



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FLÁVIO LAURETTI

**ASPECTOS CITOPATOLÓGICOS E MOLECULARES DA
CEPA 1154 DE ROTAVÍRUS PORCINO**

Londrina
2007

FLÁVIO LAURETTI

**ASPECTOS CITOPATOLÓGICOS E MOLECULARES DA
CEPA 1154 DE ROTAVÍRUS PORCINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação,
em Microbiologia da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Carlos Nozawa

Londrina
2007

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L383a Lauretti, Flávio.

Aspectos citopatológicos e moleculares da cepa 1154 de rotavírus suíno / Flávio Lauretti. – Londrina, 2007.
48f. : il.

Orientador: Carlos Mitihiko Nozawa.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia – Teses. 2. Rotavírus – Teses. 3. Gastroenterite – Teses. I. Nozawa, Carlos Mitihiko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

FLÁVIO LAURETTI

**ASPECTOS CITOPATOLÓGICOS E MOLECULARES DA
CEPA 1154 DE ROTAVÍRUS PORCINO**

BANCA EXAMINADORA

Dr. Álvaro Manuel Rodrigues Almeida
(membro – EMBRAPA - Soja)

Profa. Ionice Felipe
(membro - UEL)

Dra. Juliana Galera Castilho
(membro – Instituto Pasteur – São Paulo)

Dr. Laerte Francisco Filippesen
(membro – IAPAR - Londrina)

Prof. Carlos Nozawa
(orientador – UEL)

Londrina, 28 de novembro de 2007.

Dedico a Deus e a meus pais Celso e Lourdes

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Carlos Nozawa que sempre colaborou em vários aspectos para minha formação acadêmica e gosto pela virologia.

À Prof^a. Rosa Elisa C. Linhares pelos conselhos, observações e dedicação que sempre devotou aos alunos.

Ao Prof. Mario Sérgio Mantovani, pelo apoio, principalmente, na realização do Teste do cometa.

À Fabíola Vicençoni, pelo amor, paciência e compreensão.

Ao doutorando Fabrício José Benati, pela amizade, longas discussões sobre virologia e apoio na realização da genotipagem.

Ao doutorando Wagner Loyola, pela amizade e tempo dedicado à revisão da estatística deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia: Galdino A. Filho, Halha O. Saridakis, Ionice Felipe, Jacinta S. Pelayo, Márcia C. Furlaneto, Marco A. Nogueira, Sueli F. Y. Ogatta, pelos ensinamentos.

Aos colegas de laboratório Eduardo Pietruchinski, Mariana Minari, Alessandra C. dos Santos Ana Paula D. Ramos, Vinicius P. Rincão, Gustavo Kerntopf, Kristie A. Yamamoto, Erica S. Czernisz, Daniela Albuquerque, Airton C. M. Junior, Bárbara Nodari e Daniel Ferri.

Aos funcionários, Jussevânia S. R. de Sá e Valdelice dos Santos.

À CAPES, Fundação Araucária, CNPq e POPPG/UEL, pelo apoio técnico e financeiro.

LAURETTI, Flávio. **Aspectos citopatológicos e moleculares da cepa 1154 de rotavírus porcino**. 2007. 52f. Tese (Doutor em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

Os rotavírus são os mais importantes agentes de gastroenterite em crianças e animais jovens. Neste trabalho, os aspectos da patogenia em cultura de células MA-104 infectadas com a cepa 1154 de rotavirus porcino foram determinados e comparados com a cepa padrão SA-11. Foi determinado que a cepa 1154 pertence ao genótipo G5P[6], não possui atividade hemaglutinante e é dependente de ácido siálico nos receptores celulares e da tripsina para formação do plaque. A cepa desenvolve efeito citopático (ECP) rápido, com grande capacidade de disseminação entre as células adjacentes, além de possuir mutantes com tamanho de plaque diferente. Em paralelo ao ECP foi observado o efeito de fragmentação nuclear de células infectadas, seguido da diminuição da atividade desidrogenásica mitocondrial. Sugere-se que estes efeitos ajam de modo cooperativo e acabem levando à morte celular com implicações diretas para patogenia da infecção pelos RV.

Palavras-chave: Microbiologia. Rotavírus. Gastroenterite.

LAURETTI, Flávio. **Cytopathic and molecular characterization of a porcine strain (1154) of rotavirus**. 2007. 52f. Thesis (Doctor in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Rotaviruses (RV) are the most important agents of acute diarrhea in children and young animals. Cytopathogenic aspects of a highly cytopathic porcine RV strain (1154) and that of the prototype simian (SA-11) RV were underlined and comparatively studied. The strain 1154 was genotyped as G5P[6], and was found not to present hemagglutination activity. It is dependent upon sialic acid in the cell receptor, as well as, trypsin for plaque formation. Overall, 1154 cytopathic effect (CPE) is similar to the other RV strains, nevertheless, with high capacity to spread to adjacent cells. Paralleled to the CPE, the nuclear fragmentation of infected cells was observed followed by the decrease of mitochondrial dehydrogenase activity. It is suggested that these features together lead to cell death and possibly have direct implications in the pathogenesis of RV infection.

Keywords: Microbiology. Rotavirus .Gastroenteritis.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO..... | 9 |
| PROPRIEDADES GERAIS DOS ROTAVÍRUS..... | 10 |
| Estrutura viral e função..... | 10 |
| Ciclo replicativo..... | 11 |
| Classificação..... | 13 |
| Epidemiologia..... | 14 |
| Diagnóstico laboratorial..... | 15 |
| Imunidade..... | 16 |
| Vacina..... | 17 |
| Patogenia e citopatogenia..... | 18 |
| Dano no DNA..... | 21 |
| OBJETIVOS..... | 23 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 23 |
| Células e vírus..... | 23 |
| Viabilidade celular durante a infecção..... | 23 |
| Influência da tripsina na característica de crescimento..... | 24 |
| Seleção e purificação de mutantes de plaque do SA-11 e 1154..... | 24 |
| Reação de hemaglutinação..... | 24 |
| Dependência de ácido siálico na infecciosidade..... | 24 |
| Genotipagem dos RV..... | 25 |
| Fragmentação do DNA (Teste do cometa)..... | 25 |
| REFERÊNCIAS..... | 27 |
| | |
| ARTIGO..... | 36 |
| ABSTRACT..... | 36 |
| INTRODUCTION..... | 36 |
| MATERIALS AND METHODS..... | 38 |
| Cell and virus..... | 38 |
| Cell viability..... | 38 |
| Selection and purification of plaque mutants..... | 38 |
| Growth characteristic in the presence or absence of trypsin..... | 38 |

| | |
|--|----|
| Sialic acid dependence or independence on infectivity..... | 39 |
| Hemagglutination of erythrocytes | 39 |
| Virus RNA electrophoresis..... | 39 |
| RT-PCR for G and P typing | 39 |
| DNA fragmentation test (Comet assay) | 39 |
| Statistical analysis | 40 |
| RESULTS..... | 41 |
| DISCUSSION..... | 46 |
| BIBLIOGRAFY | 49 |

INTRODUÇÃO

A primeira descrição de supostos rotavírus (RV) foi divulgada por Light e Hodes (1943) ao relatarem a detecção de um agente filtrável causador de diarreia em bezerros. Contemporaneamente, era relatada a ocorrência de doença diarreica de origem desconhecida em crianças, denominada diarreia de inverno ou diarreia não bacteriana. Entretanto, os RV, como tal, só foram demonstrados no princípio da década de 60 por Adams e Kraft (1963) que observaram através de microscopia eletrônica (ME) partículas virais em biópsia intestinal de camundongos jovens com diarreia, denominando-as de EDIM (Epizootic Diarrhea of Infant Mice). Malherbe et al. (1963) isolaram em cultura de células um vírus a partir de swab retal de macacos vervet saudáveis, denominando-o de SA-11 (Simian Agent). Nos anos seguintes, mais dois vírus semelhantes foram descritos, em bezerros, NCDV (Nebraska Calves Diarrhoea Vírus) e carneiros, Agente O (offal) (MALHERBE; STRICKLAND-CHOLMLEY, 1967; MEBUS et al., 1971). No início da década de 70, Bishop et al. (1973) e Flewett, (1973), demonstraram através de ME, um vírus associado à diarreia aguda em crianças, tendo sido proposto o nome rotavírus (rota do latim = roda), devido ao aspecto de roda de carroça da partícula viral (Fig. 1) (FLEWETT et al., 1974). Foi observado que todos estes agentes, até então descritos, possuíam o mesmo aspecto morfológico à ME e compartilhavam as mesmas características antigênicas. Em 1979, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus classificou estes vírus como sendo pertencentes ao novo gênero *Rotavírus* dentro da família *Reoviridae* (MATTHEWS, 1979).

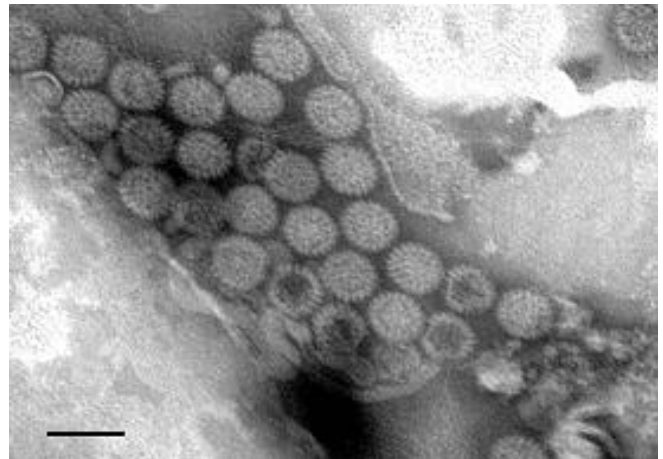


Fig 1 – Imunoeletromicrografia de partículas de RV humanos (amostra HL141) por contraste negativo. Barra: 100 nm. (SANTOS, 2007).

PROPRIEDADES GERAIS DOS ROTAVÍRUS

Estrutura viral e função

Os RV são vírus não envelopados, de duplo capsídeo e que têm cerca de 70 nm de diâmetro (Fig. 2). O genoma viral é constituído de 11 segmentos de RNA de fita-dupla (RNAfd). Cada segmento genômico é monocistrônico, exceto o décimo primeiro que codifica duas proteínas (RAMIG, 2004).

A replicação ocorre exclusivamente no citoplasma e ao todo são transcritas 12 proteínas, sendo 6 estruturais (VP1, 2, 3, 4, 6 e 7) e seis não estruturais (NSP 1 a 6). O cerne viral é formado pelas proteínas VP1, uma transcriptase com massa molecular de 125 kDa, VP2, que tem atividade de ligação inespecífica ao RNA com 94 kDa e VP3, com atividade de guanililtransferase com 88 kDa (VALENZUELA et al., 1991; PIZARRO et al., 1991; LABBÉ et al., 1994; ESTES et al., 2001). A camada mais externa do cerne é recoberta pela VP6 com 41 kDa, que constitui 51% das proteínas virais, e é antígeno determinante de grupo e subgrupo sorológico (MATTION, 1994). O capsídeo externo é formado pelas proteínas VP4 e VP7. A VP4 se projeta na superfície do vírus sob a forma de 60 espículas e com 88 kDa, é clivada por proteases, como a tripsina, dando origem a VP5* e VP8*, com 60 kDa e 28 kDa, respectivamente. A VP4 ainda é determinante de sorotipo P (**P**rotease sensível) e está envolvida em diversas propriedades como restrição do crescimento em cultura de células, aumento da infecciosidade pelo tratamento com protease, formação do plaque, hemaglutinação em algumas cepas e ligação à célula hospedeira (LUNDGREN; SVENSSON, 2001). A VP7 é uma proteína glicosilada de 38 kDa, que forma a superfície lisa da partícula; é determinante de sorotipo G (**G**licosilada); foi demonstrado que ela pode modular a VP4 na ligação a receptores, além de interagir com moléculas da superfície celular após ligação inicial da VP4 (ESTES, 2001; KAPIKIAN et al., 2001; ARIAS et al., 2002).

