos coordenadores da Pós-graduação em Microbiologia no período do Doutorado, prof. Claudio Antônio Bonjardim, Prof. Paulo César Peregrino e Prof^a. Daniele da Glória de Souza.

À prof^a. Daniele da Glória de Souza e seu Pós-Doc. Lucas Secchin por cederem parte dos iniciadores na reta final do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Pós-graduação em Microbiologia, em especial, àqueles que também passaram por aqui e que prestaram importantes auxílios quando aqui ingressei: Douglas e Gina.

Ao Instituto Pingo de Luz, à sua diretora Shirley Ramalho e a todos os professores e funcionários, por acolherem minhas crianças e me darem o auxílio em todos os momentos com amor e carinho.

Ao CNPq, Capes e Fapemig pelo apoio financeiro.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Aos meus anjos queridos!

Suas vidas modificaram minha razão de viver e me incentivaram a prosseguir neste caminho.

Meu amor por vocês é incondicional, e me fortalece a cada dia.

Seus olhares me cativam e me acalmaram nos momentos em que pensei em desistir...

E me colocaram de pé diante das dificuldades.

Quando o mundo parecia me dar às costas, seus sorrisos vinham me receber...

E pulavam em meus ombros, me fazendo recuperar a alegria de viver...

Este trabalho é dedicado a eles:

Meus queridos e amados filhos...

Anna Luísa e Arthur

e...

À minha amada esposa Aline...

Quem com dedicação e esperança em dias melhores, me fez vislumbrar aos olhos o universo da Microbiologia. Do sonho à realização, sempre se dedicou a mim com carinho e companheirismo, caminhando junta e me reerguendo nos momentos mais difíceis... e vivendo com muito amor os de grande alegria. A você, dedico grande parte deste trabalho.

*“A natureza faz poucos homens fortes.
Treinamento, esforço e disciplina fazem
muitos”.*

(Nicolau Machiavel)

RESUMO

O *Rotavirus* é um vírus de triplo capsídeo proteico e genoma de RNA segmentado de dupla fita. Representa um grande problema de saúde pública mundial, levando anualmente a óbito, mais de 500 mil crianças menores de cinco anos. O *Rotavirus* é responsável por alteração nos níveis de cálcio intracelular e sua multiplicação provoca extensa lesão do epitélio intestinal, levando a uma profusa diarreia aquosa e vômitos, que resultam em distúrbio hidroeletrólítico e grave desidratação. Uma diversidade de estudos tem investigado os benefícios e a relação entre a ingestão de probióticos e a redução dos episódios e da gravidade da diarreia pelo *Rotavirus*. Os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, oferecem benefícios ao hospedeiro. Com o objetivo de se avaliar a ação probiótica das leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A905 na infecção pelo *Rotavirus*, realizou-se experimentos em modelo murino, buscando verificar aspectos como alterações histológicas, produção de citocinas e quimiocinas e indução de sIgA. O tratamento com as leveduras foi capaz de prevenir a perda de peso nos animais. Ambas, estimularam o aumento da citocina Osteopontina (OPN), isto significa que possivelmente exista relação entre a produção de OPN e a melhora da infecção, que é conferida por estes probióticos na prática clínica. As análises demonstraram ainda que as leveduras, em especial a *S.c* UFMG A905, induziram a um aumento do recrutamento de mononucleares, provavelmente monócitos/macrófagos, para o sítio de infecção, que parece ter sido secundário à produção de OPN. A levedura *S.c*.UFMG A905, também foi hábil para induzir a produção de sIgA e, a levedura *S. boulardii*, teve esta produção reduzida, além de apresentar eficácia diminuída, na redução da infecção no modelo estudado. Contudo, quando a *S. boulardii* foi inoculada em associação com o *Rotavirus*, observou-se que a levedura apresentou performance de produção de sIgA muito superior aos outros grupos, e aumentou a eliminação de *Rotavirus* nas fezes, sugerindo uma interação física desta com o vírus. Em conjunto, estes resultados sugerem que o tratamento com as leveduras, sobretudo *Sc*. UFMG A905, poderia ter um efeito benéfico contra o *Rotavirus*, via aumento da expressão da OPN e de sIgA, pela prevenção da perda de peso e pelo aumento do *clearance* das partículas virais. As análises apontam ainda possível papel da *S. cerevisiae* UFMG A905 como probiótico na redução da diarreia causada pelo *Rotavirus*.

Palavras-chave: *Rotavirus*, Diarreia, Probióticos, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A905, Osteopontina, sIgA.

ABSTRACT

Rotavirus is a triple layered capsid virus and double-stranded segmented genome RNA. It represents a major public health problem worldwide, leading over 500000 children under five years to death every year. *Rotavirus* accounts for changes in intracellular calcium levels and its multiplication causes extensive damage of the intestinal epithelium, causing a profuse watery diarrhea and, which results in electrolyte disturbance and severe dehydration. A variety of studies has investigated the benefits and the relation between the intake of probiotics and reduction of episodes and severity of *Rotavirus* diarrhea. Probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts, provide benefits to the host. In order to evaluate the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* action and *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A905 in *Rotavirus* infection, experiments in mice were held seeking to verify aspects such as histological alterations, production of cytokines, chemokines, and sIgA induction. The treatment with the yeast was able to prevent weight loss in animals. Both yeast samples stimulated increase in cytokine Osteopontin (OPN), which means that there is a possible relationship between OPN production and improvement of infection, which is provided by these probiotics in clinical practice. The analysis also showed that yeasts, particularly *S.c.* UFMG A905, induced an increase in the recruitment of mononuclear, probably monocytes/macrophages, to the site of infection, and appears to have been secondary to OPN production. The yeast *S.c.* UFMG A905, was also able to induce the production of sIgA, while the yeast *S. boulardii* had a reduced production, and show decreased efficacy in reducing the infection in this model. However, when the *S. boulardii* was inoculated in association with the rotavirus, it was observed that the yeast had sIgA production performance far superior than the other groups, and increased elimination of rotavirus in the feces, suggesting a physical interaction with *Rotavirus*. Together, these results suggest that treatment with yeast, especially *S.c.* UFMG A905, could have a beneficial effect against *Rotavirus*, via increased expression of OPN and sIgA production for preventing weight loss and increasing clearance of viral particles. The analysis also indicates a possible role of *S. cerevisiae* UFMG A905 as probiotics in reducing *Rotavirus* diarrhea.

Key words: *Rotavirus*, *Diarrhea*, *Probiotics*, *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A905, *Osteopontin*, *sIgA*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Epidemiologia da rotavirose no mundo.....	21
Figura 2 Microscopia eletrônica de transmissão mostrando partículas de rotavírus	23
Figura 3 Desenho esquemático mostrando o genoma e proteínas do <i>Rotavirus</i>	24
Figura 4 Fisiopatologia da diarreia induzida pela proteína NSP4.....	30
Figura 5 Modelo de Infecção pelo rotavírus.....	33
Figura 6 Modelo de patogênese da diarreia induzida pelo <i>Rotavirus</i>	34
Figura 7 Monocamada de células MA104.....	50
Figura 8 PCR convencional com gradiente de temperatura.....	56
Figura 9 Gráfico das temperaturas utilizadas na PCR convencional.....	57
Figura 10 Mapa do vetor plasmidial pGEM [®] - <i>T Easy Vector</i> (Promega).....	58
Figura 11 Caracterização eletroforética das amostras de <i>Rotavirus</i>	72
Figura 12 Produtos de PCR com gradiente de temperatura.....	73
Figura 13 Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio.....	74
Figura 14 Alinhamento efetuado com a sequência de Rotavirus SA11	74
Figura 15 Gel de agarose 1,5% com curva de DNA plasmidial.....	75
Figura 16 Padronização GAPDH e concentração de cloreto.....	76
Figura 17 Células MA104 marcadas com anticorpo anti-VP6.....	77
Figura 18 Desenvolvimento ponderal dos animais submetidos ao tratamento	78
Figura 19 Desenvolvimento ponderal dos animais nos quatro dias de infecção.....	79
Figura 20 Teste rápido de aglutinação direta em látex para pesquisa de <i>Rotavirus</i>	80
Figura 21 Teste de aglutinação em látex para os diversos grupos estudados.....	81
Figura 22 Alterações histopatológicas em animais neonatos infectados pelo <i>Rotavirus</i>	82
Figura 23 Alterações histopatológicas em animais de 21 dias infectados pelo <i>Rotavirus</i> ...	83

Figura 24 Gráficos baseados na histopatologia de intestino em animais de 15 dias.....	85
Figura 25 Avaliação das quimiocinas KC e Eotaxina-1 e das citocinas IL-1 Beta e IL-10.	88
Figura 26 Avaliação dos níveis da quimiocina Osteopontina no intestino.....	89
Figura 27 Avaliação das enzimas N-Acetil-glicosaminidase pulmonar e intestinal.....	91
Figura 28 Avaliação da produção de sIgA em camundongos de 21 dias	92
Figura 29 Avaliação da produção de sIgA em camundongos de 15 dias	93
Figura 30 Amplicons obtidos de amostras fecais.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Iniciadores, orientação e tamanho esperado do <i>amplicon</i> do gene da região codificadora VP7 do <i>Rotavirus</i> do grupo A.....	54
Tabela 2 Iniciadores, orientação e tamanho esperado do <i>amplicon</i> do gene da quimiocina Osteopontina e do gene normalizador 18S.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

DLP – Double layered particle – partícula de duplo capsídeo

ENS – Sistema nervosa entérico

IP – Fosfatidil Inositol

IRF – Elemento de resposta ao Interferon

MHC – Complexo de histocompatibilidade principal

MPO – Enzima Mieloperoxidase eosinofílica

NAG – Enzima N-Acetil-Glicosaminidase

NSP – Non-structural protein, proteína não estrutural do *Rotavirus*

OPN – Osteopontina / Eta-1

PLC - Fosfolipase C

ROTA + SB – Animal infectado com *Rotavirus e tratado com S. boulardii*

RV/ Rota - *Rotavirus*

SA11 – *Rotavirus* símio 11

SA11 + UFMGA905 – Animais infectados com *Rotavirus* e tratados com *S.c.* UFMG A905

Sb – *Saccharomyces boulardii*

SB + ROTA – Suspensão de *S. boulardii* incubado com *Rotavirus*

Sc – *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A905

SGLT1 - Co-transportador sódio-glicose-1

sIgA – Imunoglobulina A secretória

TCR – Receptor de células T

TLP – Triple layered particle – particular de triplo capsídeo

TLR – Toll Like Receptors

VP – Viral Protein, proteína estrutural do *Rotavirus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Diarreias agudas e infecção pelo Rotavirus humano.....	19
1.2. Epidemiologia da diarreia induzida pelos rotavírus	20
1.2.1. Epidemiologia no Brasil.....	22
1.3. Biologia do Rotavirus.....	23
1.3.1. Estrutura gênica do Rotavirus	24
1.3.2. Morfologia e bioquímica do <i>Rotavirus</i>	25
1.3.2.1. Proteínas do capsídeo interno.....	25
1.3.2.2. Proteína do capsídeo intermediário	26
1.3.2.3. Proteínas do capsídeo externo	26
1.3.3. Proteínas não-estruturais (NSP).....	27
1.3.3.1. As proteínas NSP3 e NSP1	27
1.3.3.2. As proteínas NSP2 e NSP5	28
1.3.3.3. A proteína NSP6.....	28
1.3.3.4. A proteína NSP4.....	28
1.4. Classificação dos Rotavirus	30
1.5. Infecção e multiplicação viral	31
1.6. Patologia da infecção pelo Rotavírus	34
1.7. Resposta imune à infecção pelo Rotavirus	36
1.8. A microbiota intestinal	40
1.9. Probióticos	41
1.9.1. O uso de probióticos para o tratamento de diarreia induzida pelo <i>Rotavirus</i>	44
2. JUSTIFICATIVA	46
3.OBJETIVOS	48
3.1. Objetivo geral	48
3.2. Objetivos específicos.....	48

4.METODOLOGIA.....	49
4.1. Células MA104	49
4.2. Vírus Símio da linhagem SA11.....	50
4.2.1. <i>Rotavírus</i> Símio SA11 (Instituto Evandro Chagas, PA).....	50
4.2.2. <i>Rotavírus</i> símio SA11 (Universidade Estadual de Londrina, PR).....	51
4.2.3. Verificação da presença do vírus no sobrenadante clarificado.....	52
4.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	53
4.3.1. Análise <i>in silico</i>	53
4.3.2. Extração do RNA viral utilizando o Trizol.....	54
4.3.3. Extração de RNA viral de amostras fecais - <i>kit</i> QIAmp® Viral RNA Mini Kit.	55
4.3. Transcrição reversa e amplificação por PCR convencional.	56
4.3.1. Transcrição reversa	56
4.3.3. Amplificação por PCR Convencional.....	57
4.3.4. Clonagem em vetor plasmidial.....	57
4.3.5. Transformação bacteriana	58
4.3.6. Extração plasmidial em pequena escala	59
4.3.7. Reação de restrição enzimática - enzima EcoRI.....	59
4.3.8. Sequenciamento	60
4.3.9. Amplificação por qRT-PCR (PCR quantitativa).....	60
4.4. Semi-purificação e do Rotavirus SA11 em colchão de Sacarose.....	62
4.5. Titulação do Rotavirus.....	62
4.5.1. Titulação do Rotavírus por Formação de Foco de Fluorescência (FFU/mL).....	62
4.5.2. Titulação do <i>Rotavirus</i> por TCID/50.....	63
4.5.3. Titulação do <i>Rotavírus</i> por Ensaio de placa (UFP/mL).....	64
4.5. Leveduras.....	65
4.6. Animais.....	65
4.6.1. Desenho Experimental com animais neonatos	67
4.6.2. Desenho Experimental com animais de 21 dias	67

4.6.3. Desenho Experimental com animais de 15 dias	68
4.7. Verificação da doença diarreica e presença e ação do vírus nos animais.	68
4.8. Quantificação dos níveis de citocinas e quimiocinas - intestinal e pulmonar	69
4.9. Quantificação da sIgA em fluido intestinal	70
4.10. Verificação da ação do Rotavirus no intestino delgado por histopatologia.....	71
4.11. Análise estatística	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
5.1. Estudo in vitro.....	72
5.1.1. Verificação da presença do vírus no sobrenadante clarificado.....	72
5.1.2. Verificação da amplificação após a PCR convencional	73
5.1.3. Verificação da Reação de restrição enzimática pela Enzima EcoRI.....	73
5.1.4. Sequenciamento	74
5.1.5. Geração de curva plasmidial e avaliação de amplificação	75
5.1.6. Teste do gene normalizador GAPDH	75
5.1.7. Titulação do <i>Rotavirus</i> por TCID ₅₀ e por formação de foco de fluorescência	76
5.2. Experimentos in vivo.....	77
5.2.1. Avaliação do desenvolvimento ponderal dos animais	77
5.2.2. Verificação da presença do vírus por aglutinação em látex	80
5.2.3. Histopatologia.....	82
5.2.4. Avaliação das citocinas e quimiocinas por ELISA	87
5.2.4. Avaliação das citocinas e quimiocinas por qRT-PCR.....	88
5.2.6. Avaliação da enzima N-Acetil-glicosaminidase pulmonar e intestinal.....	90
5.2.7. Avaliação da sIgA (Imunoglobulina A secretória)	91
5.2.8. Avaliação da presença do RNA viral nas fezes por PCR convencional	94
6. CONCLUSÕES	96
7. ANEXO.....	97
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diarreias agudas e infecção pelo *Rotavirus* humano

A palavra diarreia deriva de um termo de origem na palavra grega *diarróhoia*, pela conjugação do radical **dia**, que significa *direto, ininterrupto*, com o sufixo **róhoia** que significa *escoar, fluir, derramar, escorrer* (PLEVRIS e HAYES, 1996). A diarreia, na maioria das vezes, é resultado do aumento da motilidade intestinal normal, que impede a absorção eficiente dos líquidos (GUERRANT *et al.*, 2001). A definição mais atual para o termo é o quadro clínico caracterizado por três ou mais episódios de evacuações líquidas e tem como base o aumento do número de evacuações diárias e a redução na consistência das fezes (KEUSCH *et al.*, 1992; FOSBERG, 2007).

A diarreia possui etiologia variada, podendo, entretanto, ser de cunho multifatorial. Reações do processo inflamatório, alergias, estresse (por exemplo, síndrome do cólon irritável), transtornos alimentares, distúrbios auto-imunes, uso de medicamentos e antimicrobianos e as diarreias de origem infecciosa destacam-se entre as principais causas. Dentre os agentes da diarreia infecciosa os helmintos, protozoários, bactérias e vírus podem estar envolvidos, mas na maioria das vezes podem ser episódios de natureza idiopática. Quanto ao tempo de duração, as diarreias podem ser classificadas como agudas, com duração até 14 dias ou crônicas quando a incidência dos episódios ultrapassa 14 dias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1988; FAGUNDES-NETO e PENNA, 1991; KEUSCH *et al.*, 1992; FOSBERG, 2007).

Muitos microrganismos podem estar associados aos episódios de diarreia, sendo reconhecidos como agentes etiológicos da diarreia aguda. A mortalidade nestes casos está relacionada ao aumento da secreção intestinal causado, por exemplo, por bactérias produtoras de enterotoxinas (*Escherichia coli* enterotoxigênica-ETEC, *Vibrio cholerae*). Outro fator importante é a redução da absorção intestinal, como ocorre nas infecções por microrganismos que invadem e causam dano ao epitélio intestinal (*Escherichia coli* enteropatogênica-EPEC, *Shigella* sp., *Salmonella* sp.). Dentre os principais microrganismos podemos destacar o grupo diarreio gênico de *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae* e

Campylobacter. Entre os protozoários, são agentes importantes de enterite *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Isospora belli* e *Cryptosporidium parvum* (DELLERT E COHEN, 1994; ARANDA-MICHEL e GIANELLA, 1999; CIMERMAN *et al.*, 1999; KAUR e GANGULY, 2003).

Dentre as diarreias de origem viral, as rotaviroses são responsáveis por um significativo número de distúrbios gastrintestinais agudos em crianças menores de cinco anos de idade. Estima-se que 80% dos casos de diarreias ocorridas em crianças sejam atribuídas ao *Rotavirus*, sendo este, portanto, considerado o principal agente etiológico das gastroenterites em crianças menores de cinco anos de idade, sobretudo em países em desenvolvimento (BAJOLETO e CHIPPAUX-HYPPOLITE, 1998; SAAVEDRA *et al.*, 1994; RAMING, 2004). Outros vírus envolvidos na indução de diarreias incluem os *Norovirus*, *Adenovirus*, *Coronavirus*, *Astrovirus*, *Human Picobirnavirus*, *Calicivirus*, *Bocavirus*, *Enterovirus*, *Aichivirus*, *Human Parechovirus*, *Sapovirus*, *Human Torovirus* (BAJOLETO e CHIPPAUX-HYPPOLITE, 1998; GUERRANT *et al.*, 2001; RAMANI e KANG, 2009).

Em casos de surtos de diarreia, o sinal clínico de gastroenterites, a idade dos pacientes e as circunstâncias epidemiológicas envolvidas auxiliam no diagnóstico e definição do agente etiológico. Em situações de surtos ou epidemias, o diagnóstico biológico tem evidenciado geralmente rotavírus e adenovírus. Epidemias virais relacionadas ao consumo de alimentos, transmissão hídrica e transmissão nosocomial estão especialmente associadas ao *Norwalk* vírus (BAJOLETO e CHIPPAUX-HYPPOLITE, 1998).

1.2. Epidemiologia da diarreia induzida pelos rotavírus

As gastroenterites representam um dos principais e mais expressivos problemas de Saúde Pública em todo o mundo (Figura 1), sobretudo nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Deste modo, a diarreia aguda torna-se responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em recém-nascidos e lactentes, representando uma das principais causas de mortalidade infantil nestes países. Dentre as diarreias infecciosas, aquelas adquiridas em ambientes hospitalares podem ser de difícil erradicação, gerando altos custos com cuidados médicos (GUERRANT *et al.*, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

Os rotavírus, particularmente, são os mais importantes agentes de diarreia grave na infância, em todo o mundo. Estima-se que, a cada ano, ocorram 125 milhões de quadros diarreicos associados a esses vírus, do que resultam, com base em estimativas conservadoras, 418.000 a 520.000 óbitos, 85% dos quais nas regiões menos desenvolvidas do planeta. Tais números refletem 20% da mortalidade global por doença diarreica e 5% do total de óbitos entre crianças com idades inferiores a cinco anos. Em países em desenvolvimento, 82% dos episódios de diarreia requerem apenas cuidados domiciliares sendo que 1,5% exigem cuidados hospitalares. Somando-se o total de episódios de doença gastrointestinal causada pelo *Rotavirus* em países desenvolvidos ou subdesenvolvidos, a estimativa é que a cada ano o *Rotavirus* cause aproximadamente 111 milhões de casos de gastroenterite, que exigem apenas cuidados domiciliares, quando consideradas crianças menores de cinco anos de idade. Entretanto, 25 milhões de casos exigem consultas médicas e em 2 milhões de casos são necessárias hospitalizações (PARASHAR *et al.* 2003; TATE *et al.*, 2012; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

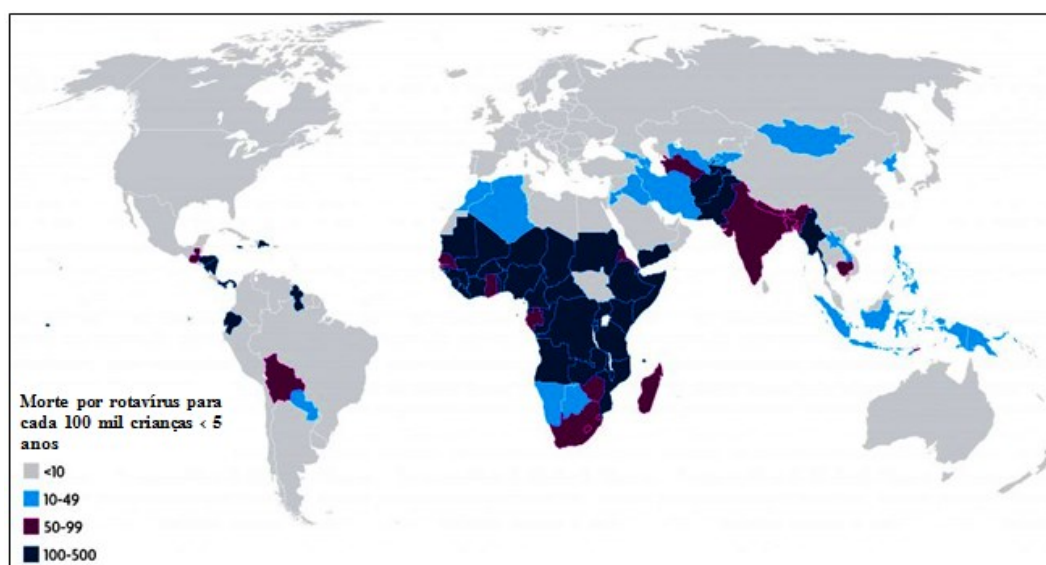


Figura 1 - Epidemiologia da rotavirose no mundo. Observa-se grande incidência de casos em países do continente africano, asiático e na América Central. Adaptado de Tate *et al.*, 2012.

Apesar de uma expressiva redução nos índices de infecção pelo *Rotavirus* em todo o mundo desde 2009, estima-se ainda que 1,7 bilhões de episódios de diarreia tenham ocorrido no ano de 2010. Em países em desenvolvimento com baixa e média renda *per capita*, o *Rotavirus* ainda tem sido o vírus mais frequentemente detectado nas gastroenterites virais. A porcentagem de crianças com sorologia positiva para o vírus pode chegar a 72% (OZDEIS *et al.*, 2010).

Estes dados mostram a necessidade de implementação de novas práticas de prevenção e tratamento da diarreia, sobretudo em países em desenvolvimento e com altos índices de pobreza (WALKER *et al.*, 2012).

1.2.1. Epidemiologia no Brasil

A gravidade dos episódios de diarreia causada pelos rotavírus tem bastante relevância em países em desenvolvimento. Esta susceptibilidade é acentuada, devido a fatores tais como o acesso restrito a serviços de saúde de qualidade, ao limitado acesso à terapia de reidratação oral e ainda a um baixo nível de nutrição, sobretudo a ingestão de zinco (DALGIC *et al.*, 2011; WALKER *et al.*, 2012). A presença de co-morbidades como a desnutrição e co-infecções por outros patógenos entéricos como os *Astrovírus*, *Calicivirus* e diarreias bacterianas também devem ser consideradas (LINHARES, 2000).

De acordo com o sistema de vigilância do monitoramento de doenças diarréicas agudas do Ministério da Saúde (MDDA), cerca de 2.400.000 casos de diarreia de diversas etiologias foram registrados, sendo que a maior parte deles foi notificada na região nordeste do país e a região sul foi que apresentou a menor notificação de casos (MARANHÃO, 2001; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Dadas às dimensões territoriais, e à grande magnitude da rotavirose, a doença é considerada de notificação compulsória apenas em Unidades de Vigilância Sentinela. Entre 2006 e 2012 foram notificados 9.812 casos suspeitos de rotavírus, sendo 2.347 confirmados para rotavírus, representando uma positividade de 23,9% (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A infecção pelo *Rotavirus* apresenta distribuição sazonal. No Brasil, dois períodos distintos podem ser identificados, com diferenças epidemiológicas entre as diferentes regiões. Sendo assim, a maior incidência de gastroenterites nas regiões centro-oeste, Sul e Sudeste pode ser observada nos meses mais secos, ao passo que nas regiões Norte e Nordeste, a ocorrência de gastroenterites de diversas etiologias têm distribuição mais homogênea durante todos os períodos do ano (LINHARES, 2000).

1.3. Biologia do *Rotavirus*

O nome *Rotavirus* deriva do latim *Rota*, que significa roda. Esta denominação foi sugerida devido à sua forma estrutural, semelhante à aparência de uma roda de carroça (FLEWETT *et al.*, 1974) (Figura 2).

O *Rotavirus* é um vírus não-envelopado pertencente à família *Reoviridae*, à subfamília *Sedoreovirinae* e gênero *Rotavirus*. A família *Reoviridae* compartilha importantes características bioquímicas e estruturais, tais como o genoma segmentado, composto por 10 a 12 segmentos de RNA de dupla fita e um triplo capsídeo proteico. Os vírus alocados no gênero *Rotavirus* infectam e se multiplicam no citoplasma de células epiteliais maduras do intestino delgado, sobretudo os enterócitos da região do jejuno e íleo (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

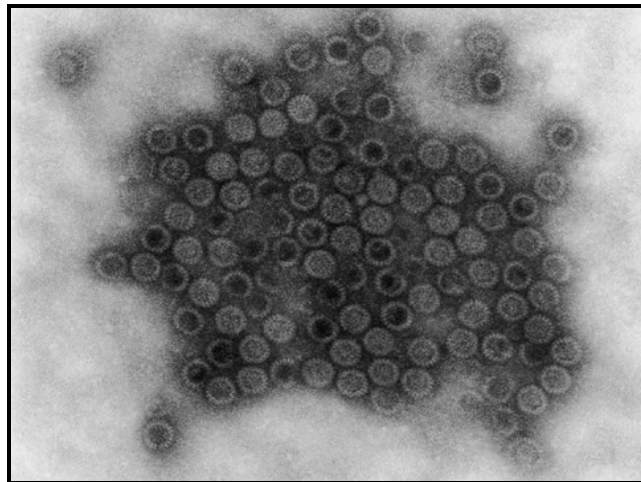


Figura 2 - Microscopia eletrônica de transmissão mostrando partículas de rotavírus humano observadas em um filtrado de fezes de um bebê com gastroenterite. Pode-se observar a semelhança das partículas virais com rodas de carroça. OLIVEIRA E LINHARES, 1999.

Três tipos distintos de partículas de *Rotavirus* podem ser encontrados em espécimes fecais. Morfologicamente, o vírion possui triplo capsídeo proteico. Com a perda das proteínas VP4 e VP7 durante o processo de penetração na célula, a partícula viral exhibe estruturas de duplo capsídeo, compostas pelas proteínas VP1, VP2, VP3, e VP6. Estas partículas exibem ainda projeções de subunidades triméricas vindas do capsídeo mais interno. Partículas com apenas uma camada de capsídeo protéico, também denominadas cerne viral são formadas pelas

proteínas virais VP1, VP2 e VP3. Este tipo morfológico é menos frequente por ser mais instável e perder facilmente seu material genômico (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

1.3.1. Estrutura gênica do Rotavirus

O genoma do *Rotavirus* é constituído por 11 segmentos de RNA de dupla fita (dsRNA). Durante a infecção celular, o segmento de senso positivo é prontamente expresso para a produção de proteínas, e o segmento de senso negativo é direcionado para a transcrição de novo RNA genômico. Com exceção do 11º segmento os dsRNAs são monocistrônicos. Cada segmento codifica para uma proteína estrutural (VPs - *viral proteins*), denominadas VP1, VP2, VP3, VP6, VP7 e VP4. Durante os primeiros eventos da infecção celular, a proteólise da proteína VP4 dá origem às proteínas VP5* e VP8*. As proteínas estruturais fazem parte da estrutura do vírion, e sua identificação se dá após empacotamento completo do vírus. Por outro lado, seis proteínas não-estruturais (NSPs – *non-structural proteins*), NSP1 a NSP6, são encontradas somente em células infectadas, fora do vírion, não fazendo das partículas virais maduras. (ESTES e COHEN, 1989; ESTES, 2001) (Figura 3).

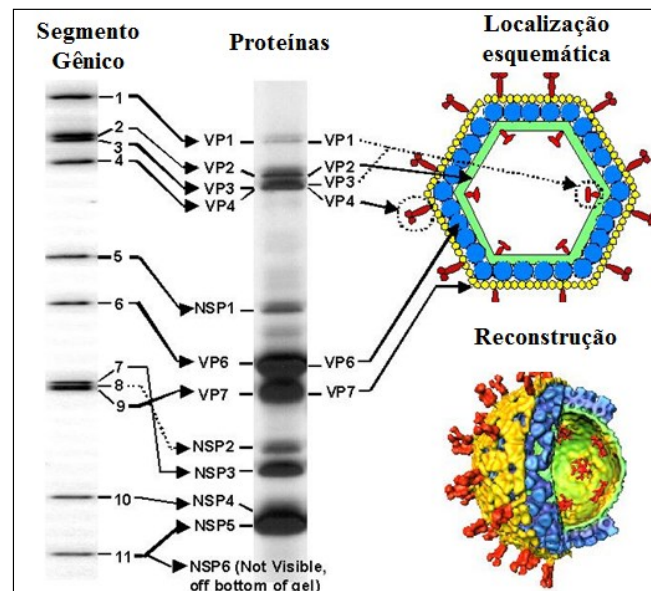


Figura 3: Desenho esquemático mostrando, à esquerda, o genoma segmentado do *Rotavirus*. Ao centro, as proteínas codificadas para cada segmento gênico; e à direita, a localização esquemática de cada proteína no vírion (superior) e uma reconstrução gráfica do vírion (inferior). As setas indicam o segmento genômico que codifica cada proteína. O esquema mostra as localizações das proteínas estruturais no triplo capsídeo Adaptado de Ramig, 2007.

1.3.2. Morfologia e bioquímica do *Rotavirus*

1.3.2.1. Proteínas do capsídeo interno

Morfologicamente e bioquimicamente, os rotavírus são constituídos por uma tripla camada de capsídeos protéicos: (i) uma primeira camada, mais externa, é composta por 780 moléculas da proteína VP7 e 60 dímeros da proteína VP4 projetando a partir da VP7; (ii) uma camada média, contendo 260 trímeros de VP6 e (iii) uma camada mais interna contendo 120 moléculas de VP2. A camada de VP2 envolve as duas menores proteínas, VP1 e VP3 e o genoma viral (ZENG *et al.*, 1998; McDONALD e PATTON, 2011).

