

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

César Da Silva Santana Moura

**Estudo *in vitro* e *in vivo* do efeito probiótico de *Weissella paramesenteroides* WpK4 no
tratamento da infecção causada por Rotavírus**

BELO HORIZONTE

2018

CÉSAR DA SILVA SANTANA MOURA

Estudo *in vitro* e *in vivo* do efeito probiótico de *Weissella paramesenteroides* WpK4 no tratamento da infecção causada por Rotavírus

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Álvaro Cantini Nunes
Co-orientadora: Dra. Edel Figueiredo
Barbosa Stancioli

Belo Horizonte
2018

043

Moura, César da Silva Santana.

Estudo in vitro e in vivo do efeito probiótico de *Weissella paramesenteroides* WpK4 no tratamento da infecção causada por Rotavírus [manuscrito] / César da Silva Santana Moura. – 2018.

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

Orientador: Dr. Álvaro Cantini Nunes. Coorientadora: Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Probióticos. 3. *Weissella*. 4. Rotavírus. I. Nunes, Álvaro Cantini. II. Stancioli, Edel Figueiredo Barbosa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

César da Silva Santana Moura

279/2018
entrada
2º/2016
CPF:
116.120.416-47

Às oito horas e trinta minutos do dia **30 de novembro de 2018**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Estudo *in vivo* e *in vitro* do efeito probiótico da *Weissella paramesenteroides* linhagem WpK4 no tratamento da infecção induzida pelo Rotavirus**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Alvaro Cantini Nunes**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para 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. Foram atribuídas as seguintes indicações:

| Prof./Pesq. | Instituição | CPF | Indicação |
|----------------------|-------------|----------------|-----------|
| Alvaro Cantini Nunes | UFMG | 678.159.606-34 | Aprovado |
| Anderson Miyoshi | UFMG | 034.357.036-01 | APROVADO |
| Thiago Lima Leão | UFMG | 016.214.536-50 | APROVADO |

Pelas indicações, 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, 30 de novembro de 2018.

Alvaro Cantini Nunes Alvaro Cantini Nunes

Anderson Miyoshi Anderson Miyoshi

Thiago Lima Leão Thiago Lima Leão



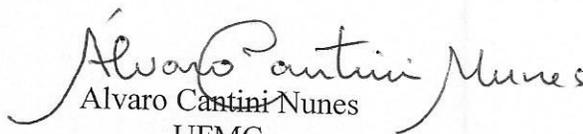
Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570

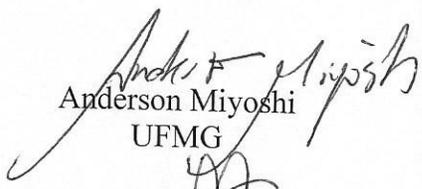


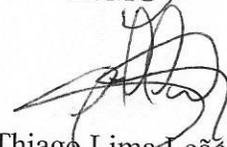
"Estudo *in vivo* e *in vitro* do efeito probiótico da *Weissella paramesenteroides* linhagem WpK4 no tratamento da infecção induzida pelo Rotavirus"

César da Silva Santana Moura

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Alvaro Cantini Nunes
UFMG


Anderson Miyoshi
UFMG


Thiago Lima Leão
UFMG

Belo Horizonte, 30 de novembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, pelo carinho, apoio, paciência e por compreenderem minhas ausências.

Ao meu orientador, Prof. Álvaro Cantini Nunes, **e minha co-orientadora**, Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, pela orientação, pela confiança depositada, pela paciência que sempre tiveram para lidar comigo e disposição para ajudar sempre que podiam.

A toda equipe dos laboratórios LGMPP, LVBA, LEFM, LABIO e LBMM que me acolheram e sempre estiveram prontos a ajudar e compartilhar conhecimento; um agradecimento especial para a técnica Tania Mara Gomes de Pinho, ao Dr. Thiago Leão e a Dra. Mariana Guimarães, pelas dicas valiosas e por toda contribuição.

À aluna de iniciação científica, Ingrid Sandy Mendes, por todo companheirismo e ajuda na realização do projeto.

Aos meus professores e colegas da Pós-graduação em Genética e da Pós-graduação em Microbiologia, pela solidariedade e por minha formação, tanto profissional como pessoal. Em especial a profa. Elisabeth Neumann, prof. Flávio da Fonseca, prof. Evanguedes Kalapothakis, prof. Jacques Nicoli, prof. Anderson Miyoshi, profa. Adriana Abalen.

Às agências de fomento, Capes, CNPq e Fapemig, pelo apoio financeiro.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”

(John F. Kennedy)

RESUMO

Diarreia severa causada por gastroenterite, ou inflamação da mucosa intestinal, é ainda um grande problema global, sendo observada em países desenvolvidos e países em desenvolvimento. É uma das doenças mais comuns do mundo, afetando pessoas de todas as faixas etárias, contudo, tem frequência maior durante os primeiros anos de vida, e é a segunda maior causa de mortalidade nos primeiros anos de vida. Os vírus estão principalmente associados à gastroenterite aguda, dentre os quais se destaca o Rotavírus. A gastroenterite induzida por RV não é tratada com antibióticos ou drogas. O Rotavírus apresenta uma grande diversidade de linhagens e as vacinas atualmente disponíveis no mercado não abrangem toda essa diversidade. Assim, várias linhagens não cobertas pela vacinação contribuem para a reemergência da doença. Nas últimas décadas, a modulação da microbiota intestinal tem sido avaliada, entre as abordagens, está o uso de probióticos. A grande vantagem da terapia com probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes quando antibióticos são usados. Neste contexto, probióticos para modular a microbiota intestinal e controlar a diarreia podem ser uma alternativa eficaz para o tratamento de gastroenterite aguda. *Weissella paramesenteroides* WpK4 mostrou ação probiótica frente a infecção por *Salmonella* Typhimurium em modelo experimental murino, assim estudos envolvendo outros enteropatógenos se tornam relevantes para melhor entendimento do caráter protetor da linhagem. Neste sentido, o presente trabalho buscou avaliar o efeito probiótico da linhagem WpK4 frente a infecção causada pelo Rotavírus SA11 *in vitro*, em células epiteliais intestinais da linhagem HT-29, e *in vivo*, em modelo experimental murino. A adesão e invasão de WpK4 foi avaliada em ensaio de co-cultivo em três linhagens celulares, MA104, HT-29 e Caco-2, usando uma ROI de 100:1 (WpK4:célula) com 1 h de contato. A quantidade de bactérias aderidas (internalizadas) variou de 4,3 a 5,9 log UFC/mL (2,6-4,0 log UFC/mL). A infecção de células HT-29 por Rotavírus SA11 pré-ativado (10^6 FFU/mL) foi avaliada: 1 hora antes da adição da bactéria (10^8 UFC); simultaneamente com a bactéria; 30 min depois da adição da bactéria; e após uma incubação da bactéria e vírus pré-ativado por 1 hora a 37°C. Houve a redução significativa da infecção nos tempos de 24, 48 e 72 h para todos grupos com exceção do grupo onde pré-incubação do vírus e bactéria não promoveu nenhuma ação direta desta sobre o vírus que permanece tão infectivo como o controle. Estudos recentes demonstraram a importância da microbiota intestinal da progenitora influenciando no desenvolvimento do sistema imune da prole. Com o objetivo de avaliar se WpK4 induziria resistência à infecção pelo RVA via modulação do sistema imune, administrou-se diariamente a bactéria *Weissella paramesenteroides* na água da fêmea progenitora durante as duas semanas antes do nascimento da prole com continuidade até o 15º dia de vida da prole. No 9º dia de vida da prole, a mesma foi desafiada com RVSA11 (10^4 UFF) e observada duas vezes ao dia, durante sete dias pós-infecção. Houve uma frequência maior de diarreia e três óbitos no grupo controle de vírus e significativamente menos diarreia, sem nenhum óbito, no grupo de fêmeas prenhes pré-tratado com WpK4. Os dados realçam o efeito probiótico protetor de WpK4 em infecções de células de mamíferos e camundongos por Rotavírus.

Palavras-chave: *Weissella paramesenteroides* WpK4, Rotavírus, probiótico.

ABSTRACT

Severe diarrhea caused by gastroenteritis, or inflammation of the intestinal mucosa, is still a major global problem, being observed in developed and developing countries. It is one of the most common diseases in the world, affecting people of all age groups. However, it has a higher frequency during the first years of life and is the second leading cause of mortality in the first years of life. The viruses are mainly associated with acute gastroenteritis, among which rotavirus stands out. Rotavirus-induced gastroenteritis is not treated with antibiotics or drugs. Rotavirus presents a wide range of strains and vaccines currently available in the market do not cover all this diversity. Thus, several strains not covered by vaccination contribute to the reemergence of the disease. In the last decades, the modulation of intestinal microbiota has been searched, among the approaches, is the use of probiotics. The great advantage of therapy with probiotics is the absence of side effects, such as the selection of resistant bacteria when antibiotics are used. In this context, probiotics to modulate intestinal microbiota and control diarrhea can be an effective alternative for the treatment of acute gastroenteritis. *Weissella paramesenteroides* WpK4 showed probiotic action against *Salmonella* Typhimurium infection in a murine experimental model, so studies involving other enteropathogens become relevant for a better understanding of the protective character of the strain. In this sense, the present study aimed to evaluate the probiotic effect of the WpK4 strain against the infection caused by rotavirus SA11 *in vitro* in intestinal epithelial cells of the HT-29 lineage, and *in vivo*, in a murine experimental model. The adhesion and invasion of WpK4 were evaluated in a co-culture assay in three cell lines, MA104, HT-29, and Caco-2, using an ROI of 100:1 (WpK4: cell) with 1h of contact. The number of adhered bacteria (internalized) ranged from 4.3 to 5.9 log CFU/ml (2.6-4.0 log CFU/ml). HT-29 cell infection by pre-activated rotavirus SA11 (10^6 FFU/mL) was evaluated: 1 h before the addition of the bacterium (10^8 UFC); simultaneously with the bacterium; 30 min after the addition of the bacterium; and after incubation of the bacterium and pre-activated virus for 1h at 37°C. There was a significant reduction of the infection in the times of 24h, 48h and 72h for all groups except for that where pre-incubation of the virus and bacterium did not promote any direct action on the virus that remains as infectious as the control. Recent studies have demonstrated the importance of intestinal microbiota of the progenitor influencing the development of the immune system of the offspring. To evaluate whether WpK4 would induce resistance to RVA infection via immune system modulation, the bacterium was administered daily in the water of female progenitor during the two weeks before the birth of the offspring with continuity until the 15th day of the life of the offspring. On the 9th day of the life of the offspring, the same was challenged with RVSA11 (10^4 FFU) and observed twice a day, for seven days post-infection. There was a higher frequency of diarrhea and three deaths in the virus control group and significantly fewer diarrhea, without any death, in the group of pregnant females pretreated with WpK4. The data highlights the probiotic protective effect of WpK4 in infection of mammalian cell lineages and mice by Rotavirus.

Keywords: *Weissella paramesenteroides* WpK4, Rotavirus, probiotics.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Microscopia eletrônica de Rotavírus. | 17 |
| Figura 2: Aspectos da estrutura do Rotavírus. | 18 |
| Figura 3: A – Interação das proteínas de estruturais do Rotavírus. B – Peplômero, constituído pela proteína VP4 e seus epítomos. C – Trímeros da proteína VP7 e seus epítomos. | 20 |
| Figura 4: Ciclo de multiplicação do Rotavírus. | 24 |
| Figura 5: Efeito da infecção por RV no intestino delgado. | 26 |
| Figura 6: Modelo de patogênese da diarreia induzida pelo Rotavírus. | 28 |
| Figura 7: Cobertura da vacina de Rotavírus em crianças de todo mundo com 1 ano de idade em 2017 e gráfico da cobertura da vacina dos anos de 2006 até 2017 no Brasil.. | 32 |
| Figura 8: Célula MA104 em alta densidade. | 38 |
| Figura 9: Modelo de diferenciação das células intestinais. | 39 |
| Figura10: Células HT-29 em baixa densidade e alta densidade, respectivamente; células Caco-2 em baixa densidade e alta densidade, respectivamente. | 39 |
| Figura 11: Desenho experimental dos ensaios <i>in vitro</i> de adsorção do Rotavírus SA11 em células HT-29. | 48 |
| Figura 12: Monocamada confluyente de células MA104 infectadas. | 52 |
| Figura 13: Titulação por formação de foco fluorescente. | 53 |
| Figura 14: Amplicon da RT-PCR utilizando como molde dsRNA de RV separado em gel de agarose a 1,5%. | 54 |
| Figura 15: Padronização da PCR de RV em gradiente de temperatura de anelamento de 50 a 58°C utilizando como molde DNA plasmidiano (clones C1-C3). | 54 |
| Figura 16: Adesão da <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 em linhagem celular MA104, HT-29 e Caco-2. | 55 |
| Figura 17: Invasão da <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 em linhagem celular MA104, HT-29 e Caco-2. | 56 |
| Figura 18: Efeito da WpK4 na expressão gênica de VP7 em células HT-29 infectadas por RV SA11. | 58 |
| Figura 19: Efeito da WpK4 na expressão gênica de VP7 em células HT-29 infectadas por RV SA11 em cada tempo e grupo. | 59 |

| | |
|---|----|
| Figura 20: Ganho de peso em porcentagem nos diferentes grupos experimentais..... | 62 |
| Figura 21: Peso médio dos animais em porcentagem, após 7 dias de infecção por RV.. | 63 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Vacinas para RVA. | 31 |
| Tabela 2: Iniciadores utilizados para amplificação de parte do segmento gênico codificador da proteína viral VP7. | 45 |
| Tabela 3: Distribuição dos grupos experimentais do ensaio <i>in vivo</i> | 50 |
| Tabela 4: Escore de diarreia nos animais por grupo de tratamentos. | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – *American Type Culture Collection*

CDC – *Center for Disease Control*

DLP – *Double Layered Particle* (Partícula viral com duplo capsídeo)

dsRNA – *Double-stranded RNA* (RNA dupla fita)

ECACC – *European Collection of Authenticated Cell Cultures*

ENS – *Enteric nervous system* (Sistema nervoso entérico)

FDA – *Food and Drug Administration*

GRAS – *Generally Recognized as Safe* (Geralmente aceito como seguro)

MOI – *Multiplicity of Infection* (Multiplicidade de infecção)

NSP – *Non-Structural Protein* (Proteínas não estruturais virais)

ORF – *Open Reading Frame* (fase aberta de leitura)

RdRp – *RNA dependent RNA polymerase* (RNA polimerase dependente de RNA)

RE – Retículo endoplasmático

ROI – *Ratio of Interaction* (Taxa de interação)

RV – Rotavírus

RVA – Rotavírus A

SFB – Soro feral bovino

ssRNA – *Single-Stranded RNA* (RNA fita única)

TLP – *Triple Layered Particle* (Partícula viral com triplo capsídeo)

UTR – *Untranslated Region* (Região não traduzida)

VP – proteínas virais estruturais

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1. Gastroenterites | 15 |
| 1.2. Rotavírus | 17 |
| 1.2.1. Estrutura e classificação | 17 |
| 1.2.2. Ciclo de multiplicação..... | 23 |
| 1.2.3. Patogênese e patofisiologia | 25 |
| 1.2.4. Resposta Imune..... | 29 |
| 1.4. Probióticos | 33 |
| 1.5. Gênero <i>Weissella</i> | 34 |
| 1.5.1. Classificação e características | 34 |
| 1.5.2. <i>Weissella paramesenteroides</i> | 34 |
| 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA | 36 |
| 3. OBJETIVOS | 37 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |
| 4.2. Células | 38 |
| 4.2.1. Célula MA104 | 38 |
| 4.1.1. Células HT-29 e Caco-2..... | 38 |
| 4.1.2. Meios de cultivo e cultura celular | 40 |
| 4.2. Amostra viral | 40 |
| 4.2.2. Titulação viral por foco de imunofluorescência | 41 |
| 4.3. Amostra Bacteriana..... | 42 |
| 4.3.1. Reativação da bactéria criopreservada e produção do estoque bacteriano | 42 |
| 4.4. Camundongos Balb/c | 42 |
| 4.5. Ensaio <i>in vitro</i> | 43 |
| 4.5.1. Preparação da bactéria <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 | 43 |
| 4.5.2. Ensaio de adesão de WpK4 em células MA104, HT-29 e Caco-2 | 43 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.5.3. | Ensaio de invasão de WpK4 em células MA104, HT-29 e Caco-2 | 44 |
| 4.5.4. | Extração do RNA viral | 44 |
| 4.5.5. | Clonagem em vetor plasmidiano do amplicon VP7 | 46 |
| 4.5.6. | Transformação bacteriana | 46 |
| 4.5.7. | Antagonismo de WpK4 frente a adsorção do Rotavírus SA11 em células HT-29 47 | |
| 4.5.8. | Quantificação da carga viral utilizando qPCR..... | 48 |
| 4.6. | Ensaio <i>in vivo</i> | 50 |
| 4.6.1. | Infecção por Rotavírus SA11 em modelo animal | 50 |
| 4.6.2. | Perda de peso e Índice de diarreia | 51 |
| 4.7. | Análises estatísticas..... | 51 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 52 |
| 5.1. | Produção e titulação do estoque viral | 52 |
| 5.4. | Verificação da clonagem do amplicon VP7 em plasmídeo pGEM-T easy | 54 |
| 6. | CONCLUSÕES..... | 65 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gastroenterites

Diarreia severa causada por gastroenterite, ou inflamação da mucosa do trato intestinal, é ainda um grande problema global, sendo observada em países desenvolvidos e países em desenvolvimento (*World Health Report, WHO, 2017*). A gama de sintomas da doença varia desde uma infecção assintomática, passando por vômito ou diarreia moderados, ou ambos, até um quadro grave resultando em desidratação, a qual pode estar associada com um distúrbio de eletrólitos e acidose metabólica, sendo a mais frequente e perigosa das complicações, que, se não tratada, pode levar à morte (HOSTETLER *et al.* 2004). Gastroenterite pode ser dividida em três grupos: aguda (<14 dias), persistente (14-29 dias) ou crônica (≥30 dias) (GUERRANT *et al.* 2001). É uma das doenças mais comuns do mundo, afetando pessoas de todas as faixas etárias, contudo, tem frequência maior durante os primeiros anos de vida, e é a segunda maior causa de mortalidade em todo o mundo nos primeiros anos de vida (FERNANDEZ-DUARTE *et al.* 2017; *Global Burden of Disease Study, GBD, 2017*; LIU *et al.* 2012).

Gastroenterite causa milhares de mortes de crianças, todos os anos, sobretudo em países em desenvolvimento. Este fato, provavelmente, está relacionado às iniquidades de acesso aos serviços de saúde, infecções concomitantes com outros enteropatógenos, desnutrição, baixa cobertura das vacinas atuais e saneamento básico precário (*World Health Report, WHO, 2017*; TATE *et al.* 2010; CLARK e PARASHAR 2013; Parashar *et al.* 2006). Além de alta taxa de mortalidade, países em desenvolvimento também apresentam altas taxas de morbidade (WANG *et al.* 2015). Em países desenvolvidos, a mortalidade associada à gastroenterite é baixa, contudo, os gastos causados pela morbidade, sua alta incidência e os custos do tratamento são substanciais (OLESEN *et al.* 2005). Países desenvolvidos também apresentam índices altos de gastroenterite em crianças e adultos, dados recentes da Alemanha indicam que 0,95 episódios ocorram por pessoa por ano, correspondendo a 64,9 milhões de episódios em adultos (WILKING *et al.* 2013).

Uma grande gama de microrganismos pode ser associada à etiologia da doença. Dentre eles, podemos citar como os principais agentes bacterianos e protozoários:

Escherichia coli, *Shigella spp.*, *C. jejuni*, *C. coli*, *H. pylori*, *Aeromonas spp.*, *V. cholerae*, *Salmonella spp.*, *C. belli*, *C. cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Isoospora belli*, *Cryptosporidium spp.* (LIU e PLATTS-MILLS *et al.* 2016). Os vírus estão principalmente associados à gastroenterite aguda, dentre os quais se destacam: Rotavírus, Norovírus, Adenovírus, Astrovírus, Sapovírus, Coronavírus, Calicivírus, Bocavírus e Enterovírus (FINKBEIBER *et al.* 2008; ELLIOT 2007; LIU e PLATTS-MILLS *et al.* 2016).

Em 2008, em todo o mundo, diarreia atribuída por infecções de Rotavírus (RV) resultou em 453.000 mortes de crianças menores de cinco anos; o que representava 5% de todas as mortes de crianças abaixo de cinco anos naquele ano (TATE *et al.* 2012). Desde a produção e implementação da vacina contra Rotavírus, as gastroenterites causadas por Rotavírus vem diminuindo. Com isso, o Norovírus se tornou o principal agente viral de gastroenterites em países desenvolvidos (WHO, 2017; GRAFF *et al.* 2016; ROBILOTTI, *et al.* 2015; O'RYAN, *et al.* 2017). Nos países em desenvolvimento, o Rotavírus ainda é o principal agente da gastroenterite aguda (LIU e PLATTS-MILLS *et al.* 2016). Os sintomas de uma gastroenterite aguda causada por Rotavírus são náusea, vômito, diarreia aquosa, mal-estar, dor abdominal, desidratação, cefaleia e febre baixa, esses sintomas normalmente desaparecem entre 3-7 dias de infecção, mas podem durar de 2 a 3 semanas (DESSELBERGER 2014).

Antes da identificação dos agentes virais, a maior parte dos episódios de gastroenterite aguda não tinham agentes etiológicos identificados. Em 1942 e 1943, Macchiavello *et al.* evidenciaram que uma doença comum, que causa leucemia e diarreia em gatos, era causada por agentes virais. LIGHT e HOBES (1943) foram um dos primeiros a sugerirem agentes virais em doenças entéricas humanas. Em seu trabalho eles induziram diarreia em bezerros inoculando filtrado de fezes de recém-nascidos, de seis surtos ocorridos em um berçário hospitalar. Em animais, a primeira descrição da presença do Rotavírus foi feita por Mebus *et al.* (1969), que inoculou fezes de bezerros com diarreia de uma fazenda local em bezerros experimentais, estudou o lúmen dos animais e demonstrou por intermédio de microscopia eletrônica a presença de partículas virais de morfologia esférica, denominando o vírus inicialmente como *Nebraska Calf Diarrhea Virus*.

Em seres humanos, em estudos conduzidos por Bishop *et al.* (1973) foram descritos os primeiros Rotavírus. Este estudo observou o vírus em biopsia de epitélio duodenal de crianças com diarreia de etiologia não-bacteriana e descreveram a presença de vesículas citoplasmáticas com partículas virais semelhantes aos Orbivírus, recebendo o nome de *Orbivirus-like agent*. Flewett *et al.* (1973) descreveram partículas virais semelhante se Flewett *et al.*(1974; 1975) propuseram a denominação Rotavírus devido sua forma estrutural, semelhantes a uma roda de carroça (latim: rota), quando observadas em microscopia eletrônica (Figura 1). No Brasil, a primeira detecção de Rotavírus foi registrada por Linhares *et al.* (1977). E em 1978, foi proposto que um novo gênero Rotavírus viria a fazer parte da Família *Reoviridae* e foi oficialmente definido pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) durante o 4º Congresso Internacional de Virologia (MATTHEWS, 1979).

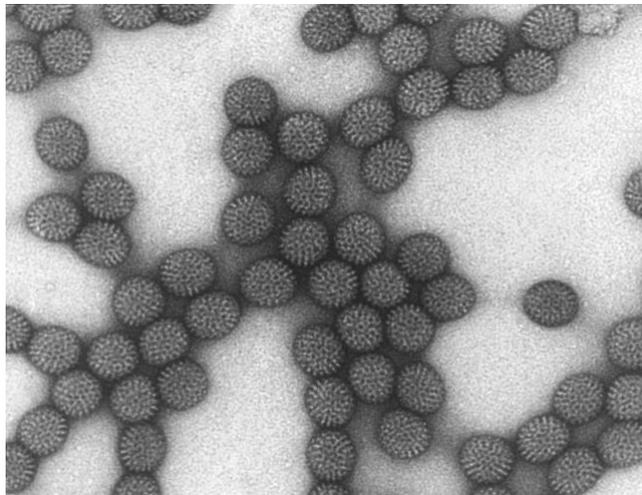


Figura 1: Microscopia eletrônica de Rotavírus (fonte: CDC) .