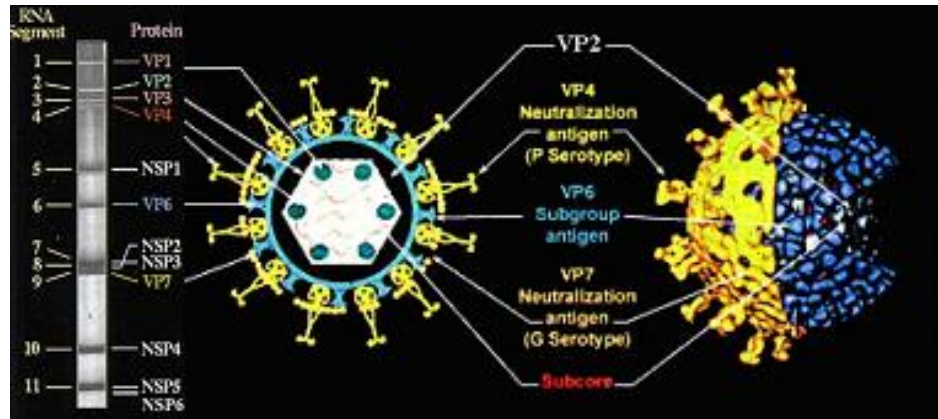


Fig. 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma RNAdf dos rotavírus, suas respectivas proteínas e representação esquemática do vírus (ESTES, 2001).

Ciclo replicativo

Os RV têm um tropismo celular muito específico, eles infectam somente enterócitos do topo da vilosidade intestinal e, *in vitro*, ligam-se a várias linhagens celulares, mas infectam somente as de origem intestinal ou epitelial (ARIAS et al., 2002). A replicação ocorre exclusivamente no citoplasma e está representada na figura abaixo (Fig. 3). Os primeiros estudos demonstraram, pela microscopia eletrônica (ME), que a entrada do RV ocorria através de vesículas, por endocitose (QUAN; DOANE, 1983). Entretanto, esta hipótese não foi sustentada porque o uso de drogas que bloqueiam a endocitose não interferia na infecção e somente partículas tratadas com tripsina eram infecciosas (SUZUKI et al., 1985). A tripsina aumenta a infecciosidade e provavelmente a maioria das cepas de RV são dependentes de tripsina. A tripsina não interfere na ligação do vírus, mas aumenta a capacidade de penetração na célula (ESTES, 2001).

A entrada do vírus na célula é mediada pelas proteínas do capsídeo externo VP4 e VP7 e os receptores celulares ainda são pouco conhecidos. Em geral, é aceito que o ácido N-acetilneuramínico ou, simplesmente, ácido siálico (Sia) é o receptor celular para algumas cepas de RV. Sugere-se que a porção VP8* da VP4 interaja primeiro com um receptor que contenha Sia. Alternativamente, os gangliosídeos GM1, GM2 e GM3 são implicados como possíveis receptores (ISA et al., 2006). Após interação inicial da VP8*, a VP5* se ligaria a um pós-receptor independente de Sia, provavelmente, as integrinas $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_4\beta_1$. Muitas cepas animais e a maioria das cepas isoladas de humanos são independentes de Sia, e, provavelmente, utilizam estas integrinas como receptores celulares (ARIAS et al., 2002; LÓPEZ; ARIAS, 2004). Foi demonstrado que a VP7 também media a interação dos RV com integrinas $\alpha\nu\beta_3$ e $\alpha\nu\beta_2$ (LÓPEZ; ARIAS, 2004; ZÁRATE et al., 2004). A Hsc 70, um membro

da família Hsp 70 (Heat shock protein) dos chaperones, também é implicada como pós-receptor para os RV. Anticorpos contra Hsc 70 ou a incubação do RV com esta proteína inibem a infecção do RV sem alterar a ligação do vírus nas células susceptíveis (Guerrero et al., 2002). Os gangliosídeos, integrinas e Hsc 70 são organizados na membrana da célula em microdomínios lipídicos (LÓPEZ; ARIAS, 2004; SONNINO et al., 2006). Estes microdomínios lipídicos seriam “plataformas” para os RV entrarem nas células. O tratamento de células com drogas que seqüestram colesterol da membrana torna a célula refratária à infecção pelos RV (MARTÍN et al., 2004).

Independente dos receptores usados, a interação vírus-receptor promove alterações conformacionais nas proteínas virais que levam a entrada na célula e a perda do capsídeo externo.

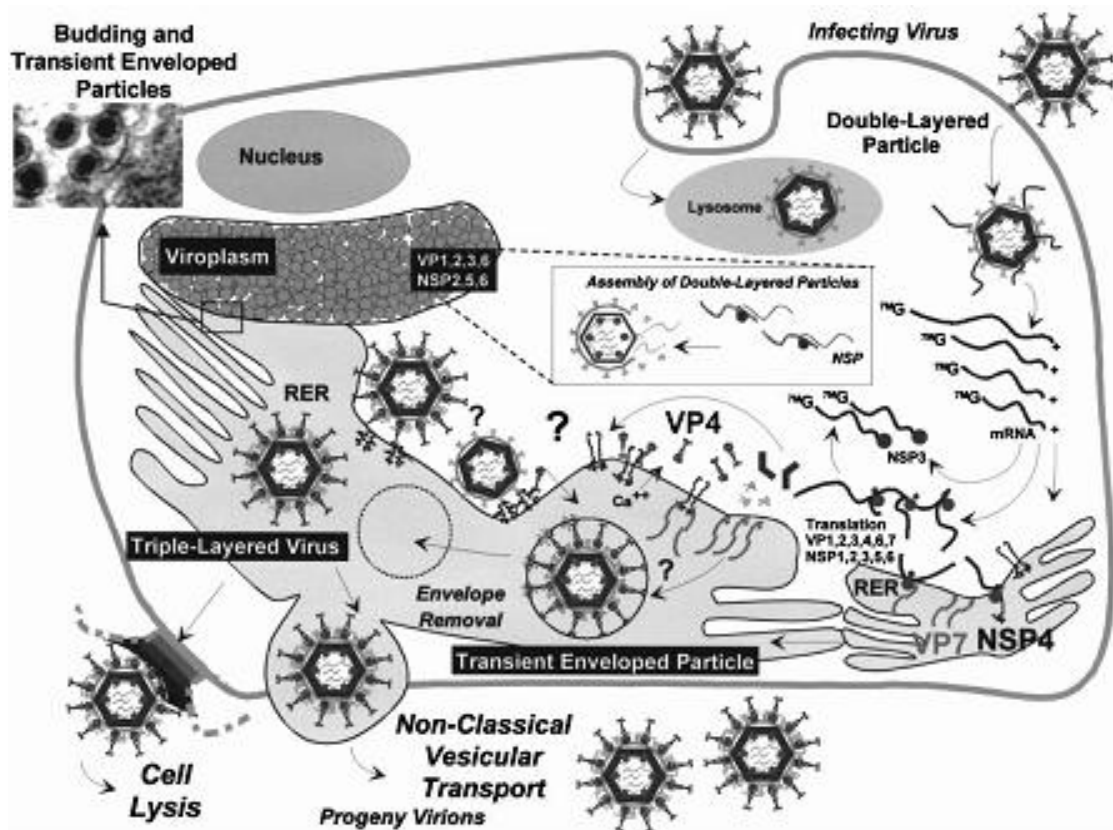


Fig. 3 – Ciclo replicativo do rotavírus mostrando as vias propostas de entrada do vírus na célula, a) desnudamento da partícula de tripla camada, b) partícula subviral onde é transcrito o RNAm, c) tradução das proteínas, d) montagem das partículas no viroplasma, e) transporte para o retículo endoplasmático rugoso (RER) com aquisição transitória de envelope, e, f) liberação da progênie viral (ESTES, 2001)

Uma vez que o vírus ganha o interior da célula e o capsídeo externo é perdido, o cerne permanece intacto como uma partícula ativa que sintetiza RNA mensageiro viral (RNAm) (PATTON; GALLEGOS, 1990). Os RNAm são traduzidos por ribossomos livres no citoplasma, exceto os RNAm das proteínas VP7 e NSP4 que são glicosiladas e, por isso, são traduzidos no retículo endoplasmático rugoso (RER). As proteínas virais VP1, 2, 3, 6, NSP2, 5, 6 e o RNAm são transportadas para o interior de vesículas, conhecidas como viroplasma, onde as partículas virais são montadas e ocorre a transcrição da fita complementar do genoma RNAdf. As partículas migram do viroplasma para o RER, momento em que ganham um envelope transitório que é perdido depois que a VP4 e VP7 são “montadas”, com o auxílio da NSP4, na camada externa do vírus e a progênie liberada por lise celular ou por vesículas através da membrana (ESTES, 2001; LÓPEZ et al., 2005).

Classificação

Os RV possuem três importantes especificidades antigênicas: grupo, subgrupo e sorotipo. Os grupos são determinados por especificidade sorológica da VP6, sendo sete os grupos, nomeados de A até G. O grupo A ainda pode ser subdividido em dois subgrupos, I e II, também determinados pela VP6 (ESTES, 2001).

Os RV do grupo A, os mais frequentes em humanos, possuem um sistema de classificação binário, semelhante ao do vírus influenza. As proteínas do capsídeo externo, VP7 e VP4, induzem a formação de anticorpos neutralizantes e permitem diferenciar sorotipos de VP7, ou sorotipos G (**G**licoproteína), e da VP4, ou sorotipos P (**P**rotease sensível). São 16 sorotipos G e 15 sorotipos P. A sequência genômica que expressa VP7 e VP4, ainda permite classificar os RV em genótipos G e P. São 16 genótipos G, completamente, relacionados com os sorotipos G, e, por outro lado, existem 28 genótipos P, não relacionados com os sorotipos P (ESTES, 2001; CHAN-IT et al., 2007; GULATI et al., 2007; MARTELLA et al., 2007).

Além da sorologia e genotipagem, a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) do RNAdf genômico, também é usada para caracterizar os RV. Os 11 segmentos têm Massa Molecular (MM) que variam de 667 pares de base (pb) a 3.3 kpb e são enumerados de 1 a 11, segundo a ordem de migração no gel (Fig. 2). Estes segmentos migram em quatro grupos, segundo suas MM. O primeiro grupo contém os quatro primeiros segmentos de maior MM, o segundo grupo, com os segmentos 5 e 6, o terceiro grupo com os segmentos 7 a 9, e o quarto grupo, com os segmentos 10 e 11, de menor MM. A maioria das cepas de RV do grupo A tem perfil eletroforético 4:2:3:2 e ainda pode ser subdividida em dois perfis, curto e longo, que são

determinados pela velocidade de migração dos segmentos 10 e 11, em relação aos demais segmentos (ESTES, 2001). A maioria das cepas do subgrupo sorológico I tem perfil eletroforético curto e do subgrupo II é de perfil longo (BROOR et al., 1995).

Através da eletroferotipagem é possível fazer o diagnóstico, detectar infecções mistas, infecções interespecie, recombinações e rearranjos no genoma viral (RAMIG, 1997; CIARLET et al., 2000; LAURETTI et al., 2003).