A proteína VP1, considerada uma das menores proteínas estruturais, é codificada pelo segmento gênico 1. As proteínas VP2 e VP3, juntamente com VP1, são responsáveis pela formação do cerne viral (ESTES E COHEN, 1989). Além da função estrutural, recentes trabalhos têm demonstrado que a proteína VP1 desempenha a função de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) funcionando concomitantemente como transcriptase e replicase. São cinco as evidências que indicam a participação da proteína VP1 no desempenho destas funções: (i) VP1 contém motivos compartilhados por RdRp de outros vírus de RNA; (ii) VP1 tem atividade de ligação a NTP e faz ligações cruzadas com o análogo de nucleotídeo 8-azido-ATP, inibindo a transcrição; (iii) a VP1 tem reconhecimento específico à terminação 3' do mRNA viral e (iv) a VP1 recombinante pode direcionar a síntese de fita negativa dependente do molde na presença de VP2 (ARNOLDI *et al.*, 2007).

A proteína VP2 (segmento 2) é a terceira proteína mais abundante. A camada mais interna do rotavírus é composta unicamente pela VP2. O RNA genômico e as proteínas VP1 e VP3 são encapsidados nesta camada. A proteína VP2 é altamente imunogênica, portanto, a presença de anticorpos séricos contra esta proteína é utilizada como um bom marcador de primo-infecção. (ESTES E COHEN, 1989). A proteína VP2 interage com os trímeros de VP6 adjacentes e são perfurados por 132 canais aquosos, responsáveis pelo transporte de metabólitos e do RNA produzido durante a transcrição (ZENG *et al.*, 1998).

A proteína VP3 (segmento 3) funciona como uma enzima multifuncional envolvida no capeamento (*capping*) do mRNA nos transcritos de senso positivo. Esta proteína liga-se especificamente na GTP e inicia as atividades de guanililtransferase e metiltransferase, tendo atividade apenas em RNAs de fita simples. Juntamente com a proteína VP1 (polimerase), a VP3 forma um complexo enzimático que fica situado nas adjacências dos canais do cerne viral. A proteína VP1 cataliza a transcrição de RNAs genômicos de fita positiva que, posteriormente, sofrem capeamento pela VP3 e são transportados através dos poros localizados no duplo capsídeo (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008).

1.3.2.2. Proteína do capsídeo intermediário

A proteína VP6, codificada pelo segmento gênico 6, é a principal proteína estrutural localizada na superfície intermediária do rotavírus. Apesar de não estar diretamente envolvida na transcrição, VP6 é requerida para atividade da polimerase e para adequada manutenção da estrutura do cerne viral, podendo ligar-se no retículo endoplasmático para promover a organização do capsídeo externo do vírion (ESTES E COHEN, 1989). A VP6 é uma proteína altamente imunogênica e antigênica, sendo a proteína mais comumente utilizada para detecção do rotavírus (PAREZ *et al.*, 2004; WARD e MCNEAL, 2010 ZHU *et al.*, 2013).

1.3.2.3. Proteínas do capsídeo externo

A proteína VP4, um produto gênico do segmento 4, é uma proteína não-glicosilada do capsídeo externo. A proteína VP4 está envolvida em uma variedade de funções, incluindo adsorção à célula-alvo, penetração, hemaglutinação, neutralização e virulência. Sob a ação de proteases digestivas, o rotavírus aumenta seu potencial de infecção celular. O tratamento proteolítico com a tripsina cliva a proteína VP4 e dá origem às proteínas VP5* e VP8* que representam, respectivamente, as regiões carboxi e amino-terminal de VP4. A proteína VP8*, de 28 kDa, apresenta alta afinidade com resíduos de ácido siálico presentes em alguns tipos celulares, não sendo, contudo, característica inerente a todos os *Rotavirus*. A proteína VP5*, um fragmento maior, com peso molecular de 60 kDa, apresenta afinidade a diversos tipos de integrinas da superfície celular. Esta proteína potencializa a penetração do vírus em sua célula

hospedeira, mas tanto ela quanto a VP8* não são indispensáveis à sua penetração (HEWISH *et al.*, 2000).

A proteína VP7, codificada pelo segmento gênico 9, é a segunda mais abundante proteína no capsídeo externo. Antígeno-específica, esta proteína é glicosilada no retículo endoplasmático e facilita a adsorção do vírus na superfície celular e a sua penetração na célula susceptível (HEWISH *et al.*, 2000). Pode ainda interagir com VP4 e auxiliar na ligação específica ao receptor, além de induzir a neutralização de anticorpos (ESTES E COHEN, 1989).

1.3.3. Proteínas não-estruturais (NSP)

As proteínas não-estruturais são proteínas produzidas por células infectadas pelo *Rotavirus*. Dentre as funções mais específicas desempenhadas por estas proteínas incluem-se a regulação da transcrição viral, formação de estruturas eletrodensas denominadas viroplasmas, além participar ativamente do antagonismo da resposta antiviral (HU *et al.*, 2012).

1.3.3.1. As proteínas NSP3 e NSP1

A NSP3 é uma proteína de 36,4 kDa codificada pelo segmento gênico 7. Dados de estudos atuais sugerem que a NSP3 facilite a tradução do mRNA e suprima a síntese de proteínas do hospedeiro por meio do antagonismo à proteína de ligação à cauda poli-A (PABD), uma vez que somente mRNA poliadenilados são eficientemente traduzidos. Além disso, NSP3 previne e impede a degradação dos mRNA por nucleases celulares (HU *et al.*, 2012). A proteína não-estrutural NSP1 é uma proteína codificada pelo segmento gênico 5. Estudos cinéticos da expressão de polipeptídeos revelam que esta proteína é produzida em eventos precoces na infecção, sendo responsável principalmente pela subversão do sistema imune inato por meio da degradação de fatores necessários à sinalização do IFN- β . Recentes trabalhos têm demonstrado que NSP1 direciona as proteínas IRF3, IRF5 e IRF7, para degradação em proteassomos. Todos estes fatores são de grande importância na imunidade inata contra rotavírus (ESTES E COHEN, 1989; GRAFF *et al.*, 2009; ARNOLD e PATTON, 2011).

1.3.3.2. As proteínas NSP2 e NSP5

A proteína NSP2 é uma proteína codificada pelo segmento gênico 8. Possui atividade enzimática multifuncional, sendo essencial em uma diversidade de eventos relacionados à multiplicação viral. A NSP2 interage diretamente com a proteína VP1 e assume a atividade de replicase, participando da replicação do RNA viral por ligação à fita de senso negativo (HU *et al.*, 2012). A NSP5, codificada pelo segmento gênico 11, está acumulada nos viroplasmas juntamente com NSP2. Uma diversidade de trabalhos demonstrou que a proteína NSP5 sofre autofosforilação e a sua interação com a proteína NSP2 promove a hiperfosforilação de NSP5 e podem, juntas, independentemente de outras proteínas, conduzir à formação de estruturas semelhantes a viroplasmas *in vitro* (AFRIKANOVA *et al.*, 1998; EICHWALD *et al.*, 2004).

1.3.3.3. A proteína NSP6

A proteína NSP6, com apenas 12 kDa, é a menor proteína estrutural do rotavírus, sendo também a menos estudada. Codificada em uma ORF do segmento genômico 11, a NSP6 é expressa constantemente durante a infecção do rotavírus, mas em baixa quantidade. Sua taxa de *turnover* é bastante elevada, com degradação total em apenas duas horas. Esta proteína apresenta função muito importante na redistribuição do viroplasma durante o ciclo de multiplicação viral e apresenta alta afinidade com o ssRNA (RAINSFORD e MCCRAE, 2007).

1.3.3.4. A proteína NSP4

Desde a descoberta da enterotoxina NSP4, vários eventos relativos à patogênese da diarreia têm sido elucidados. Codificada pelo segmento 10, a NSP4 é uma glicoproteína com funções pleiotrópicas durante a replicação viral (HU *et al.*, 2012). Deste modo está envolvida em uma diversidade de eventos biológicos relevantes à multiplicação do rotavírus e, sobretudo, na potencialização dos efeitos da infecção no hospedeiro. Dentre as funções da NSP4, destaca-se o seu envolvimento na morfogênese de partículas virais. Neste sentido a proteína possui formas livres e formas ancoradas no retículo endoplasmático da célula hospedeira. Estas formas permitem a adsorção de partículas subvirais e promovem seu brotamento no retículo

endoplasmático (ESTES E COHEN, 1989). Além disso, a NSP4 atua como mediador viral para desregulação dos níveis intracelulares de cálcio. A NSP4 produzida durante a infecção inicial rompe as junções oclusivas intercelulares, permitindo deste modo o fluxo paracelular de água e eletrólitos (ESTES E COHEN, 1989; MORRIS e ESTES, 2001).

A proteína NSP4 é o único produto gênico dos rotavírus capaz de, isoladamente, mobilizar o cálcio intracelular e mimetizar os episódios de diarreia induzida pelo vírus. As moléculas de NSP4, liberadas no meio intracelular por uma via não-clássica de secreção, induzem a liberação de cálcio do retículo endoplasmático e resultam deste modo em um aumento substancial da concentração intracelular de cálcio (ESTES E COHEN, 1989; MORRIS e ESTES, 2001). Para que este processo ocorra, o peptídeo NSP4 se liga a um receptor específico na superfície apical do enterócito iniciando assim, uma cascata celular de PLC-IP3 (fosfolipase C-inositol 1,3,5-trifosfato), que culmina na liberação de cálcio. Diferentemente, o aumento da concentração de cálcio induzida pela NSP4 intracelular é um evento independente de PLC-IP3. Estes eventos resultam, resumidamente, em liberação de cálcio do retículo endoplasmático e aumento dos níveis intracelulares de cálcio, com conseqüente rompimento da arquitetura do citoesqueleto microvilar. Deste modo, os efeitos celulares mediados pela NSP4 podem amplificar os sintomas da diarreia durante a infecção, mesmo na ausência de significativo dano tecidual (Figura 5) (TIAN *et al.*, 1994; MORRIS e ESTES, 2001; LORROT e VASSEUR, 2007).

O *Rotavirus* altera a atividade de dissacarídeos intestinais e o transporte de água acoplado ao simporte de sódio, contribuindo para a massiva perda de água para a luz intestinal. Especificamente, NSP4 inibe a atividade de simporte de Na⁺/Glicose mediado pela SGLT1 (sódio-glicose co-transportador 1). Além disso, o *Rotavirus*, ou mesmo a NSP4 isolada, aumenta a permeabilidade paracelular no epitélio. A perda de Cl⁻ no lúmen intestinal é estabelecida pelo simporte Cl⁻/H⁺ (AE2) causando reabsorção ou secreção de Cl⁻ nas vilosidades e falha na secreção de cloreto nas criptas. A absorção ou secreção de Cl⁻ na luz intestinal é diretamente dependente do gradiente eletroquímico de Cl⁻ causado pela infecção pelo *Rotavirus*. A secreção de cloreto é regulada por uma via de sinalização de cálcio dependente da fosfolipase C (PLC) induzida pelo NSP4 (LORROT e VASSEUR, 2007).

A NSP4 também é secretada na face basal dos enterócitos, mas ainda sem função completamente definida na indução de diarreia. Têm sido propostas ambas, ações secretórias de NSP4, induzida por IP_3 ou uma função anti-secretória induzida por IP_4 . Também, a mobilização de Ca^{2+} pode disparar a liberação de diferentes mediadores capazes de ativar o sistema nervoso entérico, estimulando assim, a secreção de Cl (TIAN *et al.*, 1994; LORROT e VASSEUR, 2007) (figura 4).

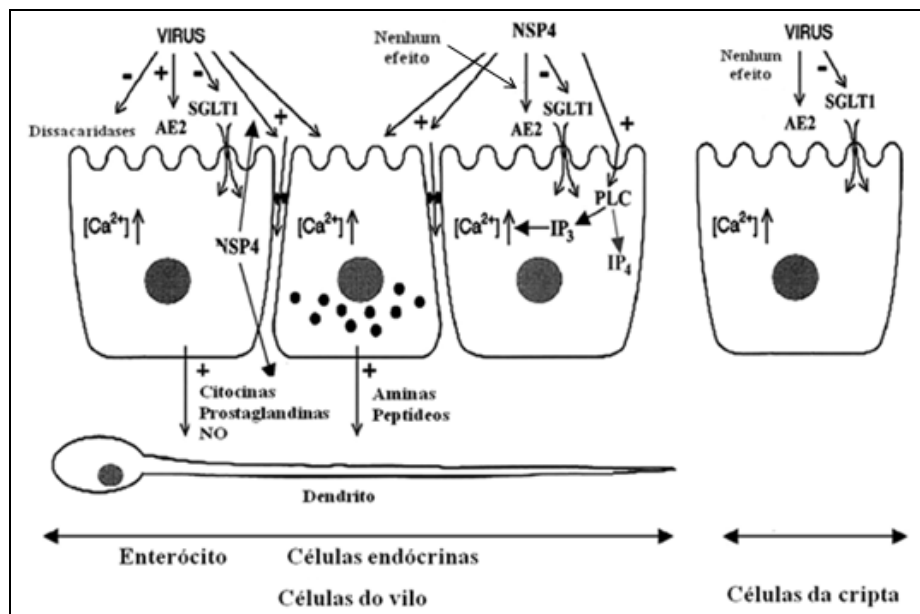


Figura 4: Fisiopatologia da diarreia induzida pela proteína NSP4. Adaptado de Lorrot e Vasseur, 2007.

1.4. Classificação dos Rotavirus

O gênero *Rotavirus* é classificado sorologicamente em sorogrupos e sorotipos. A divisão é representada por sete espécies virais distintas, que vão de A a H. Esta especificidade é mediada pela proteína VP6, encontrada no capsídeo intermediário. Dentre estes sorogrupos, apenas os vírus dos grupos A, B e C são encontrados, tanto em seres humanos quanto em animais, ao passo que *Rotavirus* dos sorogrupos D (*Chicken rotavirus D/132*) e E (*Porcine rotavirus E/DC-9*) têm sido isolados apenas em animais (COSTA *et al.*, 1990; ESTES, 2001; RAMING, 2004; ICTV, 2014).

Atualmente, são conhecidos dois sorotipos, classificados como sorotipo G e sorotipo P. A especificidade do sorotipo P é mediada pela proteína de superfície VP4 (sensível à protease).

Foram identificados 25 sorotipos P, onze deles entre seres humanos, quais sejam P 1A, 1B, 2A, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. A proteína VP7 (Glicoproteína) medeia especificidade ao sorotipo G dos quais atualmente se conhecem 14 (1 a 14, sendo 10 deles em seres humanos) (PAREZ *et al.*, 2004; MARTELLA *et al.*, 2006; RIVERA *et al.*, 2013). Os vírus pertencentes ao mesmo sorotipo podem sofrer rearranjo gênico, contudo, este fenômeno não ocorre entre sorogrupos distintos (COSTA *et al.*, 1990; ESTES, 2001; RAMING, 2004). As combinações mais frequentemente observadas são G1P1A, G2P1B, G3P1A, G4P1A 1B.

No Brasil, diversos estudos revelaram grande variabilidade na prevalência de subtipos de rotavírus (G1, G2, G3, G4 e P(4), P(6) e P(8)) (GOUVEIA *et al.*, 1994; COSTA *et al.*, 2004). O genótipo G1 foi o mais frequentemente identificado durante mais de três décadas de estudos no período pré-vacinação (COSTA *et al.*, 2004). Atualmente, o subtipo G2 tem sido o mais frequente dentre todos os genótipos (SILVA SOARES *et al.*, 2013).

Combinações entre os tipos P e G são comumente identificadas em amostras fecais humanas. Alguns trabalhos que avaliaram a infecção em diversos países mostraram a prevalência do genótipo G2P[4] (CARVALHO-COSTA *et al.*, 2011). Em Minas Gerais, um estudo realizado entre 2008 e 2010 demonstrou que a caracterização genética da maioria das amostras de rotavírus estudadas exibia genótipos G1P[8] (> 40%), G9P[8] (> 40%) ou G2P[4] (aproximadamente 15%). O genótipo G2P[4] estava associado e apresentava distribuição sazonal (SILVA, 2010). Em um estudo mais recente na região Norte do Brasil, a combinação binária mais comum foi G2P[4], o que representa 41% dos casos estudados, seguido de G3P[6] (15%), G1P[8] (8 %), G3P[8] (4%), G9P[8] (3%), e G12P[6] (2%) G3P[6] (SILVA SOARES *et al.*, 2013).

1.5. Infecção e multiplicação viral

Os vírus do gênero *Rotavirus* possuem tropismo natural pelos enterócitos do intestino delgado. Durante a primo-infecção, os enterócitos imaturos do intestino delgado são infectados por partículas virais presentes na luz intestinal. A adsorção do vírus ao enterócito é realizada pela interação sequencial entre a partícula viral e moléculas contendo resíduos de ácido siálico. Receptores específicos presentes nos enterócitos são responsáveis pela afinidade

do vírus a este tipo celular. As partículas de triplo capsídeo ligam-se primeiramente a um resíduo de ácido siálico de superfície e a grupos antigênicos na superfície da célula hospedeira (*histo-blood group antigens* - HBGAs). Estas interações são acompanhadas por interações secundárias com receptores celulares incluindo as integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e Hsc70. Desse modo, o vírus é internalizado por endocitose mediada pelo receptor. Tais moléculas podem ainda estar associadas a estruturas chamadas de *lipid rafts*, que favorecem a penetração do vírus (GUERRERO *et al.* 2000; LONDRIGAN *et al.*, 2000; HEWISH *et al.*, 2000; GUERRERO *et al.* 2002; HU *et al.*, 2003; HALASZ *et al.*, 2008).

A liberação do capsídeo externo, disparado pelo baixo nível de cálcio endossomal, resulta na liberação de partículas de duplo capsídeo (DLP) no citoplasma. Estas DLP's são partículas transcricionalmente ativas e iniciam várias etapas de transcrição do mRNA. Após o desnudamento parcial do vírus, o segmento de RNA de dupla fita presente no cerne subviral é transcrito pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) para produzir RNA mensageiro para proteínas virais (ESTES e KAPIKIAN, 2007). O RNA de senso positivo é prontamente traduzido, dando origem a seis proteínas estruturais (VP) e seis proteínas não-estruturais (NSP). A replicação do RNA ocorre concomitantemente ao empacotamento dos segmentos genômicos nos cernes virais recém-formados, e de modo coordenado, permite que os 11 segmentos sejam produzidos em níveis equimolares (MANSELL e PATTON, 1990; SILVESTRI *et al.*, 2004; GUGLIELMI *et al.*, 2010).

Uma vez produzidas, as proteínas virais permitem a replicação do genoma viral e o empacotamento de novas DLP's (*double layered particle*) em estruturas perinucleares denominadas viroplasmas. Os viroplasmas são estruturas eletrodensas altamente dependentes das proteínas NSP2 e NSP5 e tornam-se inclusões celulares, ricas em RNA e proteínas recém-sintetizadas. Os viroplasmas estimulam o aumento da tradução, replicação do material genético e montagem da progênie de DLPs desempenhando assim importante papel na multiplicação viral. O tamanho e a forma dos viroplasmas apresentam alta variabilidade durante o ciclo de multiplicação viral (MANSELL e PATTON, 1990; CARREÑO-TORRES *et al.*, 2010; GUGLIELMI *et al.*, 2010).

Após serem produzidas nos viroplasmas, as DLP's brotam para o interior do retículo endoplasmático após se ligarem às caudas transmembrana da proteína NSP4, que funcionam

como receptores no retículo. Durante este processo, as partículas do rotavírus apresentam uma estrutura envelopada transitória no retículo endoplasmático (SILVESTRI *et al.*, 2004; CARREÑO-TORRES *et al.*, 2010; GUGLIELMI *et al.*, 2010). Após a produção das DLP's, as partículas envelopadas perdem seu envelope transitório e se ligam às proteínas VP4 e VP7 do capsídeo externo resultando em partículas maduras de triplo capsídeo. A nova progênie viral é então liberada por meio de lise celular ou através da membrana plasmática das células apicais por uma via não-clássica de tráfego celular. Após a liberação de partículas virais da célula primariamente infectada, outras células são secundariamente infectadas (MANSELL e PATTON, 1990; SILVESTRI *et al.*, 2004; GUGLIELMI *et al.*, 2010; SHARP e ESTES, 2010). A ocorrência de antegenemia e de disseminação extra-intestinal de partículas virais tem sido amplamente demonstrada na literatura (TSUNG-HAN *et al.*, 2012). Este fenômeno denota um amplo espectro de células hospedeiras para o rotavírus (BLUTT *et al.*, 2007). Diversos relatos de casos mostram que a disseminação extra-intestinal do *Rotavirus* determina a indução de hepatite, nefrite, pneumonia, exantema, coagulação intravascular disseminada, linfocitose hemofagocítica e complicações neurológicas tais como encefalite, encefalopatia, infecções cerebelares e crises convulsivas. Tais disseminações são formas menos comumente descritas em infecções pelo rotavírus, e foram descritas por meio do isolamento do RNA viral no líquido cefalorraquidiano, sistema nervoso central, sangue e células endoteliais. Interessantemente, antígenos do vírus também podem ser detectados no sangue, independentemente da consistência da excreção fecal ou da sintomatologia apresentada pelo indivíduo (FENAUX *et al.*, 2006; BLUTT *et al.*, 2007).

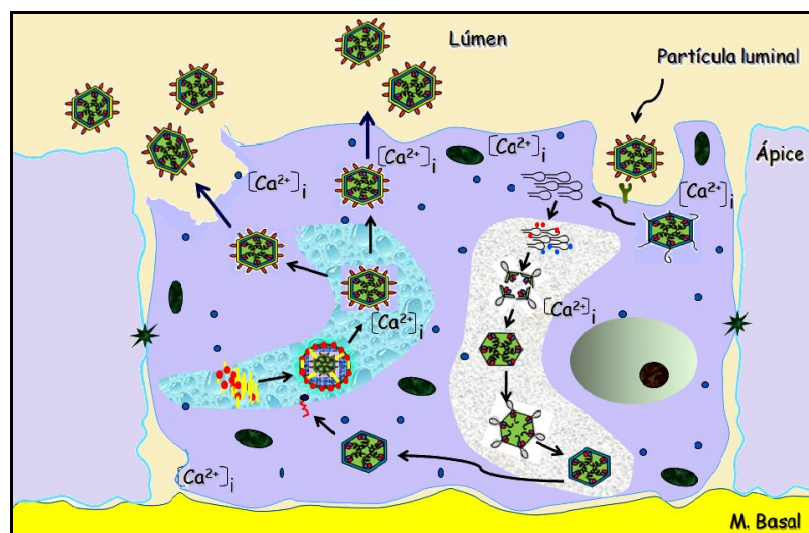


Figura 5: Modelo de Infecção pelo rotavírus. A figura demonstra esquematicamente a infecção pelo rotavírus, com destaque para a formação de envelope transitório e a presença de alta concentração de cálcio intracelular. Viroplasma em branco e retículo endoplasmático em azul. Fonte: Do próprio autor.

1.6. Patologia da infecção pelo Rotavírus

Existem atualmente diversas hipóteses sobre a fisiopatologia da gastroenterite induzida pelo *Rotavirus*. A diarreia viral é atribuída a mecanismos distintos, incluindo a má absorção intestinal, secundária à destruição do enterócito, a reações à toxina viral, estimulação do sistema nervoso entérico e à isquemia das vilosidades intestinais (Figura 6) (MORRIS e ESTES, 2001). As alterações estruturais na superfície do epitélio intestinal levam a uma redução na absorção de líquidos. Outras hipóteses incluem a ocorrência de distúrbios osmóticos na permeabilidade intestinal, secundários à destruição da mucosa e alterações nas secreções eletrolíticas (KORDASTI *et al.*, 2006).

Algumas infecções pelo rotavírus podem permanecer assintomáticas, sugerindo uma interação entre fatores virais e do hospedeiro na determinação da gravidade da doença. Certas linhagens virais podem ter sido atenuadas pela passagem em meios celulares, uma vez que a atenuação viral resulta em redução da patogenicidade do vírus. Também, certas linhagens virais podem estar adaptadas ao crescimento apenas em determinadas espécies de hospedeiro (TIAN *et al.*, 1994; MORRIS e ESTES, 2001; KORDASTI *et al.*, 2006 ; LORROT e VASSEUR, 2007) (Figura 6).

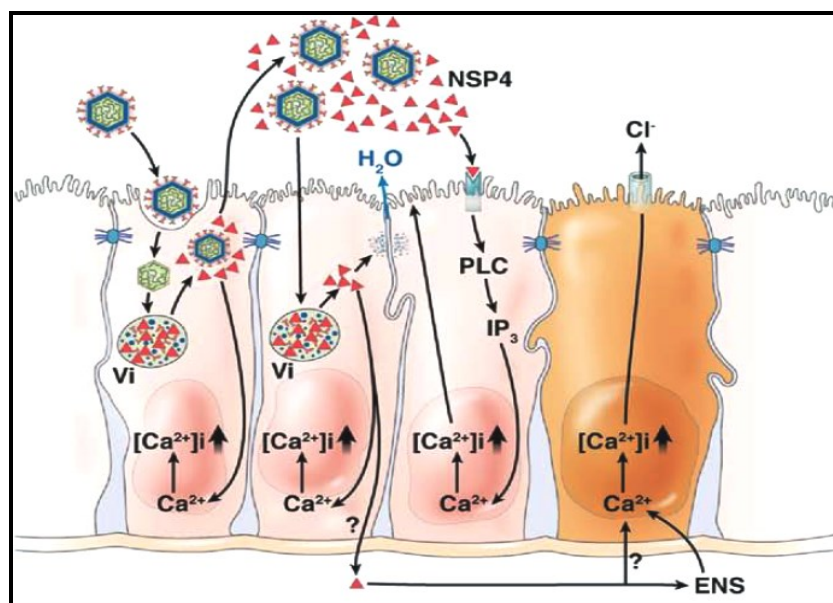


Figura 6 – Modelo de patogênese da diarreia induzida pelo *Rotavirus*. Após a penetração do vírus ocorre o desnudamento da partícula e posteriormente, a formação do viroplasma (Vi). A proteína não-estrutural NSP4 (triângulos) produzida no viroplasma necessita, quando presente no meio extracelular, de um receptor específico no ápice do enterócito para iniciar sua ação. Uma cascata de transdução de sinais iniciada com a ligação ao receptor fosforila uma série de proteínas, culminando em liberação do cálcio das reservas celulares com consequente aumento de sua concentração intracelular $[Ca^{2+}]_i$. A NSP4 pode também estimular o sistema nervoso entérico, e por um mecanismo desconhecido, elevar os níveis intracelulares de cálcio. Estes eventos resultam em ruptura das junções oclusivas intercelulares, permitindo passagem paracelular de água, a liberação de cloreto (Cl^-) na luz intestinal e estimulação do sistema nervoso entérico (ENS). Estes eventos aumentam o volume aquoso na luz intestinal causando profusa diarreia. PLC: Fosfolipase C; IP_3 : Inositol trifosfato (Adaptado de GREENBERG e ESTES, 2010).

Dentre os fatores relacionados ao hospedeiro, uma variedade deles pode estar envolvida, destacando-se a má nutrição, que pode levar a alterações na resposta inflamatória intestinal; e a característica idade-dependente da doença, uma vez que pode influenciar na neutralização de anticorpos - que neste caso aumenta com a idade e com a exposição ao vírus -, na expressão de receptores específicos para VP4, na limitação de níveis de proteases intestinais para a clivagem proteolítica de VP4, a presença de mucina e a taxa de reposição epitelial que influencia na reabsorção de líquidos e eletrólitos (KORDASTI *et al.*, 2006).

Vários trabalhos experimentais têm sido desenvolvidos com o objetivo de explicar os mecanismos da patogênese na diarreia causada pelo *Rotavirus*. A infecção de células Caco-2 pelo rotavírus promove alterações estruturais e funcionais nas junções oclusivas das células. Sendo assim, a infecção pelo vírus neste tipo celular pode promover um aumento gradativo e progressivo da permeabilidade para-celular, não havendo, contudo, alterações na integridade da monocamada (OBERT, *et al.*, 2000; BEAU *et al.*, 2007).

A infecção de células Caco-2 pelo rotavírus sítio induz seletivamente a redução da atividade apical e a redução da produção de certos açúcares. Estas alterações são o resultado de profundas alterações no tráfego intracelular de enzimas, concomitantemente ao desmembramento da F-actina microvilar e, conseqüentemente, da vilosidade intestinal (JOURDAN *et al.*, 1998).

A homeostasia do cálcio também é prejudicada em infecções de células Caco-2 pelo *Rotavirus*. Resultados experimentais demonstraram que a infecção desse tipo celular induz a

um aumento da concentração intracelular de cálcio, e este aumento leva à desorganização microvilar, com desaparecimento total da F-actina microvilar. Tais eventos patológicos são inteiramente dependentes da multiplicação do vírus no citoplasma da célula (BRUNET *et al.*, 2000; MORRIS e ESTES, 2001).

1.7. Resposta imune à infecção pelo *Rotavirus*

O epitélio do intestino delgado é topograficamente organizado em criptas e vilosidades. As células intestinais estão bem-posicionadas, de modo a oferecer uma resposta efetiva e regulada do hospedeiro contra infecções. A proliferação e a migração das células indiferenciadas da cripta são associadas com a ascensão de células em sua fase final de diferenciação. Um complexo juncional que separa o domínio apical do domínio basolateral interconecta estas células polarizadas (ROLLO *et al.*, 1999).

A membrana epitelial está firmemente fixada sobre uma membrana basal, sob a qual repousa uma lâmina própria que contém um infiltrado de células mononucleares, que respondem a infecções pelo *Rotavirus* e outros patógenos intestinais (ROLLO *et al.*, 1999). Os linfócitos intraepiteliais intestinais são, em sua maioria, linfócitos T isolados e dispersos na parede epitelial (DAS e JANEWAY, 1999).

Residentes entre as células epiteliais intestinais, os linfócitos podem ser classificados de acordo com a expressão de receptores de células T ou em relação à expressão de co-receptores. Quanto à expressão de TCR, são classificados em $\text{TCR}\alpha\beta^+$ e $\text{TCR}\gamma\delta^+$. As células $\text{TCR}\alpha\beta^+$ podem ainda ser classificadas como linfócitos $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD}8\alpha\alpha^+$ (as mais abundantes), $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD}8\alpha\beta^+$ e $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD}4^+$ (OLIVARES-VILLAGÓMEZ e KAER, 2010). Quanto à expressão de co-receptores, podem ser classificados em Tipo A: Linfócitos $\text{TCR}\alpha\beta^+$ expressando CD4 (MHC-I) e $\text{TCR}\alpha\beta^+$ expressando CD8 (MHC-II); e células do tipo B: $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD}8\alpha\alpha^+$ e $\text{TCR}\gamma\delta^+\text{CD}8\alpha\alpha^+$ (DAS e JANEWAY, 1999; OLIVARES-VILLAGÓMEZ e KAER, 2010)

As células epiteliais intestinais que compõem a mucosa intestinal representam a primeira linha de defesa contra patógenos entéricos. A infecção microbiana da mucosa intestinal está frequentemente acompanhada de mudanças estruturais e funcionais no epitélio. Estas

alterações desencadeiam um processo inflamatório da mucosa, resultando em profusas diarreias (ROLLO, *et al.*, 1999; VIJAY-KUMAR *et al.*, 2005; HIRATA *et al.*, 2007). As células epiteliais intestinais, envolvidas na iniciação da defesa do hospedeiro são estimuladas a produzir uma variedade de citocinas e quimiocinas inflamatórias, secretadas a partir da superfície basolateral do epitélio intestinal em resposta a diversos patógenos (ROLLO *et al.*, 1999; CUADRAS *et al.*, 2002).

As quimiocinas constituem uma família de pequenas proteínas de 8-14 kDa, com uma diversidade de papéis biológicos, estando criticamente envolvidas principalmente no tráfico de células inflamatórias na defesa do hospedeiro, sendo produzidas por várias populações de linfócitos. Adicionalmente, as quimiocinas desempenham outras funções biológicas destacando-se a modulação de respostas biológicas como a secreção enzimática, adesão celular, citotoxicidade, crescimento tumoral e a degranulação e ativação de células T (LUSTER, 1998; MURPHY *et al.*, 2000; ZLOTNIK e YOSHIE, 2000). Dentre as citocinas liberadas pelo epitélio durante a infecção por patógenos entéricos destacam-se a GM-CSF, TNF- α e IFN- γ . Além disso, recentes estudos relataram a citotoxicidade de TNF- α e IFN- γ para células HT-29 e a alteração da permeabilidade nas junções oclusivas em culturas de células T84 em resposta ao IFN- γ (ROLLO *et al.*, 1999; CUADRAS *et al.*, 2002).