1.2. Rotavírus

1.2.1. Estrutura e classificação

Rotavírus é um membro do gênero Rotavírus e pertence à família *Reoviridae*, subfamília *Sedoreovirinae*. A partícula infecciosa completa (vírion) do Rotavírus apresenta aproximadamente 70 a 100 nm de diâmetro, tem simetria icosaédrica e o nome do gênero provem do aspecto característico da sua forma de roda (lat. rota) radiada, quando visualizada em microscopia eletrônica (JAYARAM *et al.* 2004). O nucleocapsídeo viral

consiste de 3 camadas proteicas concêntricas que englobam o material genético viral, sendo desprovido de envelope viral. Seu material genético é composto por 11 segmentos de RNA dupla fita (dsRNA), variando de 600 a 3.300 pb totalizando, aproximadamente, 18.500 pb, massa molecular de 2×10^5 a $2,2 \times 10^6$ Da, e codifica 6 proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) e 6 proteínas não-estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6). Seus segmentos de RNA são monocistrônicos, exceto o segmento 11 (bicistrônico) que possui uma segunda ORF (*open reading frame*), expressando tanto a proteína NSP5, como a NSP6 (Figura 2).

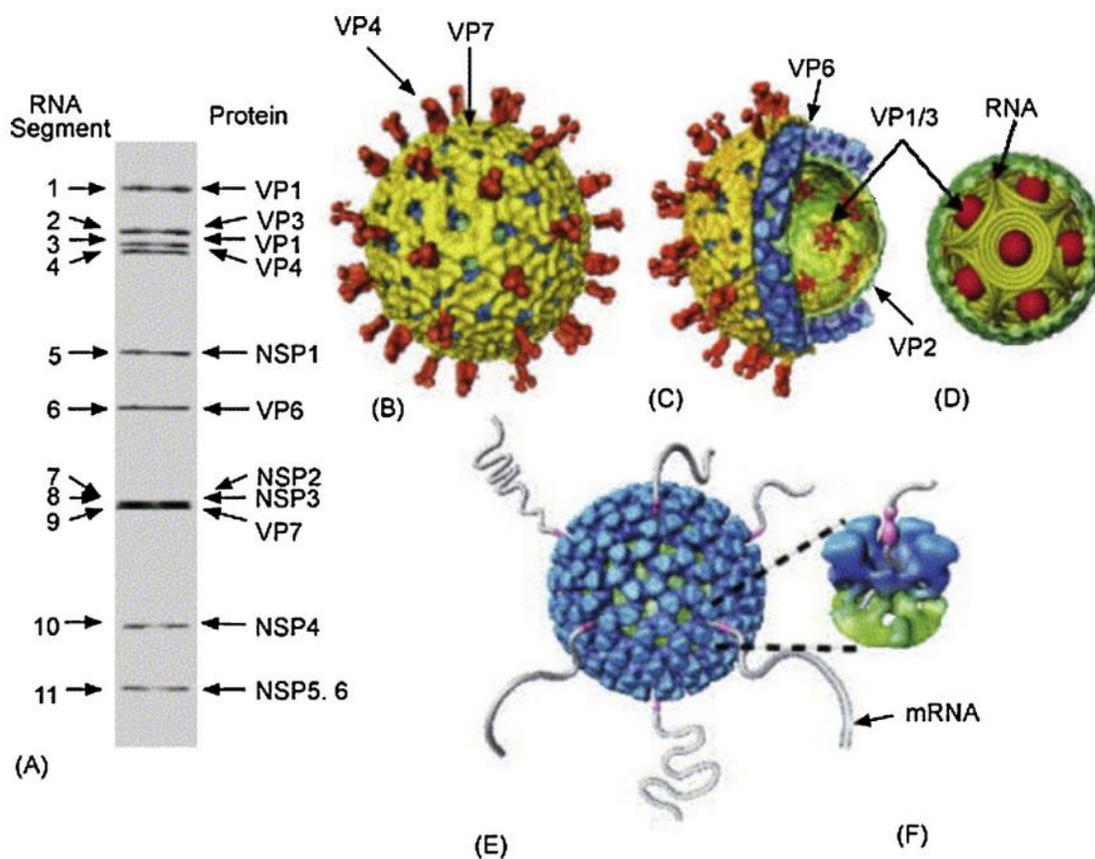


Figura 2: Aspectos da estrutura do Rotavírus: (A) Gel de poliacrilamida mostrando os 11 segmentos genômicos do vírus e suas respectivas proteínas codificadas. (B) Partícula viral com seu triplo capsídeo (TLP). (C) Imagem cortada de uma partícula viral mostrando o triplo capsídeo (TLP); em amarelo o capsídeo externo, constituído das proteínas VP4 e VP7, em azul o capsídeo intermediário, constituído da proteína VP6, e, em verde o capsídeo interno constituído das proteínas VP2, VP1 e VP3. (D) Imagem do cerne viral, mostrando o complexo de transcrição, constituído das proteínas VP1 e VP3 e o material genômico viral (dsRNA). (E) e (F) Partícula viral com duplo capsídeo realizando a transcrição e replicação do material genômico viral, que é liberado pelos canais da VP6 (fonte: JAYARAM *et al.* 2004).

Devido a variabilidade genética e reatividade sorológica da proteína VP6, os RV são separados em 8 diferentes grupos, também denominados como “espécies” (RVA-RVH) (DESSELBERGER, 2014). Recentemente, dois novos grupos foram propostos (RVI e RVJ). Dentre todos os grupos, os grupos A, B, C e H foram descritos podendo infectar humanos e animais; enquanto os demais foram descritos apenas em animais (ESTES e GREENBERG 2013; MATTHIJNSSENS *et al.* 2012; MIHALOV-KOVÁCS 2015). As proteínas VP4 e VP7 compõem o capsídeo externo do RV e definem os genótipos P e G, respectivamente, definindo a caracterização molecular dos Rotavírus. Os Rotavírus compreendem ao menos 27 tipos G e 37 tipos P, sendo estes denominados genótipos. Estes genótipos circulam ao mesmo tempo em uma população, criando condições que favorecem a coinfeção. Durante uma coinfeção, o RV tem a capacidade de fazer rearranjos entre segmentos de dsRNA (*reassortment*) de diferentes linhagens durante a montagem da partícula viral, e esses rearranjos podem gerar novas combinações. As mutações pontuais no material genético e os rearranjos são considerados os principais mecanismos de evolução e da diversidade dos RV. Essa capacidade faz com que o RV tenha um alto potencial de doença re-emergente (ITURRIZA-GOMARA, ISHERWOOD, DESSELBERGER 2001; DENNEHY *et al.*, 2015).

A camada proteica externa do triplo capsídeo é composta por 260 trímeros da glicoproteína VP7 (proteína G) e 60 trímeros da proteína VP4 (proteína P), proteína que forma os peplômeros (espículas virais). Os trímeros de VP7 são dependentes de íons cálcio (Ca^{2+}), os quais mantêm a estabilidade destes. Anticorpos neutralizantes para o vírus já foram descritos reconhecendo epítomos das proteínas VP4 e VP7 (TRASK *et al.* 2012) (Figura 3). VP7 possui os domínios hidrofóbicos, nomeados H1 e H2, que podem funcionar como sinalizadores para orientar a VP7 para o retículo endoplasmático, a proteína também modula a atividade de VP4 no processo de adsorção (DESSELBERGER 2014; GUERRERO *et al.* 2000). Existe uma intensa relação da proteína VP4 com as proteínas VP7 e VP6 (camada intermediária). VP4 está associada a diversas funções: infectividade, virulência, hemaglutinação e indução da imunidade mediada por anticorpos. A proteólise da VP4 é necessária para a ativação da partícula viral e a partir da clivagem surgem as proteínas VP5 e VP8, que vão permitir a adsorção viral e a consequente infecção celular. Várias moléculas

de superfície celular podem agir como co-receptores, como integrinas, que são reconhecidas por um "motivo" encontrado em VP5 ou VP7. Estes co-receptores servem como plataforma para o qual o RV se associe com a membrana plasmática celular (DESSELBERGER 2014).

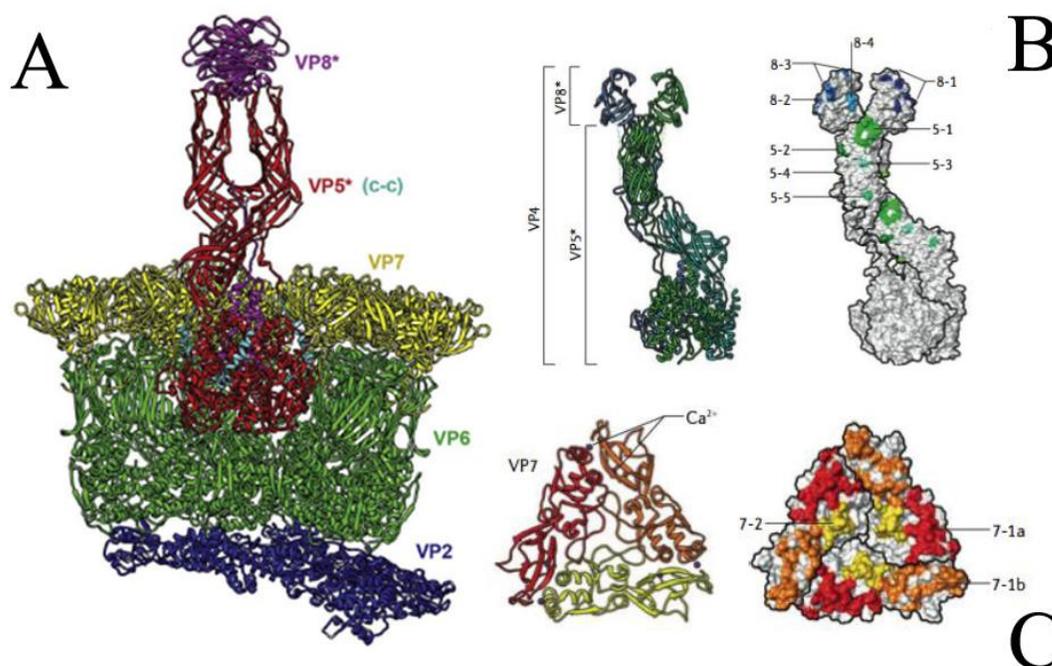


Figura 3: A – Interação das proteínas estruturais do RV (SETTEMBRE *et al.* 2011). B – Peplômero, constituído da proteína VP4 e seus epítomos (TRASK *et al.*, 2012). C – Trímeros da proteína VP7 e seus epítomos (TRASK *et al.*, 2012).

A camada proteica intermediária do triplo capsídeo é composta por 260 trímeros da glicoproteína VP6, proteína mais abundante do vírion, e interage tanto com as proteínas mais externas, como VP7 e VP4, quanto com as proteínas do cerne viral (Figura 3). VP6 apresenta regiões hidrofóbicas e possui epítomos que induzem a imunidade de proteção devido ao seu elevado potencial antigênico e imunogênico. Devido a isto, a presença de epítomos conservados entre diferentes amostras do vírus e a abundância dessa proteína na célula, faz da VP6 um excelente candidato para os ensaios diagnósticos (ESTER, 2010).

A camada proteica interna do triplo capsídeo é denominada cerne viral, sendo formada por 120 moléculas da VP2, arranjadas em 60 dímeros, 5 dímeros formam um

decâmero em torno do eixo de simetria quántupla e 12 decâmeros compõem a camada proteica a qual é uniforme com exceção de um pequeno poro (MCCLAIN *et al.* 2010). Cada poro apresenta seu próprio complexo de replicação que é composto pela proteína viral VP1, a RNA polimerase dependente de RNA e a proteína viral VP3, que é uma guanilil-transferase, que catalisa a formação do *cap* na extremidade 5' durante a modificação pós-transcricional do mRNA. Os segmentos de RNA formam cilindros cônicos em volta deste complexo e apresentam uma região dedicada de 4 bases, UGUG na extremidade 3', que fica em intenso contato com VP1 (HEIMAN *et al.* 2008; LU *et al.* 2008). A VP1 apresenta atividade de replicase e transcriptase, contudo, necessita da VP2 para atividade de replicase e da VP3 para atividade de transcriptase (JAYARAM *et al.* 2004; PERIZ *et al.* 2013). A VP3, além da função de “capear” os mRNA virais, apresenta um domínio C-terminal que tem uma função fosfodiesterase que cliva 2',5'-oligoadenilato, desde modo, impedindo a ativação da RNase L e bloqueando a resposta antiviral celular (ZHANG *et al.*, 2013). VP2 possui diversas funções dentro da célula durante a infecção: interage com VP6; transporta metabólitos e mRNAs; atua como estrutura de sustentação do cerne; atua no complexo de replicação. A parte interna dessa camada apresenta o complexo de replicação e o material genético viral, RNA de cadeia dupla (dsRNA) e segmentado (DESSELBERGER 2014).

Nos 11 segmentos de dsRNA, as ORFs apresentam em suas extremidades regiões UTR (*Untranslated Region*) que são pequenas sequências de nucleotídeos altamente conservadas, 9-48 nt na porção 5' e 17-182 nt na porção 3', parcialmente complementares e que estão sujeitas a ligações RNA-RNA de longo alcance (LRI) (DESSELBERGE *et al.* 2015). Essas regiões no final 3' servem como regiões de reconhecimento, nas quais a RdRp se liga, e também participam da interação com a proteína não estrutural 3 (NSP3).

As proteínas não estruturais (NSP) são proteínas ausentes no vírion maduro e presentes apenas nas células infectadas, que são traduzidas do dsRNA viral. Participam da replicação viral, morfogênese de novas partículas virais pela formação de estruturas eletrodensas denominadas viroplasmas, e são responsáveis por antagonizar a resposta antiviral do hospedeiro (GREENBERG 2013; DESSELBERGER 2014).

A NSP1 age como modulador da ativação de interferon (IFN) tipo I. NSP1 antagoniza a resposta imune, mediando a degradação de um ou mais componentes necessários para a expressão do IFN tipo I, como fatores regulatório (IRF3, IRF5 e IRF7) ou fatores nucleares tipo κ B (BARRO e PATTON 2005; GRAFF *et al.* 2009; MORELLI *et al.* 2015).

A NSP2 possui atividade enzimática multifuncional, sendo importante no processo de montagem da partícula viral, na transcrição, tradução, replicação e empacotamento do dsRNA. A NPS2 interage com a NSP5 e outras proteínas estruturais na formação do viroplasma (CRIGLAR *et al.* 2014). Ainda possui a capacidade de se unir ao ssRNA e tem atividade de helicase, NTPase, NDP cinase e RTPase (TARAPOREWALA *et al.* 1999, 2001; KUMAR *et al.* 2007; CAPRIO *et al.* 2006).

NSP3 apresenta 3 domínios, o domínio N terminal de união ao RNA, o domínio de interação com eIF4G (*Eukaryotic translation initiation fator 4-gamma 1*) e o domínio de dimerização (PIRON *et al.*, 1999). Possui como função ligar-se ao final da fita(+) 3' do ssRNA e ao fator de transcrição eIF4G, participa na ligação de longo alcance RNA-RNA e funciona como uma proteína ligante de poliA para mRNA celulares, diminuindo a tradução celular e aumentando a eficiência da transcrição dos mRNA virais (GROFT C. e BURLEY 2002; CHUNG K. e MCCRAE M. 2011). Além disso, previne e impede a degradação dos mRNA por nucleases celulares (HU *et al.* 2012).

NPS4, uma glicoproteína transmembrana, é multifuncional participando na morfogênese, replicação viral e na patogênese, atuando como uma enterotoxina viral. Ela pode ser apresentada em três formas: ancorada no RE, como receptor para vírus com duas camadas lipídicas; secretada pela célula; formando “cap” nos viroplasmas (BERKOVA *et al.*, 2006). A proteína apresenta dois domínios: um domínio hidrofóbico N terminal, ancorado no RE, e um domínio C terminal no citoplasma. O domínio C terminal possui a atividade de mobilização do Ca^{2+} do RE para o citosol, resultando no aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático e estabilizando a tripla camada lipídica (TIAN *et al.* 1994); permeabilização da membrana (NEWTON *et al.* 1997); formando um “cap” que serve como receptor intracelular para morfogênese viral, interagindo com VP6 (TAYLOR *et al.* 1996); e ação patogênica por indução de diarreia (BALL *et al.*, 1996). NSP4 interage com

células não infectadas pelos receptores de integrina $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$ localizados na membrana. A ativação destes receptores estimula uma cascata de reações relacionada com a liberação de Ca^{2+} no citosol e diarreia. O Rotavírus 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.

NPS5 sofre autofosforilação e ao se ligar ao dsRNA, também interage com NSP2 e VP2 sofrendo alterações que incluem a O-glicosilação e hiperfosforilação (Martin *et al.*, 2010). Durante o processo de replicação a NSP2, NSP5 e NSP6 estão associadas na formação do viroplasma (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

NPS6 possui afinidade a ssRNA e dsRNA. E como dito anteriormente, participa do processo de replicação viral e está associada à formação do viroplasma.

1.2.2. Ciclo de multiplicação

O sítio de multiplicação dos RV é o intestino delgado, o RV apresenta maior tropismo por enterócitos maduros nas vilosidades do intestino delgado, sobretudo no jejuno e no íleo (ESTES e KAPIKIAN, 2007), e a multiplicação ocorre exclusivamente no citoplasma das células (TRASK *et al.*, 2012). Antecedendo a infecção, as partículas de RV têm sua proteína VP4 clivada em VP5 e VP8 pelas proteases intestinais, expondo o domínio lipofílico da VP5 que normalmente fica escondido pela VP8, formando assim, o vírion. A adsorção viral começa quando a partícula viral reconhece e se liga a receptores sialoglicanos na superfície da célula hospedeira, estas interações são acompanhadas do reconhecimento de outros receptores, como integrina $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$ e Hsc70. Desta forma, o vírus é internalizado por endocitose mediada por receptor (Figura 4). As moléculas podem ainda estar associadas a estruturas chamadas de corpos lipídicos (*lipid rafts*), que favorecem a penetração do vírus. Seguidamente à penetração, ocorre saída de Ca^{2+} do interior do endossomo e alterando o equilíbrio da concentração de Ca^{2+} no citoplasma, fazendo com que os trímeros de VP7 tornem-se monômeros e o vírus perca o capsídeo externo (LUDERT *et al.* 1987; ESTES e KAPIKIAN 2007), expondo, assim, a partícula viral com duplo capsídeo (DLP). As linhagens de RVA diferem nos mecanismos utilizados da via endossômica (DÍAZ-SALINAS *et al.* 2014).

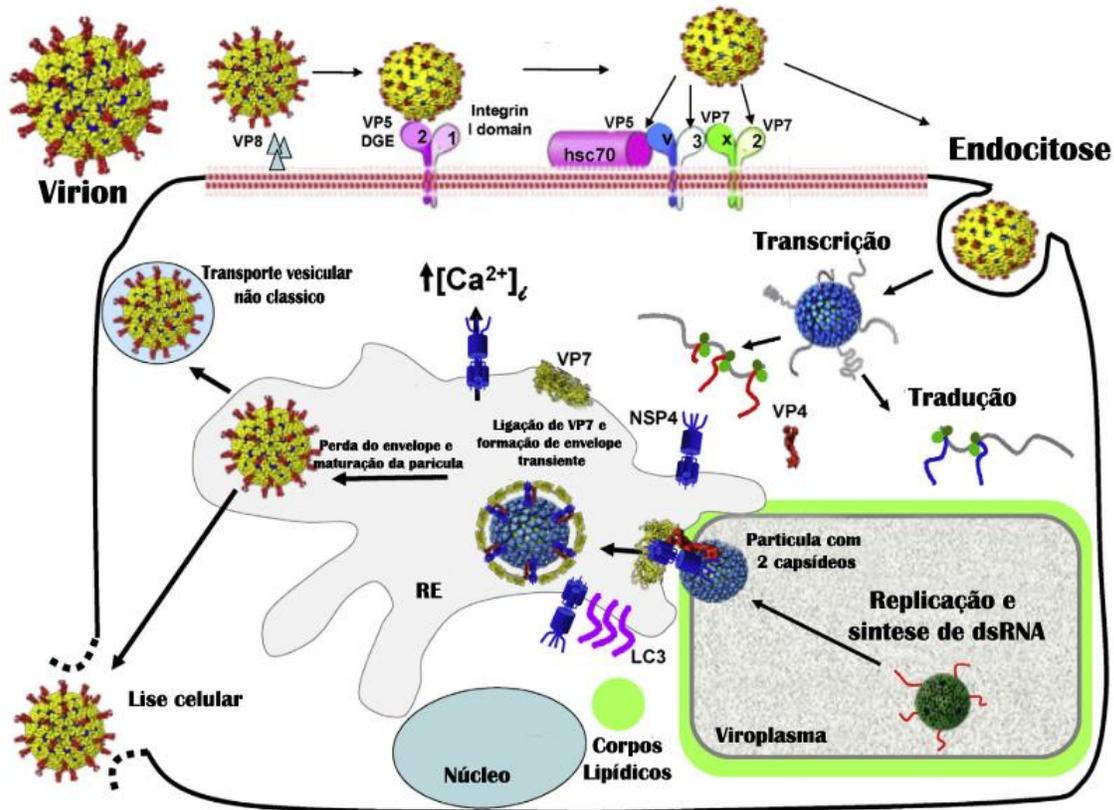


Figura 4: Ciclo de multiplicação do Rotavírus. Adaptado de Estes e Greenberg (2013).

As partículas de RV possuem seus próprios complexos transcricionais, constituídos de VP1 (RNA polimerase dependente de RNA) e VP3 (guanilil transferase). No duplo capsídeo agora exposto no citoplasma inicia-se a produção de ssRNA(+), não poliadenilados e capeados. Os transcritos gerados são usados tanto na tradução de proteínas virais (primeiros ciclos da replicação viral), como servindo de molde na replicação (ciclos mais tardios da replicação viral) para produção dos dsRNA genômicos da progênie (SILVESTRI *et al.* 2004). Durante a tradução são produzidas seis proteínas estruturais (VP) e 6 proteínas não estruturais (NSP).

Proteínas e RNAs virais interagem no citoplasma em estruturas eletrodensas, denominadas viroplasmas. Eles apresentam uma interação com corpos lipídicos celulares, que servem como fonte de energia e veículo de transporte na célula. Os viroplasmas são dependentes das proteínas NSP2 e NSP5, mas comportam outras proteínas como NSP6, VP1, VP2, VP3 e VP6. Esta estrutura estimula o aumento da tradução viral, aumenta a

replicação do material genético viral e a faz montagem da progênie de novos DLPs. Uma vez que é atingido o acúmulo de uma grande quantidade de proteínas virais e o dsRNA genômico viral é produzido começa a montagem de DLPs nos viroplasmas, utilizando as proteínas VP1, VP2, VP3 e VP6 e o dsRNA genômico viral. Estes novos DLPs se ligam a NSP4, que serve como um receptor do retículo endoplasmático, e brotam para o interior do retículo para maturação dessas partículas. Durante esse período, as partículas apresentam uma estrutura envelopada transitória no RE, contudo, o envelope é perdido quando as DLPs adquirem o capsídeo externo constituído pelas proteínas VP4 e VP6. As partículas, agora maduras com 3 capsídeos, ou TLPs, são liberadas da célula por ruptura da célula ou por alguma via não clássica de tráfego celular (SILVESTRI *et al.* 2004; TRASK *et al.* 2012).

1.2.3. Patogênese e patofisiologia

A transmissão do RV ocorre pela via fecal-oral pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados com fezes infectadas, podendo ocorrer através de fômites contaminados ou através da exposição a aerossóis, principalmente quando as condições ambientais são favoráveis (COOK *et al.* 2004; CLARK *et al.* 2013).