Epidemiologia

A gastroenterite por RV é mais comum em crianças com idade entre seis e vinte quatro meses. No mundo, estima-se que 95 % das crianças até os cinco anos de idade serão infectadas, pelo menos uma vez (PARASHAR et al., 1998). Abaixo dos seis meses as crianças estão menos sujeitas a desenvolver diarreia, provavelmente, pela proteção conferida pela amamentação ou pelo epitélio intestinal ainda imaturo (BRESEE et al., 2005). Infecções subsequentes conferem proteção aos sintomas da diarreia, por este motivo, a diarreia por RV é menos freqüente em crianças maiores que cinco anos (VELAZQUEZ et al., 1996). As infecções em adultos são geralmente subclínicas, ocasionalmente, ocorre diarreia em pais de crianças infectadas, pacientes imunocomprometidos, idosos e viajantes (HRDY, 1987; PARASHAR, et al., 1998).

Uma das propriedades epidemiológicas mais salientes da diarreia por RV é a sazonalidade. Nos países de clima temperado são observados picos durante o inverno, e no verão, os casos são menos freqüentes. Nos países de clima tropical, a doença ocorre quase o ano todo, embora possam ocorrer picos nos meses de clima mais frio em determinadas regiões (ANSARI et al., 1991).

A via de transmissão é fecal-oral, porém, mesmo em países com padrão sócio econômico elevado os rotavírus ainda são a maior causa de hospitalização infantil associada à diarreia. Por isso, outras vias de transmissão podem estar envolvidas. (CAVALLIER et al., 2000; FISCHER et al., 2004).

Durante a fase aguda, as crianças infectadas excretam mais de 100 bilhões de partículas por grama de fezes (BISHOP, 1996). A exceção do vírus pode começar antes do início dos sintomas e persistir por até 10 dias (PICKERING et al., 1988). O vírus é altamente contagioso e infeccioso em baixas doses, além de ser estável nas fezes por meses (RAMOS et al., 2000; FISCHER et al., 2004). Todas essas propriedades conferem ao vírus uma alta taxa de morbidade mundial.

A maioria das infecções em humanos é causada pelos RV do grupo A. Os RV do grupo B causaram grandes epidemias de diarreia em adultos na China, na década de 80, acometendo mais de um milhão de pessoas (HUNG et al., 1983) e foi detectado em casos esporádicos de diarreia aguda em adultos e crianças na Índia, durante 1997 a 2001 (KRISHNAN et al., 1999; SANEKATA et al., 2003). O grupo C foi detectado, inicialmente, em porcos em 1980 e hoje é encontrado em surtos esporádicos de diarreia em adultos e crianças em vários países do mundo, inclusive no Brasil, onde já foi detectado no Rio de Janeiro, Belém, São Paulo, Goiânia e Londrina (TEIXEIRA et al., 1998). Os demais grupos foram encontrados somente em animais (SAIF et al., 1980; SCHNAGL et al., 2004).

Ainda com relação ao grupo A, onze sorotipos P e dez sorotipos G têm sido detectados em humanos. Entretanto, no mundo, 96% das infecções são provocadas por quatro cepas: G1, G3 e G4, combinados com P1A[8] e G2, combinado com P1B[4]. A distribuição das cepas pode variar a cada ano de acordo com os aspectos temporais e locais. A cepa mais freqüentemente detectada, mundialmente, é P[8]G1, mas, na Índia, por exemplo, os sorotipos G9 e G2 são os mais encontrados (JAIN et al., 2001; CUNLIFFE et al., 2002; AAP, 2007).

Diagnóstico laboratorial

As fezes do primeiro ao quarto dia de diarreia são ideais para detecção do vírus, mas, em alguns casos a eliminação de partículas pode persistir por até três semanas (Kapikian et al., 2001). A ME foi a primeira técnica usada para diagnóstico e ainda é muito empregada devido a sua especificidade e rapidez. Através da ME é possível detectar os RV em 80 % a 90 % das fezes positivas (BRANDT et al., 1981).

A detecção de antígenos virais nas fezes por imunoensaio enzimático (IE) é uma das técnicas mais difundidas. É altamente sensível e não necessita de equipamentos especializados, além de possuir controle interno contra reações cruzadas. Atualmente existem kits de EI para detecção de RV dos Grupos B e C (KAPIKIAN et al., 2001). Outras técnicas como a aglutinação de látex e imunocromatografia também são usadas no diagnóstico; elas permitem a detecção de cepas circulantes, do grupo A, e possuem sensibilidade semelhante ao EI, além de serem rápidas e de simples execução (PIETRUCHINSKI et al., 2006). A detecção do RNA viral por EGPA, hibridação do RNA viral com sondas e a reação em cadeia da polimerase associada à transcriptase reversa (RT-PCR) são provas moleculares que também são empregadas para o diagnóstico e caracterização dos rotavírus. A hibridação é 10 a 100 vezes mais sensível que o EI. A RT-PCR é 5.000 e 100.000 vezes mais sensível que a hibridação e a EGPA, respectivamente (KAPIKIAN et al., 2001).

Também é possível isolar os RV em culturas de células. O isolamento permite desde a sorotipagem, através do testes de neutralização, a adaptação de cepa para vários estudos. As linhagens celulares mais empregadas são as de origem renais, de macaco MA-104 e LLC-MK₂, e de carcinoma de cólon intestinal humano, Caco-2. O efeito citopático do vírus em MA-104 é bem característico, com aumento de refringência, seguido de redução do volume citoplasmático, com formação de grumos celulares e células repuxadas, com distribuição focal (ESTES et al., 1979; SVENSSON et al., 1991; LONDRIGAN et al., 2000).

Imunidade

Os anticorpos do soro e do lúmen intestinal desempenham um papel importante na proteção à infecção e diarreia por RV. Foi demonstrado em crianças menores de 18 meses, que a pré-existência IgA anti-RV, nas fezes, em título maior que 1:20 e 1:80, conferem proteção contra diarreia e a infecção, respectivamente (MATSON et al., 1993). Da mesma maneira, anticorpos IgA e IgG anti-rotavírus no soro também estão relacionados com a proteção à infecção e doença (MATSON et al., 1993).

A infecção natural ou a vacinação conferem proteção cruzada a outras cepas de RV. Voluntários infectados com o RV humano sorotipo G1 foram protegidos da diarreia pela pré-existência de anticorpos contra o sorotipo G2. Ainda neste estudo, os pacientes que tiveram diarreia desenvolveram anticorpos neutralizantes séricos contra a cepa administrada e também contra os sorotipos G2 e G6 (KAPIKIAN et al., 1983). A proteção contra a re-infecção é conferida, principalmente, por anticorpos os anti-VP4 e VP7. As cepas homólogas são mais potentes que cepas heterólogas para induzir resposta humoral local contra a re-infecção. A importância dos anticorpos homólogos e heterólogos também é sustentada por estudos em porcos, camundongos, coelhos e bois (SNODGRASS et al., 1984; CONNER et al., 1988; McNEAL et al., 1994; TO et al., 1998).

As VP4 e VP7 induzem, de maneira independente, a formação de anticorpos neutralizantes. Como consequência, cada uma dessas proteínas do capsídeo externo desempenha um papel na proteção à doença. Até o momento, não se sabe qual a proteína de superfície e que região desta proteína é mais eficiente na indução de imunidade protetora (KAPIKIAN et al., 2001). Anticorpos IgA anti-VP6 também inativam os RV intracelulares, durante o processo de transcitose da IgA (HOSHINO; KAPIKIAN, 2000).

A imunidade celular também tem sido estudada na infecção pelo RV, em modelos animais e humanos. A maioria dos estudos é desenvolvida em camundongos e aponta para a importância dos linfócitos T CD8⁺ e resposta MHC classe I. Após a primeira infecção, os

linfócitos T CD8⁺ conferem proteção completa contra a re-infecção por duas semanas. Esta proteção vai diminuindo com o passar do tempo e dura até oito meses (FRANCO et al., 1997).

Vacina

A infecção natural não confere proteção completa contra a re-infecção ou diarreia leve, portanto, a vacina é fundamental para proteção. O objetivo de uma vacina deve ser a prevenção da diarreia severa durante os dois primeiros anos de vida, período que a diarreia por RV é mais séria (KAPIKIAN et al., 2001). As primeiras cepas candidatas à vacina, derivadas do RV bovino (RIT 4237 e WC3), atenuadas em cultura de células, foram desenvolvidas e testadas, na década de 80. Estas vacinas, administradas por via oral, foram testadas em vários países, e apresentaram modesta eficácia contra a diarreia leve, porém, eficazes na diarreia severa. Apesar dos esforços, estas vacinas foram abandonadas após insucessos em vários países (PARASHAR et al., 1998; BRESEE et al., 2005; GLASS et al., 2005). Seguiu-se ao desenvolvimento de outra vacina, semelhante às RIT e WC3, derivada da cepa de RV símio, RRV, também atenuada em cultura de células. A RRV também apresentou resultados variáveis dependendo, em parte, dos sorotipos circulantes nos locais de testes. Esta foi, posteriormente, modificada por recombinação (Fig 4), com a adição de outros três sorotipos humanos mais comuns, G1, G2 e G4, criando a RRV-TV (Rhesus Rotavirus Tetravalent Vaccine) (PARASHAR et al., 1998).

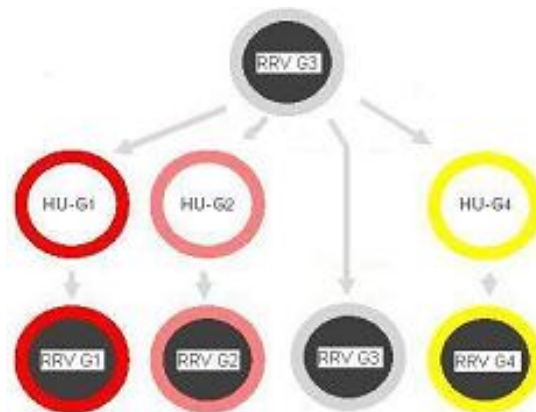


Fig 4 – Esquema de desenvolvimento da vacina recombinante RRV-TV. O RV símio cepa RRV sorotipo G3 é cultivado com os RV humanos (HRV) cepas: D sorotipo G1, DS1 sorotipo G2 e ST3 sorotipo G4, produzindo recombinantes RRV x HRV. Cada partícula recombinante possui o gene da VP 7 dos respectivos HRV e os outros 10 segmentos do RRV.

A RRV-TV foi eficaz em testes em vários países desenvolvidos e em desenvolvimento, demonstrando alto nível de proteção (>90%) contra diarreia severa (FISCHER et al., 2004). Finalmente, em 1998, foi licenciada nos EUA, com o nome de Rotashield. Esta vacina chegou a ser testada no Brasil, mas um ano após o licenciamento nos EUA, a vacina foi associada a 15 casos de intussuscepção tendo sido reprovada e não mais recomendada (LINHARES et al., 1996; CDC, 1999). Atualmente, pretende-se re-introduzir a vacina (PARASHAR et al., 1998; BRESEE et al., 2005; GLASS et al., 2005). Em 2000, foi licenciada na China uma vacina monovalente derivada de RV de carneiro cepa LLR sorotipo G10. Embora não faça parte do calendário de imunizações chinês, esta vacina é usada em várias regiões daquele país (GLASS et al., 2005).