A infecção pelo *Rotavirus* induz o epitélio intestinal a produzir e secretar várias quimiocinas CC e CXC. Este mecanismo denota grande importância das quimiocinas dos enterócitos na iniciação da resposta imune à infecção intestinal. Dentre as quimiocinas envolvidas na infecção pelo *Rotavirus* destacam-se a CXCL-8/IL-8/KC e CCL5/RANTES, notadamente, as mais potentes moléculas quimioatraentes para linfócitos no ambiente intestinal (ROLLO *et al.*, 1999). Além destas citocinas, CXCL10/IP10 e GM-CSF também são estimuladas (SHETH *et al.*, 1996; CASOLA *et al.*, 1998; ROLLO *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, uma importante molécula tem merecido destaque. A Osteopontina, uma fosfoproteína sialilada, é uma proteína da matriz extracelular produzida em uma diversidade de processos inflamatórios e lesões epiteliais, lesões endoteliais e da musculatura lisa. Além disso, esta proteína tem importantes funções na ativação de linfócitos, macrófagos e células NK (*natural killer*) durante processos inflamatórios podendo ser detectada em fluidos

corporais como plasma, urina e no leite materno (MARTIN *et al.*, 2001; WANG e DENHARDT, 2008).

Recentemente, a osteopontina tem sido descrita com uma importante citocina em uma diversidade de processos infecciosos, sobretudo em infecções virais (MAENO *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010). Em um estudo conduzido por Rollo e colaboradores (2005) a infecção pelo rotavírus foi capaz de induzir a expressão de osteopontina em modelo murino. Além disso, os autores demonstraram que a gravidade da diarreia é mais expressiva em camundongos deficientes para o gene da osteopontina (ROLLO *et al.*).

O aumento da expressão gênica de citocinas em resposta ao *Rotavirus* foi previamente demonstrado por Rollo e colaboradores (1996). Estes autores demonstraram por meio de RT-PCR a atividade transcricional de genes que codificam uma variedade de quimiocinas em células HT-29. Foram demonstradas induções de quimiocinas CXC (IL-8, IP-10 e GRO) e de quimiocinas CC (RANTES e MCP-1), enquanto os genes para interferon e GM-CSF foram regulados negativamente. Por outro lado, os transcritos para o TNF, IL-1 não aumentaram durante a infecção deste tipo celular (ROLLO *et al.*, 1996). Além da secreção de citocinas a infecção pelo *Rotavirus* provoca uma potente resposta de IgA de mucosa (ROLLO *et al.*, 1999).

Outro estudo, conduzido por Casola e colaboradores (1998), demonstrou um aumento tempo e dose-dependente da expressão de IL-8, RANTES e GRO-alpha em células HT-29 infectadas pelo rotavírus. Este estudo concluiu ainda que os enterócitos realizam um papel fundamental na iniciação e modulação da resposta imune durante a infecção pelo vírus (CASOLA *et al.*, 1998).

Diante da infecção pelo *Rotavirus*, e em resposta à produção de citocinas, ocorre um recrutamento massivo e ativação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ (ROLLO *et al.*, 1999). Estudos realizados em camundongos revelam que as células B são as primeiras determinantes de proteção contra reinfecção, ao passo que células TCD8⁺ são responsáveis pela redução do tempo de curso da infecção primária. Células TCD4⁺, por sua vez, estão geralmente envolvidas no auxílio a células TCD8⁺ e células B. Em relação aos linfócitos residentes no intestino, parecem exercer papel de destaque na regulação da imunidade contra *Rotavirus* e o

tráfego de células B para o intestino, haja vista sua importância para a proteção em modelo murino cronicamente infectado pelo *Rotavirus* (ZHANG *et al.*, 2008; GREENBERG e ESTES, 2009).

Em relação à iniciação da reposta imune/inflamatória, é importante o reconhecimento viral e a sinalização da reposta imune. Após a internalização do vírus de RNA, em especial o rotavírus humano, ocorre a produção de RNA de dupla fita (dfRNA). Biologicamente, a presença de dfRNA intracelular representa a presença de infecção viral. Este evento funciona como “sensor” molecular, que sinaliza a resposta celular do hospedeiro, tendo importante papel no controle viral, incluindo a produção de IFN e os produtos gênicos regulados pelo interferon (MIG e IP10).

Para que o hospedeiro reconheça o *Rotavirus* (dfRNA) são necessárias diversas proteínas. A proteína quinase ativada pelo dfRNA (PKR) é uma serina/treonina quinase com motivos de ligação ao dfRNA em sua extremidade N-terminal. Esta proteína sofre mudanças conformacionais após a interação com o vírus. Deste modo, a PKR fosforila eIF-2 α e pode ativar a produção de NF κ B, importante na resposta inflamatória e na produção de IFN- γ . Outro grupo de proteínas inclui a dfRNA helicase que, quando fosforilada, culmina na produção de IFN- γ (HIRATA *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2007).

1.8. Sintomatologia da infecção pelo *Rotavirus*.

A infecção pelo *Rotavirus* é caracterizada por uma infecção com padrão sazonal de manifestação, baixa letalidade e uma grande variabilidade na sua sintomatologia. Estudos recentes mostraram que grande parte dos casos de rotavirose humana se desenvolve durante o inverno e a primavera, com variações demográficas e regionais (YANG *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2012).

Dentre os sintomas mais comuns, a diarreia destaca-se como o sintoma mais frequente, estando presente em 98% dos casos. Vômitos e inapetência também se revelaram sintomas muito comuns e estão presentes em 92 a 96% dos pacientes (YANG *et al.*, 2010). O vômito na rotavirose humana é considerado um dos fatores mais importantes, tendo em vista seu grande potencial de induzir, juntamente com a diarreia, um grave quadro de desidratação.

Estudos recentes mostraram que a proteína NSP4 tem o potencial para estimular as células enterocromafins a produzirem a serotonina 5-TH. Este hormônio estimula, via nervo vago, o núcleo do trato solitário e a área postrema localizados no tronco encefálico e relacionados à indução de vômitos e náuseas (HAGBOM *et al.*, 2007).

O quadro clínico inclui também sintomas inespecíficos como febre, dor abdominal, sangue nas fezes e apreensão ao toque abdominal. Além destes sintomas, a antegenemia é bastante relevante em crianças infectadas pelo rotavírus, embora sua importância clínica seja pobremente compreendida. Os achados relativos à viremia ou antigenemia não estão correlacionados com aumento na gravidade dos sintomas e incluem quadros de bronquiolite, pancreatite e envolvimento do sistema nervoso central (BLUTT *et. al.*, 2007; YANG *et al.*, 2010; YU *et.al.*, 2012).

1.8. A microbiota intestinal

A microbiota indígena associada ao trato digestivo humano, pelo seu tamanho (estimado no total em 10^{14} células viáveis e 1,5 kg de peso) e atividade metabólica (similar à de um fígado) é considerada como um dos ecossistemas mais complexos e menos controlados que se conhece. Esta comunidade microbiana pode se localizar no lúmen, nas criptas de Lieberkühn, na superfície do epitélio intestinal ou inserida na camada de mucina (NICOLI e VIEIRA, 2004). Pela dimensão, essa microbiota é muitas vezes considerada como um órgão ou organismo difuso atuando na superfície das mucosas do hospedeiro. É responsável por três funções importantes para saúde do hospedeiro: a resistência à colonização, a imunomodulação e uma contribuição nutricional (NICOLI e VIEIRA, 2004).

A instalação desta microbiota inicia-se logo após o nascimento e necessita de um ano e meio a dois anos para completar-se. Além de proteger contra infecções, ocupando o ecossistema gastrointestinal, essa colonização é também fundamental para a maturação dos sistemas imunológico e digestivo do recém-nascido (HOOPER e GORDON, 2005; HOOPER, 2004; MACPHERSON *et al.*, 2005). A mãe tem um papel fundamental para essa colonização fornecendo não somente os componentes da microbiota (provenientes da sua microbiota vaginal e fecal), mas também fatores nutricionais de crescimento para esses componentes

(fatores *bifidus* presentes no leite materno) (NICOLI e VIEIRA, 2004). A partir destas informações, fica evidente a necessidade de uma colonização rápida do recém-nascido por microrganismos adequados assim como, uma vez instalada, a preservação da composição e das funções da microbiota intestinal para obter dela um máximo de benefícios.

Vários fatores podem perturbar tanto a colonização (tempo de gestação, via do parto, tipo de amamentação, uso de antibiótico) (HARMSSEN *et al.*, 2000; BONNEMAISON *et al.*, 2003; WESTERBEEK *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007) como a manutenção (uso de antibiótico, mudança alimentar, estresse) (NICOLI e VIEIRA, 2004) dessa microbiota no trato digestivo. No caso de utilização excessiva e inadequada de antibióticos, esses distúrbios da microbiota gastrintestinal são acompanhados pela indução de multirresistência pelo aumento da virulência em micro-organismos patogênicos (DINIZ *et al.* 2003). Neste sentido, há um esforço atual para procurar métodos alternativos de prevenção e/ou tratamento de infecções microbianas (WHO/FAO/OIE, 2003), sendo um deles o uso dos probióticos.

1.9. Probióticos

Os probióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde como “micro-organismos vivos que quando administrados em quantidade adequada oferecem um benefício para a saúde do hospedeiro” (WHO/FAO, 2002). A sua utilização tem como finalidades instalar, reforçar ou compensar as funções da microbiota normal do trato digestivo ou de outras superfícies corporais. A sugestão de utilizar alimentos fermentados para aliviar distúrbios intestinais não é nova. Já era mencionada na versão Persa do Antigo Testamento (Gênesis 18:8), que relata que “Abraão atribuiu sua longevidade ao consumo de leite azedo”. Posteriormente, em 76 A.C., o historiador romano Plínio recomendou o uso de produtos lácteos fermentados para o tratamento de gastroenterites (SCHREZENMEIR e DE VRESE, 2001). Contudo, uma abordagem científica reconhecendo o papel benéfico de certos microrganismos foi somente aplicada nas primeiras décadas do século XX, com as sugestões do uso de *Lactobacillus* (Elie Metchnikoff atribuindo a longevidade dos búlgaros ao consumo de iogurte em 1907), de *Bifidobacterium* (Henri Tissier observando uma presença maior de bifidobactérias nas fezes de crianças amamentadas no seio em 1906) e de *Saccharomyces boulardii* (Henri Boulard

notando o uso da fruta Lichia colonizada pela levedura como tratamento da diarreia pelas populações da Indochina durante uma epidemia de cólera em 1920) (SHORTT, 1999).

Os probióticos mais frequentemente utilizados são bactérias produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) e levedura (*Saccharomyces boulardii*). Segundo uma meta-análise recente sobre ensaios clínicos com probióticos, um claro efeito protetor foi evidenciado, o qual não variou significativamente entre os produtos a base de *S. boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum* e *B. lactis* (SAZAWAL *et al.*, 2006).

Os principais mecanismos de ação propostos para os probióticos são: a) o antagonismo, pela produção de substâncias ou metabólitos que inibem ou matam o micro-organismo patogênico (SERVIN, 2004); b) a imunomodulação do hospedeiro que aumenta a sua resistência à infecção e reduz a inflamação (NEUMANN *et al.*, 1998; CZERUCKA *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2000; EZENDAM e VAN LOVEREN, 2006); c) a competição por sítio de adesão ou fonte nutricional com o micro-organismo patogênico (SERVIN e COCONNIER, 2003; MOMOSE *et al.*, 2008), e d) a inibição da produção ou da ação de toxinas bacterianas (CZERUCKA *et al.*, 1994; BRANDÃO *et al.*, 1998).

A levedura *S. boulardii* é um dos poucos microrganismos utilizados como probiótico que não é de origem humana e possui a seu favor um grande número de ensaios laboratoriais e clínicos. Em meados de 1920, na Indochina (hoje, o Vietnam), um microbiologista francês, Henri Boulard, estava à procura de uma linhagem de levedura que fosse capaz de suportar altas temperaturas para produzir um bom vinho. Durante esta época houve uma epidemia de cólera em uma das vilas e ele foi informado que a população local preparava um chá da casca de uma fruta local (lichia) para aliviar e até mesmo suprimir a diarreia. Posteriormente, verificou-se que a fruta, na verdade, estava recoberta por uma levedura, e a eficácia contra a diarreia se devia a esta levedura, que foi isolada, identificada e chamada de *S. boulardii*.

A *S. boulardii* é uma levedura não patogênica, termotolerante (cresce à temperatura de 37°C) e, atualmente, de uso muito difundido na medicina humana. Geneticamente, *S. boulardii* é praticamente idêntica a *Saccharomyces cerevisiae*, mas, em termos de metabolismo e propriedades probióticas é bastante diferente (BRANDÃO *et al.*, 1998; FIETTO *et al.*, 2004).

A partir de 1960 iniciou-se a comercialização da levedura liofilizada, pelo *Laboratoire Biocodex* (Paris, França). Assim seu uso como medicação para combate às diarreias foi difundido em toda Europa. Atualmente, a levedura é amplamente comercializada na Europa, Américas do Sul e do Norte, Ásia e África. Os direitos de comercialização para a América do Sul foram adquiridos pela MERCK S.A (MARTINS, 2008).

Em um trabalho prévio (MARTINS *et al.* 2005) várias linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de diferentes ambientes do Brasil (associados a insetos, frutas tropicais, queijo e produção de cachaça) foram pré-selecionadas em testes *in vitro*, (simulando as condições gastrointestinais) e posteriormente testadas, *in vivo*, pela capacidade de colonizar o trato gastrointestinal sem causar patogenia e pelo seu efeito protetor, em animais gnotobióticos desafiados com *S. Typhimurium* e *C. difficile*. Os resultados do estudo sugeriram que *S. cerevisiae* UFMG A905 teria um potencial probiótico, sendo capaz de reduzir a ação de algumas bactérias patogênicas, assim como reduzindo níveis de translocação de *S. Typhimurium* e estimulando o sistema imunológico do hospedeiro (MARTINS *et al.*, 2007, MARTINS *et al.*, 2010).

Além disso, outros resultados mostraram que a levedura *S. cerevisiae* linhagem UFMG A905 foi capaz de diminuir a mortalidade de animais com febre tifoide induzida experimentalmente (15% de sobrevivência no grupo controle contra 55% no grupo tratado com a levedura) e os dados histopatológicos mostraram que a levedura apresentou uma boa proteção contra o desafio oral com *C. difficile* em camundongos gnotobióticos e uma boa preservação do fígado de animais convencionais tratados com a levedura e desafiados com *S. Typhimurium* (MARTINS *et al.*, 2005).

Dados recentemente publicados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que o tratamento com *S. cerevisiae* A905 inibiu a perda de peso e aumentou a sobrevivência de animais após o desafio com *Salmonella*. Dados imunológicos demonstraram que a *S. cerevisiae* A905 diminuiu os níveis de citocinas inflamatórias e modulou a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos, assim como as vias de NF- κ B e AP-1. Experimentos utilizando animais isentos de germes revelaram que os efeitos benéficos da levedura poderiam estar relacionados, pelo menos em parte, à ligação da *Salmonella* em sítios da parede da levedura (MARTINS *et al.*, 2011).

1.9.1. O uso de probióticos para o tratamento de diarreia induzida pelo *Rotavirus*

O tratamento da gastroenterite induzida pelo *Rotavirus* foi pouco modificado nos últimos anos. Ainda não há terapia específica para combater a diarreia aguda, contudo, a terapia de reidratação oral e a orientação para o aleitamento materno são as ferramentas clássicas e mais importantes no tratamento da gastroenterite aguda. Além do baixo custo, estas terapias podem reduzir significativamente a morbidade e mortalidade associadas. Isoladamente, as terapias disponíveis não são suficientes para reduzir o volume ou duração da diarreia. Terapias coadjuvantes, incluindo drogas antiperistálticas e antissecretórias, e a utilização de alguns probióticos selecionados podem reduzir a gravidade e a duração dos episódios (DALGIC *et al.*, 2011; BUCCIGROSSI *et al.*, 2014).

Uma diversidade de trabalhos desenvolvidos ao longo dos anos abordou o uso oral dos probióticos para o tratamento da gastroenterite induzida pelo rotavírus. Em um estudo duplo cego realizado na década de 1990, crianças de 5 a 24 meses que apresentavam episódios de diarreia, sobretudo pelo rotavírus humano, receberam fórmula alimentar suplementada com as bactérias *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus*. A alimentação com a fórmula reduziu substancialmente os episódios de diarreia aguda. Ainda neste estudo, dentre aqueles episódios nos quais o *Rotavirus* era o principal agente etiológico, a redução variou entre 7% e 19%. Além da redução observada, o uso da fórmula reduziu a taxa de disseminação do *Rotavirus* entre as crianças internadas no hospital (SAAVEDRA *et al.*, 1994).

Mais recentemente em um estudo experimental, camundongos BALB/c foram tratados com *B. bifidum* e *B. infantis* associados à ingestão de prebióticos, conhecidos por serem substâncias que potencializam as propriedades probióticas. O objetivo era avaliar o efeito sinérgico dos micro-organismos na modulação do curso da diarreia pelo *Rotavirus* e também avaliar a habilidade de ambos na mediação da resposta imune de mucosa e humoral. Camundongos tratados com a bifidobactéria tiveram maior resposta de anticorpo IgA específica para *Rotavirus* quando comparados àqueles não tratados. Contudo, não houve diferença entre as respostas imunes apresentadas pelos camundongos que receberam prebióticos em relação ao grupo não tratado. Estes resultados indicavam uma ação positiva de probióticos na redução da gravidade da diarreia induzida pelo *Rotavirus* (QIAO *et al.*, 2002).

Um estudo cego randomizado experimental foi conduzido para observar os efeitos da administração oral de *B. bifidum* na gastroenterite viral em camundongos lactentes da linhagem BALB/c. O objetivo era verificar se o micro-organismo alterava a dispersão do rotavírus no intestino e se haveria modificação do curso clínico da diarreia. Os resultados denotaram efetividade do *B. bifidum* na alteração do curso clínico da gastroenterite experimental, sugerindo uma interferência do probiótico na replicação e adsorção do vírus nas placas de Peyer. Deste modo o potencial de adesão e imunoestimulação do probiótico pode torná-lo uma alternativa terapêutica contra enteropatógenos (DUFFY *et al.*, 1994).

A definição melhor aceita para os probióticos foca, sobretudo, na importância de sua viabilidade. Alguns trabalhos sugerem que micro-organismos probióticos não-viáveis podem também exercer algum efeito benéfico na saúde do hospedeiro (OUWEHAND e SALMINEN, 1998). Em um estudo utilizando *Lactobacillus casei* GG não-viáveis, os autores observaram uma redução do tempo de duração da diarreia pelo *Rotavirus*. Os resultados sugeriam que a ingestão de *L. casei* linhagem GG poderia promover imunidade contra reinfecções, pela estimulação da produção de anticorpos específicos anti-rotavírus promovida durante seu uso (KAILA *et al.*, 1995).

Mais recentemente, Ventola e colaboradores (2012) verificaram os efeitos da viabilidade de *L. casei* GG no tratamento da diarreia induzida pelo *Rotavirus*. Foi comparado o desempenho das bactérias em modelo de ratos neonatos infectados pelo rotavírus SA11 na gravidade da infecção. Esta gravidade foi verificada pela variação no peso do animal, peso do cólon, consistência das fezes e persistência do rotavírus no intestino e fezes. Os autores demonstraram que ambas as bactérias, viáveis e inviáveis, foram capazes de promover efeitos benéficos no tratamento da infecção, destacando-se a eliminação do rotavírus e redução do peso do cólon, observado pela redução do edema intestinal (VENTOLA, *et al.*, 2012).

O *Lactobacillus reuteri* também foi utilizado para verificar sua ação probiótica na infecção pelo rotavírus. Em um estudo experimental, os autores avaliaram se a redução da diarreia induzida pelo *Rotavirus* era eficientemente reduzida com o uso deste probiótico. Após a verificação de sua eficácia, os autores testaram sua relação dose-dependência e verificaram que houve redução no tempo de duração da diarreia em todos os grupos estudados (SHORNIKOVA *et al.*, 1997).

Em um estudo mais recente, Preidis e colaboradores (2012) utilizaram um modelo de diarreia em camundongos neonatos para verificar o mecanismo utilizado pelo *L. reuteri*. A produção de anticorpos, proliferação e migração de enterócitos e características do microbioma intestinal foram avaliadas. Os autores demonstraram que os probióticos reduzem a duração dos episódios de diarreia por modificações na histologia intestinal e aumento da diversidade filogenética do microbioma. Além disso, os resultados mostraram que a redução da diarreia também era influenciada pelo aumento na produção de citocinas inflamatórias (MIP-1 α e IL-1 β) e anticorpos anti-rotavírus. Estes resultados foram fortemente influenciados pelo estado nutricional dos animais estudados (PREIDIS *et al.*, 2012).

Um trabalho realizado por Zhang e colaboradores revelou que o tratamento de leitões gnotobióticos com *Lactobacillus acidophilus* gera um aumento significativo da resposta de células B e células T em resposta à infecção com rotavírus atenuado. Contudo, o efeito deste tratamento em humanos é desconhecido, uma vez que seu trato gastrintestinal é rapidamente colonizado após o nascimento (ZHANG *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

As gastroenterites infantis constituem um dos principais problemas de saúde pública, sendo causa de altos índices de morbidade e mortalidade em neonatos e lactentes em todo o mundo. A gastroenterite pode ser considerada deste modo, uma doença muito importante, de grande impacto para a saúde pública. A rotavirose humana representa uma das principais causas de gastroenterite grave em neonatos e crianças menores de cinco anos em todo mundo, representando cerca de 30 a 50% das mortes causadas por diarreias. Nos Estados Unidos, o *Rotavirus* é o agente mais comum em doenças gastrintestinais em neonatos, constituindo-se numa das principais causas de morbimortalidade na faixa etária de zero a cinco anos em países desenvolvidos e subdesenvolvidos. A rotavirose humana apresenta maior relevância estatística em países em desenvolvimento, uma vez que as taxas de pobreza da população são bastante elevadas e o acesso a recursos terapêuticos é limitado.

O tratamento da gastroenterite causada pelos rotavírus baseia-se no tratamento de suporte, instituindo-se a reposição de água e eletrólitos, reestruturando o equilíbrio hidroeletrólítico.

A reduzida qualidade de saneamento básico e as condições sanitárias tem sido um importante fator para a transmissibilidade e propagação deste agente, principalmente em países em desenvolvimento. O adequado tratamento de efluentes e as condições de saneamento são, portanto, algumas das formas mais eficazes de contenção de novas infecções.

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido dada à modulação da microbiota intestinal normal por adjuvantes microbianos vivos chamados de probióticos. A grande vantagem da terapia com os probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes quando antibióticos são usados. Os efeitos benéficos destes microrganismos são basicamente os mesmos da microbiota normal do corpo humano.

Existe, atualmente, uma grande variedade de bactérias utilizadas como probióticos, como as bifidobactérias e os lactobacilos. A única levedura disponível no mercado para uso como probiótico em seres humanos é a *Saccharomyces boulardii*, que aumenta a resistência do ecossistema intestinal contra infecções patogênicas e *Saccharomyces cerevisiae*, utilizado como um probiótico na alimentação de animais.

Sabe-se que uma das principais ações, preconizada pela Organização Mundial da Saúde, é o estudo e desenvolvimento de novas terapias que não atuem como uma forte pressão seletiva. A pressão seletiva propicia a seleção de patógenos cada vez mais agressivos e resistentes, a exemplo dos antibióticos, quando são utilizados. Sabemos que há muitas diferenças nas linhagens de *S. cerevisiae*, mas somente algumas poucas têm tido suas características probióticas comprovadas. Estudos realizados por MARTINS *et al.* (2005, 2007 e 2010) mostraram que a *S. cerevisiae* linhagem UFMG A905, isolada em produto intermediário da produção da cachaça, foi capaz de colonizar e sobreviver no trato gastrointestinal de camundongos convencionais e isentos de germes, e de proteger estes animais contra infecção experimental com *Salmonella Typhimurium* e *Clostridium. difficile*.

O uso de probióticos como coadjuvantes para o tratamento de infecções pelo rotavírus tem sido bastante difundido no mundo moderno. O uso de probióticos, de acordo com a literatura tem reduzido o tempo de diarreia, a transmissibilidade do vírus, devido à redução da carga viral e o aumento da ação de anticorpos do tipo IgA. Diversos estudos apontam a eficácia dos

probióticos na redução de diarreias infecciosas e de diversas etiologias, doenças inflamatórias intestinais, dentre outros.

Vale ressaltar que pouco se sabe a respeito dos mecanismos de ação dos probióticos na redução da diarreia e da carga viral nos casos de rotavirose humana. Diante da importância destes mecanismos para o entendimento da ação dos probióticos e de seus benefícios para a saúde humana, e, considerando a carência de estudos aplicados neste campo, justificou-se a realização deste trabalho, com o objetivo de se verificar a ação e as propriedades probióticas das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A905 e *Saccharomyces boulardii*, diante da infecção experimental induzida pelo *Rotavirus* em modelo experimental murino.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os mecanismos de ação dos probióticos *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A905 e *Saccharomyces boulardii* no tratamento da infecção induzida por *Rotavirus* em modelo experimental murino.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Avaliar por exame histopatológico a ação probiótica das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A905 e *Saccharomyces boulardii* no trato gastrintestinal de camundongos convencionais infectados pelo *Rotavirus* da linhagem SA11.

3.2.2. Avaliar a capacidade de inibição da perda de peso em camundongos Balb/C infectados pelo *Rotavirus* SA11 e tratados com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A905 e *Saccharomyces boulardii*.

3.2.3. Avaliar por ensaios de ELISA o efeito probiótico das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A905 e *Saccharomyces boulardii* sobre a resposta imune intestinal

analisando as seguintes citocinas e quimiocinas em camundongos Balb/C convencionais, após a infecção pelo *Rotavirus*: KC, IL-1 β , IL-10 e eotaxina/CCL11;

3.2.4. Avaliar os níveis das enzimas NAG e MPO em tecido intestinal e pulmonar de animais infectados pelo *Rotavirus* na presença ou não dos probióticos;

3.2.5. Avaliar por PCR quantitativa a expressão da citocina Osteopontina em tecido intestinal de animais infectados pelo *Rotavirus* na presença ou não dos probióticos;

3.2.6. Avaliar os níveis de imunoglobulinas sIgA no conteúdo intestinal de camundongos convencionais após a infecção pelo *Rotavirus* da linhagem SA11, tratados ou não com os probióticos;

4. METODOLOGIA

4.1. Células MA104

As células da linhagem MA104, derivadas de rim fetal de macaco Rhesus (*Cercopithecus aethiops*) foram obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Estas células são amplamente utilizadas com sucesso para crescimento e caracterização de rotavírus de origem humana e animal, e foram utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho.

Alíquotas de células MA104 (figura 7) foram descongeladas e cultivadas em frascos de 75 cm², a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após o descongelamento, as células foram ressuspensas em 15 mL de DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 48h. Após apresentarem confluência, as células foram tripsinizadas (solução tripsina-EDTA 1,5%) e centrifugadas a 1200 rpm. O precipitado foi ressuspensado em DMEM suplementado e subcultivadas em uma taxa de 1:5 e transferido para frascos de 75 cm². Para realizar os procedimentos de expansão do vírus, as células foram subcultivadas para frascos de 150 cm² e infectadas quando apresentavam monocamadas com 80-90% de confluência.

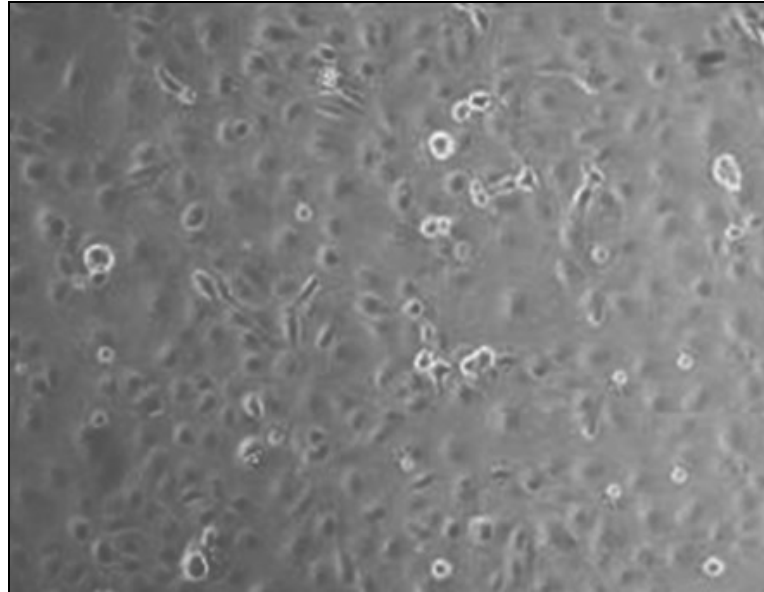


Figura 7. Monocamada de células MA104. Adaptado de American Type Culture Collection 2011.

4.2. Vírus Símio da linhagem SA11

4.2.1. *Rotavírus* Símio SA11 (Amostra cedida pelo Instituto Evandro Chagas, FIOCRUZ PA)

Na primeira fase do projeto, uma alíquota do *Rotavírus* símio da linhagem SA11 foi gentilmente cedida pelo Dr. Alexandre da Costa Linhares, do Instituto Evandro Chagas, Fiocruz-PA (IEC-PA). Para expansão, a alíquota de rotavírus SA11 foi ativada com 10 µg/mL de tripsina em um tubo cônico de 15 mL. A mistura foi vortexada e incubada por 30 minutos (min.) em banho-maria a 37°C, para promover a ativação do rotavírus. O inóculo do vírus foi então distribuído em monocamadas de células MA104 (*fetal monkey kidney epithelial cells*) cultivadas em frascos de cultura, de 150 cm² (Sarstedt®). Para adsorção do vírus à monocamada, os frascos foram incubados por 1h em estufa a 37°C e CO₂ a 5%, com movimentação periódica do líquido, a cada 15 minutos. Após este período, o inóculo foi cuidadosamente retirado e a monocamada foi coberta com 25 mL de DMEM suplementado com tripsina-EDTA (numa concentração final de 1,0 µg/mL) e isento de soro fetal bovino. Os frascos foram então incubados por 72h, até que o efeito citopático atingisse toda a monocamada. Após este período, observado o efeito citopático, para que toda a monocamada

fosse destacada, as culturas infectadas foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento. O volume final de líquido obtido foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e centrifugados a uma velocidade de 300 x g, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante clarificado foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, identificado, aliquotado e armazenado em *freezer* a -80°C até o momento de seu uso.

4.2.2. *Rotavírus* símio SA11 (Amostra cedida pela Universidade Estadual de Londrina, PR)

Na segunda fase do trabalho, uma alíquota do *Rotavírus* símio da linhagem SA11 foi gentilmente cedida pela Prof^ª Dr^ª Alice Fernandes Alfieri, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UEL, PR). Para expansão, a alíquota de rotavírus SA11 foi ativada com a adição 30 µg de Tripsina ao volume de 1 mL de Inóculo em um tubo cônico de 15 mL. A mistura foi vortexada e incubada por 30 minutos (min.) em banho-maria a 37°C, para promover a ativação do rotavírus. A mistura foi diluída, de modo que a concentração fina de tripsina não ultrapassasse 10 µg/mL, para tanto, foram adicionados 2,0 mL de meio de cultivo obtendo um total de 3 mL de inóculo. A garrafa contendo uma monocamada de células MA104 foi lavada 2x com DMEM sem Soro Fetal Bovino (SFB). O inóculo do vírus foi então distribuído na monocamada de células MA104 cultivadas em frascos de cultura, de 75 cm² (Sarstedt®). Para adsorção do vírus à monocamada, o frasco foi incubado por 3h em estufa a 37°C e CO₂ a 5%, em agitação lenta, em homogeneizador automático. Após as 3 h, foram incluídos 20 mL meio de manutenção contendo 0,5 µg de Tripsina e isento de SFB. Os frascos foram então incubados por 48h. Após este período, observado o efeito citopático, para que toda a monocamada fosse destacada, as culturas infectadas foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento. O volume final de líquido obtido foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e centrifugados a uma velocidade de 300 x g, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante clarificado foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, identificado, aliquotado e armazenado em *freezer* a -80°C até o momento de seu uso.