A infecção por Rotavírus tem um período de incubação de aproximadamente 1 a 4 dias, e as infecções podem ser assintomáticas ou sintomáticas com diferentes intensidades. Em infecções sintomáticas, estes começam com febre e diarreia aquosa e podem durar de 3 a 8 dias, sendo que a excreção máxima de partículas virais ocorre entre o 3º ou 4º dia após o início dos sintomas (STAAT *et al.* 2002; WARD *et al.* 1986; ESTES e KAPIKIAN 2007). Os RV são altamente contagiosos por quatro razões: o número de partículas para desenvolver uma infecção em um indivíduo susceptível é baixa, aproximadamente 10 partículas virais (WARD *et al.* 1986); na fase aguda da infecção são liberadas muitas partículas (10^{11} partículas/mL) nas fezes de um indivíduo infectado (PATEL *et al.* 2010); as partículas de RV são resistentes às condições ambientais, mantendo-se infecciosa em superfícies secas por até 10 dias e nas mãos humanas por até 4 horas (KESWICK *et al.* 1979; ANSARI *et al.* 1991); possui uma grande diversidade de hospedeiros susceptíveis (CHANG,

KIM e SAIF 2012). A ocorrência das infecções por Rotavírus em ambientes fechados, como asilos, creches e hospitais, é geralmente comum (ESTES e KAPIKIAN 2007).

RV infecta principalmente os enterócitos do topo das vilosidades do intestino delgado, onde a vacuolização e perda epitelial podem ser observadas, seguida da hiperplasia da cripta (Figura 5). Apesar do tropismo do RV ser maior pelos enterócitos, evidências recentes descrevem que o RV não se limita somente as células epiteliais em seres humanos e animais, sendo encontrado no fígado, pulmão, plexo coroide e pâncreas (CRAWFORD *et al.* 2006; FENAUX *et al.* 2006; KIM *et al.* 2011; FENG *et al.* 2008) e podendo causar viremia (BLUTT *et al.* 2003).

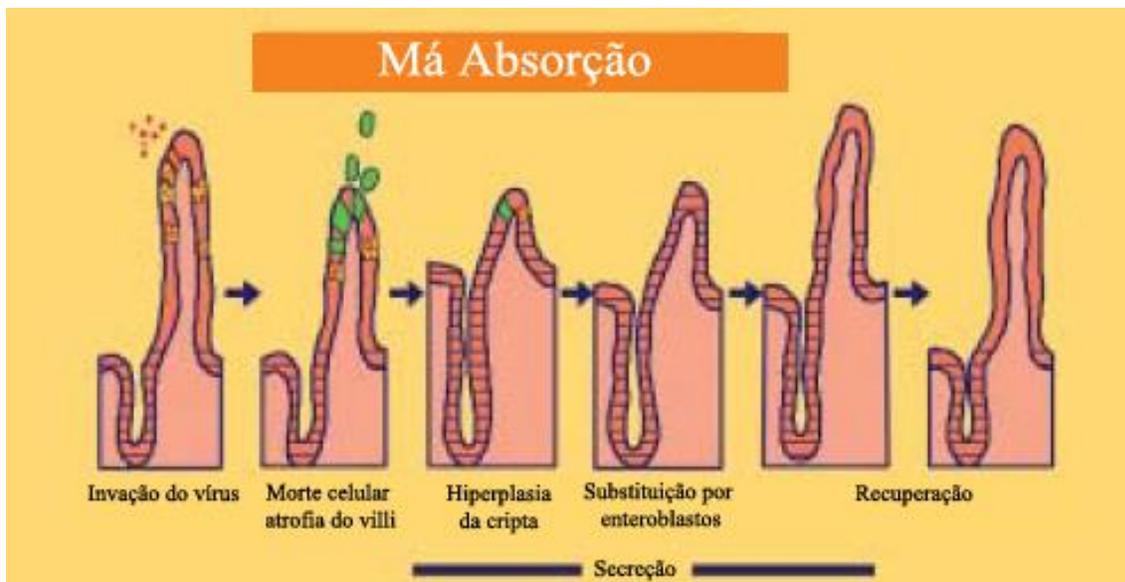


Figura 5: Efeito da infecção por RV no intestino delgado (Adaptado de Desselberger, 2006).

A má adsorção de nutrientes devido à destruição dos enterócitos, a isquemia da vilosidade, os efeitos enterotóxicos da proteína não estrutural NSP4 e a ativação do sistema nervoso entérico, são alguns mecanismos da origem da diarreia causada por esse agente (Figura 6) (ESTES e GREENBERG 2013; ESTES e ATMAR 2003; OSBORNE *et al.* 1991; GRAY *et al.* 2008). A infecção das células enterocromafins, células epiteliais que revestem o lúmen do trato digestório e do trato respiratório, estimula a produção de serotonina, ativando o nervo vago e estimulando estruturas que controlam o vômito no cérebro (HAGBOM *et al.* 2011, 2012).

Um indivíduo pode ser submetido, ao longo da vida, a diversas infecções por RV e, por causa da imunidade adquirida, os episódios são menos graves ou assintomáticos em indivíduos adultos (ANDERSON *et al.* 2004). Em modelo experimental, certas linhagens virais podem ter sido atenuadas pelas passagens em meios celulares, uma vez que a atenuação viral resulta em redução da patogenicidade do vírus. Também, certas linhagens podem se adaptar ao crescimento apenas em determinadas espécies de hospedeiro (LORROT e VASSEUR 2007).

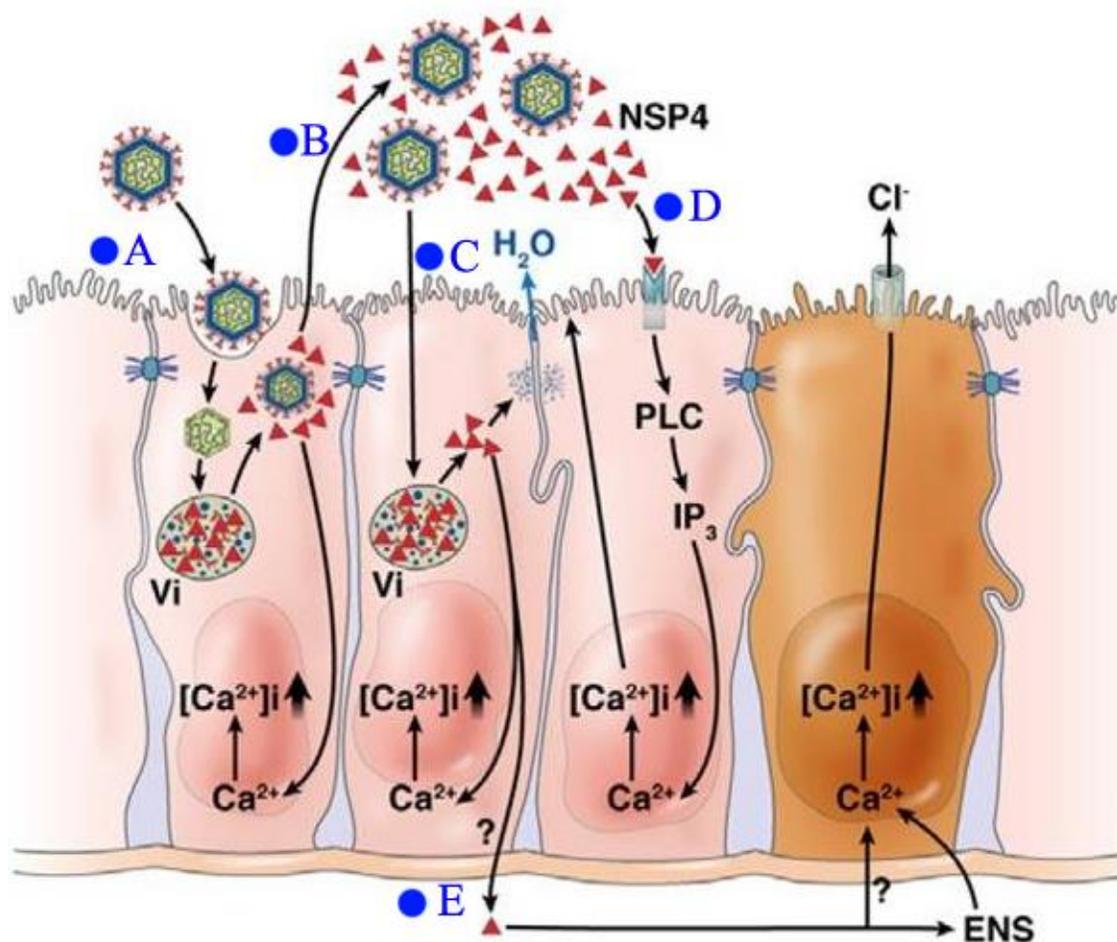


Figura 6: Modelo de patogênese da diarreia induzida pelo Rotavírus. A : Penetração do vírus e a formação do viroplasma (Vi); B: Novas partículas TLP e proteínas não-estruturais NSP4 (triângulos vermelhos) são produzidas e exportadas para o lúmen; C: Essas novas partículas infectam outros enterócitos; D: NSP4 se liga a um receptor de integrina no ápice do enterócito e desencadeia uma cascata de transdução de sinais iniciada com a ligação ao receptor e fosforilação de uma série de proteínas, culminando em liberação do cálcio das reservas celulares com consequente aumento de sua concentração intracelular $[Ca^{2+}]_i$; E: 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), aumentando o volume aquoso na luz intestinal e causando profusa diarreia. PLC: Fosfolipase C; IP3: Inositol trifosfato (Adaptado de GREENBERG e ESTES, 2010).

1.2.4. Resposta Imune

1.2.4.1. Imunidade inata

A resposta da imunidade inata é ativada imediatamente após a entrada do RV na célula, e ocorre antes da imunidade humoral e celular, pelo menos na primeira infecção (ANGEL *et al.* 2012). NSP1 já se mostrou capaz de interagir com o fator de resposta a interferon 3 (IRF3), que desempenha papel crucial na regulação dos interferons do tipo 1 (GRAFF *et al.* 2009); proteína contendo repetições de transducina (β -*transducin repeat containing protein* - β TrCP0), que tem como alvo substâncias essenciais para aspectos específicos da tumorigênese (GRAFF *et al.*, 2009); gene associado à diferenciação de melanoma 5 (MDA5), que é receptor de reconhecimento de patógenos citoplasmáticos como os vírus intracelulares; proteínas de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS), que é necessária para a resposta imune inata contra agentes virais (NANDI *et al.*, 2014); a proteína p53, que é um supressor tumoral pro-apoptótico (BHOWMICK *et al.*, 2013); fator 2 associado ao receptor de TNF (TRAF2), que modula a transdução de sinal para os membros da superfamília de receptores TNF, como por exemplo, TNF- α e NF- κ B (BAGCHI *et al.* 2013). A interação destes fatores com a NSP1 induz degradação proteossômica e previne ou regula negativamente o desencadeamento precoce de uma resposta de IFN. NSP1 regula negativamente os fatores de resposta ao interferon IRF5 e IRF7 (BARRO e PATTON 2007). A infecção por RV também inibe a fosforilação de STAT1 e a translocação de STAT1/STAT2 para o núcleo e, desse modo, inibindo o estabelecimento de um "estado antiviral" induzido por IFN (HOLLOWAY *et al.* 2009, 2014; HOLLOWAY e COULSON 2013). Como dito anteriormente, VP3 possui ação de fosfodiesterase 2'-5'-oligoadenilato sintase, impedindo a ativação da RNase L e bloqueando uma potente resposta do sistema imune inato na célula (ZHANG *et al.* 2013).

1.2.4.2. Imunidade humoral e celular

Após a infecção por RV, são produzidas repostas imunes, tanto de células B produzindo anticorpos contra as proteínas virais, quanto de células T reconhecendo epítopos de RV na superfície de células infectadas. Em seres humanos, anticorpos são

adquiridos via placenta e conferem proteção aos recém-nascidos (RAY *et al.* 2007) e que interferem com a resposta imune da vacinação por RV (APPAIAHGARI *et al.*, 2014). Enquanto as células T-*helper* eliminam o RV depois da primeira infecção, são as células B de memória que provêm uma maior proteção a longo prazo (FRANCO *et al.*, 2006). Células dendríticas plasmacitoides foram apontadas como necessárias e suficientes para induzirem a ativação das células B após infecção por RV em camundongo, *in vivo*, e em células humanas, *in vitro* (DEAL *et al.* 2013).

As proteínas VP4 e VP7 desempenham importante papel na resistência a infecção por RV, uma vez que induzem a produção de anticorpos neutralizantes. No entanto, a imunidade humoral é ampla e compreende a produção de anticorpos contra outras proteínas virais, incluindo VP2, VP6, NSP2 e NSP4 (ESTES e KAPIKIAN 2007; GRAY *et al.* 2008; KIRKWOOD 2017). Foi sugerido e provado que anticorpos anti-VP6 da classe IgA entram nas células epiteliais do intestino pelos receptores de proteína J na membrana basolateral e formam complexos com as novas partículas de DLP liberadas pelo viroplasma, impedindo assim, a maturação da DLP em TLP (SAPPARAPU *et al.* 2013).

Em estudos realizados utilizando as células HT-29 foi demonstrado que a infecção por RV induziu quimiocinas CXC (IL-8, IP-10 e GRO) e quimiocinas CC (RANTES e MCP-1), e os genes para interferon e GM-CSF foram regulados negativamente. Contudo, os transcritos para TNF e IL-1 não aumentaram durante a infecção (ROLLO *et al.* 2011). Outro estudo em célula HT-29 infectada com RV mostrou aumento de tempo e dose-dependência da expressão de IL-8, RANTES e GRO-alpha (CASOLA *et al.* 1998).

1.3. Vacinas de Rotavírus do grupo A

As linhagens de RV são comumente separadas pela sua proteína G (VP7) e/ou por sua proteína P (VP4). Apesar da grande diversidade genômica e antigênica dos RV, somente alguns tipos de RVA prevaleceram em humanos: RVA do tipo G1P1, G2P1, G3P1 e mais recentemente G9P1 e G12P1 que vêm circulando na América do Norte, na Europa e na Austrália (GENTSCH *et al.* 2005; SANTOS e HOSHINO 2005; ITURRIZA-GÓMARA *et al.* 2011). Na África, Ásia e América do Sul outros genótipos como G5, G6 e G8 são os mais prevalentes (DA SILVA *et al.* 2015; KANG *et al.* 2013; LUCHS e TIMENETSKY 2015).

Antes da implementação da vacina, Rotavírus era responsável por 500.000 mortes por ano em todo o mundo. Vários candidatos a vacinas foram desenvolvidos, com a finalidade de conferir proteção principalmente contra as gastroenterites de maior gravidade, como pode ser visto na tabela 1 (DENNEHY, 2015). O Brasil foi o primeiro país a implantar a vacina Rotarix no Programa Nacional de Imunização (PNI) em março de 2006, porém a cobertura da vacina vem diminuindo como pode ser observada na Figura 7.

Tabela 1: Vacinas para RVA.

| Nome da vacina | Ano de lançamento e ano de suspensão | Tipo de vacina | Tipos de genótipos cobertos | Atualizações |
|----------------------------|---|--|------------------------------------|--|
| RotaShield (RRV-TV) | 1998-1999 | Vacina de vírus modificado geneticamente | Tetravalente (G1-G4) | Foi descontinuada em 1999, por apresentar um risco alto de invaginação intestinal. |
| Rotarix (RV1) | 2006-* | Vírus atenuado | Monovalente (G1) | Recomendada pelo WHO |
| Rotateq (RV5) | 2008-* | Vacina de vírus modificado geneticamente | Pentavalente (G1-G4 e P8) | Recomendada pelo WHO |
| Rotasil | Em teste | Vírus atenuado | Pentavalente (G1-G4 e G9) | Em teste |
| Rotavac | Em teste | Vírus atenuado | Monovalente (G9) | Licenciada para uso na Índia em 2014 e foi pré-qualificada em 01/2018 pelo WHO |

* em comercialização atualmente.

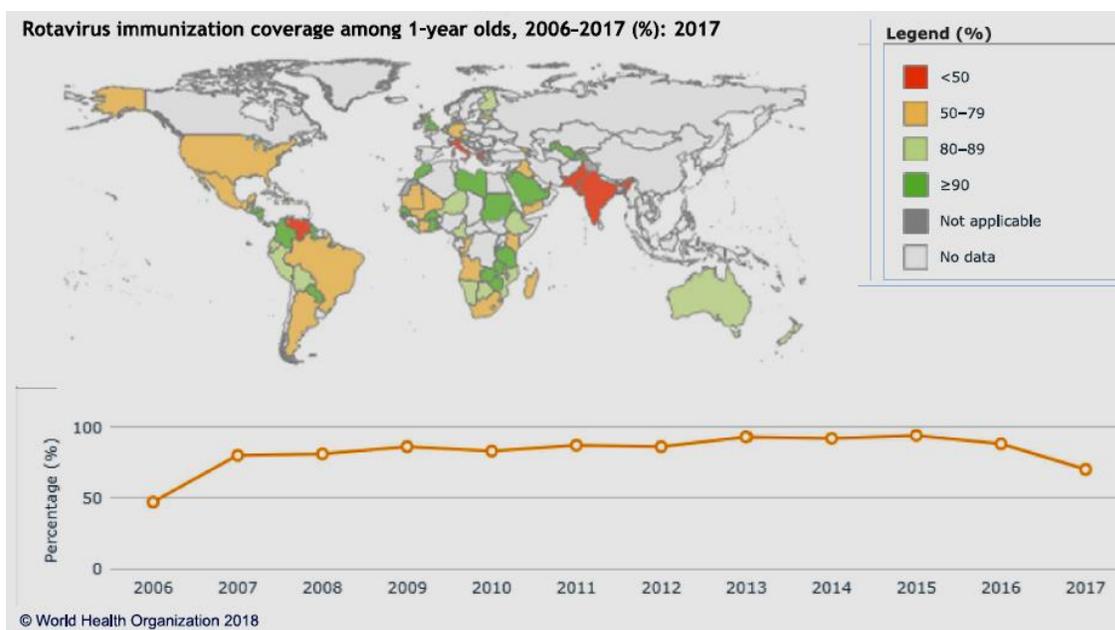


Figura 7: Cobertura da vacina de Rotavírus em crianças de todo mundo com 1 ano de idade em 2017 e gráfico da cobertura da vacina dos anos de 2006 até 2017 no Brasil (WHO, 2018).

Na era pós-vacinação, houve um declínio na prevalência das linhagens de RV e mudanças na distribuição geográfica de linhagens circulantes. E, existem linhagens de vírus que não estão incluídas nas vacinas acima, mas que estão presentes em certas partes do mundo. Apesar da eficiência da vacina ter sido alta em países desenvolvidos com proteção de 80-90% (TATE *et al.* 2013), em países em desenvolvimento, principalmente na África subsaariana e no Sudoeste da Ásia, a eficiência foi baixa 30-50% (ARMAH *et al.* 2010; MADHI *et al.* 2010; ZAMAN *et al.* 2010; DESSELBERGER, 2017). Há uma diferença temporal e geográfica na distribuição das linhagens no mundo. Seis linhagens de RVA (G1P8, G2P4, G3P8, G4P8, G9P8 e G12P8) representam 80 a 90% de todas as infecções por RV no mundo (DORO *et al.* 2012; ITURRIZA-GOMARA *et al.* 2011; MATTHIJNSSENS *et al.* 2009, 2010; BANYAI *et al.* 2012). Contudo, RV associados com genótipos de origem animal (G5, G6, G8, P9, P11, P14) foram reportadas em humanos (DESSELBERGER *et al.* 2001; GENTSCH *et al.* 2005; SANTOS *et al.* 2005). E entre as gastroenterites agudas, o Rotavírus ainda é o principal agente em países em desenvolvimento (LIU e PLATTS-MILLS *et al.* 2016). Estes dados mostram a necessidade de uma implementação de novas práticas de prevenção e tratamento da diarreia, sobretudo em países em desenvolvimento (WALKER *et al.* 2012).

1.4. Probióticos

Microrganismos probióticos são um possível agente antiviral, uma alternativa segura e de baixo custo para tratamento das diarreias infecciosas (KANG *et al.* 2015; VLASOVA *et al.* 2016; VANDENPLAS *et al.* 2016). Probióticos são definidos como “os microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios para a saúde do hospedeiro” (FAO/WHO 2001).

A gama de benefícios pode ser extensa, mas vale salientar alguns como: imunomodulação local e sistêmica que aumenta a resistência à infecção e reduz a inflamação; produção de substâncias antimicrobianas e/ou inibição da produção ou ação de toxinas bacterianas; competição com enteropatógenos; e melhoria da função da barreira gastrintestinal (GALLO *et al.*, 2016). Os probióticos mais frequentemente utilizados são bactérias do ácido lático (*Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Weissella*) *Bifidobacterium* spp. e leveduras (*Saccharomyces boulardii*) (VANDENPLAS *et al.* 2016). Microrganismos de alguns gêneros de bactérias lácticas como, por exemplo, *Lactobacillus* e *Lactococcus* são mais frequentemente empregados como probióticos por serem considerados seguros à saúde (GRAS - *Generally Recognized As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*, USA), pois não são patogênicos e nem capazes de transmitir os fatores de resistência aos antibióticos para bactérias patogênicas.

O uso de probióticos bacterianos, como agentes protetores frente a infecções por Rotavírus, já foi descrito por vários trabalhos. Algumas estratégias foram descritas para a ação antiviral, dentre elas: antagonismo direto, regulação intracelular e modulação da resposta imune (KANG *et al.* 2015; FERNANDEZ-DUARTE *et al.* 2017; GAGNON *et al.* 2016; KAWAHARA 2017; ZHANG *et al.* 2013; VLASOVA *et al.* 2013). Contudo, mais trabalhos necessitam ser realizados para melhor elucidar o efeito dos probióticos frente à infecção viral por RV.

1.5. Gênero *Weissella*

1.5.1. Classificação e características

Collins *et al.*, em 1993, a partir de um estudo taxonômico de um organismo *Leuconostoc-like*, foram os primeiros a designar o gênero *Weissella*. Atualmente o gênero *Weissella* pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales* e família *Leuconostocaceae*. O gênero *Weissella* apresenta bactérias morfologicamente com os formatos de coco, bacilo e cocobacilo, Gram-positivas, não produtoras de esporos e anaeróbios facultativos com metabolismo obrigatoriamente fermentativo, onde, os produtos da fermentação de glicose incluem o ácido lático, CO₂ e etanol e/ou acetato (COLLINS *et al.* 1993; BJÖRKROTH *et al.* 2014). Geralmente, não são móveis, com exceção da *W. beninensis* (PADONOU *et al.* 2010). Os indivíduos do gênero já foram encontrados em vários habitats como o solo (MAGNUSSON *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2005), máquinas de ordenha (KANDLER *et al.* 1983), sedimentos costeiros e de lagos (ZAMUDIO-MAYA *et al.* 2008; SICA *et al.* 2010), plantas, frutas, vegetais, em uma grande variedade de produtos fermentados, da cavidade oral, leite materno, do trato urogenital e gastrointestinal de humanos; pele, leite e trato gastrointestinal de outros animais (FUSCO *et al.* 2015). *Weissella paramesenteroides* já foi isolada de fezes de bebês em amamentação (RUBIO *et al.* 2014), de leite de vaca (ESPECHE *et al.* 2009), intestino de insetos (BELDA *et al.* 2011), e por nosso grupo, em focinho de suíno (ALVIM *et al.* 2015).

1.5.2. *Weissella paramesenteroides*

Bactérias lácticas (LAB) são parte da microbiota intestinal humana, os principais gêneros são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. O gênero *Weissella* já foi citado como tendo um grande potencial probiótico (FUSCO *et al.* 2015; ALVIM *et al.* 2015), podendo controlar patógenos bacterianos por meio da produção de compostos antimicrobianos que incluem ácido lático, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas (FUSCO *et al.* 2015; KANG *et al.* 2012; ALVIM *et al.* 2015). A linhagem WpK4 de *Weissella paramesenteroides* já foi

demonstrada pelo nosso grupo ter caráter probiótico frente a uma infecção bacteriana por *Salmonella* Typhimurium em modelo experimental murino (ALVIM *et al.* 2015).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Gastroenterite é uma das doenças mais comuns do mundo, afetando pessoas de todas as faixas etárias, principalmente crianças menores de cinco anos, causando milhares de mortes todos os anos. Logo, a gastroenterite pode ser considerada uma doença de grande importância e alto impacto para a saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (WHO) recomenda a introdução das vacinas, Rotarix e Rotateq nos programas nacionais de imunização. Contudo, o Rotavírus, por suas características biológicas, apresenta uma grande diversidade de linhagens, e as vacinas atualmente disponíveis no mercado não abrangem toda essa diversidade. Assim, a existência de várias linhagens não cobertas pela vacinação pode contribuir para a emergência de novas linhagens e o desaparecimento de outras (PHAN *et al.* 2007).