Duas novas vacinas foram recentemente desenvolvidas com metodologias diferentes. A Rotateq, uma vacina oral constituída de cinco cepas recombinantes do RV bovino, WC3, com RV humanos sorotipo G1 a G4 e G6 P 1A. Estes são os sorotipos mais comuns no mundo e testes demonstraram segurança e alta eficiência, protegendo contra 74% dos casos de diarreias (GLASS et al., 2005; CLARK et al., 2006). A outra vacina desenvolvida foi a Rotarix, uma vacina monovalente de RV humano sorotipo G1, o sorotipo mais freqüente no mundo. Esta vacina apresentou boa segurança e eficácia de 85% na proteção contra diarreia severa, inclusive contra os sorotipos G2 e G9. A vacina foi testada em vários países, inclusive no Brasil, onde foi licenciada em 2005 e adotada no calendário de imunizações desde 2006 (COVEH/CGDT; CGPNI, 2006; O'RYAN; MATSON, 2006).

Outros três possíveis candidatos à vacina estão em triagem clínica ou processo de licenciamento (GLASS et al., 2005).

Vacinas experimentais estão sendo desenvolvidas através de metodologias alternativas, tais como: o uso de vírus inativado, proteínas virais recombinantes, partículas semelhantes a vírus e DNA que expressa genes de RV.

Patogenia e citopatogenia

A patofisiologia da diarreia por RV tem sido estudada, primariamente, em modelos animais. As maiores alterações são observadas na porção superior do intestino delgado e são, geralmente, discretas ou imperceptíveis (RAMIG, 2004). Os RV infectam enterócitos maduros no topo das vilosidades intestinais. Estas células não são proliferativas e têm as funções de secreção e absorção. Durante a infecção o epitélio colunar se torna cubóide, com encurtamento e achatamento das microvilosidades (Fig 4), ocorre aumento na permeabilidade do epitélio, diminuição da atividade da Na, K ATPase e co-transporte de sódio-glicose.

Ocorre ainda diminuição da atividade de dissacaridasas como maltase, lactase e sacarase e ainda, inversão do transporte de fluidos do tecido para a luz intestinal. Todas essas alterações promovem diarréia profusa (LUNDGREN; SVENSSON, 2001). Embora a má absorção seja geralmente aceita como mecanismo da diarréia induzida pelo RV, outros fatores também estão sendo considerados. A administração oral em camundongos de NSP4 purificada promove aumento da secreção de Cl^- dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e diminuição da absorção de Na^+ e água. Este efeito é semelhante à enterotoxina termoestável (ST) de *E. coli* (BALL et al., 1996). Suspeita-se que a NSP4 e a inflamação promovida pela infecção estimulem o sistema nervoso entérico aumentando a motilidade e diminuindo o tempo de trânsito intestinal (ROLLO et al., 1999; LUNDGREN et al., 2000; LUNDGREN; SVENSSON, 2001).

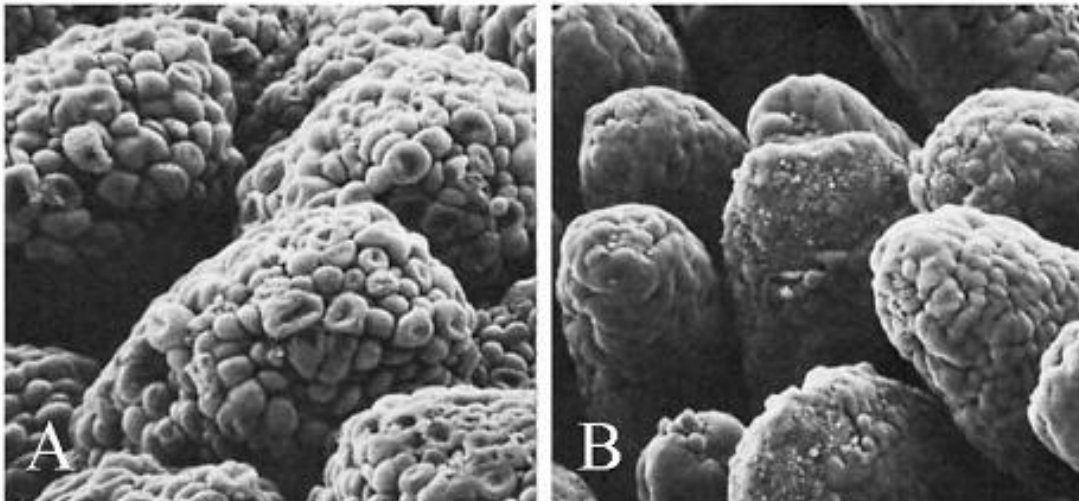


Fig. 5 – Micrografia eletrônica de varredura do tecido intestinal de bezerro não infectado (A), cujas vilosidades, em condições normais, se apresentam com células epiteliais arredondadas e ressaltadas e (B), 30 minutos após o início da diarréia por RV, com vilosidades encurtadas e desnudadas (Kapikian et al., 2001).

A patogenia dos RV depende de múltiplos fatores virais e do hospedeiro. Vários fatores do hospedeiro afetam a severidade da diarréia. A má nutrição agrava a diarréia, retarda a recuperação do intestino e modifica a resposta inflamatória (ZIJLSTRA et al., 1997; 1999). A idade é um fator preponderante na diarréia por RV. Em neonatos, até os seis meses, as infecções geralmente são assintomáticas, provavelmente devido à anticorpos maternos adquiridos durante a amamentação, imaturidade do epitélio intestinal e baixa secreção de proteases intestinais, importantes para ativação da infecciosidade do vírus pela quebra da VP4 (GREENBERG et al., 1994; BURKE; DESSELEBERGER, 1996; BRESEE et al., 2005).

Após o período de maior incidência da doença, entre seis meses e dois anos de idade, as infecções sintomáticas diminuem em frequência, devido à imunidade e outros fatores do hospedeiro. A secreção intestinal de mucinas, taxa de reposição do epitélio intestinal e absorção de fluidos são todos dependentes da idade e afetam a severidade da diarreia (RAMIG, 2004).

Já foram relatados casos de disseminação extra-intestinal após infecção por RV em humanos e animais infectados experimentalmente (RAMIG, 2004). Os RV foram encontrados no fígado de uma criança imunodeficiente e após casos de diarreia fatal (CARLSON et al., 1978; GILGER et al., 1992). Os RV do grupo C foram associados a atresia biliar em crianças (RIEPENHOFF-TALTY et al., 1996). Embora a replicação do vírus tenha sido demonstrada no fígado de uma criança imunodeficiente, a disseminação extraintestinal é rara e é provável que estes achados sejam em decorrência da viremia (RAMIG, 2004; BLUTT et al., 2006).

Alguns genes do RV têm sido associados com a habilidade de causar doença ou serem patogênicos em cultura de células. As proteínas não estruturais NSP1, NSP2 e NSP4 estão envolvidas na virulência em camundongos e as proteínas estruturais VP3 e VP7 em porcos. A VP4 esta envolvida com inúmeras propriedades *in vitro*, incluindo restrição do crescimento em cultura de células, infecciosidade aumentada pelo tratamento com protease, formação do plaque, ligação à célula e está envolvida na virulência e patogenicidade em camundongos. Entretanto, não há um único gene responsável pela patogenicidade, aparentemente o(s) gene(s) responsável varia entre as cepas e entre os hospedeiros (BURKE; DESSELBERGER, 1996).

Embora muitos aspectos da citopatogenia dos RV tenham sido estudados e estabelecidos, o mecanismo de morte celular induzida pelo vírus permanece incerto. Neste aspecto a morte celular é discutida de maneira dicotômica entre apoptose e necrose. A apoptose é um processo ativo e programado de desmantelamento da célula que evita a inflamação. Por outro lado, a necrose é um processo passivo e acidental, resultante de perturbação no meio, com liberação descontrolada de conteúdo celular pró-inflamatório (FINK; COOKSON, 2005). Na infecção experimental, em cultura de células, foi demonstrado além de arredondamento celular e desorganização do citoesqueleto, os seguintes aspectos: formação de vacúolos citoplasmáticos, perda da integridade da membrana para cátions e macromoléculas, aumento da concentração de Ca^{++} intracelular, consumo de ATP e liberação do conteúdo da célula. Estes achados sugerem que a morte celular, após infecção por RV, ocorre por necrose (PÉREZ et al., 1998; DICKMAN et al., 2000; LONIEN et al., 2001; CASTILHO et al., 2004). Entretanto, alterações citopatológicas que são próprias de apoptose,

como condensação da cromatina, formação de fragmentos do DNA associados a histonas e dano na membrana da mitocôndria com liberação de citocromo C, também foram demonstrados em células de carcinoma de cólon intestinal humano Caco₂ e HT-29, infectadas com RV (SUPERTI et al., 1996; CHAÏBI et al., 2005).

Embora os trabalhos com RV e outros patógenos descrevam os mecanismos de morte como entidades separadas e independentes, observações recentes não suportam esse paradigma. Dependendo da intensidade do estímulo, estado de diferenciação ou ativação da célula, vários tipos de morte podem ser observados simultaneamente (ANKARCRONA et al., 1995; FINK; COOKSON, 2005). Uma pequena porcentagem de células com fragmentação nuclear sugestiva de apoptose foi demonstrada durante a necrose de células MA-104 infectadas com RV (CASTILHO et al., 2004). O aumento do Ca⁺⁺ intracelular durante a infecção por RV está relacionado com a necrose em células MA-104 e também com apoptose em Caco₂ (PÉREZ et al., 1998; CHAÏBI et al., 2005). Portanto, o mecanismo de morte da célula na infecção por RV ainda permanece controverso. A compreensão destes mecanismos tem papel fundamental na patogênese da diarreia causada pelos RV.

Dano no DNA

A estrutura do núcleo à microscopia e a quebra do DNA são eventos muito observados na patogenia das doenças. Alterações nucleares têm sido relacionadas com apoptose, morte celular programada e necrose (HUPPERTZ et al., 1999; LEIST; JÄÄTELLA, 2001; BRÖKER et al., 2005). A quebra do DNA em condições de apoptose ocorre em fragmentos com massa molecular múltipla de 180 pb e pode ser observada pela eletroforese (WYLLIE, 1980) ou através da exposição das extremidades 3' -OH, *in situ*, pelo teste do TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling) (HUPPERTZ et al., 1999). Estas técnicas foram utilizadas para demonstrar a inibição ou indução da apoptose, por adenovírus, citomegalovírus, vírus Epstein-Baar, vírus da hepatite B, herpesvírus, poliovírus, vírus da imunodeficiência humana tipo I, vaccinia e papilomavírus (HAY; KANNOURAKIS, 2002).

O dano no DNA também pode ser monitorado pela eletroforese em gel de células individuais (EGCI). O aspecto dos núcleos fragmentados, após a eletroforese, é semelhante a um cometa e quanto maior a cauda, maior a intensidade de quebra do DNA (COLLINS, 2004; OLIVE; BANÁTH, 2006).

O teste do cometa é usado para determinar a genotoxicidade de produtos farmacêuticos, compostos químicos e radiações (MCKELVEY-MARTIN et al., 1998; TICE et al., 2000). É

usado no monitoramento da contaminação ambiental para avaliar biosensores, como mexilhão e minhoca (VERSCHAEVE; GILLES, 1995; DIXON et al., 2002). Em nutrição é aplicado para investigar o efeito de nutrientes na proteção ou dano oxidativo no DNA (HEATON et al., 2002; MØLLER; LOFT 2002). Na medicina, é usado para avaliar o risco de desenvolvimento de tumores e dano no DNA provocado por radioterapia, quimioterapia ou outras terapias (DENNOG et al., 1996; GUTIÉRREZ et al., 1998; SMITH et al., 2003; JIANLIN et al., 2004). Na virologia, o teste do cometa foi usado para determinar genotoxicidade do vírus influenza e o da febre suína clássica (LAKSHMI et al., 1999; GENGHINI et al., 2006). O cometa também foi usado para demonstrar apoptose em infecção por HIV, vírus do sarcoma de Rous e em blastócitos de camundongo transfectados com fragmentos de DNA de papilomavírus (LU et al., 1997; CALINISAN et al., 2002; ANDREAU et al., 2004). O teste foi usado para avaliar a proteção da clorofilina, derivado da clorofila, à fragmentação nuclear induzida pelo poliovírus (BOTELHO et al., 2004).