4.2.3. Verificação da presença do vírus no sobrenadante clarificado

Para verificar a presença do vírus nas amostras obtidas (clarificado), o RNA de dupla fita segmentado do vírus foi extraído com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (*UltrapureTM Phenol: Chloroform: Isoamyl Álcool*, Invitrogen). Para tanto, 500 µL de sobrenadante clarificado de células infectadas foram aliqüotados em tubos plásticos de 1,5 ml (Eppendorff®) onde foram adicionados 500 µL de tampão de lise (SDS 10% p/v, EDTA 110 mM pH 7,8). A mistura foi submetida a um ciclo de agitação em *vórtex* (GENIE BENDER, modelo K – 550G - EUA) e incubada a 55°C por 15 minutos. Após a incubação foram adicionados 500 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (na proporção de 50:48:2) e o mesmo foi submetido a três ciclos de agitação em *vórtex* (GENIE BENDER, mod.K – 550G - EUA) com intervalos de 30 segundos e colocados em banho-maria por 10 min., centrifugado e a fase proteica foi cuidadosamente retirada com micropipeta de 100 µL. Em seguida, uma extração adicional foi executada apenas com clorofórmio. A fase superior foi recolhida e foram adicionados acetato de sódio 3M, pH 5,2 em volume igual a 10% do volume final e juntamente com 2,5 volumes de etanol resfriado (-20°C). Os tubos foram mantidos a -20°C por uma noite para precipitação do RNA. O precipitado obtido foi centrifugado a 20.000 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e ao precipitado foram adicionados 100 µL de etanol a 80% para retirada do excesso de salinidade. Os tubos contendo o RNA foram emborcados em papel absorvente e logo depois foram diluídos em 35 µL de tampão de amostra (TRIS-HCl 62,5 mM pH 6,8; ureia 5M; beta-mercapto-etanol 5%; dodecil-sulfato de sódio 3% e 0,01% de azul de bromofenol). As amostras foram aquecidas a 56°C por 15 minutos e submetidas a eletroforese em gel de descontinuidade de pH de Laemmli (Gel de concentração a 4%, Tris 0,5M, pH6,6 e gel de resolução a 7%, 1,5M, pH8,8) em tampão tris-glicina (Tris 25mM, glicina 0,2M, pH8,6). As amostras foram corridas em 100v por aproximadamente 4h.

Após a eletroforese, o gel é FOI corado pelo método da prata para a visualização das bandas de RNA (HERRING et al, 1982). Para tanto, o gel foi rapidamente lavado em água bidestilada e fixado por uma hora em etanol 10% e ácido acético a 0,5%. A seguir, foram realizadas duas lavagens de cinco minutos em etanol aquoso (etanol 10%) e, em seguida, foi adicionada uma solução de prata 0,11M em câmara escura e o gel colocado em uma plataforma de agitação em velocidade lenta, protegido da luz, por aproximadamente uma hora. Após este período,

foram realizadas duas lavagens rápidas em água bidestilada, e foi cuidadosamente adicionada a solução reveladora (NAOH 1M - 250 ml, formaldeído - 2,0 ml) certificando-se para que não fosse adicionada diretamente sobre o gel. A interrupção da revelação foi feita com a mesma solução utilizada na fixação (etanol 10% e ácido acético a 0,5%), após a visualização da intensidade desejada. O gel foi conservado em etanol 10% e posteriormente submetido à leitura. A amostra obtida do IEC/PA foi comparada a uma alíquota obtida no ICB/UFMG e a uma amostra extraída de controle de células não infectadas.

4.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

4.3.1. Análise *in silico*

As análises *in silico* dos iniciadores foram feitas a partir da sequência da proteína VP7 de *Rotavirus* (acesso *Genebank*: **X66158.1**, utilizando-se o programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) para determinar as melhores condições de amplificação pela PCR. A proteína VP7 é codificada pelo segmento gênico conservado de *Rotavirus* (segmento 9) e sua especificidade foi avaliada com auxílio do programa BLAST (WWW.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Os iniciadores foram ancorados no gene codificando um amplicon de 94pb. Para a normalização, os iniciadores foram ancorados no gene NM_008084.2 (*Mus musculus* GAPDH - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* - mRNA), Amplicon de 97pb (Tabela 1).

Tabela 1: Iniciadores, orientação e tamanho esperado do *amplicon* do gene da região codificadora VP7 do *Rotavirus* do grupo A, linhagem SA11 e do normalizador GAPDH.

Iniciadores	Acesso no GenBank e orientação	Tamanho do amplicon
Antisenso VP7 (RVA-R) 5'- GTC AAG CAT CCA ATT CCA AG - 3'	RVA-VP7 X66158.1	94pb
Senso VP7 (RVA-F) 5'- GTG ACG AAG CGA ATA AAT GG - 3'	RVA-VP7 X66158. 1	94pb
Antisenso GAPDH 5'- ACT CCA CTC ACG GCA AAT TC - 3'	GAPDH (AJ786261) (367-463)	97pb
Senso GAPDH 5'- GAA TTT GCC GTG AGT GGA GT - 3'	GAPDH (AJ786261) (367-463)	97pb

4.3.2. Extração do RNA viral utilizando o Trizol

A extração do RNA viral foi realizada utilizando o Trizol (Invitrogen®) segundo as recomendações do fabricante com modificações. Resumidamente, após o cultivo celular, as células onde os vírus foram multiplicados foram congeladas e descongeladas por três ciclos e processadas para a obtenção de RNA. O conteúdo da lise celular causada pelo congelamento/descongelamento foi centrifugado a 1800 rpm (Jouan BR4i, FR- Rotor falcon AB 50) por 5 minutos 18°C para remoção de debris celulares. Após a centrifugação o sobrenadante contendo o vírus foi alíquotado e armazenado em *freezer* -80°C. Alíquotas de 500µL do RVA-SA11 foram separadas e adicionadas 1mL do reagente Trizol (Invitrogen®). Após a homogeneização e incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, foi adicionada 200µL clorofórmio 100% (Merck®) com agitação vigorosa por 15 segundos e incubação a temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas (MicroCL 17R

ThermoFisher Scientific, EUA) a 12000 x g por 15 minutos a 4°C, foi obtida uma mistura trifásica, uma fase aquosa transparente superior, uma interfase branco-leitosa e uma fase vermelho claro inferior (fenol-clorofórmio). À fase fenol-clorofórmio contendo o RNA viral foram adicionados 300µL de álcool etílico 100% (Merck®), homogeneizado por inversões e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugação 2000 x g (MicroCL 17R ThermoFisher Scientific, EUA) por 5 minutos 4°C, remoção da fase fenol-clorofórmio por inversão e lavagem do RNA viral 2X com solução de citrato tri-sódio (0,1M)/10% álcool etílico; entre cada lavagem, foi efetuada a incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se o material a 2000 x g (Micro CL 17R ThermoFisher Scientific, EUA) por 5 minutos 4°C, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 1,5mL de álcool etílico 75% (Merck®). Após a incubação por 20 minutos a temperatura ambiente, o RNA foi dissolvido em 150 µL de NaOH (8mM), 260µL de T.E. (Tampão EDTA 1X) e 2X o volume de álcool isopropílico, seguido da centrifugação a 12000 x g (MicroCL 17R ThermoFisher Scientific, EUA) por 10 minutos. Após secagem do RNA ao ar livre, ele foi ressuspendido em 20µL de água livre de nuclease.

4.3.3. Extração de RNA viral de amostras fecais utilizando-se o *kit* QIAmp® Viral RNA Mini Kit.

Inicialmente, antes da utilização do *kit*, as fezes coletadas de cada animal foram processadas utilizando-se *beads* de óxido de zircônio de 0,150 mm e PBS. A mistura de *beads*, fezes e PBS foram vortexada e um volume de fezes diluídas foi obtido, num total de aproximadamente 300µL. Um volume de 140 µL do líquido resultante foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5mL e foram adicionados 200 µL de uma solução de NaCl a 0,89%. A solução foi clarificada por centrifugação por 20 minutos a 4000 x g e o sobrenadante foi utilizado para purificação de RNA viral, de acordo com o *QIAamp® Viral RNA Mini Kit Handbook* (Qiagen®).

4.3. Transcrição reversa e amplificação por PCR convencional.

4.3.1. Transcrição reversa

Para a transcrição reversa, 100ng (5,0 μ L) de RNA total foi adicionada a 1,0 μ g de iniciadores específicos (RVA-F senso, 0,5 μ L e RVA-R antissenso, 0,5 μ L na concentração de 10pM cada) e água um volume final de 8 μ L. A mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos e logo depois resfriadas a 4°C por pelo menos 10 minutos. Após este tempo, as amostras foram retiradas do termociclador e rapidamente transferidas para um banho de gelo. A reação de transcrição reversa foi realizada em um volume final de 20 μ L, sendo 4,0 μ L de tampão 5X MMLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*); 1,5 μ L de dNTP-mix 10mM; 2,0 μ L de dTT 0,1M; 1,0 μ L de MMLV e água suficiente para 12 μ L. A mistura foi aquecida a 42°C por 1h e depois a 72°C por pelo menos 15 minutos.

4.3.2. Amplificação por PCR gradiente e otimização da amplificação

Para a realização da PCR convencional, 2,0 μ L do cDNA resultante da reação foram misturados a 2,0 μ L de tampão 10x; 1,2 μ L de MgCl₂ 1,5mM; água suficiente para 18 μ L; 1,0 μ L de iniciadores específicos RVA-F e RVA-R, 10pM; 0,4 μ L de dNTP mix e 0,3 μ L de *Taq* polimerase. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 20 μ L em termociclador de DNA (Biorad) com o seguinte programa: um ciclo de desnaturação de 94°C por 45 segundos, o anelamento ocorreu em temperaturas que variaram entre 50-60°C durante 1 minuto e extensão a 72°C por 45 segundos para um total de 35 ciclos (Figura 8).

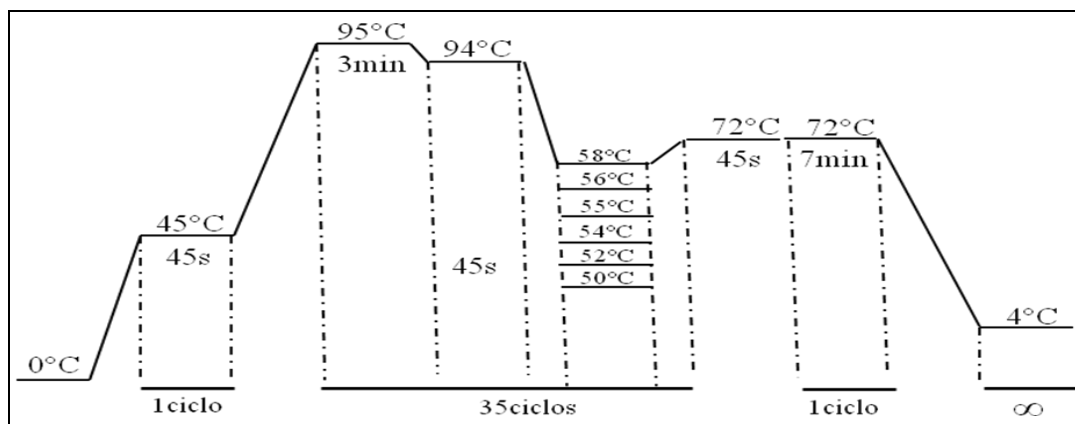


Figura 8. PCR convencional com gradiente de temperatura.

Após a definição da melhor temperatura de anelamento para os iniciadores utilizados, reações com diferentes concentrações de cloreto de magnésio (1,5mM, 1,75mM e 2,0mM) foram preparadas com a finalidade de aumentar a quantidade de amplicon gerados nas reações. Além disso, foram testadas as concentrações para o gene normalizador GAPDH (5pM ou 2.5pM).

4.3.3. Amplificação por PCR Convencional

Para a realização da PCR convencional, 2,0 μ L do cDNA resultante da reação foram misturados a 2,0 μ L de tampão 10x; diferentes concentrações de 1,2 μ L de $MgCl_2$ 1,5mM; água suficiente para 18 μ L; 1,0 μ L de iniciadores 10pM; 0,4 μ L de dNTP mix 10mM e 0,3 μ L de *Taq* polimerase. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 20 μ L em termociclador de DNA (Biorad) com o seguinte programa: um ciclo de desnaturação de 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C durante 1 minuto e extensão a 72°C por 45 Segundos para um total de 35 ciclos (Figura 9).

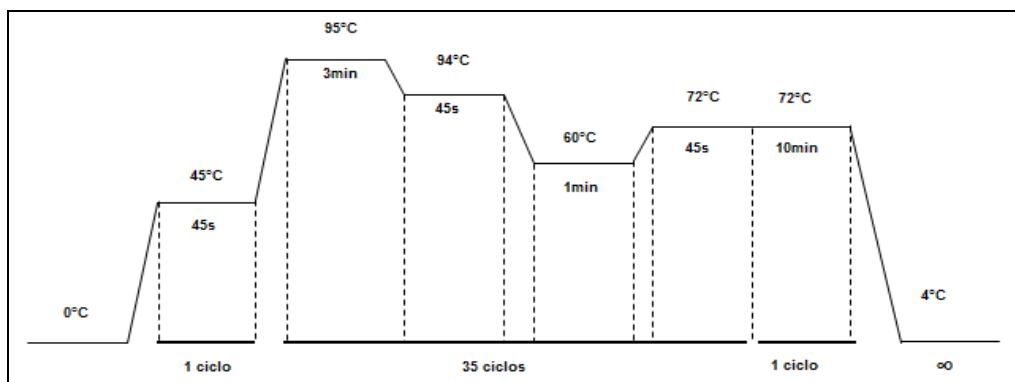


Figura 9: Gráfico das temperaturas utilizadas na PCR convencional

4.3.4. Clonagem em vetor plasmidial

Com o objetivo de construção de uma curva de DNA plasmidial para funcionar como uma curva padrão em experimento de qRT-PCR, posteriormente à amplificação do RNA da amostra viral pela PCR, foi realizada eletroforese (Loccus Biotecnologia, BR) em gel de agarose 1,5% (Invitrogen®) corado com brometo de etídeo (Invitrogen®) e visualizado em transiluminador UV (UVP®, UK). O produto de tamanho esperado foi recortado do gel de

agarose e purificado. A purificação do RNA foi realizada por meio do congelamento do gel de agarose triturado contendo o DNA por 24h a -80°C e centrifugação a $14.000 \times g$ (MicroCL 17R ThermoFisher Scientific, EUA) por 5 minutos (*freeze-squeeze*; TAUTZ & RENZ, 1983). O sobrenadante contendo o RNA purificado foi utilizado para clonagem em vetor plasmidial *pGEM-T easy* (Promega) (Figura 10). A ligação do inserto ao plasmídeo *pGEM-T easy* foi realizada utilizando $5 \mu\text{L}$ do DNA purificado do passo anterior, $7,5 \mu\text{L}$ do tampão *2x Rapid Ligation*, $1,0 \mu\text{L}$ do vetor *pGEM-T easy* e $1,5 \mu\text{L}$ da enzima *T4 DNA ligase*. A incubação foi realizada por 1 hora à temperatura ambiente seguida da incubação *overnight* a 4°C e posterior transformação bacteriana.

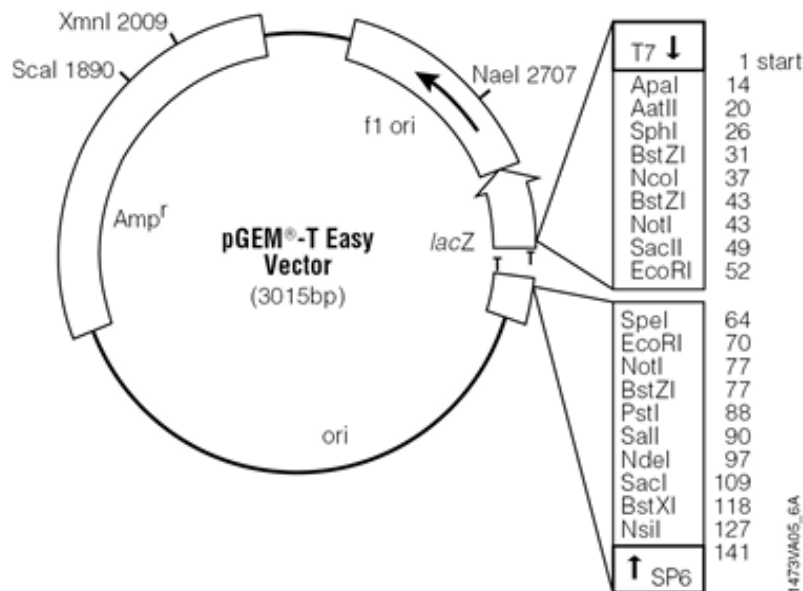


Figura 10. Mapa do vetor plasmidial Pg EM[®]-T Easy Vector (Promega) utilizado para a clonagem do amplicon VP7 a partir dos iniciadores descritos na Tabela 1.

4.3.5. Transformação bacteriana

A transformação em bactéria quimicamente competente *Escherichia coli* XL10 *gold* (Invitrogen[®]) foi realizada adicionando o produto da ligação do passo anterior em $100 \mu\text{L}$ de *E. coli* XL10 competente, incubando 20 minutos no gelo e posteriormente sendo efetuado o choque térmico a 42°C por 50 segundos e incubação no gelo novamente por 2 minutos. A bactéria transformada foi transferida para um tubo de 15mL contendo $900 \mu\text{L}$ de meio *Luria Bertani* (LB) (Extrato de levedura 0,5% p/v, Triptona 0,1% p/v, NaCl 0,5% p/v, H₂O q.s.p), incubada por 90 minutos a 37°C , na velocidade de 150 rpm em agitador orbital (Thermo

Scientific, EUA). Posteriormente foram plaqueados 100 μ L da cultura bacteriana em placas de Petri com meio LB ágar (Ágar 1,5% p/v), contendo x-Gal 25 μ g/mL (Invitrogen®) e ampicilina na concentração final 100 μ g/mL. Após a incubar 37°C em estufa por 24 horas, foram selecionadas as colônias de coloração branca.

4.3.6. Extração plasmidial em pequena escala

As colônias selecionadas foram multiplicadas em 10 mL meio LB com ampicilina na concentração final de 100 mg/mL por 16 horas. Posteriormente foram separados 4 mL da cultura bacteriana em tubo de 15 mL para a extração do plasmídeo recombinante Seguida de centrifugação a 1000 x g (MicroCL 17R Thermo Scientific, EUA) por 10 minutos a 25°C para precipitar as bactérias contendo o plasmídeo. Após ser ressuspensionado o sedimento em 200 μ L da solução GET/RNase (9g de glicose; 2,5 mL de TRIS-HCl 1M; 5mL de EDTA 0,2M; RNase 10 mg/mL (Invitrogen®), adicionou-se 400 μ L da solução de lise (5 mL de dodecil sulfato de sódio –SDS 20%; 2 mL de NaOH 10M) e 400 μ L da solução neutralizante (13g de acetato de sódio em 100 mL de solução; pH4,8). A mistura foi homogeneizada suavemente e o conteúdo transferido para um microtubo de 1,5 mL, seguido de incubação no gelo por 30 minutos. Após centrifugação a 10000 x g por 15 minutos 8°C, o conteúdo foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e foram adicionados 600 μ L de álcool isopropílico, homogeneizada a mistura e novamente centrifugada a 10000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e ao mesmo adicionou-se 500 μ L de álcool etílico 70% (Merck®), homogeneizou-se e centrifugou-se a 10000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi ressuspensionado em 20 μ L de água livre de nuclease. Dosou-se a concentração do plasmídeo recombinante em aparelho *NanoDrop* (NanoDrop Technologies, EUA) e armazenou-se a -20°C.

4.3.7. Reação de restrição enzimática - enzima EcoRI.

Após a extração do DNA plasmidial o material foi submetido a leitura espectrofotométrica e logo depois foi realizada reação de restrição enzimática com auxílio da enzima EcoRI. A reação foi feita a partir de 200ng de material para uma reação de 10 μ L. A cada clone foram adicionados 1,0 μ L de *Buffer* H; 0,5 μ L de soroalbumina bovina; 0,5 μ L da enzima EcoRI e

volume pré-calculado do clone, com base em 200 ng de DNA plasmidial. Ao final, foi adicionado para todos os tubos, um volume de água suficiente para 10 µL. A mistura foi incubada por 2h a 37°C em aparelho termociclador termoblock (*Amplifron Thermal Cycler*, Thermolyne®). Após o aquecimento, as amostras foram inativadas por aquecimento a 65°C por 15 minutos e logo depois, foram incubadas, *overnight*, a -20°C.

Para verificar o resultado da reação de restrição enzimática, catalisada pela enzima de restrição EcoRI, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio, sob uma corrente de 100v. As amostras foram misturadas em tampão de amostra e TBE e pareadas cada reação de restrição ao seu respectivo clone de origem.

4.3.8. Sequenciamento

As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. Valid Biotechnology (www.validbiotech.com). Para análise dos dados AB1 foi utilizado o *software Sequence Scanner Software* (Applied Biosystems), disponível no link: <https://www.lifetechnologies.com/us/en/home/technical-resources/software-downloads/sequence-scanner-software.html?icid=fr-cesoftware-5>.

4.3.9. Amplificação por qRT-PCR (PCR quantitativa)

A PCR quantitativa foi utilizada em dois experimentos distintos com o objetivo de: (1) medir por quantificação relativa a concentração de citocinas presentes em amostras de tecido intestinal coletadas de camundongos Balb/C após quatro dias de infecção pelo rotavírus SA11 e; (2) medir diariamente, por quantificação absoluta, a carga viral do rotavírus nas fezes de camundongos, submetidos ou não ao tratamento com as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG A905.

Para o experimento de quantificação de citocinas, cada cDNA obtido a partir do processamento do intestino delgado foi analisado por qRT-PCR, em duplicata, para quatro genes alvo da citocina Osteopontina (Tabela 2) e dois controles negativos foram incluídos nas

análises. Para cada placa analisada foi incluída a análise do gene de referência 18S. Em relação à carga viral, os dados foram obtidos a partir dos RNAs extraídos das fezes coletadas 24, 48 e 72h após a infecção com ou sem o tratamento com as leveduras. Para determinar a eficiência da amplificação e sensibilidade do teste, foram utilizadas as diluições plasmidiais descritas nos itens 4.3.6 e 4.3.7 da metodologia. Foram analisados cada grupo experimental e os controles negativos, nos respectivos dias de experimento, em triplicata.

Todos os experimentos foram realizados em um detector *FAST Real Time PCR System 7900 HT (Applied Biosystems)*. Para uma reação de 10µL, foram utilizados, por reação, um volume de 0,2 µL de iniciadores senso 10pM, 0,2 µL de iniciadores antissenso 10pM (Gene VP7, tabela 1; e genes das citocinas, tabela 2), 5 µL de *SYBR Green*, 1 µL de *Rox* e 1,6 µL de água livre de RNase e 2 µL de cDNA. A reação foi realizada sob as seguintes condições: Estágio 1 (10 min. a 95°C); Estágio 2 (40 ciclos de 95C, por 15 segundos e 60°C por 1 minuto); Estágio 3 (95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos) e um estágio final de 95°C por 15 segundos.

Tabela 2: Iniciadores, orientação e tamanho esperado do *amplicon* do gene da quimiocina Osteopontina e do gene normalizador 18S.

Iniciadores	Tamanho do amplicon
Antissenso Osteopontina 5'-GAGCTGCCAGAATCAGTCACTTT-3'	76pb
Senso Osteopontina 5'-GATTGGCAGTGATTTGCTTTTG-3'	76pb
Antissenso 18S 5'-CGTTCCACCAACTAAGAACG-3'	110pb
Senso 18S 5'-CGTTCCACCAACTAAGAACG-3'	110pb

4.4. Semi-purificação e do *Rotavirus* SA11 em colchão de Sacarose

Para a realização de experimentos *in vitro*, uma alíquota de 35 mL de vírus clarificado foi colocada em cada um de seis tubos de ultra centrífuga. Utilizando-se uma pipeta, um volume de 2 mL de sacarose a 35% foi adicionado sob o vírus clarificado. A amostra foi centrifugada por uma hora e trinta minutos a 100.000 xg a 4°C em rotor SW32Ti para formar o precipitado de vírus. Após este período, o sobrenadante foi apropriadamente descartado e o sedimento resultante ressuspendido em 1 mL de tampão TNC (Tris-HCL 1 M, pH8,0; NaCl 5M; CaCl₂ 1M e água deionizada). As alíquotas foram estocadas em freezer -80°C até o momento do uso.

4.5. Titulação do Rotavirus

4.5.1. Titulação do Rotavírus por Formação de Foco de Fluorescência (FFU/mL)

Para a titulação do rotavírus SA11 por ensaio de foco de fluorescência, células MA104 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de $6,4 \times 10^3$ células por poço. As células foram incubadas por quatro dias em DMEM completo, contendo 5% de soro fetal bovino e 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, as células foram cuidadosamente lavadas, com o auxílio de um pipetador multi-canal, utilizando-se 200µL DMEM pré-aquecido. Após a segunda lavagem foram adicionados 100 µL de DMEM não suplementado, pré-aquecido, contendo tripsina na concentração de 1µg/mL. Para titulação, uma alíquota do vírus foi descongelada em banho de gelo.

A amostra foi ativada pela mistura de 200 µL de rotavírus SA11 com 1,0 µL de tripsina na concentração de 2mg/mL, ajustado para uma concentração final de 10 µg/mL. A mistura de vírus foi incubada por 1h a 37° em banho úmido. Foi realizada diluição seriada na base 10 até a diluição de 10⁻⁸. Um volume de 100 µL de cada diluição foi adicionado a cada poço. A placa foi incubada por 1h a 37°. Após este tempo, o inóculo foi removido e foram adicionados 200 µL de DMEM suplementado com soro fetal bovino e incubada por 18h a 37°C. Após a incubação a monocamada foi lavada com um volume de 200 µL de PBS 1x e logo depois fixada com metanol 100% (Merck). A placa foi incubada por 2 minutos à temperatura ambiente e novamente lavada com PBS 1x.

Após a lavagem com PBS foram adicionados 50 μ L de anticorpo anti-RVA (Rotavirus capsid (2B4): sc101263 – Anti-VP6, *Santa Cruz Biotechnology, Inc*) diluído em PBS contendo 3% de soro-albumina bovina. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente submetido à movimentação suave e constante. O excesso de anticorpo primário foi removido e a monocamada lavada duas vezes com 200 μ L de PBS 1x. Após a última lavagem, foram adicionados 50 μ L de anticorpo secundário *IgG anti-mouse* conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína - *Goat Anti-Mouse IgG H&L*) (*Invitrogen*) diluído em PBS contendo 3% de soroalbumina bovina. A placa foi novamente incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e submetida à movimentação suave e constante. O excesso de anticorpo secundário foi removido e a monocamada lavada 4 vezes com PBS 1x.

4.5.2. Titulação do *Rotavirus* por TCID₅₀

Para a titulação do rotavírus SA11 por TCID₅₀, células MA104 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 4×10^4 células por poço. As células foram incubadas por três dias em DMEM completo, contendo 5% de soro fetal bovino e incubado a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as células foram cuidadosamente lavadas, utilizando-se 200 μ L de DMEM pré-aquecido. Após a terceira lavagem foram adicionados 200 μ L de DMEM não suplementado, pré-aquecido, contendo tripsina na concentração final de 0,5 μ g/mL. Para titulação, uma alíquota do vírus foi descongelada em banho de gelo. A amostra foi ativada com a adição 30 μ g de Tripsina ao volume de 1,0 mL de Inóculo em um tubo cônico de 15 mL. A mistura foi vortexada e incubada por 30 minutos (min.) em banho-maria a 37°C, para promover a ativação do rotavírus. A mistura foi diluída, de modo que a concentração fina de tripsina não ultrapassasse 10 μ g/mL, para tanto, foram adicionados 2,0 mL de meio de cultivo obtendo um total de 3,0 mL de inóculo. A placa contendo uma monocamada de células MA104 foi lavada com DMEM sem Soro Fetal Bovino (SFB).

Uma alíquota de 100 μ L da amostra foi diluída seriadamente (10^{-3} a 10^{-7}), em meio DMEM não suplementado e 0,5 μ g/mL de tripsina. Foram inoculados 100 μ L de cada diluição, sendo um total de oito poços por diluição. À placa foram adicionados controle positivo (célula e vírus não diluídos) e controle negativo, onde era utilizado apenas meio DMEM não suplementado e 0,5 μ g/mL de tripsina sobre as células. O inóculo do vírus foi então distribuído na monocamada de células. Para adsorção do vírus à monocamada, o frasco foi incubado por

3h em estufa a 37°C e CO₂ a 5%, sob agitação lenta em homogeneizador automático. Após as 3 horas foi adicionado meio de manutenção contendo 0,5 µg de Tripsina e isento de SFB. As placas foram então incubadas por 48h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Ao final deste período, as células foram examinadas em microscópio óptico invertido para determinação do título viral.

4.5.3. Titulação do *Rotavírus* por Ensaio de placa (UFP/mL)

Para a titulação do rotavírus SA11 por ensaio de placa, células MA104 foram cultivadas em placas de 6 poços a uma densidade de $3,0 \times 10^5$ células por poço. As células foram incubadas por cinco dias em DMEM completo, contendo 5% de soro fetal bovino e 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, as células foram cuidadosamente lavadas, utilizando-se 2 mL de DMEM pré-aquecido. Após a terceira lavagem foram adicionados 2,0 mL de DMEM não suplementado, pré-aquecido, contendo tripsina na concentração de 1µg/mL. Para titulação, uma alíquota do vírus foi descongelada em banho de gelo.

A amostra foi ativada pela mistura de 400 µL de rotavírus SA11 com 2,0 µL de tripsina na concentração de 2mg/mL, ajustado para uma concentração final de 10 µg/mL. A mistura de vírus foi incubada por 1h a 37° em banho úmido. Foi realizada diluição seriada na base 10 até a diluição de 10⁻⁷ iniciando em 10⁻³. Um volume de 1000 µL de cada diluição foi adicionado a cada poço. A placa foi incubada por 1h a 37°. Após este tempo, o inóculo foi removido e foram adicionados 2000 µL de DMEM não suplementado com soro fetal bovino e incubada por 1h a 37°C. Após a incubação a monocamada foi lavada com um volume de 2 mL de PBS 1x.

Uma mistura de carboximetil celulose e MEM 2x contendo 0,5µg de tripsina foi preparada. O meio de cultura foi retirado da placa e 3,0 mL da mistura foram cuidadosamente adicionadas a cada poço. A placa foi cuidadosamente movimentada para permitir a incorporação de toda mistura nos poços. Após a solidificação da mistura, as placas foram incubadas a 37°C por três dias.

Após a incubação uma mistura de carboximetilcelulose e EMEM 2x contendo 50µg/mL de vermelho neutro foi produzida e 2,0mL foram adicionados sobre a primeira camada de

carboximetilcelulose. A placa foi coberta com papel alumínio para proteger da luz e incubada a 37°C por 24h.

4.5. Leveduras

A levedura *S. cerevisiae* UFMG A905 foi cedida pelo Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A linhagem foi identificada e classificada como *S. cerevisiae* utilizando o programa YEASTCOMPARE (CIRRIELLO e LACHANCE, 2001). A levedura *S. boulardii* foi cedida pela MERCK indústrias farmacêuticas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (Floratil®).