A gastroenterite induzida por RV não é tratada com antibióticos ou drogas. O principal tratamento é a reposição de fluidos e eletrólitos, reestruturando o equilíbrio hidroeletrólítico, perdidos pela diarreia e vômito, mas não produz cura. Nas últimas décadas, a modulação da microbiota intestinal tem sido avaliada, entre as abordagens, está o uso de probióticos. A grande vantagem da terapia com probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes quando antibióticos são usados. Neste contexto, probióticos para modular a microbiota intestinal e controlar a diarreia podem ser uma alternativa eficaz para o tratamento de gastroenterite aguda.

Weissella paramesenteroides WpK4 mostrou ação probiótica frente a infecção por *Salmonella* Typhimurium em modelo experimental murino (ALVIM *et al.* 2015), assim estudos envolvendo outros enteropatógenos se tornam relevantes para melhor entendimento do caráter protetor da linhagem. Neste sentido, o presente trabalho buscou avaliar o efeito probiótico de *Weissella paramesenteroides* linhagem WpK4 frente a infecção causada pelo Rotavírus SA11 *in vitro*, em células epiteliais intestinais da linhagem HT-29, e *in vivo*, em modelo experimental murino. É importante destacar que o presente estudo representa avanços no trabalho de nosso grupo de pesquisa e seus colaboradores, abrindo uma importante frente para a consolidação de possíveis produtos biotecnológicos nacionais em médio prazo.

3. OBJETIVOS

O objetivo desse estudo é avaliar a habilidade probiótica da linhagem WpK4 de *Weissella paramesenteroides* em interferir na infecção por Rotavírus SA11 em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

- **Objetivos específicos:**

Avaliar *in vitro* a adesão e invasão de células de mamífero transformadas linhagens MA104, HT-29 e Caco-2 por *Weissella paramesenteroides* WpK4 e sua habilidade de interferir na adsorção do Rotavírus às mesmas células.

Avaliar *in vivo* em camundongos neonatos a capacidade protetora da linhagem WpK4 de *Weissella paramesenteroides* frente infecção por Rotavírus, caracterizando o índice de diarreia, avaliando a curva de mortalidade e capacidade de inibição da perda de peso.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2. Células

4.2.1. Célula MA104

As células da linhagem contínua MA104 ATCC CRL-2378.1 (Figura 8), derivadas de epitélio de rim de *Chlorocebus aethiops* (Macaco verde africano), foram adquiridas originalmente do Banco de Células do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Essas foram cultivadas no Laboratório de Virologia Aplicada e Básica da UFMG. Essas células foram utilizadas para multiplicação e titulação do vírus e nos ensaios *in vitro*. Na linhagem MA104, as partículas virais são liberadas através do rompimento celular (MCNULTY *et al.* 1976).

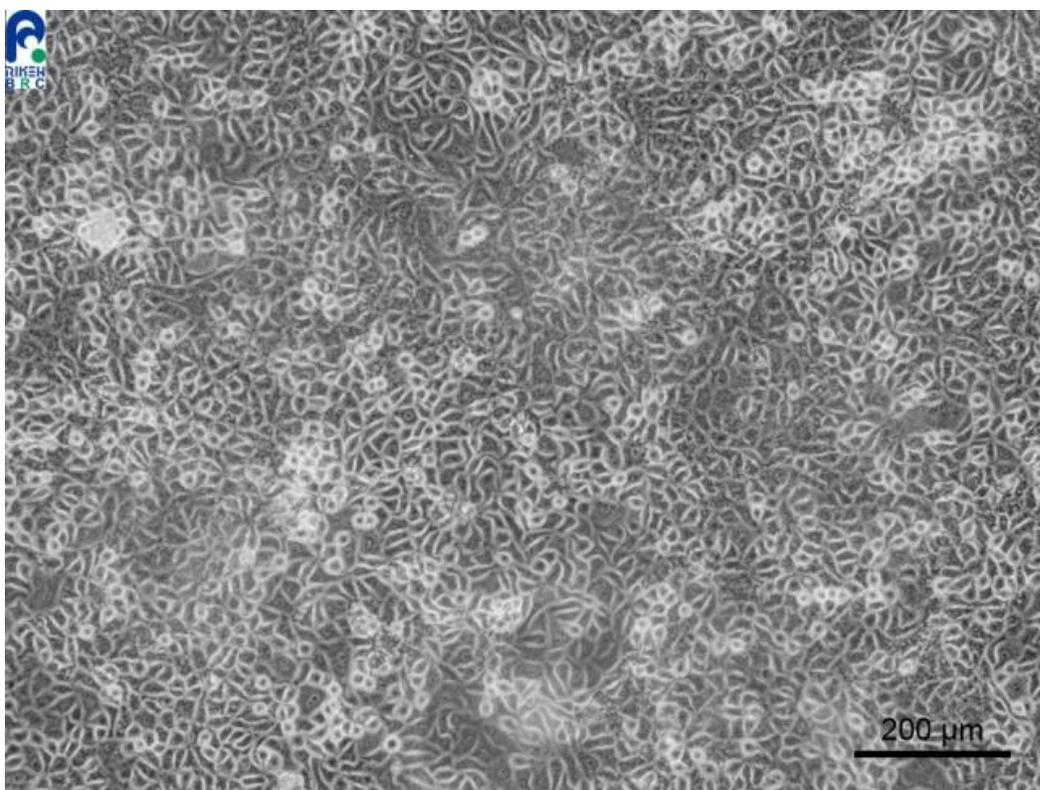


Figura 8: Célula MA104 em alta densidade (fonte: ECACC).

4.1.1. Células HT-29 e Caco-2

As células das linhagens contínuas HT-29 (ATCC HTB-38) e Caco-2 (ATCC HTB-37) são derivadas de adenocarcinoma colorretal humano (Figura 10). A linhagem HT-29 foi adquirida originalmente da *American Type Culture Collection* (ATCC), Maryland, USA. A HT-29 foi cultivada no Laboratório de Virologia Básica e aplicada (LVBA) da UFMG por um

número desconhecido de passagens. A linhagem Caco-2 foi adquirida originalmente da ATCC e cultivada no Laboratório de Genética Experimental da UFMG por 4 passagens. Ambas as linhagens foram utilizadas nos ensaios *in vitro* como modelos de células do epitélio intestinal, sendo que a Caco-2 se diferencia, normalmente, em enterócitos, enquanto a HT-29, em células enteroendócrinas secretoras de muco e enterócitos calciformes (Figura 9). Por isso, são excelentes modelos para mimetizar uma infecção intestinal por Rotavírus, uma vez que o vírus infecta principalmente enterócitos. Nas linhagens HT-29 e Caco-2 as partículas virais completas são liberadas por um tipo de brotamento que não mata imediatamente a célula (GARDET, *et al.*, 2006).

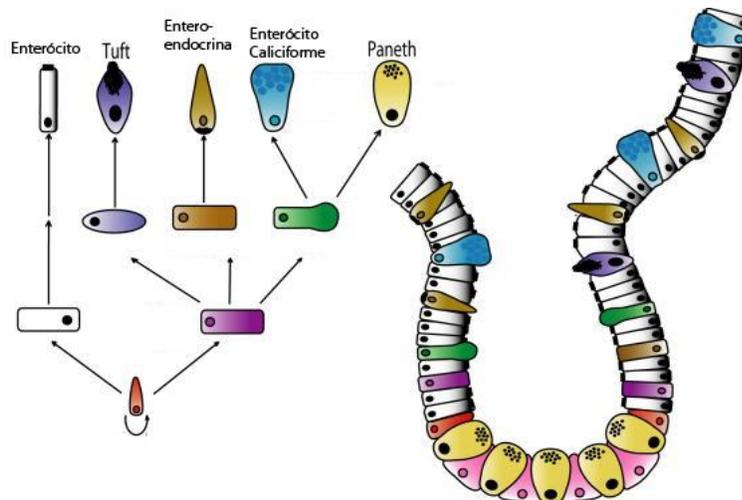


Figura 9: Modelo da diferenciação das células intestinais (Modificado de NOAH *et al.* 2011).

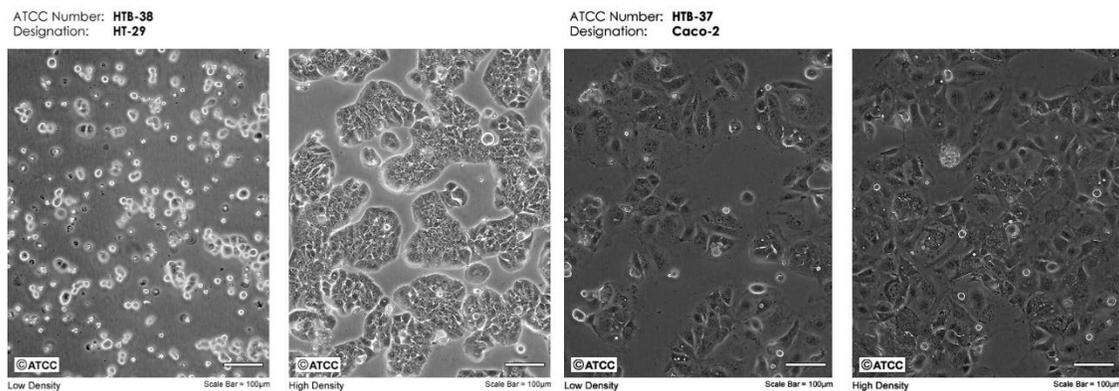


Figura 10: Células HT-29 em baixa densidade e alta densidade, respectivamente; células Caco-2 em baixa densidade e alta densidade, respectivamente (fonte: ATCC).

4.1.2. Meios de cultivo e cultura celular

As linhagens celulares MA104, HT-29 e Caco-2 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagles (DMEM; Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mmol/L L-glutamina, estreptomicina (100 U/mL), penicilina potássica (100 U/mL), gentamicina (50 µg/mL) e fungizona (2 µg/mL). As células foram mantidas em garrafas apropriadas e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Criotubos contendo alíquotas de 1 mL das células congeladas, em nitrogênio líquido, foram descongelados em banho-maria a 37°C. Após o descongelamento as células foram transferidas para um tubo Falcon de 15 mL, com meio DMEM suplementado com 10% de SFB pré-aquecido a 37°C e, em seguida, centrifugada a 500 x g por 5 minutos, para remoção do DMSO usado no processo de criopreservação, o qual é citotóxico para as células. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi suspenso no mesmo volume de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Ao final, a suspensão foi transferida para um frasco de cultura celular de 25 cm², foi completado com meio DMEM para um volume final de 7 mL e incubada em estufa com tensão de 5% de CO₂ a 37°C. Os subcultivos das linhagens foram realizadas em garrafas de 75 cm², a partir da confluência de 80%, em intervalos de 2-3 dias para MA104 e 3-4 dias para HT-29 e Caco2, utilizando solução salina tamponada por fosfato (PBS: NaCl 1,5 mM; Na₂HPO₄ 40 mM; KH₂PO₄; pH 7,2) e solução de 0,25% tripsina EDTA (Sigma-Aldrich : NaCl 136 mM; KCl 5 mM; glicose 55 mM; NaHCO₃ 69 mM; 0,5 g p/v tripsina 1:250 (Difco); EDTA 0,5 mM; 1% vermelho de fenol).

4.2. Amostra viral

Neste estudo foi utilizado a amostra de Rotavírus símio linhagem SA11 (ATCC VR-1565), gentilmente cedida pelo Dr. Alexandre da Costa Linhares, do Instituto Evandro Chagas, Fiocruz-PA (IEC-PA), sendo estocado no Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia - ICB-UFMG.

Para multiplicação viral, titulação viral e para os ensaios *in vitro*, os vírus estocados foram ativados adicionando-se 10 µg/mL de tripsina (Sigma-Aldrich) e incubando por 30 min em banho maria a 37°C, para clivar a proteína VP4 e produzir o vírion infectivo.

4.2.1. Produção do estoque viral

Os vírus foram multiplicados em garrafas de 150 cm² contendo monocamada de células MA104 (2×10^7 células). O vírus previamente ativado foi usado em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 em meio DMEM com 2 µg/mL de tripsina, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, com homogeneização em intervalos regulares de 15 min por 1 h. Após adsorção viral, o inóculo foi removido, as garrafas lavadas e o meio DMEM suplementado com 0,5 µg/mL de tripsina e sem adição de SFB foi acrescido para um volume final de 25 mL. As garrafas foram incubadas até o efeito citopático atingir 80% a 90% da monocamada, sendo, então, submetidas a três repetições de um processo de congelamento e descongelamento para o rompimento das células. O sobrenadante da cultura foi transferido para tubos de 50 mL e centrifugados a 300 x g por 5 min a 4°C, para precipitar restos celulares e obter o sobrenadante, que recebe o nome de clarificado. O clarificado foi distribuído em estoque de 20 mL e alíquotas de 500 µL que foram armazenadas a -80°C para posterior titulação e uso.

4.2.2. Titulação viral por foco de imunofluorescência

A linhagem celular MA104 foi expandida em microplacas de 96 poços, 6400 células/poço, em DMEM 5% de SFB. Ao atingir a confluência de 90%, o meio foi retirado, a placa lavada com PBS e, então, foi acrescentado 100 µL das diluições 10^{-1} até 10^{-10} dos vírus ativado, em DMEM com concentração final <2 µg/mL de tripsina. A coluna da microplaca correspondente ao controle de células recebeu 100 µL de DMEM com 2 µg/mL de tripsina em substituição às diluições dos vírus. As microplacas foram incubadas por 1 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ com homogeneização em intervalos regulares de 15 min. Após a adsorção viral, o inóculo foi removido, as placas lavadas com PBS e acrescido DMEM suplementado com SFB e 5 µg/mL de tripsina, seguindo nova incubação por 18h, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As placas foram lavadas com PBS e fixadas com solução metanol 100% por 2 min e lavada com PBS. A seguir, na monocamada fixada, foi adicionado o anticorpo primário anti-RVA (*Rotavirus capsid* (2B4):sc101363 – Anti-VP6; Santa Cruz

Biotechnology, Inc.) diluído 1:500 em PBS contendo 3% de soro-albumina bovina. A placa foi incubada, em movimentação suave e constante por 30 min a temperatura ambiente, após a incubação o excesso de anticorpo foi removido e a monocamada lavada duas vezes com PBS. Foi, então, adicionado o anticorpo secundário IgG anti-mouse conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína – Goat Anti-mouse IgG H&L; Invitrogen) diluído 1:500 em PBS contendo 3% de soro-albumina bovina. A placa foi incubada novamente, em movimentação suave e constante por 30 min a temperatura ambiente, após incubação o excesso do anticorpo foi removido e monocamada lavada quatro vezes com PBS. A leitura das placas foi feita contando focos de fluorescência individuais em um microscópio invertido de fluorescência; o título é expresso em unidade de foco fluorescente por mililitro (FFU/mL) e calculado pelo número de focos pelo inverso da diluição (Arnold et al, 2009).

$$UFF = n^{\circ} \text{ de focos fluorescentes} \times \frac{1}{\text{fator de diluição}} \times \frac{1}{\text{Volume de inóculo}}$$

4.3. Amostra Bacteriana

A bactéria usada neste estudo foi a linhagem probiótica WpK4 de *Weissella paramesenteroides* isolada do focinho de um suíno por nosso grupo de pesquisa (Alvim, 2016).

4.3.1. Reativação da bactéria criopreservada e produção do estoque bacteriano

Para produção do estoque bacteriano e para os ensaios *in vitro* e *in vivo*, os isolados estocados a -80°C foram reativados por meio de duas passagens consecutivas em caldo MRS a partir de um inóculo de 2% (v/v). Cada passagem foi feita em câmara anaeróbica com atmosfera de 85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂, a 37°C por 18 h. Após a reativação da bactéria estocada a -80°C, foi feito estoque em alíquotas de 1mL a -20°C em MRS com 15% de glicerol (~10⁹ UFC/mL).

4.4. Camundongos Balb/c

Para obtenção dos animais neonatos foram formadas colônias de camundongos de ambos os sexos, com 2 fêmeas para cada macho. Para tanto, 16 fêmeas e 8 machos com

idade variando entre 6-8 semanas foram obtidos junto ao Cebio/UFMG e alocados em microisoladores. Após duas semanas de cruzamento, as colônias eram observadas e, na presença de fêmeas prenhas, os machos eram retirados.

Camundongos Balb/c fêmeas prenhas (14-18 dias de gestação) foram alojadas individualmente em microisoladores de plástico flexível (UNO Roestvaststall B.V., Zevenaar, Holanda), alimentadas com ração comercial e água estéril *ad libitum*, mantidas em ciclo de 12h:12h claro/escuro e manuseadas em ambiente asséptico. Todos os experimentos foram feitos seguindo as normas do CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da UFMG) sob protocolo 246/2016, e os procedimentos realizados seguindo o guia do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 2015).

4.5. Ensaios *in vitro*

4.5.1. Preparação da bactéria *W. paramesenteroides* WpK4

As suspensões bacterianas foram crescidas como descrito anteriormente. As culturas foram lavadas três vezes em PBS por centrifugação a 5000 x *g* por 15 min. Logo após o descarte do sobrenadante, as bactérias foram suspendidas no seu volume original em meio DMEM completo (sem adição de antibióticos) para os ensaios de adesão/invasão e meio DMEM sem SFB (sem adição de antibiótico) para os ensaios de antagonismo e, em seguida, diluídas 1:10 em DMEM para obtenção de uma concentração aproximada de 1×10^8 UFC/mL.

4.5.2. Ensaio de adesão de WpK4 em células MA104, HT-29 e Caco-2

Para avaliar a adesão e criar um índice de adesão a cada tipo de célula, as monocamadas confluentes de cada linhagem celular ($\sim 1,5 \times 10^5$ células/poço) foram crescidas em placas de cultivo celular de 24 poços (TPP) e inoculadas com a bactéria em uma taxa de interação (*ROI – ratio of interaction*) de 100 BAL:1 célula. Após 1 h de incubação em estufa a 37°C com tensão de 5% CO₂, as células foram lavadas três vezes com PBS pré-aquecido a 37°C, tratadas com tripsina EDTA (Sigma-Aldrich) por 10 min e rompidas com 1 mL de solução contendo 0,1% de Triton X-100 em PBS por 10 min. As bactérias foram

recuperadas pela técnica padrão de contagem por plaqueamento em ágar: os lisados foram diluídos em série com salina 0,85%, plaqueados em ágar MRS e as colônias enumeradas, após incubação das placas por 48 h em estufa microbiológica a 37°C. A adesão de BAL foi expressa como log de UFC/mL de BAL recuperada de cada poço. Esse ensaio foi feito em triplicata para cada BAL testada (Gagnon, 2016).

4.5.3. Ensaio de invasão de WpK4 em células MA104, HT-29 e Caco-2

Monocamadas confluentes de cada linhagem celular ($\sim 1,5 \times 10^5$ células/poço) foram crescidas em placas de cultivo de 24 poços (TPP) e inoculadas com a bactéria em uma taxa de interação (*ROI – ratio of interaction*) de 100 BAL:1 célula. Após 1 h de incubação em estufa a 37°C com tensão de 5% CO₂, nas células lavadas três vezes com PBS pré-aquecido a 37°C foi adicionado DMEM com 2 mmol/L L-glutamina, penicilina potássica (100 U/mL), estreptomicina (100 U/mL), gentamicina (50 µg/mL) e fungizona (2 µg/mL), com a finalidade de matar qualquer bactéria que ainda esteja no meio extracelular das células, seguido de uma segunda incubação, em estufa a 37°C com tensão de 5% de CO₂. Após incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS, tratadas com tripsina EDTA (Sigma-Aldrich) por 10 min e lisadas com 1 mL de solução contendo 0,1% de Triton X-100 em PBS por 10 min. As bactérias que invadiram as células foram contadas pela técnica de plaqueamento em ágar: lisados foram diluídos serialmente em salina 0,85%, plaqueados em ágar MRS e as colônias enumeradas após incubação das placas por 48 h em estufa microbiológica a 37°C. A invasão de BAL foi expressa como log de UFC/mL de BAL recuperada de cada poço. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

4.5.4. Extração do RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) segundo a recomendação do fabricante com algumas modificações. O clarificado viral foi diluído 1:4 em PBS, a amostra foi homogeneizada e incubada em gelo por 10 min. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 12000 x g por 1min. Em 300 µL de amostra foi adicionado 700 µL de Trizol, homogeneizada vigorosamente por 15 seg. e incubada por 5

min a temperatura ambiente. Foi adicionado 300 μ L de clorofórmio 100% (Merck), homogeneizada vigorosamente por 15 seg., incubado em gelo por 30 min e centrifugado por 12000 x g por 30 min a 4°C. Uma mistura trifásica foi obtida, sendo: uma fase aquosa transparente superior, uma interfase branco-leitosa e uma fase aquosa vermelho claro inferior (fenol-clorofórmio). A fase aquosa superior foi coletada, adicionados 500 μ L de isopropanol (Merck) e incubado overnight a -20°C. Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 12000 x g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi removido e o pellet lavado com 1 mL de etanol 75% (Merck), seguido de uma centrifugação a 7500 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet secado a temperatura ambiente por 20 minutos. Após a secagem, o pellet foi suspenso em 20 μ L de água livre de nuclease tratada com DEPC. O RNA total foi quantificado por espectrofotômetro Nanovue e a análise de sua qualidade levou em conta a relação do DO_{260}/DO_{280} e o DO_{260}/DO_{230} .

Tabela 2: Iniciadores utilizados para amplificação de parte do segmento gênico codificador da proteína viral VP7.

| Iniciadores | Sequência | Acesso no GenBank e orientação | Tamanho do amplicon |
|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| RVA-F Vp7 Senso | 5' GTG ACG AAG CGA ATA AAT GG 3' | RVA-VP7 X66158. 1 | 94pb |
| RVA-R Vp7 Antisenso | 5' GTC AAG CAT CCA ATT CCA AG 3' | RVA-VP7 X66158.1 | 94pb |

Fonte: CLOVES, 2015.

As amostras de RNA total foram submetidas a uma incubação a 70°C por 6 min e no gelo por 5 min. Esse passo é feito para facilitar a ruptura de estruturas secundárias do RNA e para desfazer possíveis dímeros de iniciadores. O RNA total foi submetido a uma RT-PCR utilizando o kit *SuperScriptIII one-step* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante, e utilizando os iniciadores específicos VP7 (Cloves 2015) como mostrado na Tabela 2. Posteriormente, a reação de PCR foi realizada com o seguinte programa: um ciclo de síntese de cDNA e pré-desnaturação a 50°C por 30 min seguido de 94°C por 2 min;

quarenta ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 52°C por 1 min e extensão de 68°C por 1 min; e um ciclo de extensão final de 72°C por 5 min.

4.5.5. Clonagem em vetor plasmidiano do amplicon VP7

Com o objetivo de construir uma curva padrão de DNA viral para os experimentos de RT-qPCR, o amplicon VP7 foi clonado em vetor plasmidiano. Após a produção do cDNA, descrito no item anterior, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com SYBR safe (Invitrogen) e visualizado em transiluminador UV. O produto esperado de 94pb foi recortado do gel de agarose e purificado usando sílica. O produto VP7 purificado foi utilizado para clonagem em vetor plasmidiano *pGEM-T easy* usando T4 DNA ligase (Promega), seguindo o protocolo do fabricante.