OBJETIVOS

Determinar aspectos citopatológicos e moleculares da cepa 1154 de RV porcino em cultura de células MA-104 através da avaliação da atividade hemaglutinante, dependência de tripsina e ácido siálico, falência energética celular, genoclasticidade e mutantes de plaque.

MATERIAIS E MÉTODOS

Células e vírus – Cultura de células de rim de macaco, MA-104, foram utilizadas como substrato dos experimentos. Essas foram mantidas em meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10% de soro fetal bovino e antibióticos (100 U de penicilina/ml, 100 mg/ml de streptomicina).

Foram utilizadas a cepa protótipo símia (SA-11) e a cepa porcina, 1154. Os vírus foram pré-tratados (30 min a 37 °C) e mantidos em cultura na presença de tripsina cristalina, respectivamente, com 30 ug/ml e 10 ug/ml. Os estoques virais foram obtidos através de três ciclos de congelamento/descongelamento e os restos celulares removidos por centrifugação a aproximadamente 700 x g por 5 min

Viabilidade celular durante a infecção – A viabilidade das células infectadas foi avaliada pela mensuração da atividade da desidrogenase mitocondrial, pelo emprego do ensaio toxicológico do brometo de dimetiltiazol-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma Chem. Co., EUA). As células MA-104 cultivadas em placas de 96 poços foram infectadas com os RV SA-11 e 1154, como descrito anteriormente. Vinte e quatro, 48 e 72 horas pós-infecção (hpi), o meio sobrenadante da cultura foi removido e as células lavadas com DMEM. Dez microlitros de MTT (1,25 mg/ml) foram adicionados às células e incubados por duas horas a 37 °C sob tensão de 5% de CO₂. A reação foi bloqueada com adição de isopropanol ácido e o sistema agitado por 15 min para dissolução dos cristais de formazan (produto da ação da desidrogenase sobre o MTT). A reação foi lida em espectrofotômetro, em 530 nm e 690 nm. A viabilidade celular foi determinada pela subtração dos valores da DO₆₉₀ da DO₅₃₀, nos controles de células não infectadas e nas células infectadas. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pela fórmula, % de viabilidade = DO média corrigida das células infectadas x 100/DO média corrigida dos controles de células.

Influencia da tripsina na característica de crescimento – As cepas virais foram tratadas com tripsina cristalina (30 ug/ml). Cem microlitros da cepa SA-11 com um título de 10^3 UFP/ml e 100 ul da cepa 1154 com título de 10^2 UFP/ml foram inoculados em células MA-104, em placas de 24 poços. Os títulos virais submetidos ao tratamento com tripsina e os controles foram avaliadas pelo ensaio de plaque, de três a cinco dias após incubação a 37 °C sob tensão de 5% de CO₂.

Seleção e purificação de mutantes de plaque – A detecção e purificação de mutantes foi realizada em células MA-104, cultivadas em placa de seis poços, a 37 °C em tensão de 5 % de CO₂. A monocamada foi infectada com 1 ml do vírus, pré-tratado com tripsina, como anteriormente descrito, nas diluições de 10^{-3} a 10^{-9} . Após 90 min de adsorção, a monocamada foi lavada com tampão TNC (10mM Tris pH 7.5, 140mM NaCl, 10mM CaCl₂), para remoção das partículas não adsorvidas e recobertas com agarose nutriente contendo 2 ug/ml de tripsina. Após três dias de incubação, foi acrescentada uma nova camada de agarose nutriente contendo 0,005 % de vermelho neutro e o sistema incubado por mais seis horas. Os plaques com distância maior que 2 cm foram coletados com auxílio de pipeta Pasteur. As progênies dos plaques foram submetidas a purificação através de duas passagens consecutivas em células MA-104.

Reação de hemaglutinação – A atividade hemaglutinante das cepas SA-11 e 1154 foi testada segundo Kalica et al. (1978), com modificações. Foram feitas diluições seriadas do estoque viral em PBS, pH 7.4, em microplacas escavadas, de modo que o volume final de cada diluição foi de 50 ul. Seguiu-se à adição de 50 ul da suspensão de hemácias humanas tipo O ou de galinha a 1, 0,5 e 0,25 %. O título foi expresso em unidades hemaglutinantes (UH), correspondente ao inverso da maior diluição do vírus capaz de provocar hemaglutinação total.

Dependência de ácido siálico na infecciosidade – A infecciosidade das cepas de RV pode ser diminuída pelo tratamento das células com neuraminidase (NEU). Antes da infecção, as células MA-104 foram tratadas com 100 ul de NEU de *Vibrio cholerae* (Sigma Chem. Co., EUA) com diluições seriadas em DMEM contendo 140 mM NaCl e 10 mM de CaCl₂, partindo de 20 mU/ml da enzima. As células foram incubadas a 37 °C em tensão de 5% de CO₂ por 120 min. e controles de células não tratadas foram incluídos. A NEU foi removida com lavagens com DMEM e as células infectadas com 0,1 ml do vírus na diluição de 10^{-3} para o SA-11 e 10^{-2} para o 1154. As células foram recobertas com agarose nutriente acrescida

de 10 ug/ml de tripsina cristalina e incubadas por três dias. Os plaques foram contados e a infecciosidade calculada em termos percentuais em relação à infecciosidade em células não tratadas com NEU.

Genotipagem dos RV – O RNA da cepa 1154 foi extraído da cultura de células com o kit RNAgents total isolation system (Promega-USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA foi submetido à transcrição reversa, seguido de PCR multiplex, usando-se três pools de primers específicos para os genótipos G, G1 a G6 e G8 a G12 (Santos et al., 2002). Para os genótipos P foram usados primers específicos para P[1], P[4] e P[6] a P[8] (WINIARCZYK et al., 2002).

Fragmentação do DNA (Teste do cometa) – A fragmentação nuclear associada à infecção do RV foi estudada em três protocolos. A primeira, com células infectadas com a cepa 1154 (infeccioso), em condições normais. O segundo e o terceiro protocolos, respectivamente, com a cepa 1154 inativada com luz UV por 20 min e neutralizada com soro específico anti-RV suíno. Os experimentos foram realizados após 48 h de exposição das células ao vírus, acompanhados dos controles de células não submetidas à infecção. O teste foi realizado segundo Tice et al. (2000). As células foram dispersas com 0.25 % de tripsina (1:250), 48 h pós exposição, lavadas e ressuspensas em meio DMEM a 1×10^6 células/ml. A suspensão de células foi homogeneizada com 0,5 % de agarose de baixo ponto de fusão e dispersa sobre uma lâmina de microscopia pré-recoberta com uma película de agarose a 1,5 %. Após a solidificação da agarose a 4 °C, as lâminas foram imersas em solução de lise, a mesma temperatura (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1 % Triton X-100, 10 % dimetil-sulfóxido, pH 10) por 90 min. As lâminas foram lavadas com PBS, dispostas na cuba de eletroforese horizontal, com tampão de eletroforese (corrida) alcalino (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) por 20 min. Após desnaturação do DNA celular, no tampão de corrida, os fragmentos do ácido nucléico foram submetidos à eletroforese, com intensidade de 300 mA e 25 V. Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas três vezes consecutivas com solução de neutralização (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) por cinco min, totalizando 15 min de lavagem. O material foi fixado com etanol por 10 min, corado com brometo de etídio (2 ug/ml) e examinados em microscopia com UV e filtro de 590 nm. Foram contados aleatoriamente 100 núcleos e pontuados em escala arbitrária de quatro pontos, de acordo com a presença e extensão de(a) cauda (0 - indicando nenhum dano no DNA até 3 - dano extensivo no DNA).

Células tratadas com 10 μM de H_2O_2 foram usadas como controle positivo de fragmentação do DNA.

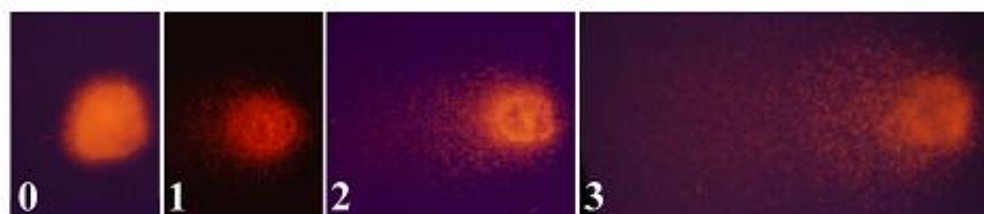


Fig. 5 – Teste do cometa em células MA-104 infectadas com RV, 48 hpi. As células são lisadas e submetidas à eletroforese alcalina por curto período. O DNA dos núcleos fragmentados migra dando um aspecto de cometa que é pontuado de acordo com a extensão da cauda (de 0 - nenhum dano até 3 - dano extensivo no DNA).

REFERÊNCIAS

- AAP Committee on Infectious Diseases Prevention of Rotavirus Disease. (2007) Guidelines for use of rotavirus vaccine. *Pediatrics*, **119**:171-182.
- Adams, W.R. & Kraft, L.M. (1963) Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*, **141**:359-360.
- Andreau, K., Perfettini, J.L., Castedo, M., Metivier, D., Scott, V., Pierron, G. & Kroemer G. (2004) Contagious apoptosis facilitated by the HIV-1 envelope: fusion-induced cell-to-cell transmission of a lethal signal. *J Cell Sci.* **117**:5643-5653.
- Ankarcróna, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A. & Nicotera, P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, **15**:961-973.
- Ansari, S.A., Springthorpe, V.S. & Sattar, S.A. (1991) Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev Infect Dis*, **13**:448-461.
- Arias, C.F., Isa, P., Guerrero, C.A., Méndez, E., Zárate, S., López, T., Espinosa, R., Romero, P. & López, S. (2002) Molecular biology of Rotavirus cell entry. *Arch Med Res*, **33**:356-361.
- Ball, J.M., Tian, P., Zeng, C.Q.Y., Morris, A.P. & Estes, M.K. (1996) Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*, **272**:101-104.
- Bishop R.F. (1996) Natural history of human rotavirus infection. *Arch Virol Suppl*, **12**:119-128.
- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H. & Huck, B.J. (1973) Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*, **2**:1281-1283.
- Blutt, S.E., Fenaux, M., Warfield, K.L., Greenberg, H.B. & Conner, M.E. (2006) Active viremia in rotavirus-infected mice. *J Virol*, **80**:6702-6705.
- Botelho, M.V., Orlandi, J.M., Melo, F.L., Mantovani, M.S., Linhares, R.E. & Nozawa, C. (2004) Chlorophyllin protects HEp-2 cells from nuclear fragmentation induced by poliovirus. *Lett Appl Microbiol*, **39**:174-177.
- Brandt, C.D., Kim, H.W., Rodriguez, W.J., Thomas, L.; Yolken, R.H., Arrobio, J.O., Kapikian, A.Z., Parrot, R.H. & Chanock, R.M. (1981) Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J Clin Microbiol*, **13**:976-981.
- Bresee, J.S., Parashar, U.D., Widdowson, M., Gentsch, J.R., Steele, A.D. & Glass, R.I. (2005) Update on rotavirus vaccines. *Pediatr Infect Dis J*, **24**:947-952.