As linhagens foram mantidas em meio contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 25% de glicerol e conservadas a -80 °C, em tubos criogênicos de 2 ml. Para todos os experimentos as leveduras foram crescidas em meio YPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), a 37°C, por 24 h, sob agitação constante (150 rpm) em agitador *Shaker* (CT712, Cientec), para as leveduras *S. cerevisiae* UFMG A905 e *S. boulardii*. As leveduras foram concentradas para se obter uma concentração de 10⁹ unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

4.6. Animais

Durante o período do trabalho, foram utilizados animais de três idades distintas: camundongos neonatos de sete dias de idade (RIEPENHOFF-TALT *et al.*, 1982; GOUVEIA *et al.*, 1986; WARD *et al.*, 1990; PREIDIS *et al.*, 2012), camundongos de 21 dias e camundongos de 15 dias de idade, todos convencionais da linhagem Balb/C, de ambos os sexos.

Para obtenção dos animais neonatos foram formadas colônias de animais de ambos os sexos. Para tanto, 10 fêmeas e quatro machos com idade variando de cinco a sete semanas foram obtidos junto ao Cebio/UFMG e alocados em isoladores apropriados. Cada microisolador alocou três fêmeas. Os filhotes obtidos foram mantidos junto às mães, não havendo contato

entre os diferentes grupos de estudo. Os animais foram manipulados no biotério do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. Para os experimentos, os animais foram retirados e mantidos em microisoladores (*UNO Roestvaststaal B.V., Zenevar, Holanda*) no Departamento de Microbiologia, ICB-UFMG. Todos os animais receberam ração sólida autoclavável (Nuvilab Nutival, Curitiba, PR, Brasil) e água esterilizada por calor úmido, *ad libitum*.

Em relação aos animais recém-desmamados, 32 camundongos Balb/C convencionais, fêmeas, de 21 dias de idade foram alocadas em microisoladores apropriados. Cada microisolador recebeu oito (8) animais que, para fins de experimentação, representava um único grupo de estudo. Os animais foram manipulados no biotério do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. Para os experimentos, os animais foram retirados e mantidos em microisoladores (*UNO Roestvaststaal B.V., Zenevar, Holanda*) no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos, Departamento de Microbiologia, ICB-UFMG. Todos os animais receberam ração sólida (Nuvilab Nutival, Curitiba, PR, Brasil) e água, *ad libitum*.

Para os últimos experimentos, 40 camundongos Balb/C convencionais, machos de 15 dias de idade foram alocados em oito microisoladores apropriados. Cada microisolador recebeu cinco animais que. Para fins de experimentação, cada dois isoladores representavam um único grupo de estudo, em um total de quatro grupos. Os animais foram manipulados no biotério do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. Para os experimentos, os animais foram retirados e mantidos em microisoladores (*UNO Roestvaststaal B.V., Zenevar, Holanda*) no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos, Departamento de Microbiologia, ICB-UFMG. Todos os animais receberam ração sólida (Nuvilab Nutival, Curitiba, PR, Brasil) e água, *ad libitum*.

A manutenção e o uso dos animais nos experimentos foram conduzidos respeitando-se as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2006). O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA. Protocolo nº 371/2012 /UFMG. Anexo 1).

4.6.1. Desenho Experimental com animais neonatos

Inicialmente os animais neonatos foram alocados em três grupos distintos (5-10 animais por grupo) para avaliação da ação profilática do uso dos probióticos: (I) animais do grupo controle negativo; (II) animais infectados com *Rotavirus* SA11 (III) animais pré-tratados com *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* UFMG A905 e infectados com *Rotavirus* SA11; Para o tratamento (grupo III), 10µL da solução salina contendo levedura (solução salina contendo 10⁹ UFC/mL) foram administrados por gavagem três dias antes da infecção pelo rotavírus. A viabilidade da levedura nas fezes foi verificada por método dependente de cultivo. Os animais do grupo controle negativo (I) receberam 10µL de DMEM sem suplementos pela mesma via. Os indivíduos do grupo infectado receberam 10µL uma solução contendo 1,2 x 10³ de *Rotavirus*. Os três grupos foram diariamente pesados e, ao final de seis dias (dois dias após a infecção pelo SA11), todos os animais foram sacrificados por decapitação e foram coletados intestino, fígado e pulmões para posterior análise.

4.6.2. Desenho Experimental com animais de 21 dias

Trinta e dois camundongos Balb/C convencionais foram alocados em quatro grupos distintos, quais sejam: Grupo I - grupo placebo; grupo II - grupo infectado pelo rotavírus; grupo III - grupo infectado com *Rotavirus* e posteriormente tratado com o probiótico 24 horas pós-infecção e diariamente até o dia do sacrifício e; grupo IV - animais tratados no dia zero com uma suspensão contendo *Rotavirus* e *S. boulardii*. Ao final do experimento os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e divididos em dois subgrupos. Dos animais do primeiro grupo, foi retirado para verificar a ação do vírus, o intestino delgado (duodeno e jejuno) para análise histopatológica. Dos animais do segundo grupo, foram retirados fragmentos de aproximadamente 3mm de comprimento das três porções do intestino delgado e fragmentos de aproximadamente 5mm dos pulmões para medida da atividade de macrófagos (NAG – N-acetil glicosaminidase), medida da atividade de neutrófilos (Mieloperoxidase - MPO) e avaliação dos níveis de citocinas envolvidas em processos infecciosos no intestino (KC, IL-1β, IL-10 e Eotaxina). O fluido intestinal foi coletado para avaliar os níveis de IgA secretada (sIgA).

4.6.3. Desenho Experimental com animais de 15 dias

Quarenta camundongos Balb/C SPF (*Specific Pathogen Free*) foram alocados em quatro grupos distintos, quais sejam: Grupo I, animais placebo; Grupo II sendo o grupo de animais infectados pelo rotavírus e posteriormente tratados com a levedura *S. boulardii*; Grupo III sendo o grupo de animais infectados pelo rotavírus e posteriormente tratados com a levedura *S. cerevisiae* UFMG A905 e Grupo IV sendo os animais apenas infectados pelo rotavírus, sem tratamento com leveduras. O grupo placebo (I) recebeu por gavagem, no primeiro dia de experimento, um volume de 100 μ L de sobrenadante de monocamada de células MA104 não infectadas pelo rotavírus. Os animais dos grupos II e III foram infectados com 100 μ L de uma solução contendo $10^{4.6}$ TCID₅₀/mL de rotavírus símio SA11 e 24h depois da infecção, receberam uma suspensão contendo 10^9 UFC/mL de *S. boulardii* (Grupo II) ou *S. cerevisiae* UFMG A905 (Grupo III). Os animais do grupo IV foram inoculados duas vezes com 100 μ L de uma solução contendo $10^{4.6}$ TCID₅₀/mL de rotavírus símio SA11 na primeira hora e 8h depois, ambas no primeiro dia de infecção.

Cada animal foi diariamente pesado e tiveram suas fezes coletadas diariamente do dia zero (1º dia de infecção) até o dia do sacrifício (dia 3 ou 4º dia de infecção). Os animais foram sacrificados no 4º dia de infecção por decapitação. Cada grupo foi então dividido em dois subgrupos de cinco animais. Do primeiro grupo, foi retirado o intestino delgado, que foi processado e enviado ao Departamento de Patologia do ICB/UFMG, para análise histopatológica. Do segundo grupo foi retirado de cada animal, o fluido intestinal para análise de sIgA e três fragmentos de aproximadamente 3mm de comprimento (um fragmento de cada porção do intestino delgado) para análise de citocinas.

4.7. Verificação da doença diarreica e presença e ação do vírus nos animais.

Após a infecção, na primeira fase do projeto, as fezes foram coletadas 24h p.i., e diariamente, até a data de sacrifício e a consistência fecal foi avaliada por um escore clínico: 1) Fezes sólidas; 2) fezes semi-sólidas e 3) fezes líquidas. Para tanto as fezes com escore a partir de 2 foram consideradas diarreicas, sendo que aqueles animais que não produziram fezes nos dias da experimentação foram considerados como estando sem diarreia.

A presença do vírus nas fezes foi avaliada por método de aglutinação direta em látex, utilizando *kit* comercial (Rotavírus K075[®], Bioclin. Brasil) conforme instruções do fabricante. Resumidamente, 200µL de amostra de fezes foram misturadas a 2,0mL de tampão de extração. A mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e logo após, centrifugada por 10 minutos a 1000rpm. O sobrenadante foi utilizado para o teste. Foram pipetados 25 µL de sobrenadante aos círculos do teste e depois foi acrescentado o látex reativo a um círculo, e o controle do látex a outro círculo. As misturas foram homogeneizadas com auxílio de uma espátula e verificadas quanto à formação de aglutinação macroscópica ou da sua ausência.

4.8. Quantificação dos níveis de citocinas e quimiocinas em tecido intestinal e pulmonar por ensaios de ELISA

As concentrações de quimiocinas e citocinas, sIgA, NAG e MPO em tecido intestinal e pulmonar foram medidas por ensaios de ELISA, realizados com *kits* comerciais para KC, IL-1beta, eotaxina-1/CCL11 e IL-10, sIgA, NAG e MPO. As amostras foram testadas em duplicata e na mesma placa.

Primeiramente, foi adicionado a cada poço da placa, o anticorpo de captura em concentração fornecida pelo fabricante diluído em tampão fosfato (PBS). A placa foi incubada a 4°C por uma noite. No dia seguinte, após a lavagem com tween 20 (Sigma) a 0,05% em PBS, a placa foi bloqueada em solução de albumina sérica bovina a 1% em PBS por uma hora à temperatura ambiente. Após a lavagem, foram adicionados as amostras e os padrões, sendo a placa novamente incubada a 4°C. Após outra lavagem, a placa foi incubada com anticorpo biotilado em concentração fornecida pelo fabricante por duas horas em temperatura ambiente. Após a lavagem foi adicionada estreptavidina conjugada com peroxidase, sendo a placa novamente incubada por mais 30 minutos. Após a incubação, adicionou-se à placa, o-fenilenodiamina, tendo-se o cuidado para que a reação a partir deste ponto ocorresse no escuro por 15 minutos. A placa foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 492 nm.

4.9. Quantificação da sIgA em fluido intestinal

A determinação da sIgA no conteúdo intestinal foi realizada pelo método de ELISA de captura. O procedimento de coleta do conteúdo foi modificado do método original descrito por LIM *et al.*, 1981. Resumidamente, o intestino delgado dos animais foi removido pela secção nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo foi raspado e coletado em tubos cônicos de 15 mL (Falcon), previamente pesados. Após a coleta, o tubo foi novamente pesado e a ele foi adicionado um volume de PBS suplementado com inibidores de protease (1 μ M de aprotinina; 25 μ M de leupeptina; 1 μ M de pepstatina e 1 μ M de PMSF) na proporção e 2mL de PBS para cada 500mg de conteúdo intestinal coletado. A mistura foi submetida a um ciclo de agitação em vórtex. Os tubos foram mantidos no gelo até a coleta do material de todos os animais. As amostras foram centrifugadas a 2000 xg por 30 minutos a 4°C. Após o término da centrifugação o sobrenadante foi coletado (1,0 mL) em tubos *eppendorff* de 1,5 mL e congelado a -80°C até o momento das análises.

A placa foi coberta com 100 μ L de anti-IgA de camundongo (Sigma M8769) e incubada *overnight* a 4°C. Logo depois, a placa foi esvaziada e a ela foram adicionados 200 μ L de solução de bloqueio (albumina 1% em PBS tween) e foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi então esvaziada e lavada 5 vezes com PBS tween e batida em papel absorvente até ficar completamente seca. Após este procedimento foram adicionados 100 μ L de amostra diluída (1:1000) e a placa foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação a placa foi esvaziada e lavada 5 vezes com PBS tween. Após as lavagens foram adicionados 100 μ L do conjugado (Sigma) diluído em PBS *tween* (10 μ L do conjugado em 10mL de PBS tween) e a placa incubada por mais 1h em temperatura ambiente. A placa foi esvaziada e a ela foi acrescentada 100 μ L de substrato da peroxidase. Foram adicionados 40 μ L de H₂O₂ e incubou-se a placa por 10 minutos à temperatura ambiente. A reação foi paralisada com 20 μ L de H₂SO₄ diluído 1:20 m em água destilada. A leitura foi feita no comprimento de onda de 492 nm.

4.10. Verificação da ação do *Rotavirus* no intestino delgado por histopatologia

Para preparação do intestino para histopatologia, o intestino delgado foi colocado em papel filtro, e identificado quanto as suas partes proximais (cranial) e distal (caudal). Logo depois toda sua extensão foi umedecida para a realização do corte, de forma suave e contínua, evitando danos à estrutura do tecido. Após aberto, o intestino foi mergulhado em recipiente contendo *Bouin* (solução saturada de ácido pícrico 750 mL; formol a 37%, 250 mL e 2% de ácido acético – 2 mL em 98 mL de Bouin) em tempo suficiente para que o órgão não se enrolasse espontaneamente. Após este período, o intestino foi enrolado em sentido distal para a extremidade proximal, de modo que a região distal sempre estivesse no centro do rocambole. O “rocambole” foi amarrado com linha de costura comum e mergulhado em formol. Após 48h, as amostras foram seccionadas longitudinalmente, inseridas em cassetes histológicos e enviadas para análise no Departamento de Patologia do ICB/UFMG pela Prof^ª. Dr^ª. Milene Alvarenga Rachid.

4.11. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata. Os dados estatísticos foram obtidos por análise de variância (ANOVA), com auxílio do software *Graphpad Prism, version 5.00 (Trial)*, para dados paramétricos (Teste *One-way ANOVA*, pós-teste de *Bonferoni* ou *Newman-Keuls*), quando foram comparados três ou mais grupos distintos. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo in vitro

5.1.1. Verificação da presença do vírus no sobrenadante clarificado

O rotavírus símio da linhagem SA11 foi propagado em células MA104. O vírus foi obtido do sobrenadante clarificado de monocamadas com 80-90% de efeito citopático. Duas amostras distintas foram utilizadas, sendo uma obtida junto ao Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do ICB/UFMG (RV-ICB) e outra obtida junto ao Laboratório de Virologia do Instituto Evandro Chagas/FIOCRUZ-PA (RV-IEC), sendo este utilizado para todos os experimentos. Uma amostra de controle de células foi obtida de monocamada de células da linhagem MA104 não infectada.

O padrão de separação das amostras apresentado após a eletroforese evidenciou a presença de bandas específicas sugestivas para *Rotavirus*. O padrão de separação eletroforética da amostra IEC, PA evidenciou a presença de 11 dos 11 segmentos específicos para o rotavírus SA11. Quando se comparou o padrão apresentado pela amostra de RV- ICB, não se observou semelhança entre as bandas desta amostra e a amostra de vírus cedido pelo IEC.PA. A figura 12 apresenta o gel de *Laemmli*.

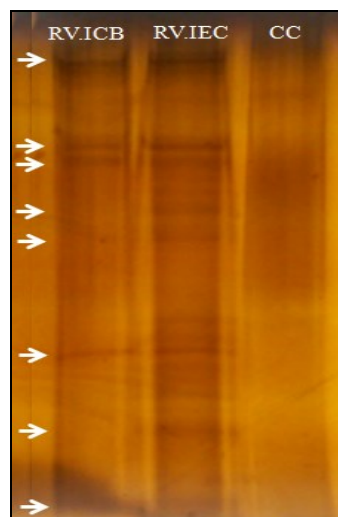


Fig. 11. Gel de Laemmli mostrando a caracterização eletroforética das amostras de *Rotavirus* SA11. RV.ICB: *Rotavirus* obtido no Instituto de Ciências Biológicas/UFMG; RV.IEC. *Rotavirus* obtido junto ao Instituto Evandro Chagas, Fiocruz/PA. Setas evidenciando as bandas sugestivas da presença de RV- SA11.

5.1.2. Verificação da amplificação após a PCR convencional com gradiente de temperatura e Freeze-squeeze.

A amplificação do DNA foi observada em diferentes intensidades em todas as temperaturas testadas. A figura 13 representa a corrida dos amplicons da PCR em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Utilizou-se neste primeiro ensaio gradiente de temperatura variando de 50 a 58°C. Os amplicons que apresentaram as maiores intensidades foram visualmente verificados para as amostras 2, 3 e 5 (Figura 13).

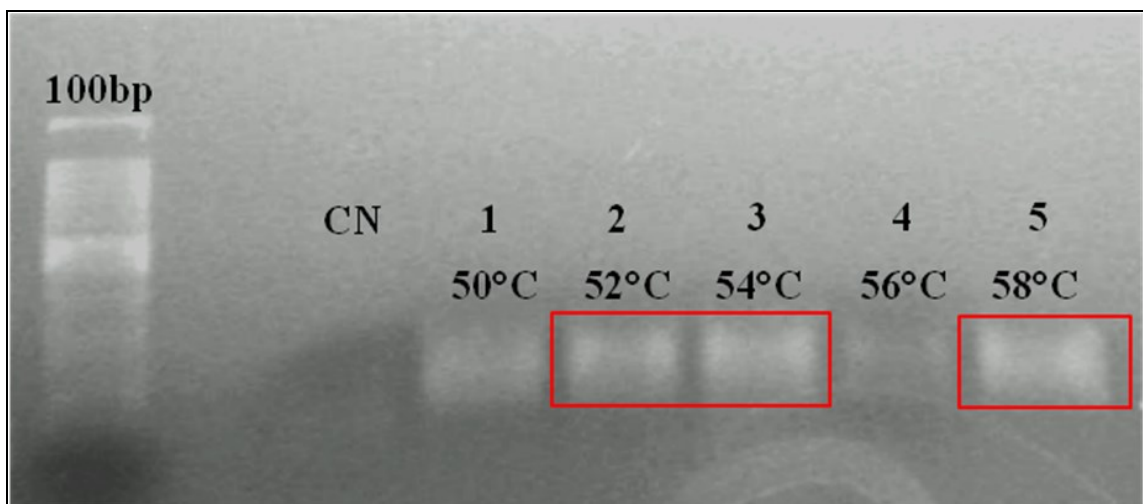


Figura 12: Gel de Agarose a 1,5% dos produtos de PCR com gradiente de temperatura. RNA extraído de amostras de rotavírus SA11 clarificado de cultivo infectado de células MA104. Após a corrida eletroforética foram observadas amplificações mais eficientes nas temperaturas 2 (52°C), 3 (54°C) e 5 (58°C). Após avaliar-se o resultado, optou-se pela temperatura de 60°C em todas as reações subsequentes.

5.1.3. Verificação da Reação de restrição enzimática pela Enzima EcoRI

Para avaliação da clonagem realizada no plasmídeo pGEM-T easy, foi realizada a restrição enzimática com a enzima EcoRI. Dentre os quatro clones submetidos à digestão enzimática, 100% mostraram a liberação da banda no tamanho esperado (94pb), apontando o sucesso da clonagem (Figura 13).

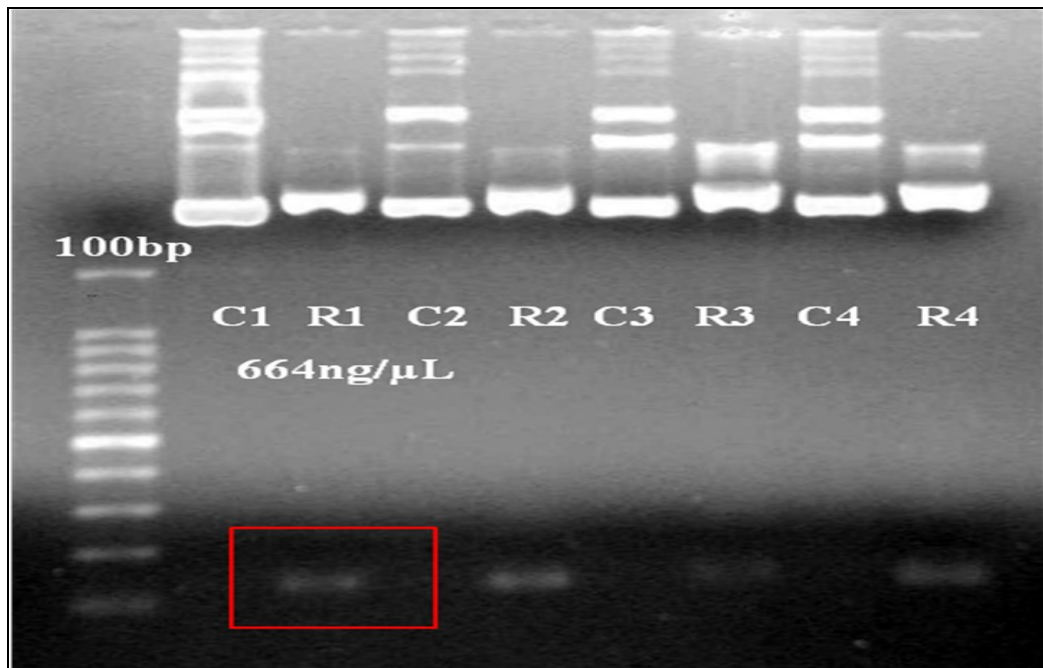


Figura 13: Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Foram submetidos à restrição enzimática, 4 clones obtidos a partir de uma mesma colônia semente. C: clone; R: alíquota do clone submetido à restrição enzimática. O clone R1 apresentou leitura espectrofotométrica de 664,5 ng/μL e foi preparado para sequenciamento.

5.1.4. Sequenciamento

As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. pela empresa Valid Biotechnology. O alinhamento efetuado com a sequência de Rotavirus SA11 depositada no *GenBank* sob o número [gb|JQ688681.1|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/JQ688681.1) (*Multialign*) revelou a especificidade da sequência amplificada (Figura 15), e, portanto, a adequação do desenho dos iniciadores para a detecção do genoma do RVA nos experimentos subsequentes.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	94	
RVA	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----											
RVAclone1contig	CTGACGAGCGAATAAATGGATATCAATGGGCTCATCATGTACATTAAGTATGTCACCTTAATACACAACCTCTTGGATTGGATGCTTGAC											
RVAclone2contig	CTGACGAGCGAATAAATGGATATCAATGGGCTCATCATGTACATTAAGTATGTCACCTTAATACACAACCTCTTGGATTGGATGCTTGAC											
Consensus	CTGACGAGCGAATAAATGGATATCAATGGGCTCATCATGTACATTAAGTATGTCACCTTAATACACAACCTCTTGGATTGGATGCTTGAC											

Figura 14. Alinhamento efetuado com a sequência de Rotavirus SA11 depositada no *GeneBank*.

5.1.5. Geração de curva plasmidial e avaliação de amplificação a partir de variação de molde inicial (cDNA).

Após o sequenciamento, uma curva com diluição seriada do DNA plasmidial foi gerada além da avaliação de diferentes quantidades de cDNA molde inicial. A figura abaixo mostra que o DNA plasmidial foi amplificado no teste desenvolvido até a menor diluição testada (200 attogramas). A PCR foi robusta na amplificação do RNA proveniente até da menor concentração, de 5 μL do sobrenadante viral não purificado, usada previamente na gavagem dos animais (figura 15).

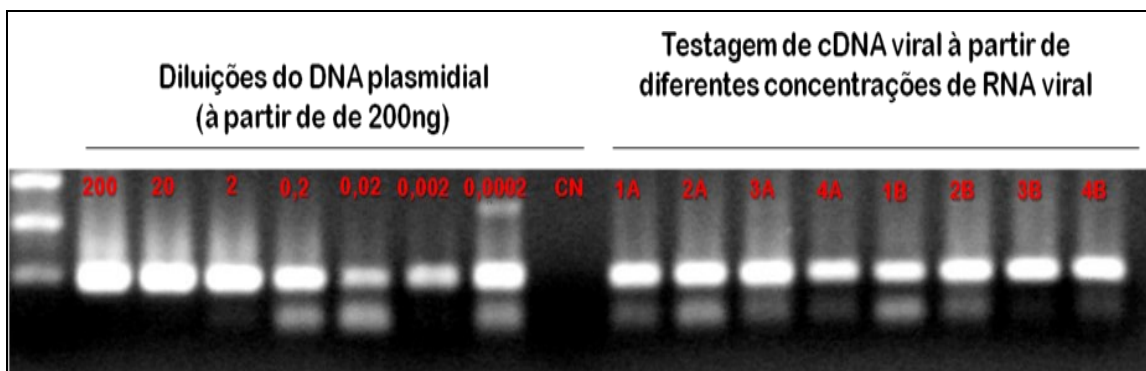


Fig. 15: Gel de agarose 1,5% com curva de DNA plasmidial. Foram utilizadas diferentes diluições do DNA plasmidial obtido. 1A a 4A: Testes de cDNA a partir de 250 ng de RNA; 1B a 4B: testes de cDNA sem considerar a dosagem espectrofotométrica pós-extração. 1. Extração de RNA a partir de 250 μL de suspensão viral; 2. Extração de RNA a partir de 125 μL de suspensão viral + 125 μL de DMEM; 3. Extração a partir de 25 μL de suspensão viral + 225 μL de DMEM; 3. Extração a partir de 5 μL de suspensão viral + 245 μL de DMEM.

5.1.6. Teste do gene normalizador GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) e otimização do MgCl_2 .

Para averiguar a acessibilidade do ácido nucleico presente nas amostras a serem testadas, utilizou-se como gene normalizador o GAPDH. A figura 17 apresenta o gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídeo, onde foram resolvidos os amplicons provenientes da padronização da PCR onde se variou a concentração do MgCl_2 e de iniciadores. Embora em todas as variações observou-se a amplificação gênica no tamanho esperado (94pb), na concentração de MgCl_2 de 1,5mM os resultados são mais reprodutíveis tanto para ácido

nucleico extraído de células MA104 infectadas, quanto não infectadas (mock). Optou-se, a partir deste ensaio, pela concentração de $MgCl_2$ de 1,5mM e iniciadores 5pM (Figura 16).

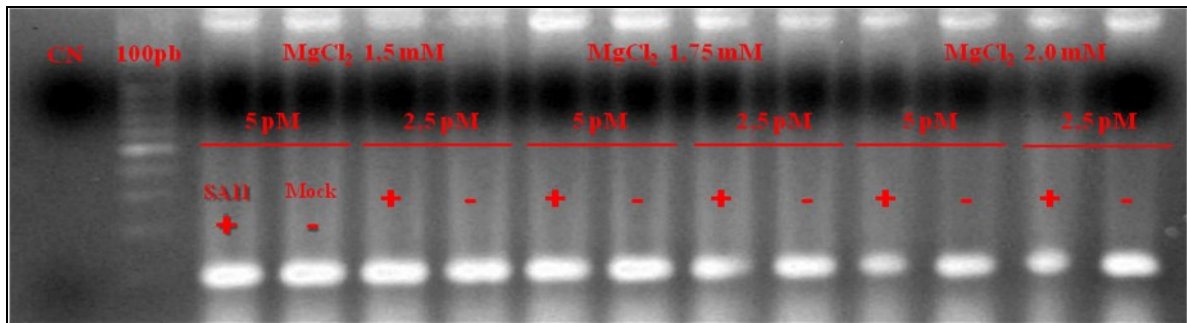


Fig. 16: Gel de agarose 1,8% - Padronização GAPDH e concentração de cloreto. Foram variadas as concentrações de $MgCl_2$ em 1,5mM, 1,75mM e 2,0mM. Além disso, os iniciadores de GAPDH foram testados nas concentrações de 2,5pM e 5,0pM.

5.1.7. Titulação do *Rotavirus* por TCID₅₀ e por formação de foco de fluorescência

Para verificação do título viral, foram realizadas três metodologias distintas de titulação de vírus, mais utilizadas para titulação de *Rotavirus*, sendo elas a titulação por formação de foco de fluorescência, dada em Unidade Formadora de Foco por mL, a TCID₅₀ e o ensaio de placa, dado em Unidade Formadora de Placa por mililitro.

Na titulação por formação de foco de fluorescência os focos fluorescentes (figura 17) foram contados individualmente e o título foi calculado seguindo-se a seguinte fórmula: $UFF = n^{\circ} \text{ de focos fluorescentes} \times 1/\text{fator de diluição} \times 1/\text{volume de inóculo}$. Sendo assim, a titulação evidenciou um título de $1,2 \times 10^3$ UFF/mL (Unidades Formadoras de Foco por mililitro).

Para a titulação por TCID₅₀, as placas foram ao final, incubadas por 48h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Ao final deste período, as células foram examinadas em microscópio óptico invertido para determinação do título viral. A TCID₅₀ (*Tissue Culture Infectious Dose 50*) (REED e MUENCH, 1938) representa a dose infectante em cultura de células onde se observa o efeito citopático em 50% das replicatas inoculadas. O título é o inverso da maior diluição onde se observa o efeito citopático. O título obtido foi $1 \times 10^{3,6} \sim 10^4$.

Em relação à titulação por ensaio de placa, após a incubação, as placas formadas foram contadas com auxílio de uma luz. Contudo não foi possível determinar o título viral por este método, apesar de representar o método mais utilizado na literatura. A determinação do título viral por meio do ensaio de placa deveria ser calculada de acordo com a seguinte fórmula: ***PFU/mL = N° de placas x 1/fator de diluição x 1/volume de inóculo.***

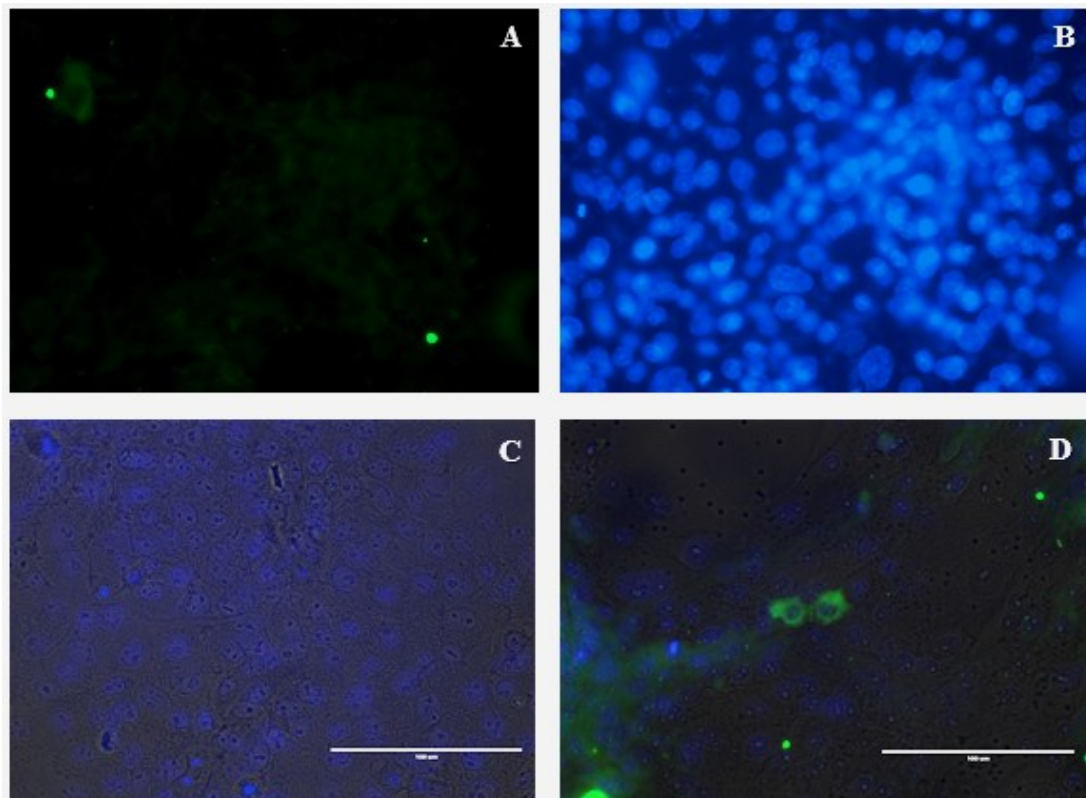


Figura 17: Células MA104 infectadas pelo *Rotavirus* SA11. A - Células marcadas com anticorpo específico Rotavirus capsid (2B4): sc101263 – Anti-VP6, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.* B - Células marcadas com anticorpo anti-nucleotídeo, mostrando os núcleos corados em azul. C – Células de controle negativo para *Rotavirus* SA11 mostrando apenas marcações nucleares; D – Células marcadas pelo anticorpo específico anti-VP6 focos de células infectadas.