4.5.6. Transformação bacteriana

Para transformação foi utilizado a bactéria quimiocompetente *Escherichia coli* XL10 Gold (Invitrogen), conforme o protocolo do fabricante. A bactéria transformada foi transferida para um tubo de 15 mL contendo meio *Luria Bertani* (LB) (extrato de levedura 0,5% p/v, triptona 0,1%, NaCl 0,5% p/v H₂O q.s.p.), incubada por 1h a 37°C, em velocidade constante de 150 rpm em agitador orbital. Após a incubação, o tubo foi centrifugado por 5 min a 2000 x g e o pellet suspenso em 1 mL de meio LB. Posteriormente foram plaqueados 70 µL e 10 µL da cultura bacteriana em placas de Petri com meio LB ágar (Ágar 1,5% p/v) contendo X-Gal 25 µg/mL (Invitrogen), IPTG 100 mM e ampicilina 100 µg/mL, e incubadas a 37°C por 24 h. Após o período de incubação, as colônias brancas isoladas foram selecionadas e transferidas para tubos de 15 mL com 5 mL de meio LB com ampicilina na concentração final de 100 µg/mL, e incubadas por 18 h a 37°C em velocidade constante de 150 rpm em agitador orbital. Finalmente, foi feita a extração do plasmídeo usando o kit de Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega), segundo o fabricante. O plasmídeo foi suspenso em 50 µL de água livre de nuclease e quantificado em espectrofotômetro Nanovue, onde a análise de sua qualidade levou em conta a relação da DO₂₆₀/DO₂₈₀ e DO₂₆₀/DO₂₃₀. As sequências dos plasmídeos foram verificadas por PCR

convencional com o plasmídeo íntegro e com o plasmídeo digerido pela enzima *EcoRI*. O anelamento foi realizado em gradiente de temperaturas para identificar a temperatura ideal de amplificação e confirmado em eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com SYBR safe e visualizado em transiluminador de UV.

4.5.7. Antagonismo de WpK4 frente a adsorção do Rotavírus SA11 em células HT-29

Células HT-29 foram inoculadas em microplacas de 24 poços, $1,5 \times 10^5$ células/poço, em DMEM com 5% de SFB sem antibióticos e usadas em 4 ensaios para avaliar a adsorção viral. Na monocamada lavada com PBS era acrescentado o Rotavírus SA11 pré-ativado (10^6 FFU/mL) por poço: 1 hora antes da adição da bactéria (10^8 UFC); simultaneamente com a bactéria; 30 min depois da adição da bactéria; e após uma incubação da bactéria e vírus pré-ativado por 1 hora em banho maria a 37°C ; sendo respectivamente grupo A, B, C e D (Figura 11).

O grupo A tem a finalidade de avaliar o efeito profilático da WpK4 na ativação e/ou modulação da resposta inata das células; o grupo B de avaliar o efeito em uma infecção conjunta; o grupo C de avaliar o efeito terapêutico da bactéria probiótica e o grupo D de avaliar se a bactéria poderia servir como ligante para o vírus, e, portanto, ser capaz de "captar ou bloquear" os vírus, impedindo a adsorção das partículas virais. Foram avaliados 8 tempos: 0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h (contabilizados a partir do momento da finalização da uma hora de adsorção viral com ou sem bactéria, ou seja, para quaisquer dos tratamentos). Após cada tempo as placas foram lavadas com PBS, tratadas com Trizol (Invitrogen) por 5 minutos em gelo e os sobrenadantes foram coletados. O RNA total foi extraído seguindo o protocolo de extração em Trizol do fabricante (Invitrogen). O kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) foi usado para converter o RNA total em cDNA utilizando *random primers* e seguindo o protocolo do fabricante. O RNA total e o cDNA foram quantificados por espectrofotômetro Nanovue, onde a análise de sua qualidade levou em conta a relação do $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ e o $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{230}$.

4.5.8. Quantificação da carga viral utilizando qPCR

A quantificação do número de cópias de RV-VP7 foi medida por PCR quantitativa em tempo real. As reações foram feitas na plataforma *ABI Step One Real Time PCR* (Thermo Fisher) utilizando o kit *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (BioRad) e iniciadores do gene VP7 (Tabela 2). Para isso foram aplicados 10 ng de cDNA em cada poço da placa (ZHANG *et al.*, 2013).

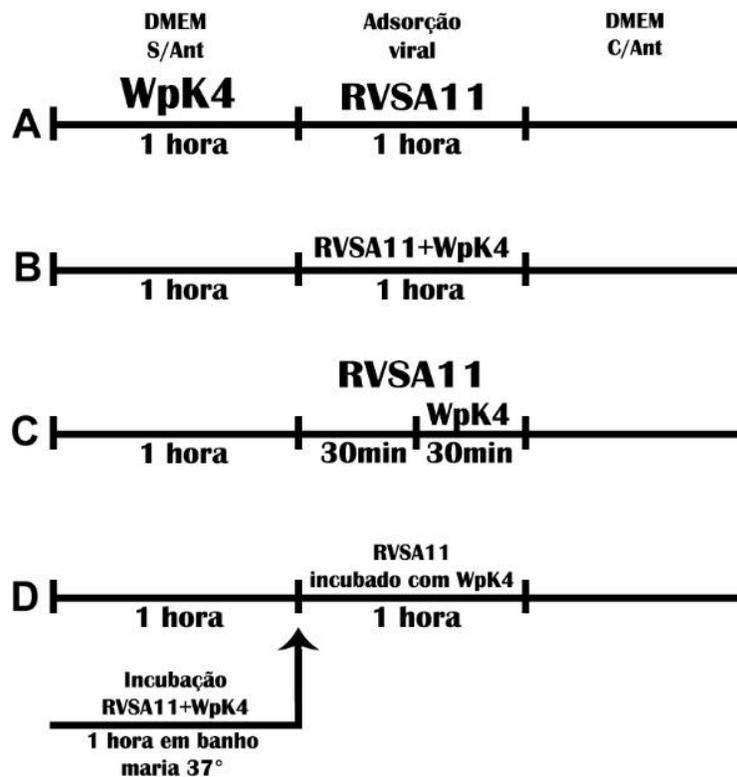


Figura 11: Desenho experimental dos ensaios *in vitro* de adsorção do Rotavírus SA11 em células HT-29.

Para a padronização das reações foram feitas curvas de diluição seriada utilizando o plasmídeo pGEMT-VP7, produzido anteriormente, utilizando pontos com 10^8 cópias; 10^7 cópias; 10^6 cópias; 10^5 cópias; 10^4 cópias; 10^3 cópias e 10^2 cópias; totalizando sete pontos. O cálculo do número de cópias foi realizado a partir da quantidade de ng/ μ L quantificado em espectrofotômetro Nanovue e quantidade de pares de bases presentes no plasmídeo pGEM-T (3015pb) mais 94 pb (VP7) totalizando 3109 pb. Este cálculo é baseado na

suposição de que a média da massa de um par de base (pb) é 650 Daltons, isso significa que cada mol de um pb pesa 650 g e que a massa molecular de qualquer dupla fita de DNA pode ser estimado partindo do produto do comprimento da fita (em pb) e 650. O inverso do peso da molécula é o número de moles de DNA presente em um grama de material. Usando o número de Avogadro, $6,022 \times 10^{23}$ moléculas/mol, o número de moléculas de DNA por grama pode ser calculado pela fórmula:

$$\frac{mol}{g} \times \frac{moléculas}{mol} = \frac{moléculas}{g}$$

Finalmente, o número de moléculas ou número de cópias de DNA em uma amostra pode ser estimado multiplicando 1×10^9 para converter para ng, e, então, multiplicando pela quantidade de DNA (em ng). Logo:

$$\begin{aligned} \text{Número de cópias} &= \frac{ng \times \frac{\text{número}}{mol}}{pb \times \frac{ng}{g} \times \frac{g}{mol \text{ de pb}}} \\ \text{Número de cópias} &= \frac{ng \times 6,022 \times 10^{23}}{3109 \times \frac{1 \times 10^9}{1} \times \frac{650}{1}} \end{aligned}$$

As cópias do gene VP7 foram calculadas de acordo com a curva padrão estabelecida pelo plasmídeo pGEMT-VP7. Valores menores do que 10 cópias/mL de RNA viral VP7 foram definidas como ausência de infecção (ZHANG *et al.* 2013). Todas as reações foram usadas em um programa de ciclagem universal com um passo inicial de ativação da DNA polimerase e desnaturação do DNA a 95°C por 30 seg, amplificação em 40 ciclos com uma desnaturação a 95°C por 3 seg., anelamento e extensão a 54°C por 30 seg. e análise da curva de *melting* de 65°C a 95°C com incremento de 0,5°C a cada 2-5 seg.

4.6. Ensaios *in vivo*

4.6.1. Infecção por Rotavírus SA11 em modelo animal

O ensaio com camundongos foi realizado para avaliar o efeito do tratamento com *Weissella paramesenteroides* WpK4 na morbidade e mortalidade dos animais durante um desafio experimental com Rotavírus SA11. Antes do início dos procedimentos com os animais foi realizado um processo de vermifugação, a fim de prevenir e evitar infecções por parasitas que poderiam influenciar nos resultados dos experimentos. A solução de 0,25% de ivermectina foi colocada na mamadeira dos camundongos por 24 h, sendo substituída por água filtrada após esse período.

Os camundongos fêmeas prenhes foram separadas aleatoriamente em quatro grupos, como mostrado na tabela 3. A prole de cada uma dessas fêmeas foi marcada e desafiada no 9º dia de vida. O desafio foi realizado pelo inóculo de 10^4 FFU/mL de Rotavírus SA11, por via intragástrica, a partir do estoque previamente feito e diluído em PBS. Dois grupos de fêmeas prenhes receberam *Weissella paramesenteroides* Wpk4 (10^7 UFC/mL) em sua água durante as 2 semanas antes de gerar a prole, a água era trocada diariamente e cessou no 15º dia de vida da prole (tabela 3).

Tabela 3: Distribuição dos grupos experimentais do ensaio *in vivo*.

| Nome dos grupos | <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 | | Rotavírus SA11 Inóculo no dia 9 de vida (FFU/animal) |
|------------------------------|--|-----------------------|--|
| | Dias de vida que recebeu bactéria | Dose diária UFC/mL | |
| A (Controle negativo) | - | - | - |
| B (Controle de vírus) | - | - | 10^4 |
| C (Controle de WpK4) | 2 semanas antes do nascimento da prole até o 15º dia da prole | - | - |
| D (Grupo teste) | 2 semanas antes do nascimento da prole até o 15º dia da prole | 10^7 | 10^4 |

Ao final do período experimental, os camundongos foram anestesiados com Cetamina (100 mg/kg de peso) e Xilazina (20 mg/kg de peso) (Syntec, Cotia, Brasil) por injeção intraperitoneal e, posteriormente, eutanasiados por deslocamento cervical. Os animais foram submetidos à laparotomia em capela de fluxo laminar, sob condições assépticas, o conteúdo intestinal foi cuidadosamente removido do cólon e reto, e o intestino delgado foi coletado, pesado e armazenado em Trizol.

4.6.2. Perda de peso e Índice de diarreia

A capacidade de *W. paramesenteroides* WpK4 de proteger os camundongos frente a infecção por Rotavírus SA11 foi analisada. Para isso, os animais de diferentes grupos foram comparados, a fim de avaliar a taxa de mortalidade e morbidade decorrente da infecção com o vírus. O peso foi medido no dia do desafio (9º dia de vida) e no dia do sacrifício (15º de vida).

Um escore de diarreia foi feito para cada grupo, observando 2 vezes ao dia (manhã e tarde) e fazendo uma média dos indivíduos, durante todos os dias após a administração do Rotavírus. Seis (6) escalas de escore foram utilizadas: 1, sem fezes; 2, fezes marrons de formato normal; 3, fezes macias marrons; 4, fezes macias-mucosas marrom-amareladas; 5, fezes mucosas amarelas; 6, fezes amarelas líquidas. Os escores 1, 2 e 3 foram considerados normais; 4 e 5 diarreia leve; e 6 diarreia grave (Zhang et al, 2013).

4.7. Análises estatísticas

Os ensaios *in vitro* foram comparados usando o teste Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. O peso corporal foi comparado entre os grupos usando teste ANOVA seguido pelo teste Hsu-Dunnett. A significância estatística foi $P < 0,05$. Todas as análises estatísticas e gráficos foram feitos usando o programa GraphPad Prism 6 e o programa IBM SPSS Statistics.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção e titulação do estoque viral

O Rotavírus símio da linhagem SA11 foi propagado em células MA104. A amostra sem título inicial foi inoculada em monocamadas confluentes. O vírus foi obtido do sobrenadante clarificado de monocamadas com 80-90% de efeito citopático (ECP) (Figura 12).

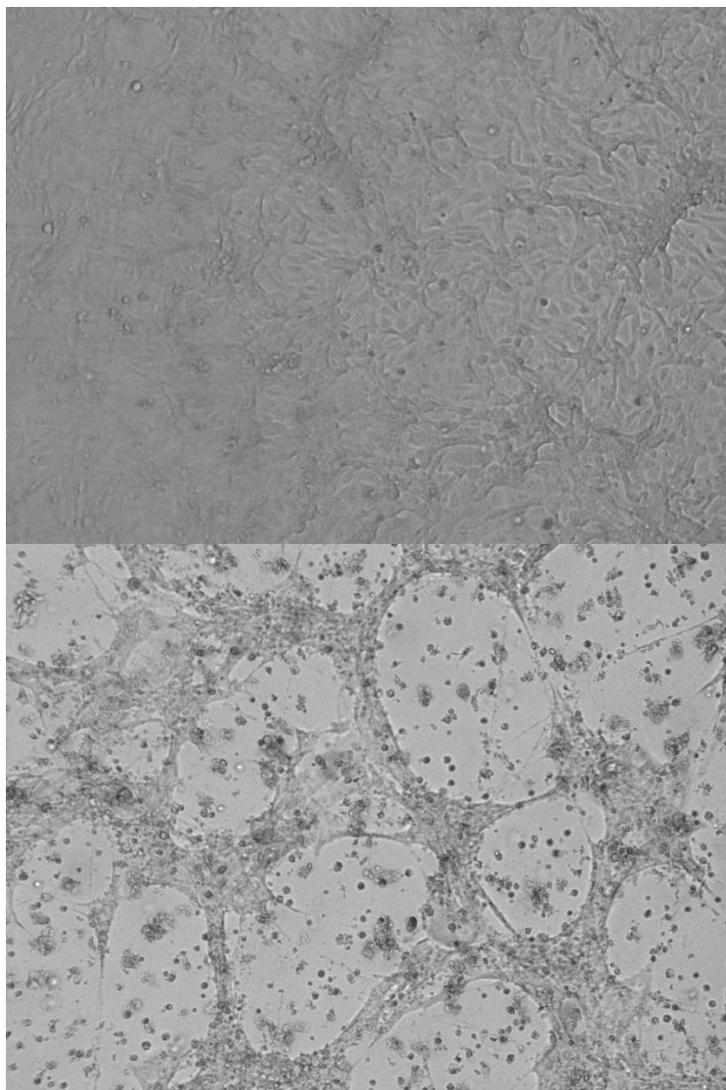


Figura 12: Monocamada confluyente de células MA104 infectadas: Acima, ausência de ECP (controle de célula); Abaixo, monocamadas confluentes de células MA104 após 96 horas de infecção por Rotavírus apresentando ECP.

5.2. Titulação do Rotavírus por formação de foco de fluorescência

Para verificação do título viral, o clarificado celular foi submetido a titulação por formação de foco de fluorescência (Figura 13), dada em Unidades Formadoras de Foco por mL. Após infecção, as células foram incubadas por 18 horas, fixadas e marcadas com anticorpos específicos e observadas em microscópio fluorescente invertido, em comprimento de onda de excitação e emissão de aproximadamente 495 nm/521 nm. Foi contado cada foco fluorescente e o título foi calculado pela fórmula:

$$UFF = n^{\circ} \text{ de focos fluorescentes} \times \frac{1}{\text{fator de diluição}} \times \frac{1}{\text{Volume de inóculo}}$$

Aplicando a fórmula, o título obtido para o estoque viral foi de $1,5 \times 10^6$ UFF/mL.

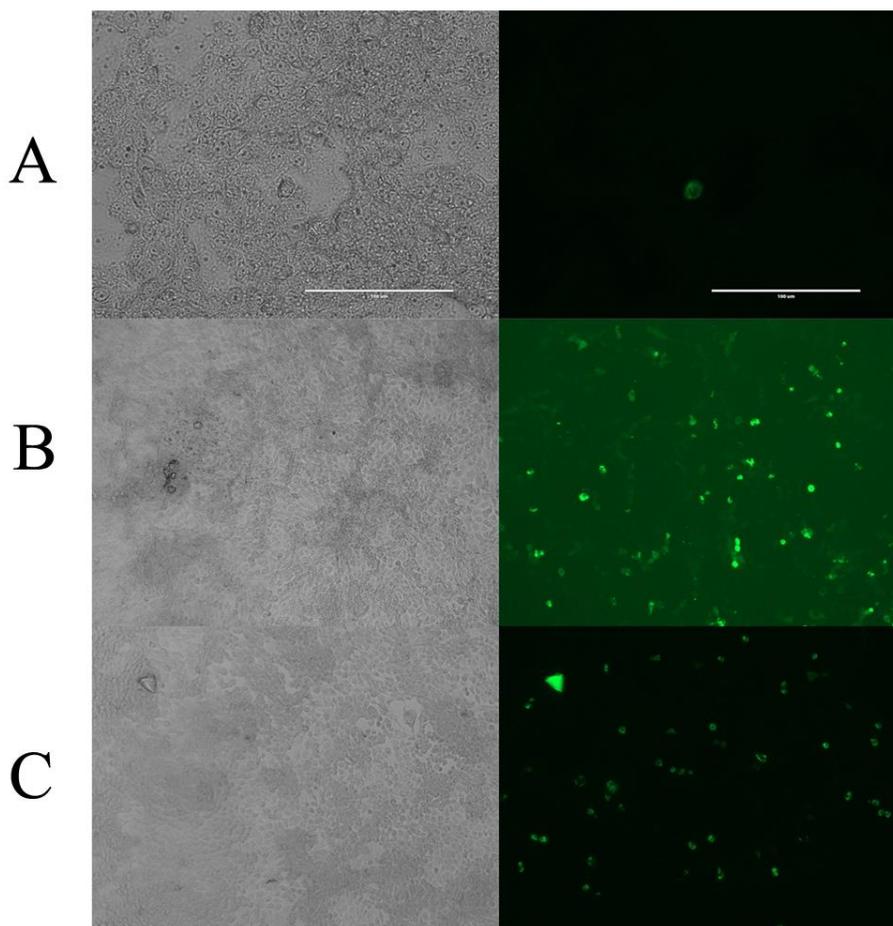


Figura 13: Titulação viral por formação de foco florescente: À esquerda, células em luz branca e à direita, células em luz com comprimento de onda de 495nm. A) Célula marcada com anticorpo específico anti-VP6. B e C) Células marcadas pelo anticorpo.

5.3. Verificação da presença do vírus por PCR

Para verificação da presença do dsRNA viral do RV foi realizado um RT-PCR convencional como primers específicos VP7 (Figura 14).

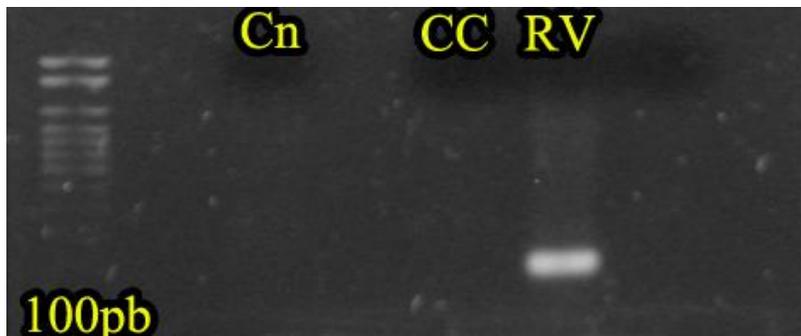


Figura 14: Amplicon da RT-PCR utilizando como molde dsRNA de RV separado em gel de Agarose a 1,5%.

5.4. Verificação da clonagem do amplicon VP7 em plasmídeo pGEM-T easy

Para avaliação da clonagem realizada no plasmídeo pGEM-T easy, foi realizada a restrição enzimática com a enzima *EcoRI*. O plasmídeo extraído foi submetido a digestão com a enzima *EcoRI*, e o sucesso da clonagem foi confirmado por PCR convencional em gradientes diferentes de temperatura (Figura 15). Ao observar o gel, a banda com maior intensidade representa a temperatura de 54°C, por isso, optou-se pela temperatura para os experimentos em qPCR.

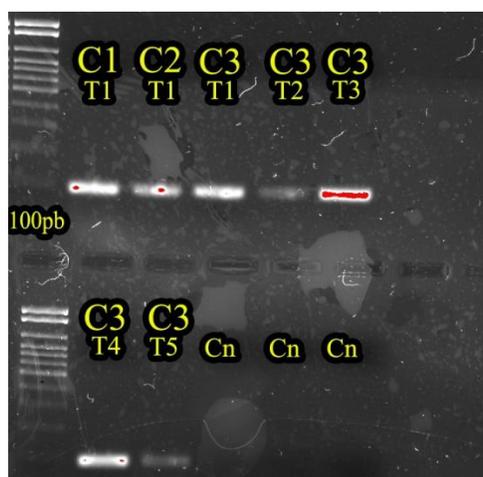


Figura 15: Padronização da PCR de RV em gradiente de temperatura de anelamento de 50°C a 58°C: T1 = 52°C, T2 = 50°C, T3 = 54°C, T4 = 56°C, T5 = 58°C) utilizando como molde DNA plasmidiano (clones C1-C3).

5.5. Testes de adesão e invasão de células por *W. paramesenteroides* WpK4

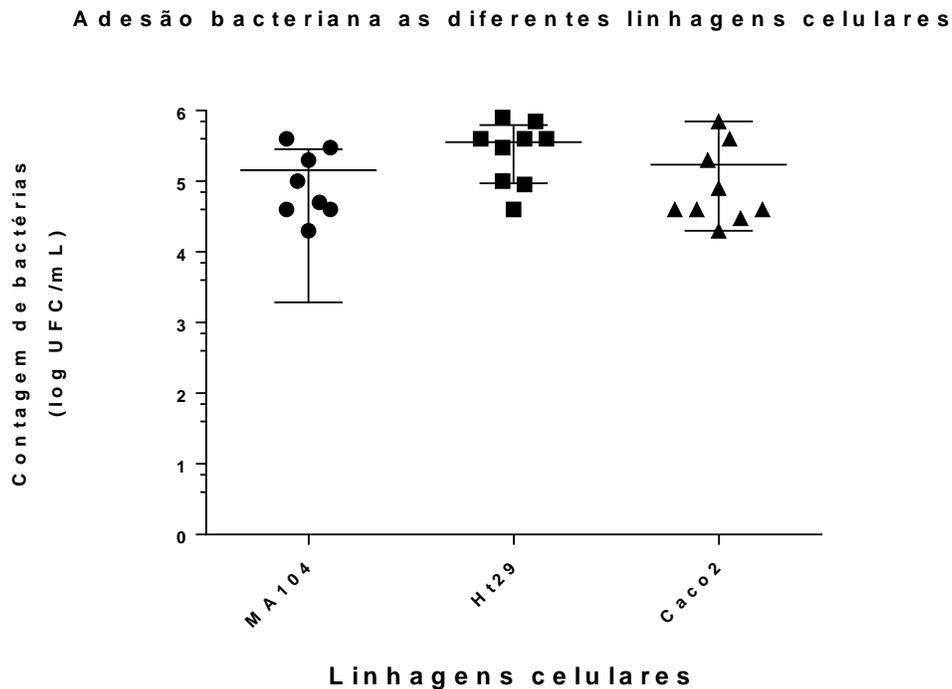


Figura 16: Adesão da *Weissella paramesenteroides* WpK4 em linhagem celular MA104, HT-29 e Caco-2.

A adesão da *Weissella paramesenteroides* foi avaliada em ensaio de co-cultivo em três linhagens celulares, MA104, HT-29 e Caco-2, usando uma ROI de 100:1 (BAL:célula) com 1 h de contato e foi expressa como log UFC de BAL/mL de lisado celular (Figura 16). A quantidade de bactérias aderidas variou de 4,3 a 5,3 log de UFC/mL, para a MA104; 4,6 a 5,9 log de UFC/mL, para HT-29; e 4,6 a 5,8 log de UFC/mL, para Caco-2; a média de bactérias aderidas foi 5,15 log UFC/mL, 5,50 log UFC/mL e 5,23 UFC/mL de lisado celular, respectivamente, não havendo diferença significativa entre as linhagens ($p = 0,0758$; Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn). Em comparação ao total de BAL adicionadas à monocamada de células ($\sim 7 \log_{10}$ de UFC), aproximadamente 2 \log_{10} de UFC de BAL não foram capazes de aderir-se às linhagens celulares. Estes resultados são interessantes pois demonstram que a bactéria foi capaz de se aderir nas diferentes linhagens celulares e que a adesão não foi estatisticamente diferente entre elas (Figura 16).