- Bröker, L.E., Kruyt, F.A.E. & Giaccone, G. (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*, **11**:3155-3162.
- Broor, S., Husain, M., Chatterjee, B., Chakraborty, A. & Seth, P. (1995) Direct detection and characterization of rotavirus into subgroups by dot blot hybridization and correlation with 'long' and 'short' electropherotypes. *Clin Diagn Virol*, **3**:29-38.
- Burke, B. & Desselberger, U. (1996) Rotavirus pathogenicity. *Virology*, **218**:299-305.
- Calinisan, J.H., Chan, S.R., King, A., Chan, P.J. (2002) Human papillomavirus and blastocyst apoptosis. *J Assist Reprod Genet*, **19**:132-6.
- Carlson, J.A., Middleton, P.J., Szymanski, M.T., Huber, J. & Petric, M. (1978) Fatal rotavirus gastroenteritis: an analysis of 21 cases. *Am J Dis Child*, **132**:477-479.
- Castilho, J.G., Botelho, M.V.J., Lauretti, F., Taniwaki, N.; Linhares, R.E.C. & Nozawa, C.M. (2004) The in vitro cytopathology of a porcine and the simian (SA-11) strains of rotavirus. *MemInst Oswaldo Cruz*, **99**:1-5.
- Cavallier, B.G., Genoulaz, O., Pesce, K.B., Soule, H., Francillard, I., Bost, M., Gofti, L., Zmirou, D. & Seigneurin, J.M. (2000) Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water. *Appl Environ Microbiol*, **66**:2690-2692.
- CDC. (1999) Intussusception among recipients of rotavirus vaccine, United States, 1998–1999. *MMWR*, **48**:577–581.
- Chaïbi, C., Cotte-Laffitte, J., Sandré, C., Esclatine, A., Servin, A.L., Quéro, A. & Géniteau-Legendre, M. (2005) Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Virology*, **322**:480-490.
- Chan-it, W., Khamrin, P., Saekhow, P., Pantip, C., Thongprachum, A., Peerakome, S., Ushijima, H. & Maneekarn, N. (2007) Molecular characterization of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a novel P[28] genotype in porcine rotaviruses. *J Clin Microbiol*, JCM.01709-06v2.
- Ciarlet, M., Estes, M.K. & Conner, M.E. (2000) Simian rhesus rotavirus is a unique heterologous (non-lapine) rotavirus strain capable of productive replication and horizontal transmission in rabbits. *J Gen Virol*, **81**:1237-1249.
- Clark, H.F., Offit, P.A., Plotkin, S.A. & Heaton, P.M. (2006) The new pentavalent rotavirus vaccine composed of bovine (Strain WC3) -human rotavirus reassortants. *Pediatr Infect Dis J*, **25**:577-583.
- Collins, A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, **26**:249-261.
- Conner, M.E., Estes, M.K. & Graham, D.Y. (1988) Rabbit model of rotavirus infection. *J Virol*, **62**:1625-1633.

- COVEH/CGDT e CGPNI. (2006) Doença diarréica por rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano – VORH. Informe Técnico DEVEP/SVS/MS. 1:36.
- Cunliffe, N., Bresee J., Gentsch J & Glass R. (2002) The expanding diversity of rotaviruses. *Lancet*, **359**:640-642.
- Dennog, C., Hartmann, A., Frey, G. & Speit, G. (1996) Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis*, **11**:605-609.
- Dickman, K.G., Hempson, S.J., Anderson, J., Lippe, S., Zhao, L., Burakoff, R. & Shaw, R.D. (2000) Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **279**:G757-G766.
- Dixon, D.R., Pruski, A.M., Dixon, L.R.J. & Jha, A.N. (2002) Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis*, **17**:495–507.
- Estes, M.K. Rotaviruses and their replication. In: Knipe, D.M. & Howley, P.M. (ed.). *Fields Virology*, 4th edition, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2001, p. 1747–1785.
- Estes, M.K., Graham, D.Y., Gerba, C.P. & Smith, E.M. (1979) Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. *J Virol*, **31**:810-815.
- Fink, S.L. & Cookson, B.T. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, **73**:1907-1916.
- Fischer, T.K., Bresee, J.S. & Glass, R.I. (2004) Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. *Vaccine*, **22**:49-54.
- Flewett, T.H. (1973) Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, **2**:1497.
- Flewett, T.H., Bavies, H. & Bryden, A.S. (1974) Diagnostic electron microscopy of feces. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. *J Clin Pathol*, **27**:608-614.
- Franco, M.A., Tin, C. & Greenberg, H.B. (1997) CD8+ T cells can mediate almost complete short-term and partial long-term immunity to rotavirus in mice. *J Virol*, **71**:4165–4170.
- Genghini, R., Tiranti, I., Bressán, E., Zamorano-Ponce, E., Fernández, J. & Dulout, F. (2006) Determination of genotoxicity of classical swine fever vaccine *in vitro* by cytogenetic and comet tests. *Mutagenesis*, **21**:213-217.
- Gilger, M.A., Matson, D.O., Conner, M.E., Rosenblatt, H.M., Finegold, M.J. & Estes, M.K. (1992) Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J Pediatr*, **120**:912–917.
- Glass, R.I., Bresee, J.S., Parashar, U., Turcios, R., Fischer, T., Jiang, B., Widdowson, M.A. & Gentsch, J. (2005) Rotavirus vaccines: past, present, and future. *Arch Pediatr*, **12**:844-847.

- Greenberg, H.B., Clark, H.F. & Offit, P.A. (1994) Rotavirus pathology and pathophysiology. *Curr Top Microbiol Immunol*, **185**:255-283.
- Guerrero, C.A., Bouyssouade, D., Zárata, S., Iša, P., López, T., Espinosa, R., Romero, P., Méndez, E., López, S. & Arias, C.F. (2002) Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J Virol*, **76**:4096-4102.
- Gulati, B.R., Deepa, R., Singh, B.K. & Rao, C.D. (2007) Diversity in indian equine rotaviruses: identification of genotype G10,P6[1] and G1 strains and a new VP7 genotype (G16) strain in specimens from diarrheic foals in India. *J Clin Microbiol*, **45**:972-978.
- Gutiérrez, S., Carbonell, E., Galofré, P., Creus, A. & Marcos, R. (1998) The alkaline single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay applied to the analysis of radiation induced DNA damage in thyroid cancer patients treated with ¹³¹I. *Mutat Res*, **413**:111-119.
- Hay, S & Kannourakis, G. (2002) A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol*, **83**:1547-1564.
- Heaton, P.R., Ransley, R., Charlton, C.J., Mann, S.J., Stevenson, J., Brigitte H. E. Smith, B.H.E., Rawlings, J.M. & Harper, E.J. (2002) Application of single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. *J Nutr*, **132**:1598S-1603S.
- Hoshino, Y. & Kapikian, A. (2000) Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J Health Popul Nutr*, **18**:5-14. 2000.
- Hrdy, D.B. (1987) Epidemiology of rotaviral infection in adults. *Rev Infect Dis*, **9**:461-469.
- Hung, T., Chen, G.M., Wang, C.G., Chou, Z.Y., Chao, T.X., Ye, W.W., Yao, H.L. & Meng, K.H. (1983) Rotavirus-like agent in adult nonbacterial diarrhoea in China. *Lancet*, **2**:1078-1079.
- Huppertz, B., Georg, F.H. & Kaufmann, P. (1999) The apoptosis cascade - morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol*, **200**:1-18.
- Isa, P., Arias, C.F. & López, S. (2006) Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj J*, **23**:27-37.
- Jain, V., Das, B.K., Bhan, M.K., Glass, R.I., Gentsch, J.R. & The Indian Strain Surveillance Collaborating Laboratories. (2001) Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. *J Clin Microbiol*, **39**:3524-3529.
- Jianlin, L., Jiliang, H., Lifan, J., Wei, Z., Baohong, W. & Hongping, D. (2004) Measuring the genetic damage in cancer patients during radiotherapy with three genetic end-points. *Mutagenesis*, **19**:457-464.
- Kalica, A.R., James, H.D. & Kapikian, A.Z. (1978) Hemagglutination by simian rotavirus. *J Clin Microbiol*, **7**:314-315.

- Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Levine, M.M., Yolken, R.H., Vankirk, D.H., Dolin, R.; Greenberg, H.B. & Chanock, C.K. (1983) Oral administration of human rotavirus to volunteers: Induction of illness and correlates of resistance. *J Infect Dis*, **147**:95-106.
- Kapikian, A. Z., Hoshino, Y. & Chanock, R. M. Rotaviruses. In Knipe, D.M. & Howley, P.M. (ed.) *Fields virology*, 4th edition, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2001, p. 1787–1833.
- Krishnan, T., Sen, A., Choudhury, J.S., Das, S., Naik, T.N. & Bhattacharya, S.K. (1999) Emergence of adult diarrhoea rotavirus in Calcutta, India. *Lancet*, **353**:380–381.
- Labbé, M., Baudoux, P., Charpilienne, A., Poncet, D., & Cohen, J. (1994) Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J Gen Virol*, **75**:3423-3430.
- Lakshmi, A.V., Ramana, M., Vijayashree, B., Ahuja, Y.R. & Sharma, G. (1999) Detection of influenza virus induced DNA damage by comet assay. *Mutat Res*, **442**:53-58.
- Lauretti, F., Melo, F.L., Benati, F.J., Volotão E.M., Santos, N., Linhares R.E.C. & Nozawa, C. (2003) Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels. *J Virol Methods*, **114**:29-35.
- Lennette, D.A. General principles for laboratory diagnosis of viral infections. In: Lennette, E.H., Lennette, D.A., Lennette, E.T. (ed.) *Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 7th edition, American Public Health Association, Washington, 1995, p.3-26.
- Leist, M. & Jäättelä, M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**:589-598.
- Light, J.S. & Hodes, H.L. (1943) Studies of epidemic diarrhoea of the newborn: isolation of a filtrable agent causing diarrhoea in calves. *Am J Public Health*, **33**:1451-1454.
- Linhares, A.,C., Gabbay, Y.B., Mascarenhas, J.D.P., Freitas, R.B., Oliveira, C.S., Bellesi, N., Monterio, T.A., Lainsou, L.Z., Ramos, F.L. & Valente S.A. (1996) Immunogenicity, safety, and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belem, Brazil. *Bul. W. H. O.*, **74**:491-500.
- Londrigan, S.L., Hewish, M.J., Thomson, M.J., Sanders, G.M., Mustafa, H. & Coulson, B.S. (2000) Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins. *J Gen Virol*, **81**:2203-2213.
- Lonien, S.C.H., Bolognini, A.M., Linhares, R.E.C. & Nozawa. C.M. (2001) The *in vitro* comparative cytopathology of a porcine rotavirus and the simian prototype (SA-11). *Arq Bras Med Vet Zootec*, **53**:406-409.
- López, S. & Arias, C. (2004) Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol*, **12**:271-278.
- López, T., Camacho, M., Zayas, M., Nájera, R., Sánchez, R., Arias, D.F. & López, S. (2005) Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol*, **79**:184-192.