5.2. Experimentos *in vivo*

5.2.1. Avaliação do desenvolvimento ponderal dos animais

Uma das características da infecção pelo *Rotavirus* é a expressiva perda de peso, secundária à grave desidratação. No experimento realizado, com animais neonatos, os animais foram avaliados quanto às possíveis alterações do peso corporal durante o período de infecção. Para

isso, medidas individuais e em grupo foram realizadas diariamente. A média do peso entre os animais de cada grupo foi obtida. Os animais do grupo controle e do grupo infectado pelo rotavírus foram pesados a partir do dia zero e os animais pré-tratados com *S. boulardii*, três dias antes do desafio e diariamente até o dia do sacrifício. Pode-se observar que dentre os animais do grupo controle negativo houve pouca diferença de peso quando comparados ao grupo infectado pelo *Rotavirus*. Por outro lado, animais alocados no grupo pré-tratado com *S. boulardii* mostraram uma maior média de peso no dia zero quando comparado aos grupos controle e infectado com *Rotavirus* (Figura 18).

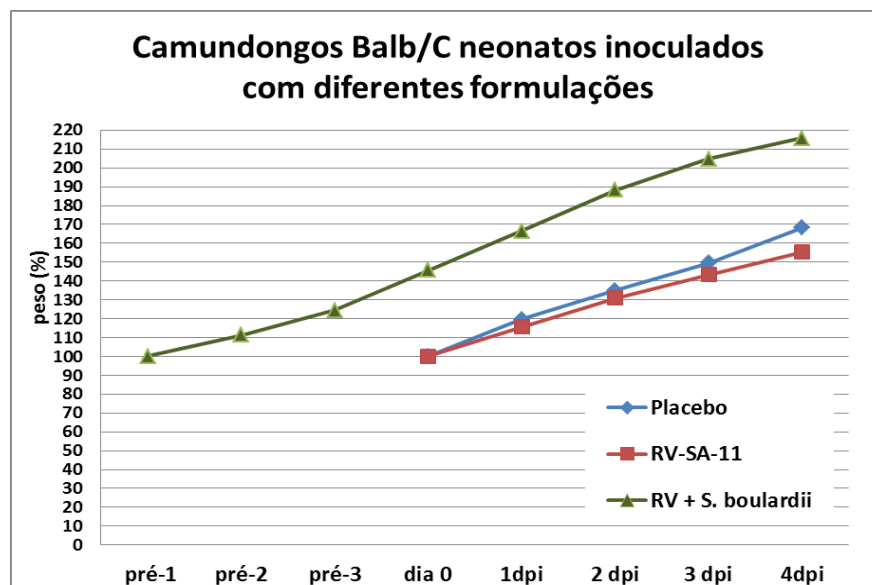


Figura 18: Desenvolvimento ponderal dos animais submetidos ou não ao tratamento com *S. boulardii*. A linha verde representa a variação do peso dos animais que receberam pré-tratamento com *S. boulardii*. Em azul, os animais tratados com meio de cultura estéril e em vermelho o grupo de animais desafiados com rotavírus da linhagem SA11. O grupo pré-tratado recebeu uma suspensão contendo a *S. boulardii* três dias antes da infecção, diferentemente daqueles animais do grupo controle e dos que receberam apenas o vírus.

Os resultados mostram que animais do grupo infectado pelo rotavírus, apresentaram acentuada perda de peso em relação ao peso inicial no segundo dia pós-infecção, mantendo-se até o terceiro dia pós-infecção. Animais do grupo placebo apresentaram ganho de peso gradativo do primeiro ao último dia de experimento. Em relação aos animais tratados com as leveduras observou-se que houve uma ligeira redução no peso dos animais do grupo tratado com *S. boulardii* a partir do segundo dia de infecção. Houve ganho de peso a partir do terceiro dia de experimento. Em relação ao grupo tratado com *S. cerevisiae* UFMG A905, os animais

mantiveram o peso no segundo dia de experimento, aumentando gradativamente o ganho ponderal até o quarto dia. Diferenças estatísticas foram observadas entre o grupo placebo e o grupo infectado pelo rotavírus no terceiro dia de infecção ($p < 0,01$), entre o grupo tratado com *S. cerevisiae* UFMG A905 e o grupo infectado pelo rotavírus no terceiro dia de infecção ($p < 0,01$), entre os grupos tratados com as leveduras e o grupo infectado pelo rotavírus no quarto dia de experimento ($p < 0,001$) e entre o grupo placebo e o grupo tratado com *S. boulardii* no quarto dia de infecção ($p < 0,01$).

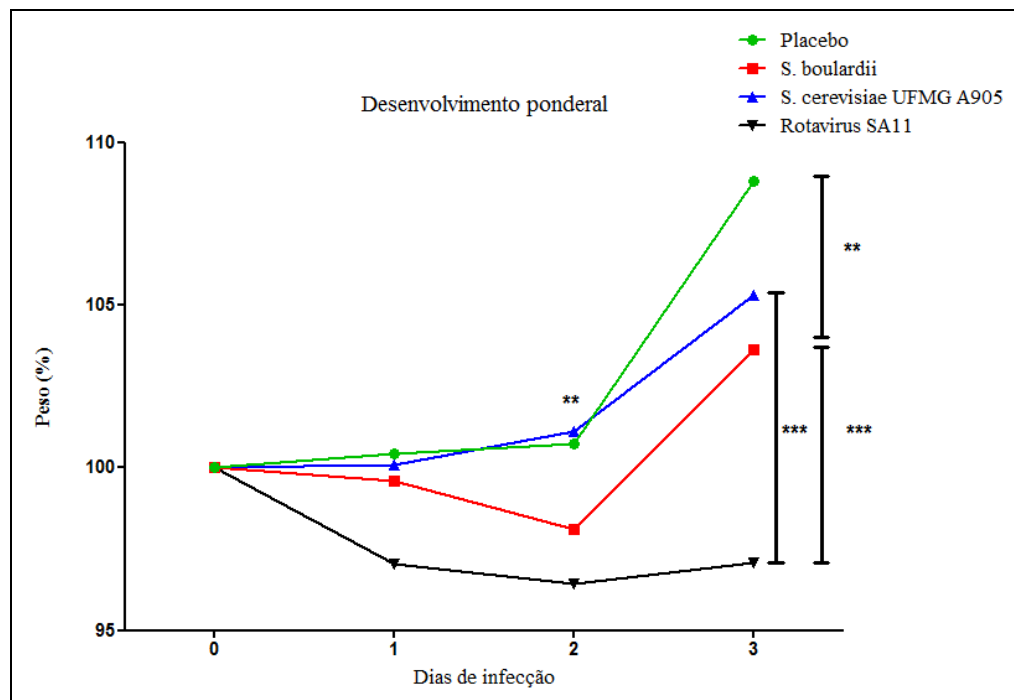


Figura 19: Desenvolvimento ponderal dos animais nos quatro dias de infecção. A linha verde representa o desenvolvimento ponderal dos animais do grupo placebo. Em azul, os animais previamente infectados com rotavírus símio SA11 e posteriormente tratados com *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A905. Em vermelho, os animais previamente infectados com rotavírus símio SA11 e posteriormente tratados com *Saccharomyces boulardii*. Em preto o grupo de animais apenas infectados pelo rotavírus símio SA11. Peso em %. Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni. Resultados estatísticos com $p < 0,01$, $p < 0,05$ e $p < 0,001$.

A perda de peso é uma das características clínicas mais importantes em animais e humanos infectados pelo rotavírus. As diarreias causadas por este vírus são importantes causas de mortalidade em países em desenvolvimento e de morbidade em países desenvolvidos. O estado nutricional do indivíduo é um fator importante na determinação da gravidade da diarreia. Em um recente estudo, Preidis e colaboradores (2012) demonstraram que o estado nutricional do indivíduo influencia a resposta de probióticos no tratamento da diarreia pelo

Rotavirus. Eles observaram que a proliferação de enterócitos da cripta e a migração de enterócitos, importantes para o *clearance* de rotavírus, eram aumentadas após o tratamento com probióticos e, além disso, era dependente do peso corporal dos animais.

5.2.2. Verificação da presença do vírus por aglutinação em látex

Para verificação da presença dos vírus infecciosos nas amostras de fezes coletadas de cada animal, utilizou-se um teste de aglutinação em látex sensibilizado comercial, que utiliza anticorpos monoclonais contra o antígeno VP6 de *Rotavirus* do grupo A. Analisando-se as amostras testadas, não foram observadas reações de aglutinação semelhantes ao controle positivo fornecido pelo fabricante, contudo pode-se observar uma reação positiva, mas menos intensa das amostras testadas (figuras 20 e 21).



Figura 20: Teste rápido de aglutinação direta em látex para pesquisa de Rotavírus (ROTAVÍRUS K075 – Bioclin, Belo Horizonte - Brasil) mostrando o modelo de aglutinação em amostra do teste. Em 1, aspecto do teste de sobrenadante de amostra potencialmente infectada; 2, controle do látex. 3, controle positivo do teste. O aspecto do sobrenadante de amostra potencialmente infectada é semelhante ao controle de látex (negativo), mostrando ser um teste negativo.

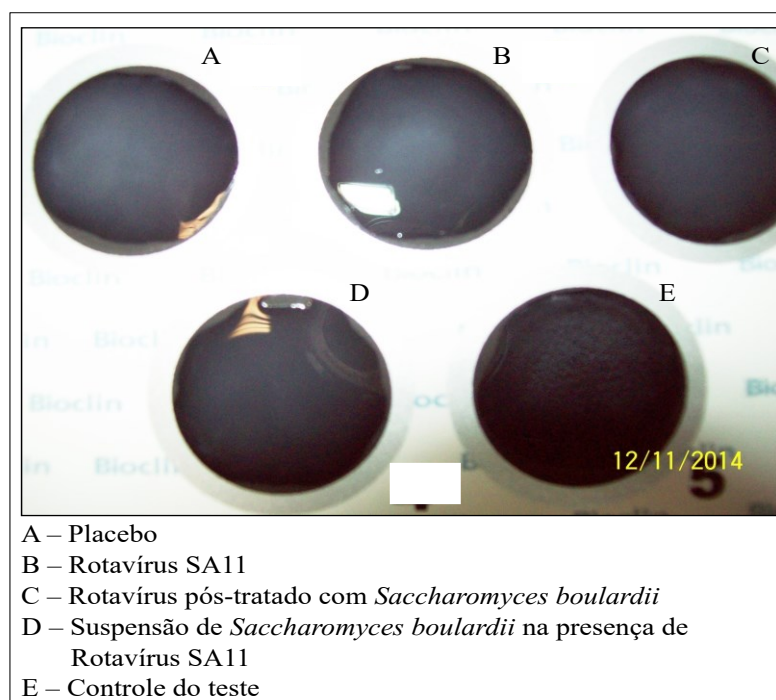


Figura 21. Teste de aglutinação em látex para os diversos grupos estudados

Os *kits* comerciais de aglutinação em látex têm sido frequentemente utilizados em laboratórios hospitalares de rotina, como método de escolha para o diagnóstico rápido de agentes causadores de diarreias agudas em crianças e adultos, destacando-se o rotavírus e adenovírus (LOGAN *et al.*, 2006), sendo de fácil manuseio e apresentam alta especificidade. No presente trabalho, observou-se uma reação pouco intensa das amostras quando comparados aos controles positivos fornecidos pelo fabricante. O título viral inoculado nos animais nesta fase do estudo era inferior a 10^3 UFF/mL. O método de aglutinação em látex mostra-se um método bastante sensível para amostras de fezes infectadas pelo rotavírus, sendo um fator limitante, o volume de material fecal analisado e a quantidade de partículas virais presentes na amostra. No modelo experimental estudado neste trabalho, a eliminação de partículas virais nas fezes provavelmente apresentava-se bastante reduzida, tendo em vista o pequeno volume e o baixo título viral no inóculo. O teste de aglutinação, deste modo, não representou um método eficiente para detecção precoce ou tardia do rotavírus neste modelo animal, apesar de representar uma importante alternativa para análise da presença de partículas virais em modelos de infecção experimental.

5.2.3. Histopatologia

Para verificar os efeitos da infecção pelo *Rotavírus* em nível histológico, foram realizados experimentos de histopatologia de toda a extensão do intestino delgado dos animais estudados. A técnica de “Rocamble” foi utilizada. Este modelo de preparação do intestino para histopatologia permite uma visualização mais completa e menos segmentada de toda a extensão do órgão, dando uma visão mais compreensível do fenômeno ocorrido. A histopatologia dos cortes de tecido proveniente dos animais neonatos revelou lesões sugestivas de infecção pelo *Rotavírus* (Figura 22).

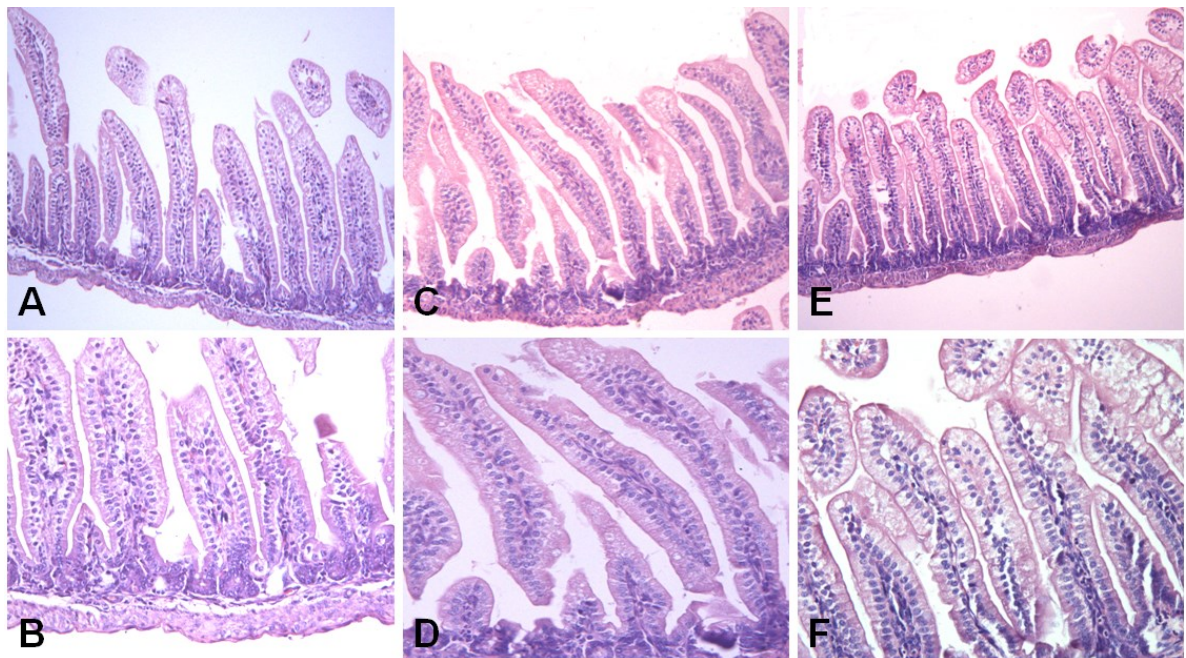


Figura 22. Alterações histopatológicas em animais neonatos infectados pelo rotavírus. Fotomicrografia representativa de seções intestinais de camundongos Balb/C com oito dias de idade, coradas com Hematoxilina & Eosina. (A, B) Jejunum de camundongo do grupo controle mostrando aparência histológica normal; (C, D) Jejunum de animal infectado com RV-SA11, sem lesões histológicas significativas; (E, F) Animal tratado com *Saccharomyces boulardii* e infectado com RV-SA11 exibindo leve vacuolização celular nas células do topo da vilosidade. Ampliação A, C, E: $\times 200$; B, D, F: $\times 400$.

Em animais do grupo controle negativo pode-se observar a arquitetura normal do jejunum, com vilosidades regulares e bem definidas, núcleos celulares em situação basal, indicando a ausência de infecção produtiva (Figuras 22A e 22B). Em animais do grupo infectado pelo rotavírus pode-se observar a presença de enterócitos alterados no topo das vilosidades. A

maioria dos núcleos permaneceu na base dos enterócitos. Pode-se observar moderada lesão do epitélio, caracterizada pelo alargamento das vilosidades e infiltrado de mononucleares na lâmina própria (figuras 22C e 22D). Nos animais tratados com *S. boulardii* e infectados pelo rotavírus pode-se observar a formação de vacuolização nos enterócitos apicais (figuras 22E e 22F).

Em animais de 21 dias, as análises das secções do intestino delgado por microscopia de luz revelaram vilosidades regulares e núcleos localizados na região basal dos enterócitos, revelando aspecto histológico normal em animais do grupo controle (figuras 23A e 23B). Em animais infectados pelo rotavírus, pode-se observar infiltrado de células mononucleares na lâmina própria do intestino (figuras 23C e 23D). Naqueles animais tratados com *S. boulardii*, observou-se também um pronunciado infiltrado de células mononucleares, além de necrose focal e infiltrado de neutrófilos (figura 23E e 23F). Em animais tratados com a suspensão de leveduras concomitantemente à infecção pelo rotavírus evidenciou edema na lâmina própria, ectasia em vasos e infiltrado de mononucleares na lâmina própria (figuras 23G e 23H).

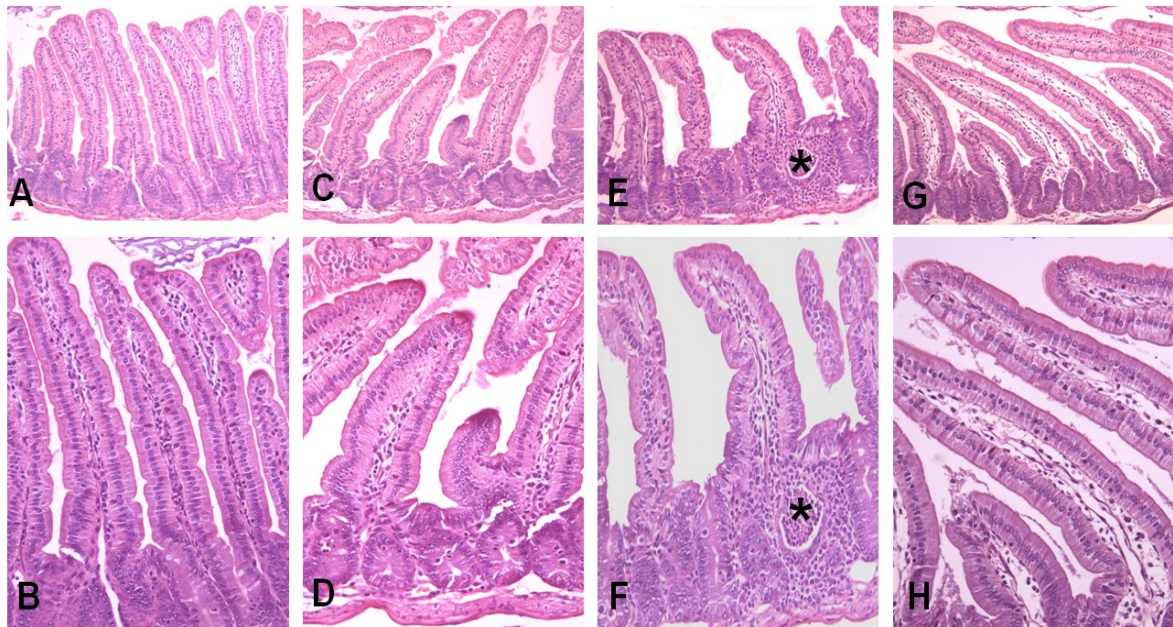


Figura 23. Alterações histopatológicas em animais infectados pelo *Rotavirus* (animais de 21 dias). Fotomicrografia de secções de intestino delgado de animais de 21 dias de idade, coradas em Hematoxilina & Eosina. (A, B) Jejunum de animal do grupo controle negativo com aparência histológica normal; (C, D) jejunum de animal infectado pelo Rotavirus mostrando infiltração de células mononucleares na lâmina própria da mucosa; (E, F) jejunum de animal infectado com rotavírus e tratado com *S. boulardii* exibindo necrose focal e infiltração de neutrófilos (asterisco) e infiltração de mononucleares na lâmina própria; (G, H) jejunum de animal tratado com

uma suspensão de leveduras e rotavírus, mostrando edema da lâmina própria da mucosa e ectasia de vasos linfáticos e infiltração de células mononucleares na lâmina própria. Ampliação A,C,E,G:×200; B,D,F,H: ×400.

Ao se analisarem as secções de intestino obtidas em animais de 15 dias de idade, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Quando se avaliou a presença de alterações estruturais no epitélio intestinal, pode-se observar a presença de edema de vilosidade em todos os grupos estudados. Em animais do grupo apenas infectado pelo rotavírus SA11, a presença deste edema superou o índice apenas do grupo placebo. Quando foram avaliados os grupos tratados com as leveduras, pode-se observar que houve um incremento no índice de edema de vilosidade, principalmente naqueles animais tratados com *S. cerevisiae* UFMG A905, quando comparados aos animais do grupo controle. Não foram observadas diferenças estatísticas entre estes grupos, ainda que o escore do grupo tratado com *S. cerevisiae* UFMG A905 tenha sido expressivamente maior do que o escore dos outros grupos de estudo (Figura 24-A).

Ao se avaliarem os índices de infiltrado de células mononucleares na mucosa do epitélio intestinal, pode-se observar um maior recrutamento destas células em intestinos de animais apenas infectados pelo rotavírus SA11 e de modo mais expressivo em animais do grupo tratado com a levedura *S. boulardii*. Estes resultados não apresentaram relevância estatística, contudo foi observada redução do infiltrado no grupo tratado com *S. cerevisiae* UFMG A905, de modo semelhante ao ocorrido no grupo controle, contudo os resultados não foram significativos (Figura 24-B).

A próxima análise, realizada nas amostras de intestino, foram em relação à tumefação celular na mucosa intestinal. Pode-se observar que houve um aumento da tumefação celular no grupo tratado com *S. boulardii* quando comparados aos animais do grupo controle. Os resultados não apresentaram relevância estatística (Figura 24-C).

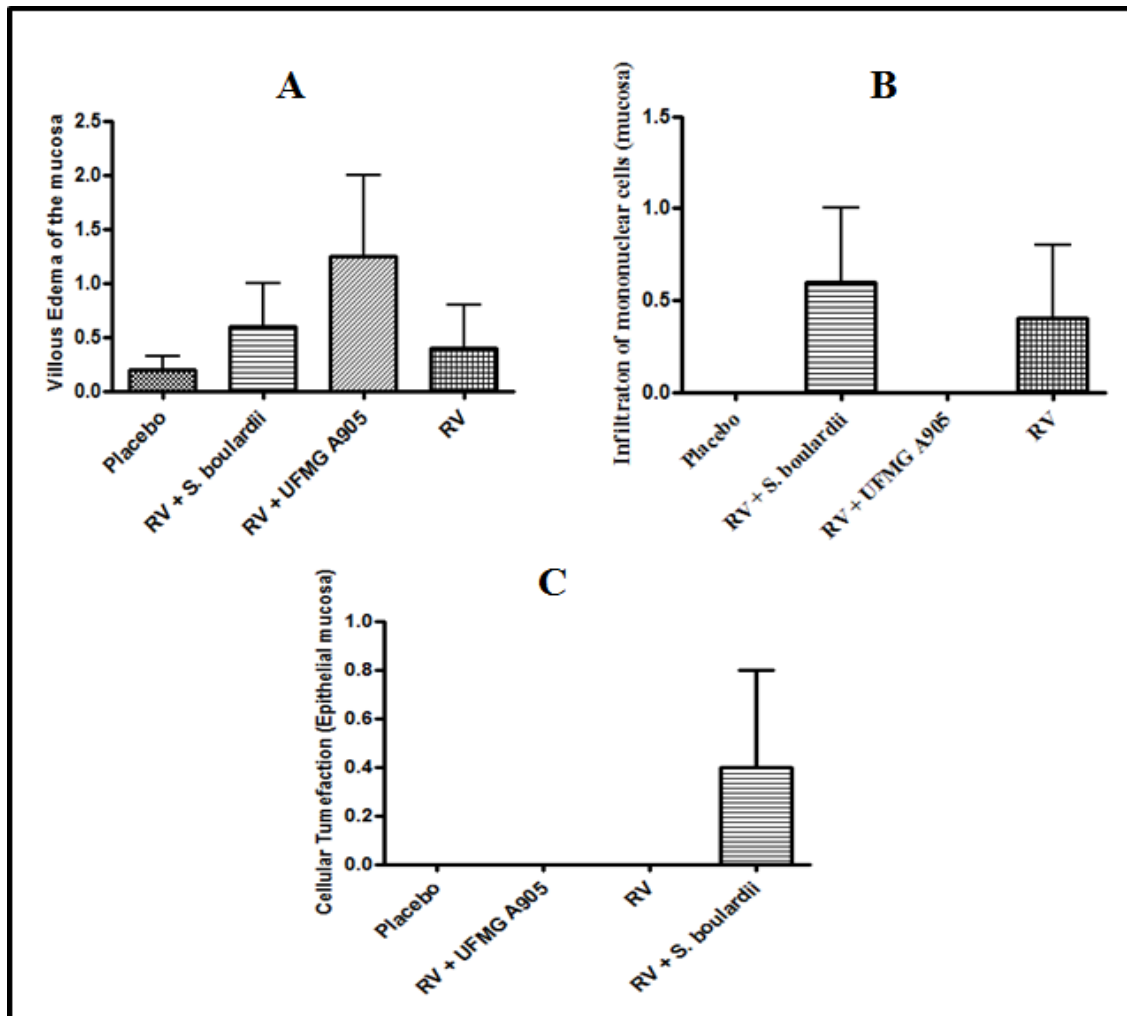


Figura 24. Gráficos baseados em escore de histopatologia de intestino – animais de 15 dias de idade. Seção de “rocambolo” de intestino englobando duodeno, jejuno e íleo (A) Edema de mucosa da vilosidade intestinal; (B) infiltrado de células mononucleares na mucosa intestinal; (C) Tumefação celular em células epiteliais da mucosa intestinal. (1) Placebo: animais inoculados com sobrenadante de cultivo de células MA104 não infectadas pelo rotavírus; (2) RV + *S. boulardii*: animais inoculados com rotavírus SA11 e tratados após 24h com a levedura *S. boulardii*; RV + UFMG A905: animais inoculados com rotavírus SA11 e tratados após 24h com a levedura *S. cerevisiae* UFMG A905; RV: animais inoculados com rotavírus SA11. Teste: One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

As alterações patológicas devidas ao rotavírus símio da linhagem SA11 foram observadas em modelo heterólogo de infecção murina. Em nossos experimentos foram observados os efeitos da infecção pelo vírus e do tratamento com leveduras, em nível histológico. Os animais foram sacrificados e tiveram seu intestino delgado coletado após 72h de infecção, onde não foram observadas alterações significativas em relação aos aspectos histopatológicos da infecção. Starkey e colaboradores (1986) observaram em seu estudo a presença de um fenômeno

denominado bifásico de infecção e recuperação da infecção em modelo murino. De acordo com este padrão de doença/recuperação, a redução do título de antígeno viral 72h pós-infecção pode ser resultado de uma disseminação e rápida *clearance* do vírus com redução da sintomatologia em animais com perda dos receptores celulares específicos necessários à infecção (STARKEY *et al.*, 1986). Este modelo, explicaria em parte a ausência de lesões específicas da infecção pelo *Rotavirus* após 72h de infecção em nosso modelo animal, como observado em outros estudos semelhantes (MAJEROWICZ *et al.*, 1994). Esta ausência de efeitos robustos é resultado, portanto, de um conjunto de fatores que pode incluir o reduzido título viral no inóculo utilizado e o modelo bifásico proposto no trabalho de Starkey e colaboradores.

Em relação aos efeitos observados nos animais neonatos foi evidenciada a presença de vacuolização no grupo de animais pré-tratados com *S. boulardii* e infectados pelo rotavírus. Esta alteração é bastante comum em camundongos neonatos, desafiados com determinadas proteínas e partículas coloidais. Possivelmente, as vacuolizações observadas neste grupo, são representadas, em sua maioria, por vesículas pinocíticas esféricas supranucleares, estimuladas por produtos contidos na suspensão contendo a levedura (STARKEY, *et al.*, 1986).

Independentemente do tratamento utilizado, pode-se observar nos grupos de estudo, a presença de infiltrado de células mononucleares. A constituição deste grupo celular parece ser bastante homogênea e é composto provavelmente de monócitos/macrófagos e linfócitos T ativados (ZHANG *et al.*, 2008a; ZHANG *et al.*, 2008b). Estes tipos celulares são responsáveis pela produção de quimioatraentes em resposta à infecção pelo rotavírus (MOHANTY *et al.*, 2010). Um estudo conduzido por Zhang e colaboradores em 2008, mostrou que a ingestão de bactérias probióticas por porcos gnotobióticos reduzia a frequência de monócitos/macrófagos em relação ao grupo apenas infectado com rotavírus (ZHANG *et al.*, 2008b). No presente estudo, nós observamos a infiltração de células mononucleares na mucosa do epitélio intestinal. Um maior infiltrado pode ser observado em cortes histológicos de animais dos grupos apenas infectados pelo rotavírus, sem tratamento com as leveduras e também no grupo de animais infectados pelo *Rotavirus* e posteriormente tratados com *S. boulardii*. Observou-se também neste experimento, que o infiltrado de mononucleares na mucosa foi abolido quando se analisou o grupo tratado com *S. cerevisiae* UFMG A905 ocorrido de modo semelhante aos animais do grupo controle. Estes resultados parecem refletir efeito protetor, anti-inflamatório,

da levedura *S. cerevisiae* UFMG A905. Este fenômeno foi observado de forma oposta no grupo tratado com *S. boulardii*.

A levedura *S. cerevisiae* UFMG A905, demonstrou efeitos benéficos em modelos de febre tifoide induzida experimentalmente. Em um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, ficou demonstrado que a levedura foi capaz de diminuir a mortalidade de animais em até 55%. Os dados histopatológicos mostraram que a levedura apresentou uma boa proteção contra o desafio oral com *C. difficile* em camundongos gnotobióticos e uma boa preservação do fígado de animais convencionais tratados com a levedura e desafiados com *S. Typhimurium* (MARTINS *et al.*, 2005). No presente trabalho a levedura *S. cerevisiae* UFMG A905 mostrou ser capaz de reduzir alguns parâmetros patológicos apresentados pelos animais apenas infectados pelo *Rotavirus* e que, interessante, esta mesma propriedade não foi observada nos animais tratados com *S. boulardii*.

5.2.4. Avaliação das citocinas e quimiocinas por ELISA

Nas análises realizadas para as citocinas KC, Eotaxina e IL-10 (Figura 25), não foram observadas diferenças nas expressões das citocinas, influenciadas pelos tratamentos aos quais foram submetidos os grupos de estudo. Uma pequena tendência à redução da expressão da eotaxina pode ser observada quando se tratou o grupo de animais com a levedura *S. boulardii* e quando se tratou o grupo com a mistura levedura/vírus. Entretanto, os dados obtidos não tiveram significado estatístico quando foram comparados os grupos estudados e os tratamentos oferecidos.

Na avaliação da citocina IL-1 Beta (Figura 26), pode-se observar que o tratamento do grupo com a mistura levedura/vírus, não aumentou a concentração da citocina. O mesmo padrão foi observado para o grupo apenas infectado com *Rotavirus* e também no grupo placebo, que recebeu apenas sobrenadante de cultivo celular. Uma tendência ao aumento da concentração da citocina foi observada no grupo infectado pelo *Rotavirus* e posteriormente tratado com *S. boulardii*, ainda que esta diferença de concentrações não tenha apresentado significado estatístico (Figura 25).