Invasão bacteriana nas diferentes linhagens celulares

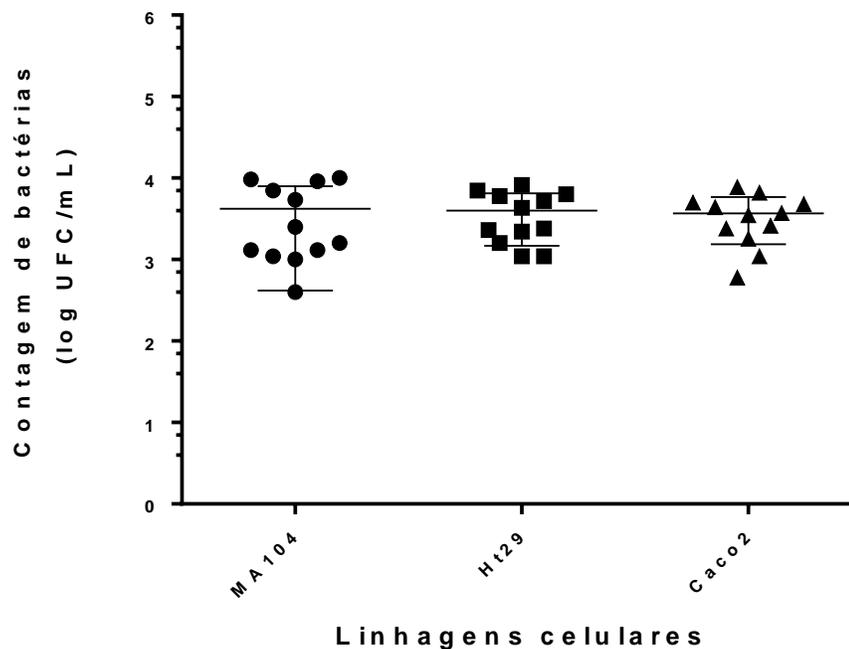


Figura 17: Invasão da *Weissella paramesenteroides* WpK4 em linhagem celular MA104, HT-29 e Caco2.

A invasão da *Weissella paramesenteroides* WpK4 foi avaliada em ensaio de co-cultivo em três linhagens celulares, MA104, HT-29 e Caco-2, usando uma ROI de 100:1 com 1 h de contato e foi expressa como log UFC BAL/mL de lisado celular (Figura 17). A quantidade de bactérias internalizadas variou de 2,6 a 4,0 log UFC/mL para a MA104; 3,04 a 3,91 log UFC/mL para HT-29; e 2,77 a 3,88 log UFC/mL para Caco-2 de lisado celular e a média de bactérias internalizadas foi 3,60 log UFC/mL, 3,59 log UFC/mL e 3,56 UFC/mL de lisado celular de MA104, HT-29 e Caco-2, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os valores para as linhagens ($p = 0,9687$; Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn). Em comparação ao total de BAL adicionadas à monocamada de células ($\sim 7 \log_{10}$ de UFC), quase 3 \log_{10} UFC de BAL não foram capazes de entrar nas linhagens celulares. Estes resultados corroboram os dados de adesão e demonstram que a bactéria é também internalizada pelas células hospedeiras (Figura 17).

5.6. Avaliação da carga viral após tratamento com WpK4 nas células HT-29 *in vitro*

Para avaliar se o probiótico possui ação antiviral *in vitro*, foi realizado um ensaio para quantificar as cópias do gene VP7 em células HT-29 infectadas por RV. Para tal, foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real. O plasmídeo pGEM-VP7 produzido foi usado para confeccionar uma curva padrão. O grupo A teve a finalidade de avaliar o efeito profilático da WpK4 na ativação e/ou modulação da resposta inata das células; o grupo B avaliar o efeito da WpK4 em uma infecção conjunta com RV; o grupo C avaliar o efeito probiótico da bactéria de forma terapêutica e o grupo D avalia se a bactéria poderia servir como ligante para o vírus, e portanto, impedir sua adsorção na célula hospedeira. Pode ser observado na figura 20, analisando o controle de vírus, que o transcrito de VP7 teve o seu pico de acumulação nos tempos de 24 e 48h pós infecção (o tempo de 72h para o controle de vírus foi perdido).

A figura 20, representada em unidades arbitrária do transcrito de VP7 das replicatas de 3 experimentos de quantificação por PCR em tempo real, mostra claramente uma redução da infecção viral especialmente nos tempos de 24h até 96 h para todos grupos, exceto o grupo D. Houve redução dos transcritos especialmente com 24 h (B>C>A), 48 h (A>C>B) e 96 h (B>C>A>D). Portanto, diante dos dados e com a ferramenta metodológica utilizada, os tratamentos B (onde as células receberam bactéria e vírus de maneira concomitante), C (onde as células receberam a bactéria 30 minutos após a incubação com RVA), além de A (onde as células foram "tratadas" com as bactérias por 1h, seguida da inoculação do vírus mais 1h) provando uma possível ação antiviral da bactéria WpK4, com inibição da progressão da infecção viral e possível modulação da resposta imune inata (especialmente no caso do grupo A). Os dados observados para o grupo D, onde a incubação de bactéria e vírus por 1h antes da inoculação do RV nas células, mostraram que praticamente não há interação direta de WpK4 e RV responsável pela "redução viral" observada. Certamente novos estudos com maior número de replicatas serão conduzidos, porém, estes dados apontam para uma ausência de ligação direta vírus/bactéria e/ou competição por ligantes.

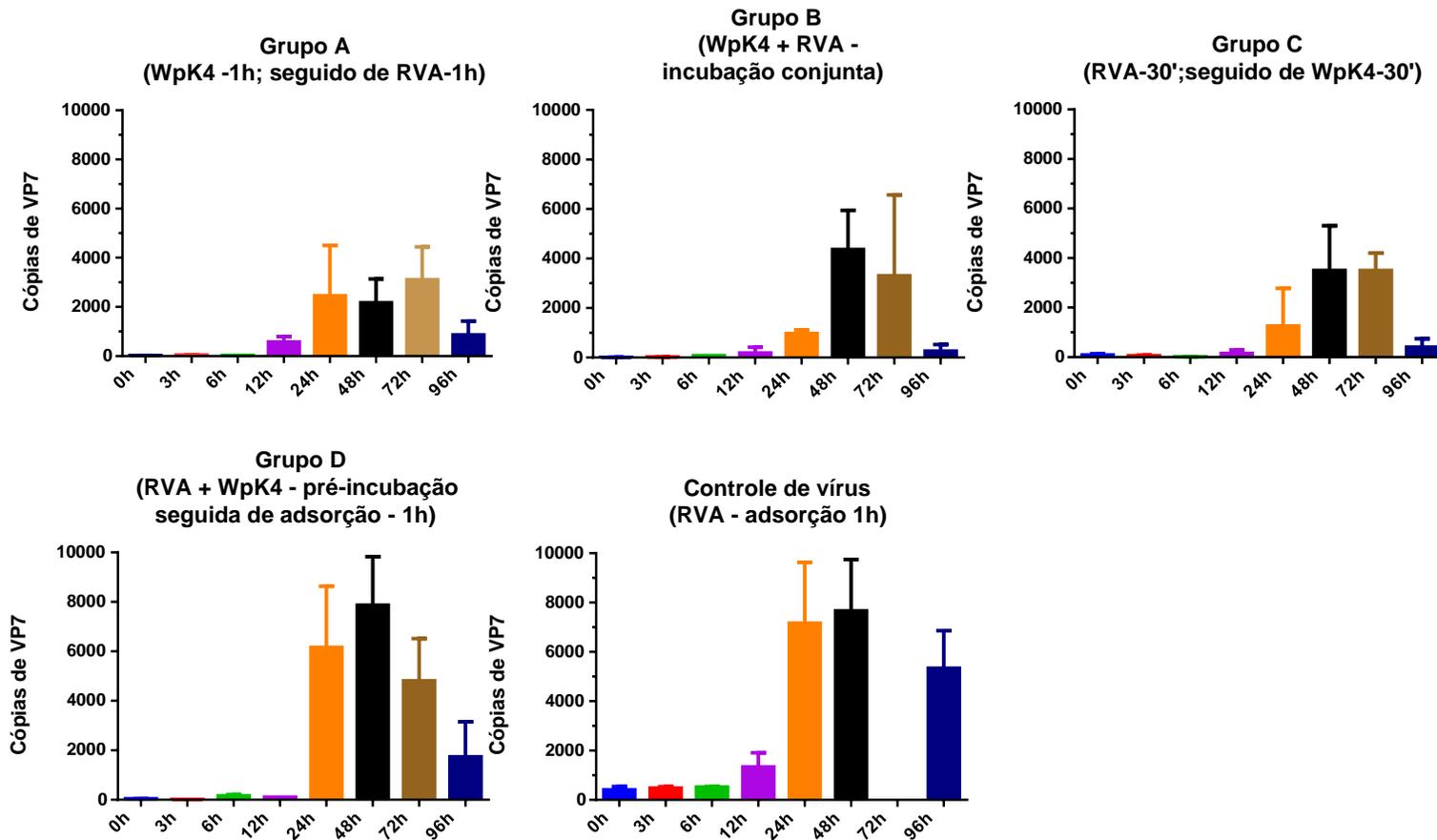


Figura 18: Efeito da WpK4 na expressão gênica de VP7 em células HT-29 infectadas por RVSA11. Grupo A, ação profilática de WpK4; grupo B, ação concomitante de WpK4 e Rotavírus; grupo C, ação terapêutica de WpK4 pós-infecção por RV; grupo D, interação prévia WpK4 e RV.

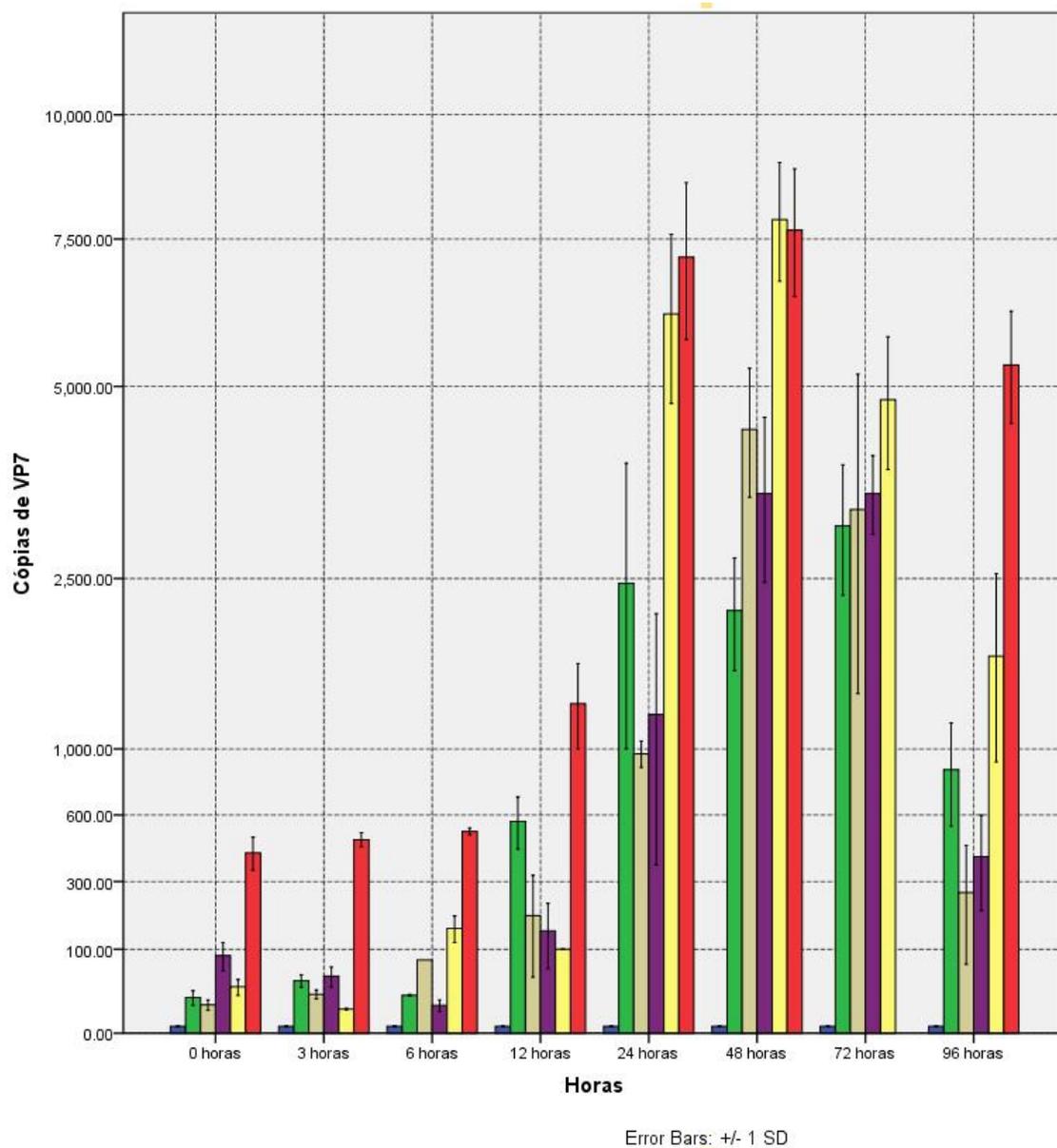


Figura 19: Efeito da WpK4 na expressão gênica de VP7 em células HT-29 infectadas por RVSA11 em cada tempo e grupo. Células HT-29 ($1,5 \times 10^5$ células) foram infectadas com RVSA11 ($1,5 \times 10^4$ UFF). Grupo A (verde) foi incubado por 1h com WpK4 antes da adsorção viral; grupo B (Bege) foi incubado com a WpK4 simultaneamente à adsorção viral; grupo C (Roxo) WpK4 foi inoculada e incubada por 30 min após adsorção viral prévia por 30 min; grupo D (amarelo) feito adsorção viral com RV incubado com a WpK4 por 1h, centrifugado e adicionado nas células. Barras azuis são controle negativos e vermelhas são controle positivo (RV). Valores mostrados representam a média \pm desvio padrão.

5.7. Infecção de camundongos neonatos com RV

Estudos recentes mostraram a importância da microbiota intestinal da fêmea prenhe influenciando no desenvolvimento do sistema imune da prole (Lawrence *et al.* 2017; Chien-Ning Hsu *et al.* 2018; Tain *et al.* 2016). Com o objetivo de avaliar se o probiótico *Weissella paramesenteroides* WpK4 induziria alguma resistência à infecção pelo RVA via modulação do sistema imune materno (e indiretamente “programando” a prole), administrou-se diariamente WpK4 na água de fêmeas prenhes durante as duas semanas antes do nascimento da prole com continuidade até o 15º dia de vida da prole. No 9º dia de vida da prole, a mesma foi desafiada com RVSA11 (10^4 UFF).

Os animais desafiados foram observados duas vezes ao dia, durante sete dias pós-infecção. Pode ser observado que houve uma frequência maior de diarreia no grupo controle de vírus. No grupo tratado com WpK4 e infectado foi visto diarreia em uma frequência bem menor e diferente do grupo controle apenas tratado com WpK4 e não desafiado com RV (Tabela 4).

Tabela 4: Escore de diarreia nos animais por grupo de tratamento:

| | | Dias pós-infecção | | | | | | |
|----------------------|-----|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Número de indivíduos | | | | | | | | |
| | PBS | 2 | 1 1 | 2 1 | 1 2 | 1 1 | 2 2 | 2 2 |
| 7 | | 1 2 | 2 2 | 2 2 | 2 3 | 2 3 | 2 2 | 3 |
| RVA | 4 | 2 2 | 1 1 | 3 2 | 4 3 | 3 3 | 1 1 | 5 |
| | 5 | 1 2 | 1 1 | 3 2 | 3 3 | 4 1 | 4 4 | 5 |
| WpK4+PBS | 3 | 1 2 | 2 2 | 1 2 | 2 2 | 2 2 | 2 2 | 2 |
| | 3 | 1 1 | 1 1 | 2 2 | 2 2 | 1 1 | 1 2 | 1 |
| WpK4+RV | 3 | 1 1 | 2 2 | 2 3 | 3 3 | 3 3 | 1 4 | 3 |
| | 6 | 2 1 | 2 2 | 2 1 | 3 3 | 3 3 | 2 2 | 3 |
| | 1 | 1 1 | 2 1 | 2 2 | 1 3 | 3 1 | 1 2 | 3 |
| | 6 | 1 2 | 2 2 | 2 1 | 4 1 | 3 2 | 3 3 | 3 |

1, sem fezes; 2, fezes marrons de formato normal; 3, fezes macias marrons; 4, fezes macia-mucosa marrom-amarela; 5, fezes mucosas amarelas; 6, fezes amarelas liquidas. Score 1, 2 e 3 foram considerados normais; 4 e 5, diarreia leve; e 6, diarreia grave. Cada linha em cada grupo representa uma ninhada diferente.

As infecções por Rotavírus possuem como característica a perda de peso, causada pela má absorção dos nutrientes e pela diarreia. Os animais desafiados foram avaliados quanto as possíveis alterações no peso corporal. Para isso, medidas individuais foram anotadas no dia do desafio (9º dia de vida) e sete dias após o desafio (15º de vida). A porcentagem média de ganho de peso dos animais foi de 159,1±4,3% para o grupo PBS; 140,5±13% para o grupo PBS+RV; 142,3±7,5% para o grupo WpK4+ PBS; 142,9±13,9% para o grupo WpK4+RV. Contudo, nenhum grupo apresentou mortalidade diferente de zero, com exceção do grupo RV, onde três animais morreram no 5º dia pós-infecção.

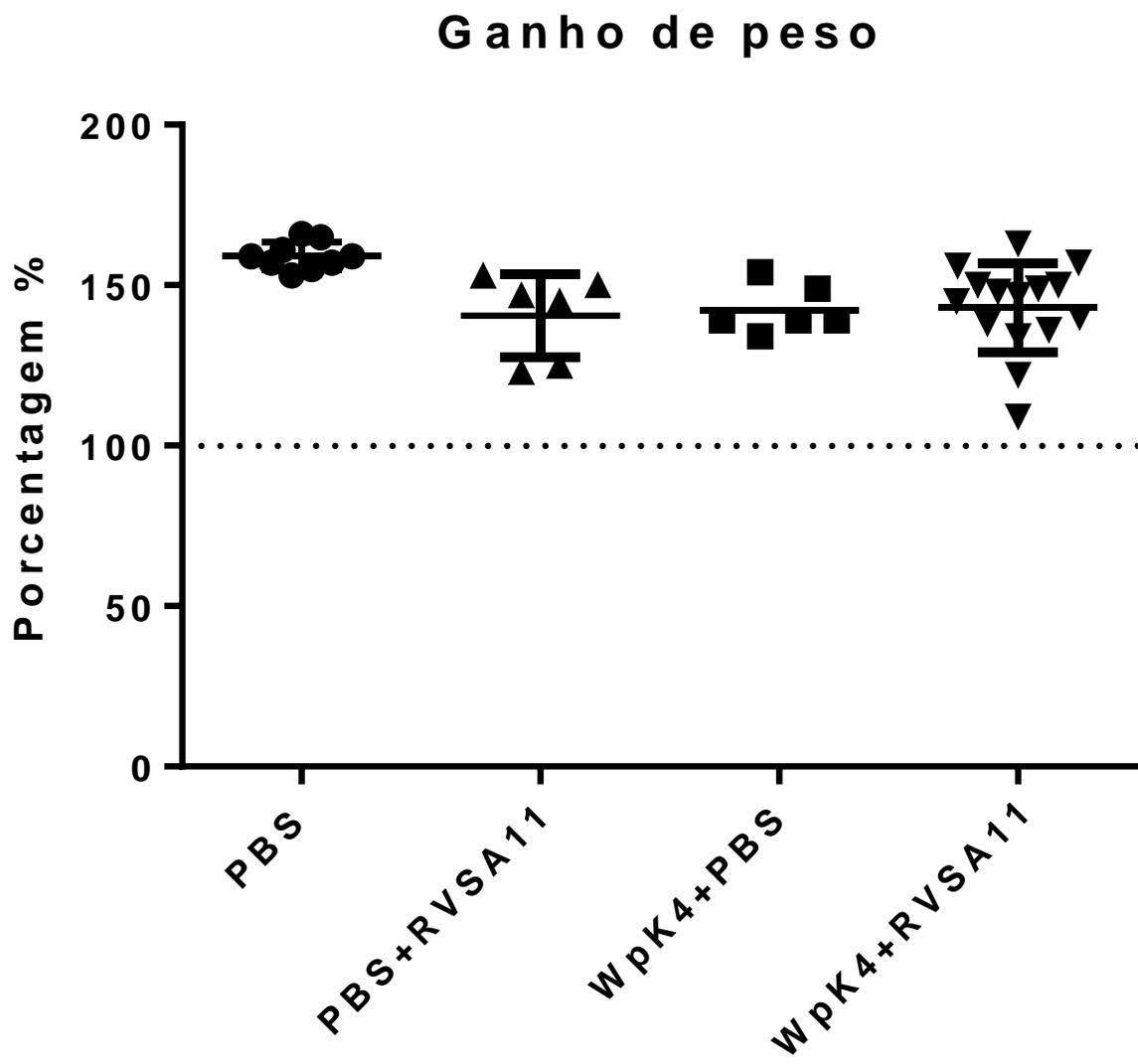


Figura 20: Ganho de peso em porcentagem dos diferentes grupos: Ganho de peso de animais desafiados no 9º dia de vida (100%) em comparação com o peso no 15º dia de vida em diferentes grupos.

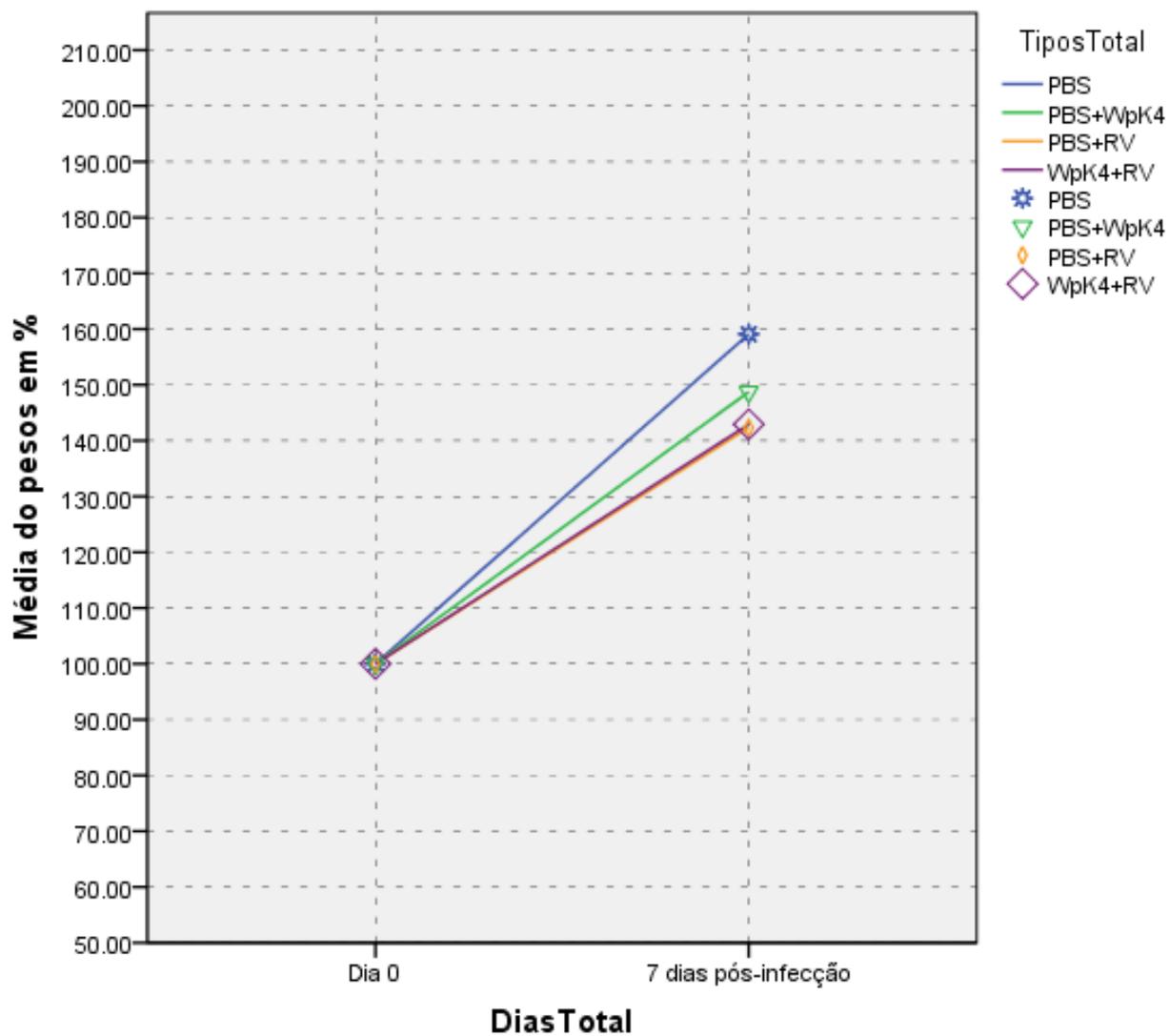


Figura 21: Pesos médio dos animais em porcentagem, após 7 dias de infecção por RV.