- Lu, X., Fairbairn, D.W., Bradshaw, W.S., O'Neill, K.L., Ewert, D.L. & Simmons, D.L. (1997) NSAID-induced apoptosis in Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts is dependent on v-src and c-myc and is inhibited by bcl-2. *Prostaglandins*, **54**:549-68.
- Lundgren, O., Peregrin, A.T., Persson, K., Kordasti, S., Uhnoo, I. & Svensson, L. (2000) Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*, **287**:491-495.
- Lundgren, O. & Svensson, L. (2001) Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect*, **3**:1145-1156.
- Malherbe, H.H., Harwin, R. & Ulrich, M. (1963) The cytopathic effect of vervet monkey viruses. *S Afr Med J*, **37**:407-411.
- Malherbe, H.H. & Strickland-Cholmley, M. (1967) Simian virus SA-11 and the related "O" agent. *Arch Gesamte Virusforsch*, **22**:235-245.
- Martella, V., Ciarlet, M., Bányai, K., Lorusso, E., Arista, S., Lavazza, A., Pezzotti, G., Decaro, N., Cavalli, A., Lucente, M.S., Corrente, M., Elia, G., Camero, M., Tempesta, M. & Buonavoglia, C. (2007). Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in Italian swine herds. *J Clin Microbiol*, **45**:577-580.
- Martín, C.S.S., López, T., Arias, C.F. & López, S. (2004) Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol*, **78**:2310-2318.
- Matson, D.O., O'Ryan, M.L., Herrera, I., Pickering, L.K. & Estes, M.K. (1993) Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J Infect Dis*, **167**:577-583.
- Matthews, R.E.F. (1979) The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, **11**:133-135.
- Mattion, N.M., Cohen, J. & Estes MK. The rotavirus proteins. In: Kapikian, A. (ed.) *Viral Infections of the gastrointestinal tract*, 2nd edition, Marcel Dekker, New York, 1994, p. 169-249.
- McNeal, M.M., Broome, R.L. & Ward, R.L. (1994) Active immunity against rotavirus infection in mice is correlated with viral replication and titers of serum rotavirus IgA following vaccination. *Virology*, **204**:642-650.
- McKelvey-Martin, V.J., Ho, E.T.S., McKeown, S.R., Johnston, S.R., McCarthy, P.J., Rajab, N.F. & Downes, C. (1998) Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent *in situ* hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis*, **13**:1-8.
- Mebus, C.A., Kono, M., Underdahl, N.R. and Twiehaus, M.J. (1971) Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. *Can Vet J*, **12**:69-72.

- Møller, P. & Loft, S. (2002) Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *Am J Clin Nutr*, **76**:303-310.
- Olive, P.G. & Banáth, J.P. (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc*, **1**:23-29.
- O’Ryan, M. & Matson, D.O. (2006) New rotavirus vaccines: renewed optimism. *J Pediatr*, **149**:448-451.
- Parashar, U.D., Bresee, J.S., Gentsch, J.R. & Glass, R.I. (1998) Rotavirus. *Emerg Infect Dis*, **4**:561-570.
- Patton, J.T. & Gallegos, C.O. (1990) Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *J Gen Virol*, **71**:1087-1094.
- Pérez, J.F., Chermello, M.E, Liprandi, F.; Ruiz, M.C. & Michelangeli, F. (1998) Oncosis in MA 104 cells is induced by rotavirus infection through an increase of cellular Ca⁺⁺ concentration. *Virology*, **252**:17-27.
- Pickering, L.K., Bartlett, A.V., Reves, R.R. & Morrow, A. (1988) Asymptomatic excretion of rotavirus before and after rotavirus diarrhea in children in day care centers. *J Pediatr*, **112**:361–365.
- Pietruchinski, E., Benati, F., Lauretti, F., Kisielius, J., Ueda, M., Volotão, E.M., Soares, C.C., Hoshino, Y., Linhares, R.E.C., Nozawa, C. & Santos, N. (2006) Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. *J Med Virol*, **78**:1241-1249.
- Pizarro, J.M., Pizarro, J.L., Fernández J, Sandino, A.M. & Spencer, E. (1991) Effect of nucleotide analogues on rotavirus transcription and replication. *Virology*, **184**:768-772.
- Quan, C. M. & Doane, F.W. (1983) Ultrastructural evidence for the cellular uptake of rotavirus by endocytosis. *Intervirology*, **20**:223-231.
- Ramig, R.F. (1997) Genetics of the rotaviruses. *Annu Rev Microbiol*, **51**:225-55.
- Ramig, R.F. (2004) Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol*, **78**:10213-10220.
- Ramos, A. P., Stefanelli, C. C., Linhares, R. E., Brito, B. G, Santos, N., Gouvea, V., Cassia, L. R. & Nozawa, C. (2000). The stability of porcine rotavirus in feces. *Vet Microbiol*, **71**:1-8.
- Riepenhoff-Talty, m., Gouvea, V., Evans, M.J., Svensson, L., Hoffenberg, E., Sokol, R.J., Uhnoo, I., Greenberg, S.J., Schakel, K., Zhaori, G., Fitzgerald, J., Chong, S., El-Yousef, M., Nemeth, A., Brown, M., Piccoli, D., Hyans, J., Ruffin, D. & Rossi, T. (1996) Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *J Infect Dis*, **174**:8–15.

- Rollo, E.E., Kumar, K.P., Reich, N.C., Chohen, J., Angel, J., Greenberg, H.B., Sheth, R., Anderson, J., Oh, B., Hempson, S.J., Mckow, E.R. & Shaw, R.D. (1999) The epithelial cell response to rotavirus infection. *J Immunol*, **163**:4442-4452.
- Saif, L.J., Bohl, E.H., Theil, K.W., Cross, R.F. & House J.A. (1980) Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol*, **12**:105-111.
- Sanekata, T., Ahmed, M.U., Kader, A., Taniguchi, K. & Kobayashi, N. (2003) Human group B rotavirus infections cause severe diarrhea in children and adults in Bangladesh. *J Clin Microbiol*, **41**:2187-2190.
- Santos, A.C.S. Caracterização de cepas de rotavírus humanos em cultura de células. (2007) Dissertação de Mestrado - Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- Santos, N. Volotão, E.M., Soares, C.C., Albuquerque, M.C., Silva, F.M., Chizhikov, V. and Hoshino, Y. (2002) VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on genotype determination by PCR. *Virus Res*, **90**:1-14.
- Schnagl, R.D., Boniface, K., Cardwell, P., McCarthy, D., Ondracek, C., Coulson, B., Erlich, J. & Morey, F. (2004) Incidence of group C human rotavirus in Central Australia and sequence variation of the VP7 and VP4 genes. *J Clin Microbiol*, **42**:2127-2133.
- Smith, T.R. Miller, M.S., Lohman, K.K., Case, L.D. & Hu, J.J. (2003) DNA damage and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, **24**: 883-889.
- Snodgrass, D.R., Ojeh, C.K., Campbell, I. & Herring, A.J. (1984) Bovine rotavirus serotypes and their significance for immunization. *J Clin Microbiol*, **20**:342-346.
- Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V. & Prinetti, A. (2006) Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*, **17**:1R-13R.
- Superti, F., Ammendolia, M.G., Tinari, A., Bucci, B., Giammarioli, A.M., Rainaldi, G., Rivabene, R. & Donelli, G. (1996) Induction of apoptosis in HT-29 cells infected with SA-11 rotavirus. *J Med Virol*, **50**:325-334.
- Suzuki, H., Kitaoka, S., Konno, T., Sato, T. & Ishida, N. (1985) Two modes of human rotavirus entry into MA 104 cells. *Arch Virol*, **85**:25-34.
- Svensson, H., Finlay, B.B., Bass, D., Bonsdorff, C.H.V. & Greenberg, H.B. (1991) Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Virol*, **65**:4190-4197.
- Teixeira, J.M.S, Camara, G.N.N.L, Pementel, P.F.V., Ferreira, M.N.R., Ferreira, M.S.N., Alfieri, A.A., Gentsch, J.R. & Leite, J.P.G. (1998) Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District, Brazil. *Braz J Med Biol Res*, **31**:1397-1403.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. & Sasaki, Y. F. (2000) Single-cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, **35**:206-221.

- To, T.L., Ward, L.A., Yuan, L. & Saif, L.J. (1998) Serum and intestinal isotype antibody responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. *J Gen Virol*, **79**:2661–2672.
- Valenzuela, S., Pizarro, J., Sandino, A.M., Vásquez, M., Fernández, J., Hernández, O., Patton, J. & Spencer, E. (1991) Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: Identification of the viral RNA polymerase. *J Virol*, **65**:3964–3967.
- Velazquez, F.R., Matson, D.O., Calva, J.J., Guerrero, M.L., Morrow, A.L., Campbell, S.C., Glass, R.I., Estes, M.K., Pickering, L.K. & Palacios, G.M.R. (1996) Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med*, **335**:1022–1028.
- Verschaeve, L. & Gilles, J. (1995) Single-cell gelelectrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bull Env Contam Toxicol*, **54**:112–119.
- Winiarczyk, S., Paul, P.S., Mummidi, S., Panek, R. & Gradzki, Z. (2002) Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland in the United States using RT-PCR. *J Vet Med*, **49**:373-378.
- Wyllie, A. H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**:555-556.
- Zárate, S., Romero, P., Espinosa, R., Arias, C.G. & López, S. (2004) VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin $\alpha\beta 3$ through a novel integrin-binding site *J Virol*. **78**:10839-10847.
- Zijlstra, R. T., Donovan, S.M., Odle, J., Gelberg, H.B., Petschow, B.W. & Gaskins, H.R. (1997) Protein-energy malnutrition delays small-intestinal recovery in neonatal pigs infected with rotavirus. *J Nutr*, **127**:1118-1127.
- Zijlstra, R. T., McCracken, B.A., Odle, J., Donovan, S.M., Gelberg, H.B.; Petschow, B.W., Zuckermann, F.A. & Gaskins, H.R. (1999) Malnutrition modified pig small intestinal inflammatory responses to rotavirus. *J Nutr*, **129**:838-843.

ARTIGO

CYTOPATHIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A PORCINE STRAIN (1154) OF ROTAVIRUS.

Lauretti, F., Benati, F.J., Santos, N., Mantovani, M.S., Linhares, R.E.C. & Nozawa, C.

ABSTRACT

Rotaviruses (RV) are the most important agents of acute diarrhea in children and young animals. Cytopathogenic aspects of a highly cytopathic porcine RV strain (1154) and that of the prototype simian (SA-11) RV were underlined and comparatively studied. The strain 1154 was genotyped as G5P[6], and was found not to present hemagglutination activity. It is dependent upon sialic acid in the cell receptor, as well as, trypsin for plaque formation. Overall, 1154 cytopathic effect (CPE) is similar to the other RV strains, nevertheless, with high capacity to spread to adjacent cells. Paralleled to the CPE, the nuclear fragmentation of infected cells was observed followed by the decrease of mitochondrial dehydrogenase activity. It is suggested that these features together lead to cell death and possibly have direct implications in the pathogenesis of RV infection.

INTRODUCTION

Rotavirus (RV), a member of the *Reoviridae* family is a non-enveloped, double-stranded RNA (dsRNA) virus. It is the single most important cause of acute severe gastroenteritis in young children and animals. It is estimated to cause over 440.000 deaths annually in children aged less than 5 years of age, especially in developing countries (PARASHAR et al., 2003). Virions display three concentric protein layers which surround viral genome represented by 11 segments of dsRNA. Each of the 11 genes codes for a single gene product, except for the 11. Several proteins have been associated with rotavirus virulence in different hosts. VP4 and VP7, the outermost capsid proteins, induce neutralizing antibodies, and are associated with virulence, attachment and entry into cells (RAMIG, 2004; LUNDGREN; SVENSSON, 2001). These proteins are also the basis of the present dual classification of group A RV into P (protease sensitive) and G (glycoprotein) types. To date, there are 16 G and 28 P genotypes (CHAN-It et al., 2007; GULATI et al., 2007). Group A is the most common group found in humans and animals,

A number of human infections with virion bearing animal genes have been observed, and this event contributes to the genetic and antigenic diversity of RV (HEIDE et al., 2005;

Ahmed et al., 2007). Pigs are thought to be reservoirs and source for emergent human strains (SANTOS et al., 1999; PHAN et al., 2007). A highly cytopathic strain of porcine RV was described in a study of virion stability in that plaque size mutants were evidenced (LONIEN et al., 2001; RAMOS et al., 2000). Plaque size mutants of RV were described before with different electrophoretic mobilities of RNA segments (TANIGUCHI et al., 1994; TANIGUCHI et al., 1996). Plaque mutants may represent remarkable features of RV pathogenicity *in vivo*. The hemagglutination activity and the dependence upon trypsin and sialic acid for cell receptor adsorption and/or cell infection have been studied for the characterization of RV stains (KALICA et al., 1978; TANIGUSHI et al. 1994; ISA et al., 2006; CIARLET et al., 2002). The features together with cytopathological outcome have been explored to establish the pattern of host variability and infectivity.