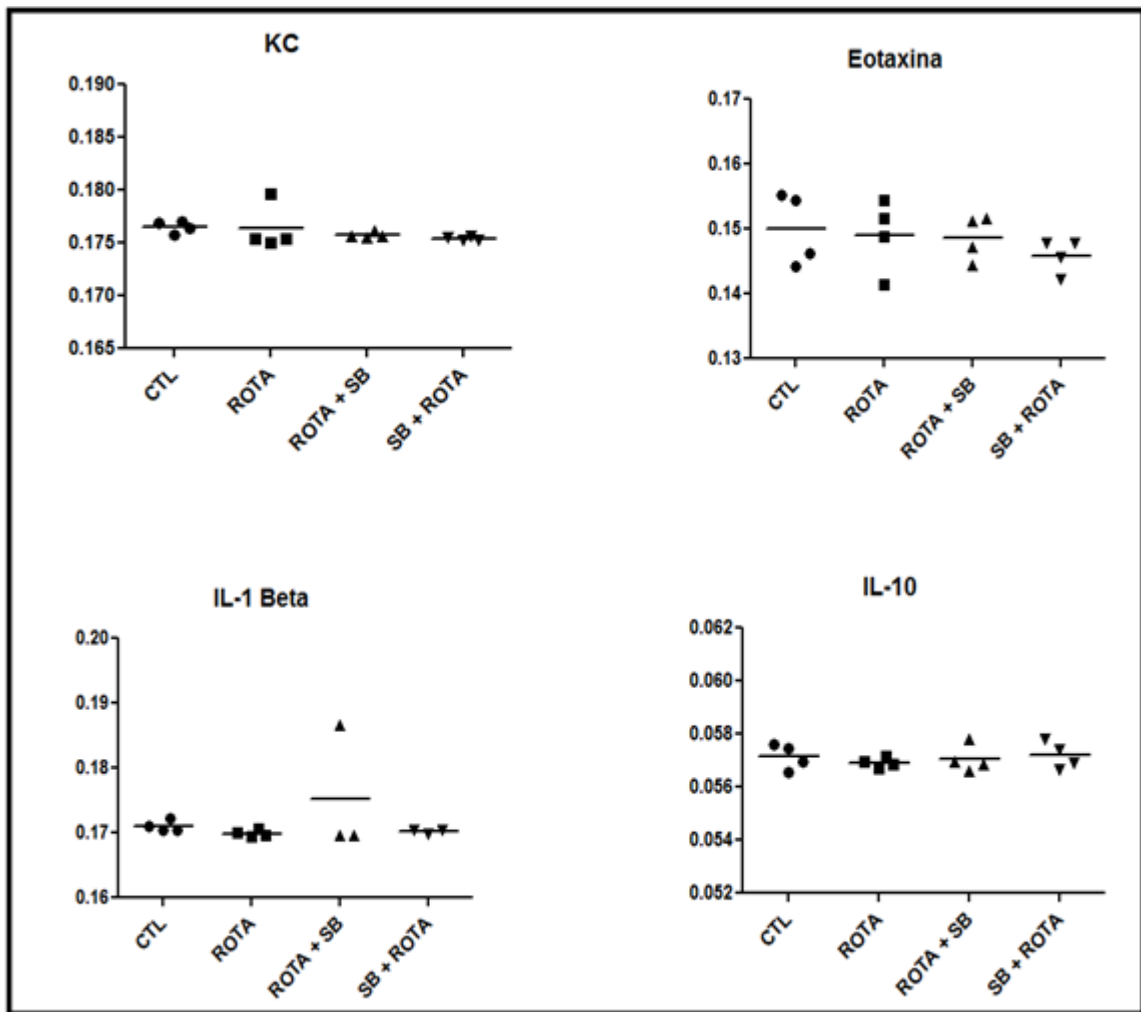


Figura 25: Avaliação dos níveis das quimiocinas KC e Eotaxina-1 e das citocinas IL-1 Beta e IL-10 em sobrenadante clarificado de intestino de camundongos Balb/C. CTL – placebo; Rota – Grupo de animais infectados pelo rotavírus SA11; Rota + Sb – indivíduos infectados pelo rotavírus SA11 e posteriormente tratados com *S. boulardii*; Sb+ Rota – indivíduos tratados com uma suspensão de leveduras incubadas na presença do rotavírus SA11. Teste: One-way ANOVA, pós-teste de *Newman-Keuls*.

5.2.4. Avaliação das citocinas e quimiocinas por qRT-PCR

A quantificação da citocina Osteopontina foi verificada por quantificação relativa por PCR em tempo real. O cDNA utilizado, foi obtido de RNA extraído de fragmentos de intestino de animais infectados pelo rotavírus SA11, submetidos ou não ao tratamento com probióticos.

Quando se analisou a citocina Osteopontina, observou-se que houve uma produção expressiva da quimiocina em animais dos grupos tratados com as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG A905, quando comparados ao grupo controle e ao grupo de animais apenas infectados

com o Rotavírus SA11 ($p=0,0608$). A indução da expressão de osteopontina em animais do grupo controle ocorreu, porém em um nível mais baixo. Embora a infecção pelo rotavírus induza sua produção em níveis mais baixos, a produção desta quimiocina não é dependente da infecção viral (MAENO *et al.*, 2009) (Figura 26).

A Osteopontina é uma proteína encontrada em grandes quantidades em uma variedade de tecidos e é secretada em fluidos corporais, incluindo o leite materno, podendo interagir com um amplo espectro de receptores celulares, incluindo integrinas e resíduos de ácido siálico, importantes para a interação e penetração do rotavírus nos enterócitos (DENHARDT *et al.*, 2001; ROLLO *et al.*, 2005). Tal citocina tem sido demonstrada como importante determinante na proteção contra patógenos intracelulares, incluindo o *Rotavirus*, como demonstrado em estudos utilizando animais *knok-out* para o gene da Osteopontina (ROLLO *et al.*, 2005) e contra outros patógenos como herpes simplex virus tipo 1, *Listeria monocytogenes* e *Plasmodium falciparum* (CANTOR e SHINOHARA, 2009).

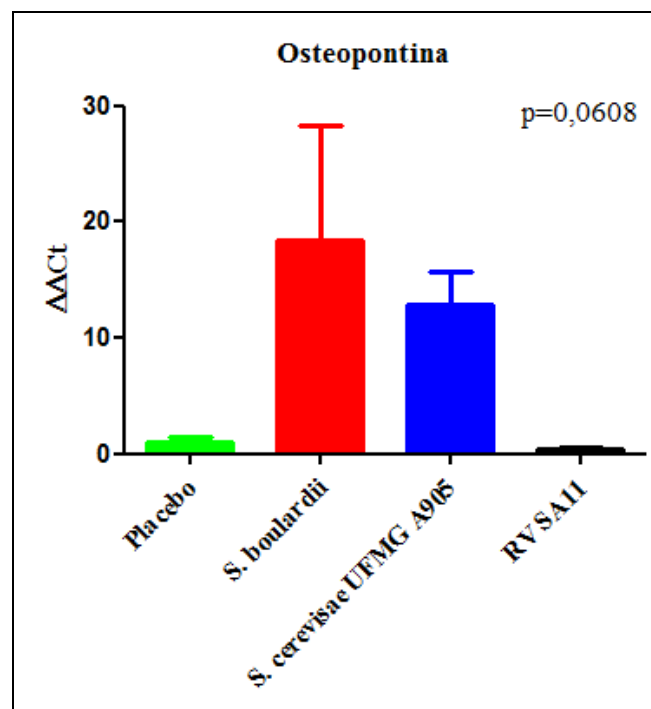


Figura 26: Avaliação dos níveis da quimiocina Osteopontina em sobrenadante clarificado de intestino de camundongos Balb/C. Verde: Placebo; Vermelho grupo infectado com rotavírus SA11 e posteriormente tratado com *S. bouardii*; Azul: Grupo de animais infectados pelo rotavírus SA11 e posteriormente tratados com *S. cerevisiae* UFMG A905; Preto grupo desafiado com Rotavírus Teste: One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni. $P=0,0608$.

No presente estudo, observou-se nos achados histopatológicos, a infiltração de células mononucleares, provavelmente composta de monócitos/macrófagos e linfócitos T ativados na lâmina própria e mucosa intestinal de camundongos infectados pelo Rotavírus SA11, 72h após a infecção. Maeno e colaboradores (2009) demonstraram em seu estudo que o infiltrado celular observado em seu modelo experimental apresentava expressão de Osteopontina, que poderia estimular o recrutamento de macrófagos e células T e ativá-las no sítio de infecção (MAENO *et al.*, 2009). Monócitos expressam Osteopontina em níveis basais, contudo, quando são diferenciados em macrófagos, há um aumento substancial na indução desta quimiocina, regulando esta célula em funções como migração, ativação e fagocitose e contribuem na imunidade inata à infecção pelo rotavírus (MAENO *et al.*, 2009). Além disso, a osteopontina aumenta a produção de CD40L por células T, induzindo a proliferação de células B e a produção de anticorpos (WANG e DENHARDT, 2008).

A osteopontina também é quimioatraente para neutrófilos (WANG e DENHARDT, 2008). No presente estudo, a histopatologia revelou um acentuado infiltrado de neutrófilos na vilosidade intestinal. Este achado pode indicar um recrutamento de polimorfonucleares, em resposta à invasão pelo rotavírus, na tentativa de eliminar o patógeno. A necrose focal evidenciada também na histopatologia parece ter sido um dano tecidual causado pela liberação de produtos citotóxicos destas células no sítio de infecção.

O aumento da indução da Osteopontina pelas leveduras em nosso trabalho reflete possivelmente um efeito protetor dos probióticos sobre a infecção causada pelo rotavírus. A acentuada produção da quimiocina promove imunidade anti-inflamatória (do tipo TH1). Em animais tratados com as leveduras houve redução da infiltração de células na mucosa intestinal, contudo estudos mais detalhados são necessários para confirmar a polarização da resposta a um tipo específico de imunidade, T_{H1} ou T_{H2}.

5.2.6. Avaliação da enzima N-Acetil-glicosaminidase pulmonar e intestinal

Para medir o recrutamento de macrófagos para o sítio de infecção pelo rotavírus, foram avaliados os níveis da enzima N-Acetil-glicosaminidase em tecido pulmonar e intestinal. Na avaliação da enzima N-Acetil-glicosaminidase intestinal as médias de produção da enzima, os valores para os grupos experimentais ficaram semelhantes ao grupo controle, não havendo

diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Em relação à produção da enzima pulmonar, entretanto, podem-se observar resultados estatísticos quando foram comparados os quatro grupos estudados, especialmente entre o grupo Rota x placebo, Rota x Rota + SB e entre SB + Rota e Rota. O tratamento com as leveduras reduziu o recrutamento de macrófagos em relação ao grupo controle. Pode-se observar também, que em ambos, pulmões e intestino, a dispersão dos valores em torno da média foi menor nos grupos tratados com a levedura (Figura 27).

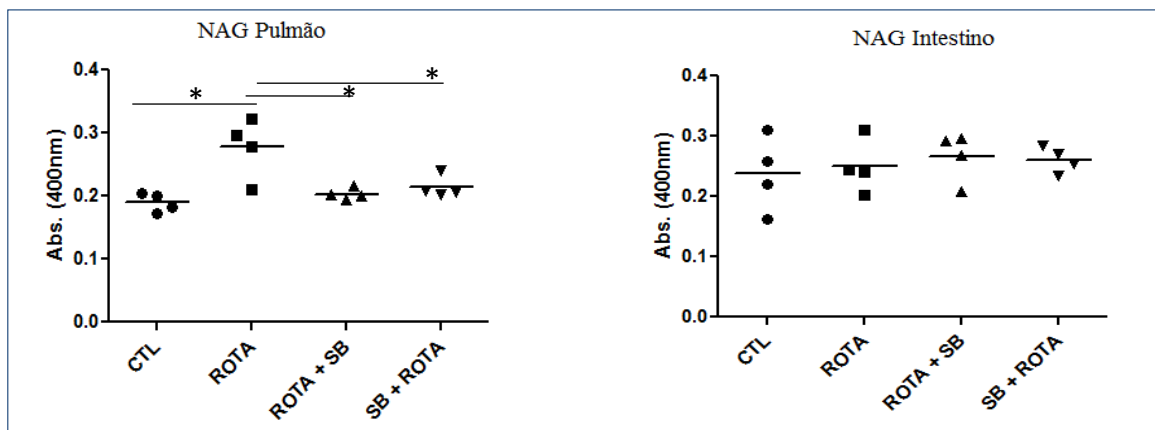


Figura 27: avaliação das enzimas N-Acetil-glicosaminidase pulmonar e intestinal em sobrenadante clarificado de intestino e pulmões de camundongos. CTL – placebo; Rota – Grupo de animais infectados pelo rotavírus SA11; Rota + Sb – indivíduos infectados pelo rotavírus SA11 e posteriormente tratados com *S. boulardii*; Sb+ Rota – indivíduos tratados com uma suspensão de leveduras incubadas na presença do rotavírus SA11. Teste: One-way ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

A produção da enzima NAG reflete indiretamente o recrutamento de macrófagos para o sítio de infecção. A presença do macrófago no sítio de lesão promove a expressão de quimiocinas que são quimiotáticas para células inflamatórias, importantes na resolução da infecção. No presente estudo, o infiltrado de mononucleares é sugestivo de infiltração de monócitos/macrófagos. Neste caso, o aumento deste tipo celular no epitélio intestinal parece ser em resposta ao estímulo de quimiocinas como a Osteopontina, presente em níveis aumentados neste modelo animal.

5.2.7. Avaliação da sIgA (Imunoglobulina A secretória)

Foram avaliados os níveis de sIgA em fluido intestinal coletados nas porções duodenal e jejunal do intestino delgado dos animais. Na figura 29 é mostrado que os níveis de sIgA

diferem entre os grupos estudados. Ao se analisarem os grupos infectados pelo *Rotavirus* e o grupo infectado e tratado com *S. boulardii* (Rota +SB), pode-se observar que houve redução na produção de sIgA nos dois grupos estudados, quando comparados ao grupo placebo (CTL). Estas diferenças não foram estatisticamente significativas, embora tenha sido observada uma tendência à redução da produção do anticorpo em nos grupos tratados com a levedura.

Embora o tratamento com *S. boulardii* após a infecção pelo *Rotavirus* não tenha oferecido proteção no modelo animal estudado, foi observado que o co-tratamento de leveduras com *Rotavirus* e posterior inoculação nos camundongos (grupo tratado com uma mistura pré-incubada de *S. boulardii* e *Rotavirus*) gerou uma maior produção da sIgA nestes animais. Estes resultados foram estatisticamente significativos, quando comparados os grupos Sb + Rota e os grupos Rota + Sb (grupo tratado com *S. boulardii* após ser infectado com *Rotavirus*), *Rotavirus* (infectado e não-tratado) e placebo (figura 28).

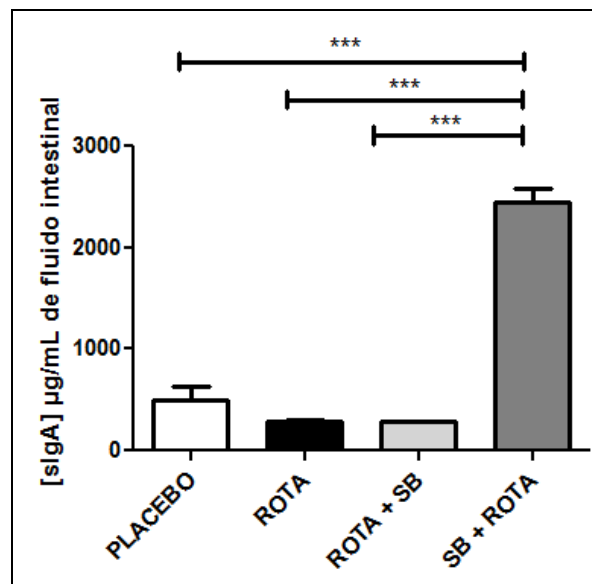


Figura 28: Avaliação da produção de sIgA em fluido intestinal de camundongos Balb/C convencionais. CTL – placebo; Rota – Grupo de animais infectados pelo rotavírus SA11 sem tratamento com leveduras; Rota + Sb – indivíduos infectados pelo rotavírus SA11 e posteriormente tratados com *S. boulardii*; Sb+ Rota – indivíduos tratados com o sobrenadante de uma suspensão de leveduras pré-incubadas por 1h na presença do rotavírus SA11. $p < 0,05$. Teste: One-way ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

Quando foram estudados animais de 15 dias de idade, a análise da sIgA demonstra que, semelhantemente ao grupo de animais de 21 dias, animais tratados com *S. boulardii* tiveram a produção de sIgA estatisticamente reduzida quando comparou-se estes animais aos animais do

grupo controle ($p < 0,05$). A produção do anticorpo neste grupo também foi menor que no grupo apenas infectado pelo *Rotavirus*, ainda que esta diferença não tenha apresentado significado estatístico. Entretanto, o tratamento dos animais com a levedura *S. cerevisiae* UFMG A905, estimulou maior produção e maior concentração desta imunoglobulina. A produção de sIgA no grupo tratado com *S. cerevisiae* UFMG A905, foi estatisticamente maior quando comparada ao grupo ao grupo tratado com *S. boulardii* ($p < 0,05$) e quando comparados ao grupo de animais somente infectados com *Rotavirus* ($p < 0,05$) (Figura 29).

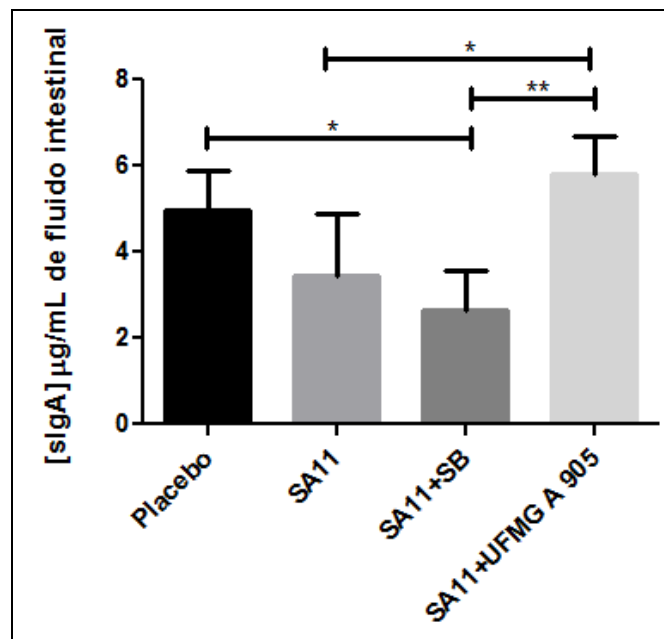


Figura 29. Avaliação da produção de sIgA em fluido intestinal de camundongos Balb/C convencionais. Placebo: animais inoculados com sobrenadante clarificado não infectado de células MA104; SA11: animais apenas inoculados com rotavírus SA11, sem tratamento adicional; SA11 + SB: animais inoculados com rotavírus SA11 e posteriormente tratados com a levedura *S. boulardii*, 24h após a infecção; SA11 + UFMG A905: animais inoculados com rotavírus SA11 e posteriormente tratados com a levedura *S. cerevisiae* UFMG A905, 24h após a infecção. $p < 0,05$. Teste: One-way ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

A sIgA representa a primeira linha de defesa intestinal e atua como uma espécie de barreira contra a adesão e invasão de patógenos na mucosa intestinal. A imunidade celular na lâmina própria e órgãos linfoides representam a segunda linha de defesa neste sítio anatômico (HAJISHENGALLIS *et al.*, 1992; MARTINS *et al.*, 2007). No presente estudo, o tratamento com *S. cerevisiae* UFMG A905, dos animais infectados com *Rotavirus*, mostrou maior estimulação da produção de sIgA no fluido intestinal, assim como observado em estudos anteriores (GENEROSO *et al.*, 2010) no qual o tratamento de animais com a referida levedura

aumentou significativamente os níveis de sIgA. Diferentemente de estudos anteriores (BUTS e KEISER, 2006; MARTINS *et al.*, 2007), no modelo animal do presente estudo, *S. boulardii* não foi eficiente na indução da produção de sIgA. Interessantemente, quando *S. boulardii* foi tratado com *Rotavirus* e depois inoculado nos animais, observou-se uma expressiva produção da sIgA, o que não foi observado quando do tratamento isolado com a levedura em dois experimentos distintos.

Generoso e colaboradores demonstraram que o tratamento *S. cerevisiae* UFMG A905 estimula o sistema imune do animal e preservar a integridade da barreira intestinal, além de prevenir contra a translocação bacteriana (GENEROSO *et al.*, 2010). A produção de sIgA no epitélio intestinal representa deste modo, uma barreira contra a adesão de patógenos, podendo esta proteção, ocorrer ou por ligação da sIgA aprisionando o patógeno e impedindo sua ligação ao epitélio ou por ligação a receptores específicos, impedindo a ligação do patógeno às células epiteliais (MARTINS *et al.*, 2007). No presente estudo, foi demonstrado que a produção de sIgA foi mais robusta quando os animais foram tratados com *S. cerevisiae* UFMG A905, sugerindo um potencial efeito protetor desta levedura contra a infecção pelo *Rotavirus*.

5.2.8. Avaliação da presença do RNA viral nas fezes por PCR convencional

Com o objetivo de se avaliar a presença de RNA viral em amostras de fezes coletadas no experimento, foi realizada uma PCR convencional, utilizando-se como molde, o cDNA produzido a partir do RNA extraído das amostras fecais. Observou-se que ocorreu maior intensidade nas bandas referentes aos grupos 3 e 4, respectivamente no grupo infectado com rotavírus e pós-tratado com *S. boulardii* e no grupo que recebeu uma o sobrenadante de uma suspensão de *S. boulardii* agitado na presença de rotavírus (Figura 30). Ao se avaliar a presença do rotavírus nas fezes dos animais, pode-se perceber que a intensidade da fluorescência não pode ser entre os animais alocados no grupo placebo ou controle negativo. No grupo infectado pelo rotavírus, a reduzida intensidade da fluorescência, sugere ter havido pouca amplificação do RNA neste grupo de animais, especialmente nos indivíduos 2 e 4. Além disso, observa-se amplificação gradativamente crescente nos animais dos grupos 3 e 4.

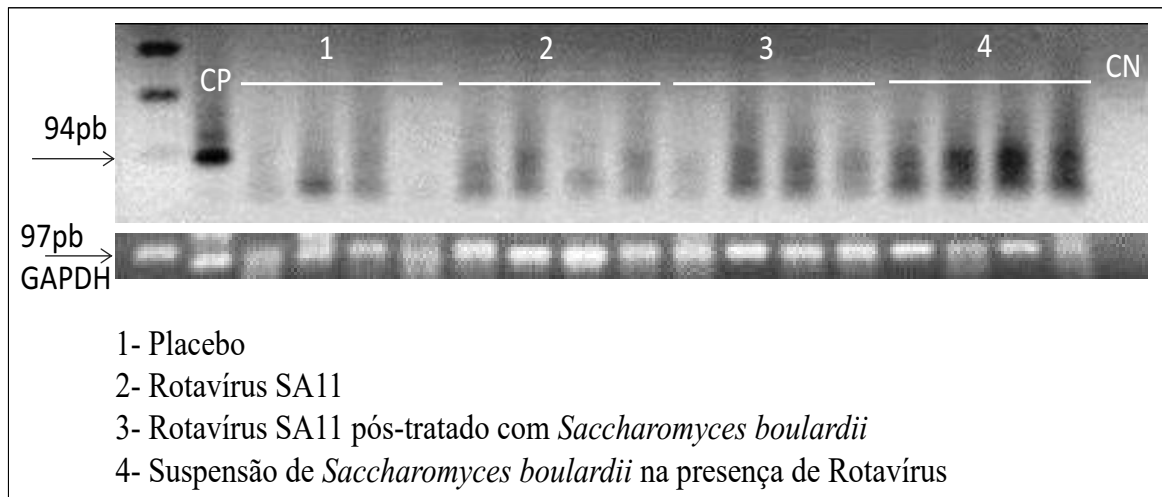


Figura 30. Gel de agarose a 2% mostrando amplicons obtidos de amostras fecais coletadas de camundongos convencionais de 21 dias. 1: Animais do grupo controle negativo, recebendo DMEN intra-gástrico; 2: Grupo de animais infectados com *Rotavirus* SA11, sem tratamento com leveduras; 3: Grupo infectado com *Rotavirus* SA11 e com *S. boulardii* e 4: Grupo de animais que receberam sobrenadante de uma suspensão de leveduras pré-incubadas por 1h na presença do rotavírus SA11. Cada grupo era composto por quatro animais. Cada canaleta representa um destes animais, 1, 2, 3 e 4.

Experimentos utilizando animais isentos de germes revelaram que os efeitos benéficos da levedura poderiam estar relacionados, pelo menos em parte, à ligação da *Salmonella* em sítios da parede da levedura (MARTINS *et al.*, 2011). No presente estudo, o tratamento dos animais infectados com *Rotavirus*, com a levedura *S. boulardii*, não apresentou proteção contra o vírus. Quando se analisou a presença de RNA viral nas fezes dos animais, observou-se que houve maior intensidade de fluorescência nos animais tratados com a suspensão de leveduras tratadas com *Rotavirus*. O *clearance* das partículas virais pode ser observado a partir de 24h após a infecção. A maior intensidade de fluorescência observada para os animais do grupo 4 sugere que um maior número de partículas tenha sido excretado nas fezes. A ingestão da mistura levedura vírus pelos animais parece ter aumentado o *clearance* do vírus, sugerindo haver uma interação física entre as partículas virais e as células de levedura, como observado entre a bactéria *S. Typhimurium* e a levedura *S. boulardii* (THIAGO *et al.*, 2012).

6. CONCLUSÕES

O tratamento com as leveduras probióticas de camundongos desafiados com o vírus levou a um ganho em peso maior quanto comparado com animais controle ou somente desafiados com o vírus. Contudo, o exame histopatológico do intestino não mostrou um efeito benéfico dos probióticos *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG A905 em camundongos convencionais infectados pelo *Rotavirus*, provavelmente devido ao efeito bifásico observado na produção da lesão intestinal;

O tratamento de camundongos Balb/C convencionais com *S. boulardii* após a infecção por *Rotavirus*, não alterou a produção das citocinas e quimiocinas avaliadas (KC, IL-1b, eotaxina e IL-10).

A quimiocina Osteopontina parece exercer importante papel protetor na infecção induzida no modelo experimental estudado, modulando a infiltração de células mononucleares para o sítio de lesão. Esta modulação pode ser percebida nos resultados histopatológicos observados.

Os níveis de imunoglobulinas sigam no conteúdo intestinal de camundongos convencionais após a infecção pelo *Rotavirus* foram maiores na presença das leveduras *S. cerevisiae* UFMG A905 e de *S. boulardii*, sugerindo que as leveduras induzem a produção da citocina Osteopontina pelas células do hospedeiro, uma vez que a mesma é relatada ser eficiente indutora da produção de anticorpos, e, os seus níveis foram elevados nos grupos estudados.

Experimentos mais detalhados deverão ser conduzidos para determinar o mecanismo de ação das leveduras do presente estudo, estabelecer a relação entre a osteopontina e a produção de sIgA e citocinas/quimiocinas como KC, RANTES e IL-10 e estudar a possível interação física entre as partículas virais e as células de leveduras, como ocorre para certos patógenos bacterianos.

7. ANEXO

 <p>UFMG</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>Senhor(a) Professor(a) Jacques Robert Nicoli,</p>	
<p>Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Avaliação de leveduras probióticas no tratamento da infecção induzida por rotavírus em camundongos, submetido a esta comissão pelo protocolo 371 / 2012, a CEUA decidiu aprovar a sua solicitação.</p>	
<p>Justificativa: Aprovado na reunião do dia 13/03/2013.</p>	
<p>Para acessar ao seu projeto clique no link: https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/ Belo Horizonte, 14/03/2013.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	
<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>	

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFRIKANOVA I., FABBRETTI E., MIOZZO M.C., BURRONE O.R. Rotavirus NSP5 phosphorylations up-regulated by interaction with NSP2. **J. Gen. Virol.** 11: 2679-86, 1998.
2. ARNOLD J.R., BOOR P.J. Improved transmission electron microscopy (TEM) of cultured cells through a “floating sheet” method. **J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.** 94: 30-36, 1986.
3. ARNOLD M.M., PATTON J.T. Diversity of Interferon Antagonist Activities Mediated by NSP1 Proteins of Different Rotavirus Strains. **J. Virol.** 85 (5): 1970-1979, 2011.
4. ARNOLDI F., CAMPAGNA M., EICHWALD C., DESSELBERGER U, O. BURRONE R. Interaction of Rotavirus Polymerase VP1 with Nonstructural Protein NSP5 Is Stronger than That with NSP2. **J. Virol.** 81, 5: 2128–2137, 2007.
5. ARANDA-MICHEL J. e GIANELLA R.A. Acute diarrhea: a practical review. **Am. J. Med.** 106: 670-676, 1999.
6. BAJOLETO e CHIPPAUX-HYPPOLITE, Rotavirus and other viruses of diarrhea. **Bull. Soc. Pathol. Exot.** 91: 432-437, 1998.
7. BAILEY PJ. Sponge implants as models. **Methods. Enzymol.** 162: 327-334, 1988.
8. BEAU I., COTTE-LAFFITTE J., AMSELLEM R., SERVIN A.L. A Protein Kinase A-dependent mechanism by which Rotavirus affects the distribution and mRNA level of the functional tight junction-associated protein, occludin, in human differentiated intestinal Caco-2 cells. **J. Virol.** 81: 8579-8586, 2007.

9. BENGMARK S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **Gut**. 42: 2-7, 1998.
10. BERG R.D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends Microbiol.** 4: 430-435, 1996.
11. BLUTT S.E., CONNER M.E. Rotavirus: to the gut and beyond. **Curr. Opin. Gastroenterol.** 23: 39-43, 2007.
12. BLUTT S.E., MATSON D.O., CRAWFORD S.E., STAAT M.A., AZIMI P., BENNETT B.L., PIEDRA P.A., CONNER M.E. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. **PLoS Med.** 4: 660-668, 2007.
13. BOTIĆ T., KLINGBERG T.D., WEINGARTL H., CENCIČ A. A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** 115: 227-234, 2007.
14. BONNEMAISON E., LANOTTE P., CANTAGREL S. *et al.* Comparison of fecal flora following administration of two antibiotic protocols for suspected maternofetal infection. **Biol. Neonate** 84: 304-310, 2003.
15. BRANDÃO R.L., CASTRO I.M., BAMBIRRA E.A., AMARAL S.C., FIETTO L.O., TROPIA M.J.M., NEVES M.J., SANTOS R.G., GOMES N.C.M., NICOLI J.R. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environm. Microbiol.** 64: 564-568, 1998.
16. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, INFORME TÉCNICO, 2006. Doença diarréica por rotavírus: Vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano-VORH. Documento elaborado por COVEH/CGDT e CGPNI do DEVEP/SVS/MS (Ministério da Saúde). Disponível em: WWW.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_rotavirus_02_03_2006.pdf.

17. BRUNET J. P., J. COTTE-LAFFITTE, C. LINXE, A. M. QUERO, M. GENITEAU-LEGENDRE, A. SERVIN. Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: role in microvillar actin alteration. **J. Virol.** 74: 2323–2332, 2000.
18. BRUNET J.P., JOURDAN N., COTTE-LAFFITTE J., LINXE C., GENITEAU-LEGENDRE M., SERVIN A., QUERO A.M. Rotavirus infection induces cytoskeleton disorganization in human intestinal epithelial cells: implication of an increase in intracellular calcium concentration. **J. Virol.** 74: 10801–10806, 2000.
19. BUCCIGROSSI V., LAUDIERO G., RUSSO C., MIELE E., SOFIA M., MONINI M., RUGGERI F.M., GUARINO A. Chloride Secretion Induced by Rotavirus Is Oxidative Stress-Dependent and Inhibited by *Saccharomyces boulardii* in Human Enterocytes. **PLoS ONE** 9(6): e99830. doi:10.1371/journal.pone.0099830, 2014.
20. BUSSCHER, H.J., MULDER, A.F., VAN DER MEI, H.C. *In vitro* adhesion to enamel and *in vivo* colonization of tooth surfaces by *Lactobacilli* from a bio-yoghurt. **Caries Res.** 33: 403-404, 1999.
21. BUTS J-P., KEYSER N.D. Effects of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. **Dig. Dis. Sci.** 51: 1485-1492, 2006.
22. CANGEMI DE GUTIERREZ, R.C., SANTOS DE ARAOZ, V.S., NADER-MACIAS, M.E. Effect of intranasal administration of *Lactobacillus fermentum* on the respiratory tract of mice. **Biol. Pharm. Bull.** 23: 973-978, 2000.
23. CANTOR H., SHINOHARAM.L. Regulation of T-Helper –cell lineage development by osteopontina: the inside story. **Nat. Rev.** 9: 137-141, 2009.