A partir desses resultados, concluímos que a microbiota intestinal da progenitora, de alguma forma modulou a resposta à RVA na prole e, portanto, que a bactéria mostrou um possível caráter probiótico frente a infecção viral. Contudo, mais repetições e análises necessitam ser feitas para poder avaliar a modulação da resposta imune nos animais desafiados e mostrar se a ação probiótica foi realmente a observada.

6. CONCLUSÕES

- A bactéria *Weissella paramesenteroides* WpK4 mostrou-se capaz de aderir e invadir células epiteliais intestinais humanas e células epiteliais de macaco. Não houve diferença significativa em sua adesão e invasão entre as três linhagens testadas.
- O uso da bactéria *Weissella paramesenteroides* WpK4 apontou para uma ação antiviral *in vitro* em culturas de células epiteliais humanas especialmente nos tempos 24h a 96h pós-adsorção do RV.
- O tratamento de fêmeas prenhes com *Weissella paramesenteroides* WpK4 mostrou criar algum mecanismo de proteção na prole contra Rotavírus.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVIM, L. B. *et al.* Weissella paramesenteroides WpK4 reduces gene expression of intestinal cytokines, and hepatic and splenic injuries in a murine model of typhoid fever. *Beneficial Microbes*. Vol. 7. Pág. 61-73. 2016.
- ALVIM, L. B. Segurança e efeito probiótico de Weissella paramesenteroides WpK4 isolada de suíno na infecção experimental com *Salmonella typhimurium* em camundongos. p. 1–97, 2015.
- ANDERSON, E.J., WEBER, S.G. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis*. 2004 Feb;4(2):91-9.
- ANGEL, J., FRANCO, M.A., GREENBERG, H.B. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Curr. Opin. Virol*. 2 (August (4)), 419–425. 2012
- ANSARI SA, SPRINGTHORPE VS, SATTAR SA. Survival and vehicular spread of human Rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev Infect Dis*.;13(3):448-61. 1991
- ANSARI, S.A., SPRINGTHORPE, V.S., SATTAR, S.A. Survival and vehicular spread of human Rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev Infect Dis*. May-Jun;13(3):448-61. 1991
- APPAIAHGARI MB, GLASS R, SINGH S, TANEJA S, RONGSEN-CHANDOLA T, BHANDARI N, MISHRAS, VRATI S. Transplacental Rotavirus IgG interferes with immune response to live oral Rotavirus vaccine ORV-116E in Indian infants. *Vaccine*. 2014 Feb 3;32(6):651-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.12.017. Epub Dec 25. 2013
- ARIAS, C. F. *et al.* Trypsin activation pathway of Rotavirus infectivity. *Journal of virology*, v. 70, n. 9, p. 5832–5839, 1996.
- ARMAH G.E., SOW S.O., BREIMAN R.F., DALLAS M.J., TAPIA M.D., FEIKIN D.R., BINKA F.N., STEELE A.D., LASERSON K.F., ANSAH N.A., *et al.* Efficacy of pentavalent Rotavirus vaccine against severe Rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. ;376:606–614. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60889-6. 2010
- AYALA-BRETON, C. *et al.* Analysis of the Kinetics of Transcription and Replication of the Rotavirus Genome by RNA Interference. *Journal of Virology*, v. 83, n. 17, p. 8819–8831, 2009. BIELECKA, M. Probiotics in Food. p. 413–426, 2006.
- BAGCHI, P., BHOWMICK, R., NANDI, S., KANT NAYAK, M., CHAWLA-SARKAR, M. Rotavirus NSP1 inhibits interferon induced non-canonical NFkappaB activation by interacting with TNF receptor associated factor 2. *Virology* 444 (September (1–2)), 41–44 2013
- BALL, J.M., TIAN, P., ZENG, C.Q., MORRIS, A.P., ESTES, M.K. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* 272 (April (5258)), 101–104 1996
- BANYAI K, LASZLO´ B, DUQUE J, *et al.* Systematic review of regional and temporal trends in global Rotavirus strain diversity in the pre Rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of Rotavirus vaccination programs. *Vaccine*; 30(Suppl 1):A122–30. 30. 2012
- BARRO, M., PATTON, J.T. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J. Virol*. 81 (May (9)), 4473–4481. 2007
- BARRO, M., PATTON, J.T.,. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 102 (March (11)), 4114–4119. 2005
- BELDA, E., PEDROLA, L., PERETÓ, J., MARTÍNEZ-BLANCH, J. F., MONTAGUD, A., NAVARRO, E., *ET AL.* Microbial diversity in the midguts of field and lab-reared populations of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. *PLoS ONE* 6:e21751. doi: 10.1371/journal.pone.0021751. 2011
- BERKOVA, Z., CRAWFORD, S.E., TRUGNAN, G., YOSHIMORI, T., MORRIS, A.P., ESTES, M.K.,. Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm. *J. Virol*. 80 (June (12)), 6061–6071. 2006
- BHOWMICK, R., HALDER, U.C., CHATTOPADHYAY, S., NAYAK, M.K., CHAWLA-SARKAR, M. Rotavirus-encoded nonstructural protein 1 modulates cellular apoptotic machinery by targeting tumor suppressor protein p53. *J. Virol*. 87 (June (12)), 6840–6850. 2013

- BIELECKA, M. Probiotics in Food. p. 413–426, 2006.
- CLOVES, A.S. Estudo da ação probiótica das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 e *Saccharomyces boulardii* no tratamento da infecção induzida pelo Rotavírus em modelo experimental murinho. Universidade Federal de Minas Gerais.
- BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH, RUCK BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. 2(7841):1281-3. 1973
- BJÖRKROTH, J. A., DICKS, L. M. T. D., AND ENDO, A. "The genus *Weissella*," in *Lactic Acid Bacteria, Biodiversity and Taxonomy*, eds W. H. Holzapfel and B. J. B. Wood (Chichester: Wiley Blackwell), 418–428. 2014
- BOBEK, V. *et al.* A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. *Anticancer Research*, v. 30, n. 12, p. 4799–4804, 2010.
- BORJA-CACHO, D.; MATTHEWS, J. A novel method for oral delivery of drug compounds to the neonatal SMN Δ 7 mouse model of spinal muscular atrophy. *Nano*, v. 6, n. 9, p. 2166–2171, 2008.
- BOSCHI-PINTO, C.; VELEBIT, L.; SHIBUYA, K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 86, n. 9, p. 710–717, 2008.
- BRUNET J, COTTE-LAFFITTE J, LINXE C, QUERO A, GÉNITEAU-LEGENDRE M, S. A. Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: Role in microvillar actin alteration. *Journal of Virology*, v. 74, n. 5, p. 2323–2332, 2000.
- BUTTERY, J. P.; KIRKWOOD, C. D. What can Rotavirus vaccines teach us about Rotavirus? *The Lancet Infectious Diseases*, v. 14, n. 9, p. 786–788, 2014.
- CAPRIO RV, GONZALEZ-NILO FD, RIADI G, TARAPOREWALA ZF, PATTON JT. Histidine triad-like motif of the Rotavirus NSP2 octamer mediates both RTPase and NTPase activities. *J. Mol. Biol.* 2006;362,539–554.
- CARSON, R. A.; MUDD, S. S.; MADATI, P. J. Clinical Practice Guideline for the Treatment of Pediatric Acute Gastroenteritis in the Outpatient Setting. *Journal of Pediatric Health Care*, v. 30, n. 6, p. 610–616, 2016.
- CASOLA A, ESTES MK, CRAWFORD SE, OGRA PL, ERNST PB, GAROFALO RP, CROWE SE. Rotavirus infection of cultured intestinal epithelial cells induces secretion of CXC and CC chemokines. *Gastroenterology*. May;114(5):947-55. 1998
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Rotavirus Rotavirus. Pink Book, p. 263–274, 2014.
- CÉSAR, L.; SILVA, D. A. Detecção da infecção de rotavírus e levantamento soropidemiológico de alguns patógenos com potencial zoonótico em avestruzes (*Struthio camelus*) no estado do Paraná. Universidade Federal do Paraná, 2006.
- CHANG KO, KIM Y, SAIF LJ.. Rotaviruses and reoviruses, p 621–634. In Zimmerman JJ, Kariker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. (ed), *Diseases of swine*, 10th ed Wiley-Blackwell, Chichester, United Kindom. 2012
- CHELO, I. M. *et al.* Physical and genetic map of the *Weissella paramesenteroides* DSMZ 20288T chromosome and characterization of different *rrn* operons by ITS analysis. *Microbiology*, v. 150, n. 12, p. 4075–4084, 2004.
- CHEN, Y. S., YANAGIDA, F., AND SHINOHARA, T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 195–200. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01653.x. 2005
- CHHABRA, P. *et al.* Etiology of viral gastroenteritis in children <5 years of age in the United States, 2008-2009. *Journal of Infectious Diseases*, v. 208, n. 5, p. 790–800, 2013.
- CHUNG, K. T.; McCRAE, M. A. Regulation of gene expression by the NSP1 and NSP3 non-structural proteins of Rotavirus. *Archives of Virology*, Berlin, v. 156, n. 12, p. 2197-2203, 2011.
- CLARK FH, OFFIT PA, PARASHAR UD. Rotavirus vaccine. In: Plotkin SA, Oreste W, Offit PA, editors. *Vaccines*. 6th ed. London, UK: Elsevier Saunders;. p. 669. 2013

- COLLINS, M. D., SAMELIS, J., METAXOPOULOS, J., AND WALLBANKS, S. Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 595–603. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb01600.x. 1993
- COOK N1, BRIDGER J, KENDALL K, GOMARA MI, EL-ATTAR L, GRAY J. The zoonotic potential of Rotavirus. *J Infect.* May;48(4):289-302. 2004
- CREMON, C. *et al.* Salmonella gastroenteritis during childhood is a risk factor for irritable bowel syndrome in adulthood. *Gastroenterology*, v. 147, n. 1, p. 69–77, 2014.
- CRIGLAR JM, HU L, CRAWFORD SE, HYSER JM, BROUGHMAN JR, PRASAD BV, ESTES MK. A novel form of Rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly. *J Virol.* Jan;88(2):786-98. doi: 10.1128/JVI.03022-13. Epub 2013 Nov 6. 2014
- DA SILVA POLÓ, T. *et al.* Human norovirus infection in Latin America. *Journal of Clinical Virology*, v. 78, p. 111–119, 2015. DENNEHY, P. H. Rotavirus Infection: A Disease of the Past? *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 29, n. 4, p. 617–635, 2015.
- DEAL, E.M., LAHL, K., NARVÁEZ, C.F., BUTCHER, E.C., GREENBERG, H.B. Plasmacytoid dendritic cells promote Rotavirus -induced human and murine B cell responses. *J. Clin. Invest.* 123 (June (6)), 2464–2474. 2013
- DENNEHY PH. Rotavirus Infection: A Disease of the Past? *Infect Dis Clin North Am.* Dec;29(4):617-35. doi: 10.1016/j.idc.2015.07.002. Epub 2015 Sep 1. 2015
- DESSELBERGER U, ITURRIZA-GOMARA M, GRAY JJ. Rotavirus epidemiology and surveillance. *Novartis Found Symp*;238:125–47 [discussion: 147–52]. 2001
- DESSELBERGER, U. 2006. Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* Jan,25 S30-41. 2006
- DESSELBERGER, U. Rotaviruses. *Virus Research*, v. 190, p. 75–96, 2014.
- DÍAZ-SALINAS, M.A., SILVA-AYALA, D., LÓPEZ, S., ARIAS, C.F.,. Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell. *J. Virol.* (February) 2014
- DORO R, MIHALOV-KOVAČS E, MARTON S, *et al.* Large-scale whole genome sequencing identifies country-wide spread of an emerging G9P[8] Rotavirus strain in Hungary, 2012. *Infect Genet Evol*;28:495–512. 74. 2014
- DWIVEDI, M. *et al.* Induction of regulatory T cells: A role for probiotics and prebiotics to suppress autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, v. 15, n. 4, p. 379–392, 2016. ELLIOTT, E. J. Acute gastroenteritis in children. *Bmj*, v. 334, n. 7583, p. 35–40, 2007. F
- DWIVEDI, Mitesh; KUMAR, Prasant; LADDHA, Naresh C.; KEMP, E. HELEN. Induction of regulatory T cells: A role for probiotics and prebiotics to suppress. *Autoimmunity Reviews*. Vol.15, pag. 379-392. 2016
- ELLIOT, E. Acute gastroenteritis in children. *BMJ.* Jan 6; 334(7583): 35–40. 2007
- ESPECHE, M. C., OTERO, M. C., SESMA, F., AND NADER-MACIAS, M. E. Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Vet. Microbiol.* 135, 346–357. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.078. 2009
- ESTES MK, KAPIKIAN A. ROTAVÍRUSES. IN: KNIPE D, GRIFFIN D, LAMB R, MARTIN M, ROIZMAN B, STRAUS S, EDITORS. *Fields Virology*. Wolters Kluwer Health; Lippincott, Williams and Wilkins; Philadelphia, PA, USA: pp. 1917–1975. 2007
- ESTES, M. K., Greenberg, H.G. Rotaviruses and their replication, In: Knipe, D. M.; Howley, P. M.; Griffin, D. E.; Lamb, R. A.; Martin, M. A.; Roizman, B.; Straus, S. E. (6ed). *Fields Virology 6ed*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. 2013
- ESTES, M. K., Greenberg, H.G. Rotaviruses, In: Knipe, D. M.; Howley, P. M.; Griffin, D. E.; Lamb, R. A.; Martin, M. A.; Roizman, B.; Straus, S. E. (6ed). *Fields Virology 6ed*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. 2010

- FERNANDEZ-DUARTE, K. P. *et al.* *Bifidobacterium adolescentis* (DSM 20083) and *Lactobacillus casei* (Lafti L26-DSL): Probiotics Able to Block the In Vitro Adherence of Rotavirus in MA104 Cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 10, n. 1, p. 56–63, 2017.
- FINKBEINER, S. R. *et al.* Metagenomic analysis of human diarrhea: Viral detection and discovery. *PLoS Pathogens*, v. 4, n. 2, 2008.
- FISCHER, T. K.; STEINSLAND, H.; VALENTINER-BRANTH, P. Rotavirus particles can survive storage in ambient tropical temperatures for more than 2 months. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 12, p. 4763–4764, 2002.
- FISCHER, Thea K.; Steinsland, Hans; Valentiner-Branth, Palle Rotavirus particles can survive storage in ambient tropical temperatures for more than 2 months. *Journal of clinical microbiology*. 2002.
- FLEWETT, T. H. *et al.* Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*, 2:61-3, 1974
- FLEWETT, T. H., BRYDEN, A. S. AND DAVIES, H.. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, 2, 1497. 1973
- FLEWETT, T.H., BRYDEN, A. S. AND DAVIES, H.. Virus diarrhoea in foals and other animals. *Vet. Rec.*, 96, 477. 1975
- FRAGA, D.; MEULIA, T.; FENSTER, S. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, p. 10.3.1-10.3.40, 2014.
- FUSCO, V. *et al.* The genus *Weissella*: Taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. MAR, 2015.
- FRANCO MA¹, ANGEL J, GREENBERG HB. Immunity and correlates of protection for Rotavirus vaccines. *Vaccine*. 2006 Apr 5;24(15):2718-31. Epub Jan 17. 2006
- FUSCO, V.; QUERO, G.; CHO, G.; KABISCH, J.; MESKE, D.; NEVE, H.; BOCKELMANN, W.; FRANZ, C. The genus *Weissella*: Taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontier of microbiology*. Vol 5. 2015
- GAGNON, M. *et al.* Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT-29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *Journal of Microbiological Methods*, v. 94, n. 3, p. 274–279, 2013.
- GAGNON, M. *et al.* Study of the ability of bifidobacteria of human origin to prevent and treat Rotavirus infection using colonic cell and mouse models. *PLoS ONE*, v. 11, n. 10, p. 1–18, 2016.
- GAGNON, Mealanie; VIMONT, Allison; DARVEAU, André; FLISS, Ismaïl; JEAN, Julie. Study of the ability of bifidobacteria of human origin to prevent and treat Rotavirus infection using colonic cell and mouse models. *PLoS ONE*. Vol 11. Pag. 1-182016
- GALLO A, PASSARO G, GASBARRINI A, LANDOLFI R, MONTALTO M. Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: An update. *World J Gastroenterol*. Aug 28;22(32):7186-202. doi: 10.3748/wjg.v22.i32.7186. 2016
- GALLO, A. *et al.* Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: An update. *World Journal of Gastroenterology*, v. 22, n. 32, p. 7186–7202, 2016.
- GANDHI, G. R. *et al.* Cytokines in the management of Rotavirus infection: A systematic review of in vivo studies. *Cytokine*, v. 96, n. February, p. 152–160, 2017.
- GARDET, A., BRETON, M., FONTANGES, P., TRUGNAN, G., CHWETZOFF, S.,. Rotavirus spike protein VP4 binds to and remodels actin bundles of the epithelial brush border into actin bodies. *J. Virol.* 80, 3947–3956. 2006
- GBD 2013 DALYs and HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990–2013: quantifying the epidemiological transition. *Lancet*; 386: 2145–91. 2015
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*; 385: 117–71. 2015

- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. VOLUME 390, ISSUE 10100, P1211-1259, SEPTEMBER 16, 2017
- GENTSCH JR, LAIRD AR, BIELFELT B, *et al.* Serotype diversity and reassortment between human and animal Rotavirus strains: implications for Rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis*;192(Suppl 1):S146–59. 2005
- GENTSCH, J.R., LAIRD, A.R., BIELFELT, B., GRIFFIN, D.D., BANYAI, K., RAMACHANDRAN, M., JAIN, V., CUNLIFFE, N.A., NAKAGOMI, O., KIRKWOOD, C.D., FISCHER, T.K., PARASHAR, U.D., BRE-SEE, J.S., JIANG, B., GLASS, R.I. Serotype diversity and reassortment between human and animal Rotavirus strains: implications for Rotavirus vaccine programs. *J. Infect. Dis.* 192 (September (Suppl. 1)), S146–S159 2005
- GONZALEZ-OCHOA, G. *et al.* Modulation of Rotavirus severe gastroenteritis by the combination of probiotics and prebiotics. *Archives of Microbiology*, v. 199, n. 7, p. 953–961, 2017.
- GRAFF, J.W., ETTAYEBI, K., HARDY, M.E., Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS Pathog.* 5 (January (1)), e1000280. 2009
- GRAY LE, O'HELY M, RANGANATHAN S, SLY PD, VUILLERMIN P. The Maternal Diet, Gut Bacteria, and Bacterial Metabolites during Pregnancy Influence Offspring Asthma. *Front Immunol.* 2017 Mar 31;8:365. doi: 10.3389/fimmu.2017.00365. eCollection 2017.
- GROFT, C.M., BURLEY, S.K. Recognition of eIF4G by Rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol. Cell* 9 (June (6)), 1273–1283. 2002
- GUERRANT, R. L., VAN GILDER, T., STEINER, T. S., THIELMAN, N. M., SLUTSKER, L., TAUXE, R. V., PICKERING, L. K. Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, 32(3), 331–351. doi:10.1086/318514. 2001
- GUERRERO, C.A., BOUYSSOUNADE, D., ZÁRATE, S., ISA, P., LÓPEZ, T., ESPINOSA, R., ROMERO, P., MÉNDEZ, E., LÓPEZ, S., ARIAS, C.F. Heat shock cognate protein 70 is involved in Rotavirus cell entry. *J. Virol.* 76 (April (8)), 4096–4102. 2002
- GUIDE, A. *Methods and Applications Guide Introduction to Quantitative PCR Introduction to Quantitative PCR Methods and Applications Guide.* Analysis, p. 104, 2010.
- GURGEL, R. Q. *et al.* Impact of Rotavirus vaccination on diarrhoea mortality and hospital admissions in Brazil. *Tropical Medicine and International Health*, v. 16, n. 9, p. 1180–1184, 2011.
- HAGBOM, M., ISTRATE, C., ENGBLOM, D., KARLSSON, T., RODRIGUEZ-DIAZ, J., BUESA, J., TAYLOR, J.A., LOITTO, V.M., MAGNUSSON, K.E., AHLMAN, H., LUNDGREN, O., SVENSSON, L., Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog.* 7 (July (7)), e1002115. 2011
- HAGBOM, M., SHARMA, S., LUNDGREN, O., SVENSSON, L., Towards a human Rotavirus disease model. *Curr. Opin. Virol.* 2 (August (4)), 408–418 2012
- HALASZ, P.; HOLLOWAY, G.; COULSON, B. S. Death mechanisms in epithelial cells following Rotavirus infection, exposure to inactivated Rotavirus or genome transfection. *Journal of General Virology*, v. 91, n. 8, p. 2007–2018, 2010.
- HEIMAN, E. M.; MCDONALD, S. M.; BARROM N., TARAPOREWALA, Z. F.; BAR-MAGEN, T.; PATTON, J. T. Group A human Rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *Journal of Virology*, v. 82, n. 22, p. 11106–11116, 2008.
- HOLLOWAY, G., COULSON, B.S. Innate cellular responses to Rotavirus infection. *J. Gen. Virol.* 94 (June (Pt 6)), 1151–1160. 2013
- HOLLOWAY, G., DANG, V.T., JANS, D.A., COULSON, B.S. Rotavirus inhibits interferon- induced STAT nuclear translocation by a mechanism that acts after STAT binding to importin- α . *J. Gen. Virol.* (May), <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.064063-0> 2014
- HOLLOWAY, G., TRUONG, T.T., COULSON, B.S. Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NF-kappaB. *J. Virol.* 83 (May (10)), 4942–4951 2009