24. CARREÑO-TORRES J.J., GUTIÉRREZ M., ARIAS C.F., LÓPEZ S., ISA P. Characterization of viroplasm formation during the early stages of Rotavirus infection. **Virolog. J.** 7: 350-361, 2010.
25. CARVALHO-COSTA F.A., VOLOTÃO E.M., DE ASSIS R.M.S., FIALHO A.M., DE ANDRADE J.S.R., ROCHA L.N., TORT L.F.L., DA SILVA M.F.M., GÓMEZ M.M., DE SOUZA, PAMELLA M., LEITE J.P.G. Laboratory-based Rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005–2009. **Ped. Infect. Dis. J.** 30: S35-S41, 2011
26. CASOLA A., ESTES M.K., CRAWFORD S.E., OGRA P.L., ERNST P.B., GAROFALO R.P., CROWE S.E. Rotavirus infection of cultured intestinal epithelial cells induces secretion of CXC and CC chemokines. **Gastroenterol.** 114: 947-955, 1998.
27. CHEN J., CAI W., FENG, Y. Development of intestinal bifidobacteria and lactobacilli in breast-fed neonates. **Clin. Nutr.** 26: 559-566, 2007.
28. CIMERMAN S., CIMERMAN B., LEWI D.S. Enteric parasites and AIDS. **São Paulo Med. J.** 117: 266-273, 1999.
29. CIRIELLO C.J., LACHANCE M.A. **YEASTCOMPARE**. University of Western Ontario, London, ON, Canadá, 2001.
30. COBEA. Colegio Brasileiro de Experimentação Animal. **Legislação e Ética**. <http://www.cobea.org.br/>. 2006.
31. COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES. Prevention of Rotavirus disease: guidelines for use of Rotavirus vaccine. **Pediatrics** 119: 171-182, 2007.
32. COSTA C., CANDEIAS J.A.N., CAPELETTI E.L.L. Eletroferotipos de rotavírus em crianças com e sem quadros de gastroenterite. **Rev. Saúde Pub.** 24: 152-155, 1990.

33. COSTA P.S.S., CARDOSO D.D.P., GRISI S.J.S.E., SILVA P.A., FIACCADORI F., SOUZA M.B.L.D., SANTOS R.A.T. Infecções e reinfecções por Rotavírus A: genotipagem e implicações vacinais. **J. Ped.** 80: 119-122, 2004.
34. CZERUCKA D.; DAHAN S.; MOGRABI B.; ROSSI B.; RAMPAL P. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. **Infect. Immun.** 68: 5998-6004, 2000.
35. DAS G.; JANEWAY C. A. Development of CD8 α/α and CD8 α/β T cells in major histocompatibility complex class I-deficient mice. **J. Exp. Med.** 190: 881–884, 1999.
36. DELLERT S.F. e COHEN M.B. Diarrheal disease: established pathogens, new pathogens, and progress in vaccine development. **Ped. Gastroenterol.** 23: 636-654, 1994.
37. DENHARDT D.T., NODA M., O'REGAN A.W., PAVLIN D., BERMAN J. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. **J. Clin. Invest.** 107 (9): 1055-1061, 2001.
38. DINIZ C.G., ARANTES R.M., CARA D.C., LIMA F.L., NICOLI J.R., CARVALHO M.A.R, FARIAS L.M. Enhanced pathogenicity of susceptible strains of the *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole. **Microb. Infect.** 5: 19-26, 2003.
39. DONG Y., ZENG C.Q., BALL J.M., ESTES M.K., MORRIS A.P. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94: 3960–3965, 1997.

40. DUFFY L.C., ZIELEZNY M.A., RIEPENHOFF-TALTY M., DRYJA D., SAYAHTAHERI-ALTAIE S., GRIFFITHS E., RUFFIN D., BARRETT H., ROSSMAN J., OGRA P.L. Effectiveness of *Bifidobacterium bifidum* in mediating the clinical course of murine rotavirus diarrhea. **Pediatr. Res.** 35 (6): 690-695, 1994.
41. EICHWALD C., RODRIGUEZ J.F., BURRONE O.R. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamic of viroplasm formation. **J. Gen. Virol.** 85: 625-634, 2004.
42. ESTES M.K. Rotaviruses and their replication. In: **Fields Virology**. 4.ed. Lippincott-Raven, Philadelphia. Vol.2, pp 1747-1776, 2001.
43. ESTES M.K., COHEN J. Rotavirus gene structure and function. **Microb. Rev.** 53: 410-449, 1989.
44. ESTES M.K., KAPIKIAN A.Z. Rotaviruses. In: **Fields Virology**. 5.ed. Lippincott Williams & Wilkins. Vol.2, pp.1917-1974, 2007.
45. EZENDAM J., VAN LOVEREN H. Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. **Nutr. Rev.** 64: 1-14, 2006.
46. FAGUNDES-NETO U., PENNA F.J. Diarréia aguda. In: FAGUNDES-NETO, U., PENNA F.J., WEHBA J. **Gastroenterologia Pediatrica**. 2.ed. Medsi. Rio de Janeiro, pp. 163-177, 1991.
47. FAO/WHO. Food and Agriculture Organization / World Health Organization. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada. 11p. April 30 and May 1, 2002.
48. FENAUX M., CUADRAS M.A., FENG N., JAIMES M., GREENBERG H.B. Extraintestinal spread and replication of a homologous EC Rotavirus strain and a heterologous rhesus Rotavirus in BALB/c mice. **J. Virol.** 80: 5219-5232, 2006.

49. FIETTO, J.L.R., ARAÚJO, R.S., VALADÃO, F.N., FIETTO, L.G., BRANDÃO, R.L., NEVES, M.J., GOMES, C.O., NICOLI, J.R. *et al.* Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. **Can. J. Microbiol** 50: 615-621, 2004.
50. FLEWETT T.H., BRYDEN A.S. DAVIES H. Diagnostic electron microscopy. II- Acute gastroenteritis associated with Reovirus-like particles. **J. Clin. Pathol.** 27: 608-614, 1974.
51. FLORES C.A., MELVIN J.E., FIGUEROA C.D., SEPULVEDA F.V. Abolition of Ca²⁺-mediated intestinal anion secretion and increased stool dehydration in mice lacking the intermediate conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channel Kcnn4. **J. Physiol.** 583: 705-717, 2007.
52. GENEROSO S.V., VIANA M., SANTOS R., MARTINS F.S., MACHADO J.A.N., ARANTES R.M.E., NICOLI J.R., CORREIA M.I.T.D., CARDOSO V.N. *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. **Arch. Microbiol.** 192: 477-484, 2010.
53. GOUVEIA V., DE CASTRO L., TIMENETSKY M.C., GREENBERG H., SANTOS N. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.** 32: 1408-1409, 1994.
54. GRAFF J.W., ETTAYEBI K., HARDY M.E. Rotavirus NSP1 Inhibits NFκB Activation by Inducing Proteasome-Dependent Degradation of b-TrCP: A Novel Mechanism of IFN Antagonism. **PLoS Pathog.** 5(1): e1000280., 2009.
55. GRAHAM K.L., O'DONNELL J.A., TAN Y., SANDERS N., CARRINGTON E.M., ALLISON J., COULSON B.S. Rotavirus infection of infant and young adult nonobese diabetic mice involves extraintestinal spread and delays diabetes onset. **J. Virol.** 81: 6446-6458, 2007.

56. GRANGETTE C., MULLER-ALOUF H., GOUDERCOURT D., GEOFFROY M.C., TURNEER M., MERCENIER A. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. **Infect. Immun.** 69: 1547-1553, 2001.
57. GREENBERG H.B., ESTES M.K. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. **Gastroent.** 136: 1939-1951, 2009.
58. GUERRANT R.L., GILDER T.V., STEINER T.S., THIELMAN N.M., SLUTSKER L., TAUXE R.V., HENNESSY T., GRIFFIN P.M., DuPONT H., SACK R.B., TARR P., NEILL M., NACHAMKIN I., RELLER L.B., OSTERHOLM M.T., BENNISH M.L., PICKERING L.K. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin. Infect. Dis.** 32: 331-350, 2001.
59. GUERRERO C.A., BOUYSSOUNADE D., ZARATE S., ISA P., LOPEZ R.T. ROMERO P., MENDEZ E., LOPEZ S., ARIAS C.F. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. **J. Virol.** 76: 4096–4102, 2002.
60. GUERRERO C.A., ZARATE S., CORKIDI G., LOPEZ S., ARIAS C.F. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. **J. Virol.** 74: 9362–9371, 2000.
61. GUGLIELMI K.M., McDONALD S.M., PATON J.T. Mechanism of intraparticle synthesis of the Rotavirus double-stranded RNA genome. **J. Biol. Chem.** 24:18123-18128, 2010.
62. HAJISHENGALLIS G., NIKOLOVA E., RUSSEL M.W. Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to saliva coated hydroxiapatite by human secretory immunoglobulin A antibodies to the cell surface protein antigen I/II: reversal by IgA I protease cleavage. **Infect. Immun.** 60: 5057-5064, 1992.

63. HALASZ P., HOLLOWAY G., TURNER S.J., COULSON B.S. Rotavirus replication in intestinal cells differentially regulates integrin expression by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway, resulting in increased cell adhesion and virus yield. **J. Virol.** 82: 148-180, 2008.
64. HARMSSEN H.J.M., WILDEBOER-VELOO A.C.M., RAANGS G.C. *et al.* Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 30: 61-67, 2000.
65. HEWISH M.J., TAKADA Y., COULSON B.S. Integrins $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_4\beta_1$ can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. **J. Virol.** 74: 228–236, 2000.
66. HIRATA Y., BROQUET A. H., MENCHEN L., KAGNOFF M. F. Activation of innate immune defense mechanisms by signaling through RIG-I/IPS-1 in intestinal epithelial cells. **J. Immunol.** 179: 5425-5432, 2007.
67. HOOPER L.V. Bacterial contributions to mammalian gut development. **Trends Microbiol.** 12: 129-134, 2004.
68. HOOPER L.V., GORDON J.I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. **Science** 292: 1115-1118, 2001.
69. HU L., CHOW D.C., PATTON J.T., PALZKILL T., ESTES M.K., PRASAD B.V.V. Crystallographic Analysis of Rotavirus NSP2-RNA Complex Reveals Specific Recognition of 5' GG Sequence for RTPase Activity. **J. Virol.** 86(19): 10547-10557, 2012 A.
70. HU L., CRAWFORD S.E., HYSER J.M., ESTES M.K., PRASAD B.V. Rotavirus non-structural proteins: structure and function. **Curr. Opin. Virol.** 2:380-388, 2012.
71. ICTV 2014. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2010>.

72. JIANG X., CRAWFORD S.E., ESTES M.K., PRASSAD B.V.V. Rotavirus Structure. In: **Segmented Double-Stranded RNA viruses – Structure and Molecular Biology**. Ed. by John Patton. Caister Acc. Press. p 45-60, 2008.
73. KABIR A.M., AIBA Y., TAKAGI A., KAMIYA S., MIWA T., KOGA Y. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. **Gut**. 41: 49-55, 1997.
74. KAILA M., ISOLAURI E., SOPPI E., VRTANEN E., LAINE, S., ARVILOMMI, H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by human *Lactobacillus* strain. **Pediat. Res.** 32: 141-144, 1992.
75. KAILA M.; ISOLAURI E.; SAXELIN M.; ARVILOMMI H.; VESIKARI T. Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhea. **Arch. Dis. Child.** 72: 51-53, 1995.
76. KAPIKIAN A.Z., HOSHINO Y., CHANOCK R.M. Rotaviruses. In: **Fields Virology**. 4.ed. Lippincott-Raven, Philadelphia. Vol.2, pp 1747-1776, 2001.
77. KAUR T., GANGULY N.K. Modulation of gut physiology through enteric toxins. **Mol. Cell. Biochem.** 253: 15-19, 2003.
78. KEUSH G.T., THEA D.M., KAMENGA M., KALANDA K., MBALA M., BROWN C., DAVACHI F. Persistent diarrhea associated with AIDS. **Acta. Paediat.** Suppl 381: 45-48, 1992.
79. KITAMOTO N., RAMIG R.F., MATSON D.O., ESTES M.K. Comparative growth of different rotavirus strains in differentiated cells (MA104, HepG2, and CaCo-2). **Virology** 184: 729–737, 1991.
80. KORDASTI S., ISTRATE C., BANASAZ M., ROTTENBERG, M., SJOVALL H., LUNDGREN O., SVENSSON L. Rotavirus infection is not associated with small intestinal fluid secretion in the adult mouse. **J. Virol.** 80: 11355-11361, 2006.

81. LADD N., NGO T. The use of probiotics in the prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. **Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent)**. 22: 287–291, 2009.
82. LAMMERS K.M., HELWIG U., SWENNEN E., RIZZELLO F., VENTURI A., CARAMELLI E., KAMM M.A., BRIGIDI P., GIONCHETTI P., CAMPIERI M. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. 12: 1245-1257, 2002.
83. LINHARES A.C., Rotavirus infections in Brazil: epidemiology and challenges for control. **Cad. Saúde Pub.** 16: 629-646, 2000.
84. LORROT M., VASSEUR M. How the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? **Viol. J.** 4:31, 2007
85. LONDRIGAN S.L., HEWISH M.J., THOMSON M.J., SANDERS G.M., MUSTAFA H., COULSON B.S. Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins. **J. Gen. Virol.** 81: 2203-2213, 2000.
86. LOWENTHAL A., LIVNI G., AMIR J., SAMRA Z., ASHKENAZI S. Secondary bacteremia after Rotavirus gastroenteritis in infancy. **Pediatrics** 117: 224-226, 2006.
87. LUSTER A.D. Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Eng. J. Med.** 338: 436-445, 1998.
88. MACPHERSON A.J., GEUKING M.B., MCCOY K.D. Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. **Immunology** 115: 153-162, 2005.
89. MACKIE R., SGHIR A., GASKINS H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **Am. J. Clin. Nutr.** 69: 1035S-1045S, 1999.

90. MAENO Y., SHINZATO M., NAGASHIMA S., RITTLING S.R., DENHARDT D.T., UEDE T., TANIGUCHI K. Effect of Osteopontin on Diarrhea Duration and Innate Immunity in Suckling Mice Infected with a Murine Rotavirus. **Vir. Immunol.** 22: 139-144, 2009.
91. MAJEROWICZ S., KUBELKA C.F., STEPHENS P., BARTHO.M. Ultrastructural study on experimental infection of rotavirus in a murine heterologous model. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 89 (3): 395-402, 1994.
92. MANSELL E.A., PATTON J.T. Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. **J. Virol.** 64: 4988-4996, 1990.
93. MARANHÃO H.S. Diarréia aguda: aspectos clínico-epidemiológicos, evolução nutricional e isolamento de enteropatógenos em lactentes na cidade do Natal, Nordeste do Brasil. **Elect. J. Ped. Gas. Nut. Liv. Dis.** (Tese de Doutorado – Unifesp-SP) 5: 225p, 2001.
94. MARTEAU P.R., VRESE M., CELLIER C.J., SCHREZENMEIR. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **Am. J. Clin. Nutr.** 73: 4305-4365, 2001.
95. MARTIN I., JAKOB M., SCHÄFER D., DICK W., SPAGNOLI G., HEBERER M. Quantitative analyses of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. **Osteoarthr. Cartilage.** 9: 112–118, 2001.
96. MARTIN-LATIL S., MOUSSON L., AUTRET A., COLBERE-GARAPIN F., BLONDEL B. Bax is activated during Rotavirus-induced apoptosis through the mitochondrial pathway. **J. Virol.** 81: 4457-4464, 2007.
97. MARTINS F.S. Efeito de dois probióticos, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG 905, na resposta inflamatória induzida por *Salmonella*

- enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium. **Universidade Federal de Minas Gerais**. 222 p. Tese de Doutorado, 2008.
98. MARTINS F.S., NARDI R.M.D., ARANTES R.M.E., ROSA C.A., NEVES M.J., NICOLI J.R. Screening of yeast as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 51: 83-92, 2005.
99. MARTINS F.S., RODRIGUES A.C.P., TIAGO F.C.P., PENNA F.J., ROSA C.A., ARANTE R.M.E., NARDI R.M.D., PENNA F.J., NEVES M.J., NICOLI J.R. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **J. Med. Microbiol.** 56 : 352-359, 2007.
100. MARTINS F.S., DALMASSO G., ARANTES R.M.E., DOYE A., LEMICHEZ E., LAGADEC P., IMBERT V., PEYRON J.F., RAMPAL P., NICOLI J.R., CZERUCKA D. Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to infection. **PLOS One.** 5: 1-12, 2010.
101. MARTINS F.S., ELIAN S.D.A., VIEIRA A.T., TIAGO F.C.P., MARTINS A.K.S., SILVA F.C.P, SOUZA E.L.S., SOUSA L.P., ARAÚJO H.R.C., PIMENTA P.F., BONJARDIM C.A., ARANTES R.M.E., TEIXEIRA M.M., NICOLI J.R. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. **Int. J. Med. Microbiol.**, 2011. doi:10.1016/j.ijmm.2010.11.002.
102. MATTHIJNSSENS J., CIARLET M., HEIMAN E., ARIJS I., DELBEKE T., MCDONALD S.M., PALOMBO E.A., MARA M-GO, MAES P., PATTON J.T., RAHMAN M., VAN RANST M. Full Genome-Based Classification of Rotaviruses

- Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains. **J. Virol.** 82 (7): 3204-3219, 2008.
103. MCDONALD S.M., PATTON J.T. Rotavirus VP2 Core Shell Regions Critical for Viral Polymerase Activation. **J. Virol.** 85(7): 3095–3105, 2011.
104. MOHANTY S.K., IVANTES C.A.P., MOURYAR., PACHECO C., BEZERRA J.A. Macrophages are targeted by rotavirus in experimental biliary atresia and induce neutrophil chemotaxis via Mip2/CXCL2. **Pediatr. Res.** 67(4): 345–351, 2010.
105. MOMOSE Y., HIRAYAMA K., ITOH K. Competition for proline between indigenous *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota and its contribution to the colonization resistance against *E. coli* O157:H7. **Antonie van Leeuwenhoek** 94: 165-171, 2008.
106. MOORE W.E.C., HOLDEMAN L.V. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. **Appl. Microbiol.** 27: 961-979, 1974.
107. MURPHY P.M., BAGGIOLINI M., CHARO I.F., HEBERT C.A., HORUK R., MATSUSHIMA K., MILLER L.H., OPPENHEIM J.J., POWER C.A. International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokines Receptors. **Pharmacol. Rev.** 52: 145-170, 2000.
108. NEUMANN E., OLIVEIRA M.A.P., CABRAL C.M., MOURA L.N., NICOLI J.R., VIEIRA E.C., CARA D.C., PODOPRIGORA G.I., VIEIRA L.Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H₂B₂₀ stimulates the phagocytic system of germfree mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31 1565-1573, 1998.
109. NICOLI J.R., VIEIRA L.Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos: moduladores do ecossistema digestivo. **Ciência Hoje.** 28: 34-38, 2000.

110. NICOLI J.R., VIEIRA L.Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: **Gastroenterologia**. CASTRO L.P.; L.G.V. COELHO eds., MEDSI Editora Médica e Científica Ltda., Rio de Janeiro, p. 1037-1047, 2004.
111. OLIVARES-VILLAGÓMEZ D.; KAER L.V. TL and CD8 α : Enigmatic Partners in Mucosal Immunity. **Immunol. Lett.** 134 (1): 1–6, 2010.
112. OLIVEIRA C.S., LINHARES A.C. Rotavírus: aspectos clínicos e prevenção. **J. Pediatr.** 75 (Supl 1): s91-s102, 1999.
113. OUWEHAND A.C., SALMINEN S.J. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. **Int. Dairy J.** 8: 749-758, 1998.
114. PARASHAR U.D., HUMMELMAN E.G., BRESEE J.S., MILLER M.A., GLASS R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg. Infect. Dis.** 9: 565-572, 2003.
115. PAREZ N., GARBARG-CHENON A, FOURGEUX C, LE DEIST F, SERVANT-DELMAS A., CHARPILLENNE A., COHEN J., SCHWARTZ-CORNIL I. The VP6 Protein of Rotavirus Interacts with a Large Fraction of Human Naive B Cells via Surface Immunoglobulins. **J. Virol.** 78 (22):12489-12496, 2004.
116. PEREZ J.F., RUIZ M.C., CHEMELLO M.E., MICHELANGELI F. Characterization of a membrane calcium pathway induced by rotavirus infection in cultured cells. **J. Virol.** 73: 2481-2490, 1999.
117. PLEVRIS J.N., HAYES P.C. Investigation and management of acute diarrhoea. **Br. J. Hosp. Med.** 56: 569-73, 1996.
118. PREIDIS G.A., SAULNIER D.M., BLUTT S.E., MISTRETA T.A., RIEHLEK.P., MAJOR A.M., VENABLES.F., BARRISH J.P., FINEGOLD M.J., PETROSINO J.F., GUERRANT R.L., CONNER M.E., VERSALOVIC J. Host response to probiotics

- determined by nutritional status of Rotavirus-infected neonatal mice. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 55 (3): 299-307, 2012.
119. PREIDIS G.A., SAULNIER D.M., BLUTT S.E., MISTRETA T.A., RIEHLEK.P., MAJOR A.M., VENABLES.F., BARRISH J.P., FINEGOLD M.J., PETROSINO J.F., GUERRANT R.L., CONNER M.E., VERSALOVIC J. Probiotics stimulate enterocyte migration and microbial diversity in the neonatal mouse intestine. **FASEB J.** 26: 1969-1969, 2012.
120. RAINSFORD E.W., MCCRAE M.A. Characterization of NSP6 protein product of rotavirus gene 11. **Virus Res.** 130 (1-2): 193-201, 2007.
121. RAMANI S., KANG G. Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 22: 477-82, 2009.
122. RAMIG R.F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **J. Virol.** 78 (19): 10213-10220, 2004.
123. RAMIG R.F. Systemic Rotavirus Infection. **Exp. Rev. Anti. Infect. Ther.** 5 (4): 591-612, 2007.
124. REID G. Probiotic therapy and functional foods for prevention of urinary tract infections: state of the art and science. **Curr. Infect. Dis. Rep.** 2: 518-522, 2000.
125. REED L.J., MUENCH H. A Simple Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. **Am. J. Epidemiol.** 27 (3): 493-497, 1938.
126. RIVERA R., FORNEY K., CASTRO M.R., REBOLLEDO P.A., MAMANI N., PATZI M., HALKYER P., LEON J.S., IÑIGUEZ V. Rotavirus genotype distribution during the pre-vaccine period in Bolivia: 2007-2008. **Int. J. Infect. Dis.** 17 (9): 762-767, 2013.

127. ROBERFROID M.B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? **Am. J. Clin. Nutr.** 73: 406-409, 2001.
128. RODRIGUES A.C.P., CARA D.C., FRETEZ S.H.G.G., CUNHA F.Q., VIEIRA E.C., NICOLI J.R., VIEIRA L.Q. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. **J. Appl. Microbiol.** 89: 404-414, 2000.
129. ROLLO E.E., KUMAR K.P., REICH N.C., COHEN J., ANGEL J., GREENBERG H.B., SHETH R., ANDERSON J., OH B., HEMPSON S.J., MACKOW E.R., SHAW R.D. The epithelial cell response to rotavirus infection. **J. Immunol.** 163: 4442–4452, 1999.
130. ROLLO E.E., HEMPSON S., BANSAL A., TSAO E., HABIB I. RITTLING S., DENHARDT D.T., MACKOW E.R., SHAW R. The cytokine osteopontina modulates the severity of rotavirus diarrhea. **J. Virol.** 79: 3509–3516, 2005.
131. SAAVEDRA J.M., BAUMAN N.A., OUNG I., PERMAN J.A., YOLKEN R.H. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of Rotavirus. **The Lancet.** 344: 1046-1049, 1994.
132. SCARABELI-ALVES M.C.S. Caracterização de amostras de *Rotavirus* de espécimes fecais de crianças com diarreia aguda e sem diarreia em Belo Horizonte: eletroferotipagem e identificação de tipos G e P. **Universidade Federal de Minas Gerais.** 110p. Dissertação de Mestrado, 2010.
133. SAVAGE D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annu. Rev. Microbiol.** 31: 107-133, 1977.
134. SAVAGE D.C. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. **Food Technol.** 7: 82-87, 1987.

135. SAZAWAL, S., HIREMATH G., DHINGRA U., MALIK P., DEB S., BLACK R.E. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. **Lancet Infect. Dis.** 6: 374-382, 2006.
136. SCHREZENMEIR J., DE VRESE M. Probiotics, prebiotics and symbiotics – approaching a definition. **Am. J. Clin. Nutr.** 73: 361S-364S, 2001.
137. SERVIN A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiol. Rev.** 28: 405-440, 2004.
138. SERVIN A.L., COCONNIER M.H. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.** 17: 741-754, 2003.
139. SHARP T.M., ESTES M.K. An inside job: subversion of the host secretory pathway by intestinal pathogens. **Curr. Op. Infect. Dis.** 23: 464-469, 2010.
140. SHETH R., ANDERSON J., SATO T., OH B., HEMPSON S.J., ROLLO E., MACKOW E.R., SHAW R. Rotavirus stimulates IL-8 secretion from cultured epithelial cells. **Virology.** 221: 251-259, 1996.
141. SHORTT C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends Food Sci. Technol.** 10: 411-417, 1999.
142. SHORNIKOVA A.V., CASAS I.A., MYKKÄNEN H., SALO E., VESIKARI T. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. **Pediatr Infect. Dis. J.** 16 (12): 1103-1107, 1997.
143. SILVA A.M., BAMBIRRA E.A., OLIVEIRA A.L., SOUZA P.P., GOMES D.A., VIEIRA E.C., NICOLI J.R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. **J. Appl. Microbiol.** 86: 331-336, 1999.

144. SILVA SOARES L., GUERRA S. F. S., OLIVEIRA A.S.L., SANTOS S.S. F., DE MENEZES F. C., MASCARENHAS J.D., LINHARES A.C. Diversity of rotavirus strains circulating in Northern Brazil after introduction of a rotavirus vaccine: High prevalence of G3P[6] genotype. **J. Med. Virol.** 2013 doi: 10.1002/jmv.23797.
145. SILVESTRI L.S., TARAPOREWALA Z.F., PATTON J.T. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms **J. Virol.** 78: 7763-7774, 2004
146. SONNENBURG J.L., ANGENENT L.T., GORDON J.I. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? **Nat. Immunol.** 5: 569-573, 2004.
147. STARKEY W.G., COLLINS J., WALLIS T.S., CLARKE G.J., SPENCER A.J., HADDON S.J., OSBORNE M.P., CANDY D.C.A., STEPHEN J. Kinetics, tissue specificity and pathological changes in murine Rotavirus infection in mice. **J. Gen. Virol.** 67: 2625-2634, 1986.
148. STEIN M. A., MATHERS D.A., YAN H., BAIMBRIDGE K.G., FINLAY B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* markedly decrease the resting membrane potential of Caco-2 and HeLa human epithelial cells. **Infect. Immun.** 64: 4820-4825, 1996.
149. STRATH M., WARREN D.J., SANDERSON C.J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J. Immunol. Methods** 83: 209-215, 1985.
150. SUZUKI K., HA S.A., TSUJI M., FAGARASAN S. Intestinal IgA synthesis: A primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. **Seminars Immunol.** 19: 127-135, 2007.
151. SVENSSON L. FINLAY B.B., BASS D., VON BONSDORFF C.H., GREENBERG H.B. Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. **J. Virol.** 65: 4190-4197, 1991.

152. TATE J.E., BURTON A.H., BOSCHI-PINTO C., STEELE A.D., DUQUE J., PARASHAR U.D.: 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect. Dis.** 12: 136-141, 2012.
153. TIAGO F.C.P., MARTINS F.S., SOUZA E.L.S., PIMENTA P.F.P., ARAUJO H.R.C., CASTRO I.M., BRANDÃO R.L., NICOLI J.R. Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. **J. Med. Microbiol.** 61: 1194-1207, 2012.
154. TIAN P., HU W.P.Y., SCHILLING D.A., EIDEN L.J., ESTES M.K. The nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. **J. Virol.** 68: 251–257, 1994.
155. VENTOLA H., LEHTORANTA L., MADETOJA M., SIMONEN-TIKKA M.L., MAUNULA L., ROIVAINEN M., KORPELA R., HOLMA R. Effects of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG on rotavirus infection in neonatal rat. **World J. Gastroenterol.** 18 (41): 5925-31, 2012.
156. VIJAY-KUMAR, M., GENTSCH, J. R., KAISER, W. J., BORREGAARD, N., OFFERMANN, M. K., NEISH, A. S., GEWIRTZ, A. T. Protein kinase R mediates intestinal epithelial gene remodeling in response to double-stranded RNA and live Rotavirus. **J. Immunol.** 174: 6322-6331, 2005.
157. WANG K.X., DENHARDT D.T. Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. **Cytok. Growth Fact. Rev.** 19: 333–345, 2008.
158. WARD R. L., McNEAL M. M. VP6: A Candidate Rotavirus Vaccine. **J. Infect. Dis.** 2010; 202(S1):S101–S107

159. WESTERBEEK E.A.M., VAN DER BERG A., LAFEBER H.N., KNOL J., FETTER W.P.F., VAN ELBURG R.M. The intestinal bacterial colonization in preterm infants: a review of the literature. **Clin. Nutr.** 25: 361-368, 2006.
160. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Persistent diarrhea in children in developing countries. Memorandum from a WHO meeting. **Bull WHO.** 66: 709-717, 1988.
161. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Program for control of diarrheal diseases. Interim program report. 1990.
162. WHO/FAO. Joint World Health Organization/Food and Agricultural Organization Working Group (2002) *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, London, Ontario, Canada.
163. WHO/FAO/OIE. World Health Organization/Food and Agricultural Organization Background document for the Joint WHO/FAO/OIE expert. (2003). *Workshop on Non-Human Antimicrobials Usage and Antimicrobials Resistance Scientific Assessment*. Geneva, Switzerland.
164. YAN D.F., POLK B. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. **J. Biol. Chem.** 2006.
165. ZENG C.Q.Y., ESTES M.K., CHARPILLENNE A., COHEN J. The N Terminus of Rotavirus VP2 Is Necessary for Encapsidation of VP1 and VP3. 72 (1): 201–208, 1998.
166. ZHANG W., AZEVEDO M.S., WEN K, GONZALEZ A., SAIF L.J., LI G., YOUSEF A.E., YUAN L. Probiotic *Lactobacillus acidophilus* enhances the immunogenicity of an oral rotavirus vaccine in gnotobiotic pigs. **Vaccine.** 26: 3655-3661, 2008a.

167. ZHANG W., WEN K., AZEVEDO M.S.P., GONZALEZ A., SAIF L., LI G., YOUSEF A.E., YUAN L. Lactic acid bacterial colonization and human rotavirus infection influence distribution and frequencies of monocytes/macrophages and dendritic cells in neonatal gnotobiotic pigs. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 121(3-4): 222–231, 2008b.
168. ZHOU, R., WEI, H., SUN, R., TIAN, Z. Recognition of double-stranded RNA by TLR3 induces severe small intestinal injury in mice. **J. Immunol.** 178: 4548-4556 2007.
169. ZHU J.Y., YANG Q., CAO L., DOU X.J., ZHAO J., ZHU W., DING F., BU RI-E, SUO S., REN Y., LI G., REN X. Development of porcine rotavirus vp6 protein based ELISA for differentiation of this virus other viroses. **Virol. J.** 10 (91): 2-8, 2013.