- HOLLOWAY, G.; COULSON, B. S. Innate cellular responses to Rotavirus infection. *Journal of General Virology*, v. 94, n. PART 6, p. 1151–1160, 2013.
- HOSTETLER MA, NAKANISHI AK, WHITEMAN PJ. Gastroenteritis: an evidence-based approach to typical vomiting, diarrhea, and dehydration. *Pediatr Emerg Med Pract.* ;1:1–19. 2004
- HSU CN, LIN YJ, HOU CY, TAIN YL. Maternal Administration of Probiotic or Prebiotic Prevents Male Adult Rat Offspring against Developmental Programming of Hypertension Induced by High Fructose Consumption in Pregnancy and Lactation. *Nutrients*. Sep 4;10(9). pii: E1229. doi: 10.3390/nu10091229. 2018
- HU, L, CRAWFORD, S.E., CZAKO, R., CORTES-PENFIELD, N.W., SMITH, D.F., LE PENDU, J., ESTES, M.K., PRASAD, B.V. Cell attachment protein VP8* of a human Rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* 485 (April (7397)), 256–259. 2012
- ITURRIZA-GOMARA M, DALLMAN T, BA'NYAI K, *et al.* Rotavirus genotypes cocirculating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect*;139(6):895–909. 75. 2011
- ITURRIZA-GOMARA M, ISHERWOOD B, DESSELBERGER U, GRAY J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human Rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol.*;75(8):3696-705. 2001
- ITURRIZA-GÓMARA, M., DALLMAN, T., BÁNYAI, K., BÖTTIGER, B., BUESA, J., DIEDRICH, S., FIORE, L., JOHANSEN, K., KOOPMANS, M., KORSUN, N., KOUKOU, D., KRONEMAN, A., LÁSZLÓ, B., LAPPALAINEN, M., MAUNULA, L., MARQUES, A.M., MATTHIJNSSENS, J., MIDGLEY, S., MLADENOVA, Z., NAWAZ, S., POLJSAK-PRIJATELJ, M., POTHIER, P., RUGGERI, F.M., SANCHEZ-FAUQUIER, A., STEYER, A., SIDARAVICIUTE-IVASKEVICIENE, I., SYRIOPOULOU, V., TRAN, A.N., USONIS, V., VAN RANST, M., DE ROUGEMONT, A., GRAY, J. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol. Infect.* 139 (June (6)), 895–909. 2011
- JAYARAM, H., ESTES, MK., PRASAD BV. Emerging themes in Rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res*. Apr;101(1):67-81. 2004
- JOHN J, SARKAR R, MULIYIL J, BHANDARI N, BHAN MK, KANG G. Rotavirus gastroenteritis in India, 2011-2013: revised estimates of disease burden and potential impact of vaccines. *Vaccine*. Aug 11;32 Suppl 1:A5-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.004. 2014
- JOLLEY, D.; DOUGLAS, K. M. The effects of anti-vaccine conspiracy theories on vaccination intentions. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, 2014.
- JONESTELLER C.L., BURNETT E., YEN C., TATE J.E., PARASHAR U.D. Effectiveness of Rotavirus Vaccination: A systematic review of the first decade of global post-licensure data, 2006–2016. *Clin. Infect. Dis.* doi: 10.1093/cid/cix369. 2017
- KALJOT, K. T. *et al.* Infectious Rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *Journal of virology*, v. 62, n. 4, p. 1136–1144, 1988.
- KAMBOJ, K.; VASQUEZ, A.; BALADA-LLASAT, J. M. Identification and significance of *Weissella* species infections. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. OCT, p. 1–7, 2015.
- KANDLER, O., SCHILLINGER, U., AND WEISS, N. *Lactobacillus halotolerans* sp. nov., nom. rev. and *Lactobacillus minor* sp. nov., nom. rev. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 280–285. doi: 10.1016/S0723-2020(83)80056-3. 1983
- KANG, J. Y. *et al.* Antiviral effects of *Lactobacillus ruminis* SPM0211 and *Bifidobacterium longum* SPM1205 and SPM1206 on Rotavirus-infected Caco-2 cells and a neonatal mouse model. *Journal of Microbiology*, v. 53, n. 11, p. 796–803, 2015.
- KASTNER, J. Original source. *Twist*, n. 93, p. 52–53, 2018.
- KAWAHARA, T. *et al.* Oral administration of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 alleviates Rotavirus gastroenteritis through regulation of intestinal homeostasis by inducing mucosal protective factors. *PLoS ONE*, v. 12, n. 3, p. 1–22, 2017.
- KESWICK, B.H., PICKERING, L.K., DUPONT, H.L., WOODWARD, W.E. Survival and detection of Rotavirus on environmental surfaces in day care centers. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (October (4)), 813–816. 1983

- KIRKWOOD, C. D. *et al.* The Rotavirus vaccine development pipeline. *Vaccine*, 2017.
- KOLLARITSCH, H. *et al.* Rotavirus vaccines: A story of success. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 21, n. 8, p. 735–743,. KUTNER, R. H.; ZHANG, X. Y.; 2015
- KOLLARITSCH, H.; KUNDI, M.; GIAQUINTO, C.; Rotavirus vaccines: A story of success. *Clinical Microbiology and Infection*.. Vol 21. Pag. 735-743. 2015
- KUMAR M¹, JAYARAM H, VASQUEZ-DEL CARPIO R, JIANG X, TARAPOREWALA ZF, JACOBSON RH, PATTON JT, PRASAD BV. Crystallographic and biochemical analysis of Rotavirus NSP2 with nucleotides reveals a nucleoside diphosphate kinase-like activity. *J Virol*. Nov;81(22):12272-84. Epub 2007 Sep 5. 2007
- LEITE *et al.*, 2017 Rotavirus genotypes as etiological agents of diarrhoea in general populations of two geographic regions of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 2017; 59: e45
- LESHEM E., MORITZ R.E., CURNS A.T., ZHOU F., TATE J.E., LOPMAN B.A., PARASHAR U.D. Rotavirus vaccines and health care utilization for diarrhea in the United States (2007–2011) *Pediatrics*. ;134:15–23. doi: 10.1542/peds.2013-3849. 2014
- LESHEM, E. *et al.* Distribution of Rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the Rotavirus vaccine after its introduction: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 14, n. 9, p. 847–856, 2014
- LIGHT, J. S.; HODES, H. L. Studies on epidemic diarrhea of the new-born: isolation of filterable agent causing diarrhea in calves. *American Journal of Public Health*, v. 33, n. 12, p. 1451-1454, 1943.
- LIN, J. DA *et al.* Distinct Roles of Type I and Type III Interferons in Intestinal Immunity to Homologous and Heterologous Rotavirus Infections. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 4, p. 1–29, 2016.
- LINHARES A.C.; PINHEIROS, F P.; SCHMETZ, C.; MÜLLER, G.; PETERS, D. Duovirus(Rotavírus) em Belém do Pará, Brasil. *Rev Inst Med Trop*, v. 19, n 4, p. 278-279, 1977.
- LIU L, JOHNSON HL, COUSENS S, *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*; 379: 2151–61. 2012
- LIU, J. *et al.* Molecular Genotyping and Quantitation Assay for Rotavirus Surveillance. p. 157–163, 2016.
- LIU, J; PLATTS-MILLS, J.; JUMA, J.; KABIR, F.; NKEZE, J.; ESTES, C.; GREENBERG. H; Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. *Lancet*. Sep 24;388(10051):1291-301. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31529-X. 2016
- LIU, N. *et al.* Update on the disease burden and circulating strains of Rotavirus in China: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*, v. 32, n. 35, p. 4369–4375, 2014.
- LORROT M, VASSEUR M. How do the Rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Virol J*. Mar 21;4:31. 2007
- LU, X; MCDONALD, S. M; TORTORICI, M. A; TAO, Y. J.; CARPIO, V.; NIBERT, M. L.; PATTON, J. T.; HARRISON, S. C. Mechanism ORF coordinated RNA packaging and genome replication by Rotavirus polymerase VP1. *NIH Public Access*, v.16, n.11, p1678-1688, 2008.
- LUCA, P. DE *et al.* Morphology related functionality in Caco2 / HT-29 co-culture cells: a versatile model of human intestinal epithelium. v. 1, n. 1991, p. 2014, 2014.
- LUCA, P.; Arnaboldi, F; Maggioni M.; Morphology related functionality in Caco2 / HT-29 co-culture cells: a versatile model of human intestinal epithelium. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*. (2014) Vol. 119, n1
- LUCHS A, CILLI A, MORILLO SG, CARMONA RDE C, TIMENETSKY MDO C. Rotavirus genotypes circulating in Brazil, 2007-2012: implications for the vaccine program. *Rev Inst Med Trop São Paulo*.; 57(4):305-13 2015
- LUCHS, A.; TIMENETSKY, M. DO C. S. T. Group A Rotavirus gastroenteritis: post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission. *Einstein (São Paulo)*, v. 14, n. 2, p. 278–287, 2016.

- LUDERT, J.E., MICHELANGELI, F., GIL, F., LIPRANDI, F., ESPARZA, J. Penetration and uncoating of Rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* 27 (2), 95–101. 1987
- LUDERT. E.; Ajit A. KRISHNANEY, John W. BURNS, Phuoc T. VO and Harry B. GREENBERG. Cleavage of Rotavirus VP4 in vivo. *Journal of General Virology*, 77, 391–395. 1996
- MACCHIAVELLO, A., and COUTINHO, A. B., *Arq. big.*, December, 1942,],2, 15. 7. Coutinho, A. B., and Macchiavello, A., *Arq. big.*, August, 1943, 13, 79. 8. Macchiavello, A., Coutinho, A. B., and Torres, S., *Arq. big.*, August, 1943, 13, 93.
- MADHI S.A., CUNLIFFE N.A., STEELE D., WITTE D., KIRSTEN M., LOUW C., NGWIRA B., VICTOR J.C., GILLARD P.H., CHEUVART B.B., *et al.* Effect of human Rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *N. Engl. J. Med.* 2010;362:289–298. doi: 10.1056/NEJMoa0904797.
- MAGNUSSON, J., JONSSON, H., SCHNURER, J., AND ROOS, S. *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 831–834. doi: 10.1099/ijs.0.02015-0. 2002
- MANUSCRIPT, A.; REPLICATION, R. Structural Insights into the Coupling of Virion Assembly and Rotavirus Replication. v. 10, n. 3, p. 165–177, 2013.
- MART, M. DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ROTAVÍRUS DA ESPÉCIE A ANTES E APÓS A INTRODUÇÃO DA VACINA MONOVALENTE NO BRASIL. Instituto Oswaldo Cruz. 2014.
- MARTIN, D., DUARTE, M., LEPAULT, J., PONCET, D.,. Sequestration of free tubulin molecules by the viral protein NSP2 induces microtubule depolymerization during Rotavirus infection. *J. Virol.* 84 (March (5)), 2522–2532 2010
- MATTHEWS, R. E. F. The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings on the international Committee on Taxonomy of Viruses in The Hague. *Intervirology*, v.11, p 133-135, 1979
- MATTHIJNSSENS J, BILCKE J, CIARLET M, *et al.* Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol*;4(10):1303–16. 76. 2009
- MATTHIJNSSENS J, HEYLEN E, ZELLER M, *et al.* Phylodynamic analyses of Rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol*;27(10):2431–6. 2010
- MATTHIJNSSENS J, OTTO PH, CIARLET M, DESSELBERGER U, VAN RANST M, JOHNE R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for Rotavirus species demarcation. *Arch Virol.*;157:1177 2012
- MCCLAIN, B., SETTEMBRE, E., TEMPLE, B.R., BELLAMY, A.R., HARRISON, S.C.,. X-ray crystal structure of the Rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 397 (March (2)), 587–599. 2010
- MCNULTY, M.S., CURRAN, W.L., MCFERRAN, J.B.,. The morphogenesis of a cytopathic bovine Rotavirus in Madin-Darby bovine kidney cells. *J. Gen. Virol.* 33, 503–508. 1976
- MEBUS, C. A., UNDERDAHL, N. R., RHODES, M. B. AND TWIEHAUS, M. J. Calf diarrhoea (scours) reproduced with a virus from a field outbreak. *Nebraska Agric. Exp. Stat. Bull.*, 233, 1969
- MENEZES, S. M. P. N. J. M. F. E. W. DE. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ / USP. Usp, p. 234 p., 2013.
- MIHALOV-KOVÁCS E, GELLÉRT Á, MARTON S, FARKAS SL, FEHÉR E, OLDAL M, *et al.* Candidate new Rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg Infect Dis.* 2015;
- MORELLI M, OGDEN KM, PATTON JT. SILENCING THE ALARMS: INNATE IMMUNE ANTAGONISM BY ROTAVÍRUS NSP1 AND VP3. *VIROLOGY.* May;479-480:75-84. doi: 10.1016/j.virol.2015.01.006. Epub Feb 25. 2015
- NANDI, S., CHANDA, S., BAGCHI, P., NAYAK, M.K., BHOWMICK, R., CHAWLA-SARKAR, M. MAVS protein is attenuated by Rotavirus nonstructural protein 1. *PLoS ONE* 9 (March (3)), e921262014
- NEWTON, K., MEYER, J.C., BELLAMY, A.R., TAYLOR, J.A.,. Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. *J. Virol.* 71 (December (12)), 9458–9465 1997

- NOAH K., BRIDGITTE DONAHUE, AND NOAH F. SHROYER. Intestinal development and differentiation *Exp Cell Res.* Nov 15; 317(19): 2702–2710. 2011
- OCEGUERA, A.; SANDOVAL-JAIME, C. Stress response and translation control in Rotavirus infection. *Viruses*, v. 8, n. 6, 2016.
- OLESEN, B.; NEIMANN, J.; BÖTTIGER, B.; ETHELBERG, S.; SCHIELLERUP, P.; JENSEN, C.; HELMS, M.; SCHEUTZ, F.; OLSEN, K.E.P.; KROGFELT, K.; PETERSEN, E.; MOLBAK, K.; GERNER-SMIDT, P. Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 8, p. 3636-3641, 2005.
- OLIVEIRA, L. H. D. E. Vacinas de Rotavírus: processo de introdução e efetividade em programas de imunização na América Latina e Caribe Latina e Caribe. 2014.
- PADONOU, S. W., SCHILLINGER, U., NIELSEN, D. S., FRANZ, C. M., HANSEN, M., HOUN- HOUIGAN, J. D., *ET AL.* *Weissella beninensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium from submerged cassava fermentations, and emended description of the genus *Weissella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2193–2198. doi: 10.1099/ijso.0.014332-0 2010
- PARASHAR UMESH D, BURTON A, LANATA C, BOSCHI-PINTO C, SHIBUYA K, STEELE D, *et al.* Global Mortality Associated with Rotavirus Disease among Children in 2004. *The Journal of Infectious Diseases.*;200(s1):S9-S15. 2009
- PARASHAR, U. D. *et al.* Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 2, p. 304–306, 2006.
- PARASHAR, UMESH D.; GIBSON, CHRISTOPHER J.; BRESEE, JOSEPH S.; GLASS, ROGER I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 12. Pag 304-306. 2006
- PATTON, J. T. Review article Structure and function of the Rotavirus RNA-binding proteins. *Journal of General Virology*, n. 1995, p. 2633–2644, 1995
- PATTON, J. T.; VASQUEZ-DEL CARPIO, R.; SPENCER, E. Replication and transcription of the Rotavirus genome. *Current pharmaceutical design*, v. 10, n. 30, p. 3769–77, 2004.
- PAULO, S.; DORNELAS, F.; SILVA, F. Análise multigênica de rotavírus do grupo A em suínos São Paulo. 2016. PAYNE, D. C. *et al.* Developments in understanding acquired immunity and innate susceptibility to norovirus and Rotavirus gastroenteritis in children. v. 27, n. 1, p. 105–109, 2016.
- PAYNE DC, SZILAGYI PG, STAAT MA, EDWARDS KM, GENTSCH JR, WEINBERG GA, *ET AL.* Secular variation in United States Rotavirus disease rates and serotypes: implications for assessing the Rotavirus vaccination program. *Pediatr Infect Dis J.*;28(11):948-53. 2009
- PIRON M¹, DELAUNAY T, GROSCLAUDE J, PONCET D. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of Rotavirus nonstructural protein NSP3. *J Virol.* 1999 Jul;73(7):5411-21.
- QTVPCR, B. Real-Time PCR Applications Guide. *Methods*, p. 2–4, 2006.
- RAY, P.G., KELKAR, S.D., WALIMBE, A.M., BINIWALE, V., MEHENDALE, S. Rotavirus immunoglobulin levels among Indian mothers of two socio-economic groups and occurrence of Rotavirus infections among their infants up to six months. *J. Med. Virol.* 79 (March (3)), 341–349 2007
- REISER, J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nature Protocols*, v. 4, n. 4, p. 495–505, 2009.
- REOVIRIDAE, C.; ROTAVÍRUS, A.; TEMP, S. Original Source : p. 1–2, 2000. RESQUE, H. R. Caracterização molecular de astrovírus em amostras fecais de crianças com gastroenterite em São Paulo, Brasil. p. 1–48, 2007.
- RHA B., TATE J.E., PAYNE D.C., CORTESE M.M., LOPMAN B.A., CURNS A.T., PARASHAR U.D. Effectiveness and impact of Rotavirus vaccines in the United States—2006–2012. *Expert Rev. Vaccines.* ;13:365–376. doi: 10.1586/14760584.2014.877846. 2014
- ROLLO, E. E. *et al.* The Epithelial Cell Response to Rotavirus Infection. *The Journal of Immunology*, v. 163, p. 4442–4452, 2011.
- ROSE, M. A. Mucosal Immunity and acute viral gastroenteritis. *Human vaccines & immunotherapeutics*, v. 10, n. 7, p. 2112–4, 2014.

- Rotavirus. In: Knipe DM, Howley PM, editors-in-chief *Field's virology*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
- ROUSSET, M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*, v. 68, n. 9, p. 1035–1040, 1986.
- RUBIO, R., JOFRÉ, A., MARTÍN, B., AYMERICH, T., AND GARRIGA, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiol.* 38, 303–311. doi: 10.1016/j.fm.2013.07.015. 2014
- SANTOS N, HOSHINO Y. Global distribution of Rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective Rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*;15(1):29–56. 2005
- SANTOS, N., HOSHINO, Y. Global distribution of Rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective Rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 15 (January–February (1)), 29–56. 2005
- SAPPARAPU, G., SIMS, A.L., AIYEGBO, M.S., SHAIKH, F.Y., HARTH, E.M., CROWE JR., J.E. Intracellular neutralization of a virus using a cell-penetrating molecular transporter. *Nanomedicine (Lond.)* (November) 2013
- SAXENA, K. *et al.* Human Intestinal Enteroids: a New Model To Study Human Rotavirus Infection, Host Restriction, and Pathophysiology. *J. Virol*, v. 90, n. 1, p. 43–56, 2016.
- SETTEMBRE, E. C. *et al.* Atomic model of an infectious Rotavirus particle. *EMBO Journal*, v. 30, n. 2, p. 408–416, 2011.
- SICA, M. G., OLIVERA, N. L., BRUGNONI, L. I., MARUCCI, P. L., LÓPEZ-CAZORLA, A. C., AND CUBITTO, M. A. Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the Bahía Blanca estuary. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 45, 389–397. doi: 10.4067/S0718-19572010000300003. 2010
- SILVA, L. D. DA *et al.* Detection and genetic characterization of the emergent G11.17_2014 norovirus genotype among children with gastroenteritis from Northern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 48, p. 1–3, 2017.
- SILVA, R. S. DA. CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DA GLÂNDULA MAMÁRIA BOVINA SAUDÁVEL E COM MASTITE SUBCLÍNICA E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS ISOLADAS DESTA ECOSISTEMA. Universidade Federal de Minas Gerais. 2016.
- SILVESTRI, L.S., TARAPOREWALA, Z.F., PATTON, J.T. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J. Virol.* 78 (July (14)), 7763–7774 2004
- SOARES, L. DA S. ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES *VP4*, *VP7* E *NSP4* DE ROTAVÍRUS DO TIPO G1 CIRCULANTES EM BELÉM E MARITUBA, PARÁ, BRASIL, DE 1982 a 2008. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, 2011.
- SOLUTIONS, I.; APPLICATIONS, R. P. C. R. Critical Factors for Successful Real-Time PCR. *W W W . Q I A G E N . C O M. Journal Of Neurosurgery*, v. 104, n. 40, p. 746–8, 2006.
- STAAT MA¹, AZIMI PH, BERKE T, ROBERTS N, BERNSTEIN DI, WARD RL, PICKERING LK, MATSON DO. Clinical presentations of Rotavirus infection among hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J.* Mar;21(3):221-7. 2002
- TARAPOREWALA, Z., CHEN, D., PATTON, J.T. Multimers formed by the Rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J. Virol.* 73 (December (12)), 9934–9943. 1999
- TARAPOREWALA, Z.F., PATTON, J.T. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of Rotavirus nonstructural protein NSP2. *J. Virol.* 75 (May (10)), 4519–4527. 2001
- TATE J.E., BURTON A.H., BOSCHI-PINTO C., PARASHAR U.D. World Health Organization-Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. Global, regional, and national estimates of Rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000–2013. *Clin. Infect. Dis.* ;62(Suppl. 2):S96–S105. 2016
- TATE JE, PATEL MM, STEELE AD, GENTSCH JR, PAYNE DC, CORTESE MM, *et al.* Global impact of Rotavirus vaccines. *Expert Rev Vaccines*.;9(4):395-407. 2010

- TATE, J. E. *et al.* 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. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 12, n. 2, p. 136–141, 2012.
- TAYLOR, J.A., O'BRIEN, J.A., YEAGER, M. The cytoplasmic tail of NSP4, the endo-plasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of Rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *EMBO J.* 15 (September (17)), 4469–4476. 1996
- TIAN, P., HU, Y., SCHILLING, W.P., LINDSAY, D.A., EIDEN, J., ESTES, M.K.,. The non- structural glycoprotein of Rotavirus affects intracellular calcium levels. *J. Virol.* 68 (January (1)), 251–257. 1994
- TRASK SD, MCDONALD SM, PATTON. JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and Rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol.* Jan 23;10(3):165-77. doi: 10.1038/nrmicro2673. 2012
- VANDENPLAS Y, BRUNSER O, SZAJEWSKA H. *Saccharomyces boulardii* in childhood. *Eur J Pediatr.* Mar;168(3):253-65. doi: 10.1007/s00431-008-0879-7. 2009
- VLASOVA, A. N. *et al.* Comparison of probiotic *lactobacilli* and *bifidobacteria* effects, immune responses and Rotavirus vaccines and infection in different host species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 172, p. 72–84, 2016.
- VLASOVA, A. N. *et al.* Lactobacilli and Bifidobacteria Promote Immune Homeostasis by Modulating Innate Immune Responses to Human Rotavirus in Neonatal Gnotobiotic Pigs. *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, p. 1–14, 2013.
- WANG, C.-M.; CHEN, S.-C.; CHEN, K.-T. Current status of Rotavirus vaccines. *World Journal of Pediatrics*, v. 11, n. 4, p. 300–308, 2015.
- WARD, L.A., ROSEN, B.I., YUAN, L., SAIF, L.J. Pathogenesis of an attenuated and a virulent strain of group A human Rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *J. Gen. Virol.* 77 (July (Pt 7)), 1431–1441. 1996
- WHO. World Health Statistics 2017: Monitoring Health for The SDGs. 2017
- WHO. World Health Statistics 2018- Monitoring Health for the SDG's (Sustainable development goals). 2018
- WIDDOWSON, M. *et al.* Global Rotavirus Surveillance: Determining the Need and Measuring the Impact of Rotavirus Vaccines. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 200, n. s1, p. S1–S8, 2009.
- WILKING, H., SPITZNAGEL, H., WERBER, D., LANGE, C., JANSEN, A., & STARK, K. . Acute gastrointestinal illness in adults in Germany: a population-based telephone survey. *Epidemiology and Infection*, 141(11), 2365–2375. doi:10.1017/s0950268813000046. 2013
- YE, L. *et al.* Murine bone marrow-derived DCs activated by porcine Rotavirus stimulate the Th1 subtype response in vitro. *Microbial Pathogenesis*, v. 110, p. 325–334, 2017.
- YOU-LIN TAIN, JULIE Y. H. CHAN, AND CHIEN-NING HSU. Maternal Fructose Intake Affects Transcriptome Changes and Programmed Hypertension in Offspring in Later Life Nutrients. *Dec; 8(12): 757.* 2016
- ZAMAN K., DANG D.A., VICTOR J.C., SHIN S., YUNUS M., DALLAS M.J., PODDER G., VU D.T., LE T.P., LUBY S.P., *et al.* Efficacy of pentavalent Rotavirus vaccine against severe Rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* ;376:615–623. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60755-6. 2010
- ZAMUDIO-MAYA, M., NARVÁEZ-ZAPATA, J., AND ROJAS-HERRERA, R. Isolation and identification of lactic acid bacteria from sediments of a coastal marsh using a differential selective medium. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 402–407. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02329.x. 2008
- ZHANG, R., JHA, B.K., OGDEN, K.M., DONG, B., ZHAO, L., ELLIOTT, R., PATTON, J.T., SILVERMAN, R.H., WEISS, S.R.,. Homologous 2',5'-phosphodiesterases from disparate RNA viruses antagonize antiviral innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (August (32)), 13114–13119. 2013
- ZHANG, Z. *et al.* Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG against human Rotavirus-induced diarrhoea in a neonatal mouse model. *Pathogens and Disease*, v. 67, n. 3, p. 184–191, 2013.