Hence, experimental studies were undertaken to study the porcine RV, strain 1154, in respect of the cytopathogenicity and molecular characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Cell and virus – Cell line MA104 (monkey epithelial cell line) grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U penicillin/ml and 100 mg of streptomycin/ml of medium). Strains of the prototype SA-11 and a field isolate porcine 1154 were used, pre-treated and maintained in culture with crystalline trypsin (Gibco, USA) at final concentrations of 30 ug/ml and 10 ug/ml, respectively, unless otherwise stated. Virus titer was determined either by TCID₅₀ or by plaque assay.

Cell viability – Cell viability was monitored by mitochondrial dehydrogenase activity by the MTT kit [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma Chem Co., USA), according to the manufacturer's instructions. Infected and mock-infected cell cultures were harvested at 24, 48 and 72 hpi and washed with DMEM. MTT solution was added and incubated for 2h at 37°C under 5% CO₂. This was followed by the addition of acidic isopropanol. Coloured product was dissolved by agitation and optical density (OD) read in a microtiter plate reader spectrophotometer at 530 and 690 nm. Cells viability was determined by subtracting OD₆₉₀ values from OD₅₃₀ in infected and mock-infected cells. Cell viability was expressed in percentage, as following: % viability = corrected mean OD of infected cells x 100/corrected mean OD of mock-infected cells.

Selection and purification of plaque mutants – Plaque mutants were purified in MA-104 cell cultures grown in 6-well trays at 37°C under 5% of CO₂ (Urusawa, et al., 1982). Briefly, cell monolayers were infected with 1 ml of virus pre-treated with trypsin, as described before, diluted from 10² to 10⁻³ PFU/ml for 90 min. Monolayers were washed with TNC buffer (10mM Tris pH7.5, 140mM NaCl, 10mM CaCl₂), and cell culture were overlaid with 0.7% nutrient agarose containing 2 ug/ml trypsin and cultivated at 37 °C under 5% CO₂ for 3 days. Plaques separated apart from one another with more than 2 cm were recovered, purified for at least three passage cell cultures.

Growth characteristic in the presence of trypsin – Virus was pre-treated with 30 ug/ml trypsin at 37 °C for 50 min. paralleled with a mock-treated virus suspension. One hundred microliter of either SA-11 or 1154 at 10³ PFU/ml were adsorbed in MA-104 cell cultures for 90 min.

After washings, cell monolayers were overlaid with a 0.7 % nutrient agarose containing 2 ug/ml of trypsin. Trypsin treated and mock-treated virus titers were calculated.

Sialic acid dependence on infectivity – The virus infectivity dependence on sialic acid Sia was evaluated in cells grown in 24-well tissue culture plates. Briefly, cells were treated with 100 ul of twofold dilutions of neuraminidase (NEU) (*Vibrio cholerae* – Sigma Chem Co., USA), for 2 h at 37 °C, starting at 20 mU/ml in DMEM supplemented with 140mM NaCl and 10mM CaCl₂. Controls of nontreated cells were performed in parallel. Cells were washed with DMEM and infected with 100 ul of SA-11 and 1154 at 10³ PFU/ml. After an incubation period of 90 min at 37 °C, the unadsorbed viruses were removed with DMEM, followed by the addition of 0.7 % agarose overlay medium containing 2 ug/ml trypsin and maintained for 72 h. Plaques were scored and the effect of NEU expressed as percentage of treated cells in comparison to nontreated cells.

Hemagglutination of erythrocytes - virus stock was diluted twofold in PBS, pH 7.4, and mixed for 10 sec with fifty microliters of a 1, 0.5 and 0.25 % suspensions of human O and chicken erythrocytes (Kalica et al., 1978). The tests were recorded after 1 to 1.5 h, and the number of hemagglutinin activity (HA) was determined.

Virus RNA electrophoresis – Virus RNA was extracted with standard phenol/chloroform method and electrophoresis procedure as previously described (JONES et al., 2003; HERRING et al., 1982).

RT-PCR for G and P typing – Virus RNA was extracted from cell culture with RNAgents total isolation system (Promega-USA), according to the manufacturer's instructions and submitted to multiplex RT-PCR by using sets of type-specific primers for VP7, genotypes G1 to G6 and G8 to G12 (SANTOS et al., 2002). VP4 genotyping was determined with specific primers for P[1], P[4] and P[6] to P[8] (WINIARCZYK et al., 2002).

DNA fragmentation test (Comet assay) – This experiment was carried out with cell cultures infected with 1154, harvested at 48 hpi. Controls were performed by the exposition of cell cultures with strains either inactivated by UV light or neutralized with specific antibodies. The UV-inactivation of the strain 1154 was carried exposing the suspension to a UV light (TUV 15 W G15 T8 – Philips, Holland) for 20 min at 20 cm from the light bulb, in ice bath.

For neutralization virus was incubated with 1:25, 1:50 and 1:100 polyclonal antibodies to porcine RV, for 1 h at 37 °C. Comet assay was performed as described in Tice et al. (2000) with modifications. All experiment was performed in ice bath to avoid DNA repair and cell aggregation. Infected and mock-infected cells were harvest by trypsinization at time intervals of 24, 48 and 72 hpi. Twenty microliters of cell suspension in DMEM were added to 120 ul of 0.5 % low gelling temperature agarose (kept at 37 °C) and dispersed on glass slides, prelayered with 1.5 % regular agarose and placed at 4 °C for 20 min. The cells were lysed with ice-cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1 % Triton X-100, 10 % dimethylsulfoxide, pH 10) for 90 min. This was followed by washing with PBS, immersion in alkaline buffer (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) for 20 min, and electrophoresis at 25 V and 300 mA for 20 min. The material was washed thrice with a neutralization solution (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) for 5 min each, fixed in ethanol for 10 min and dried at room temperature, approximately 25°C. Ethidium bromide (2 ug/ml) staining was performed and examination was carried out under UV microscopy with 590 nm barrier filter. One hundred cells were randomly selected and scored for the fluorescent tail length from the cell nuclei on an arbitrary four point scale (0 = no DNA damage and 3 = extensive DNA damage). Hydrogen peroxide at 10 mM was used as positive control for DNA fragmentation.

Statistical analysis - Descriptive statistical analysis was carried out to check the homogeneity of means between uninfected and infected cells using ANOVA (analysis of variance). Significant differences were analysed either by Student or Bonferroni test, as stated for each experiment.

RESULTS

As the underlying mechanism of the cytopathology is represented by the CPE, the effect of RV strains SA-11 and 1154 in MA-104 cell cultures is shown in fig. 1.

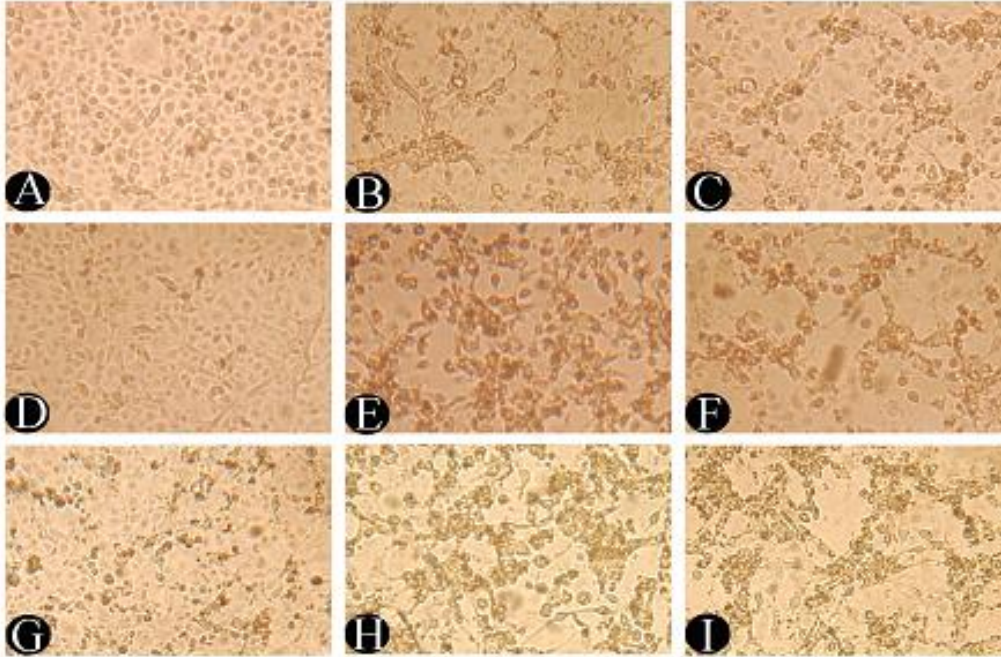


Fig. 1 - MA-104 cell cultures infected with SA-11 (B, E and H) and 1154 (C, F and I) at 24, 48 and 72 h pi , respectively, and the corresponding noninfected cultures controls (A, D and G). Magnification 50X.

The viability of RV-infected cell cultures is show in fig. 2. The score varied from 93 % at 24 hpi to 70 % at 72 hpi, for SA-11. For 1154 strain, it varied from 98 % at 24 hpi to 75 % at 72 hpi. At 48 hpi, cell viability decreased 35 % in infected cell, for both strains, and was maintained up to 72 hpi.

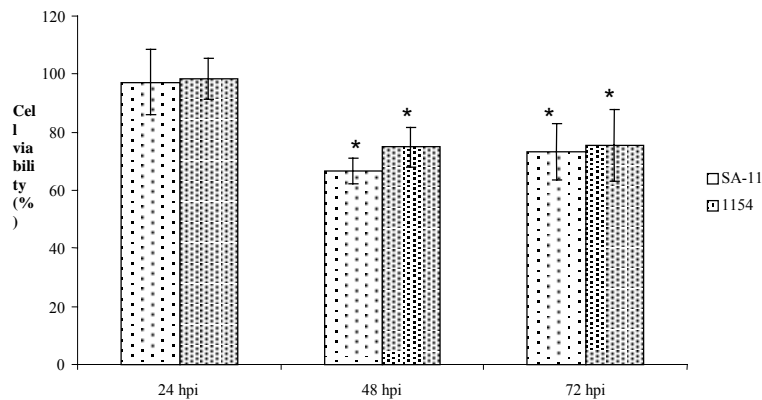


Fig. 2 - Assay of cell viability by MTT kit [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]. MA-104 cell cultures infected with SA-11 (●) or 1154 (■) strains and viability tested at 24, 48 and 72 hpi. * $P < 0.05$ (Bonferroni test) for the values of cell viability at 48 and 72 hpi, for both strains.

The average plaque sizes ($n = 20$) of SA-11 and 1154 detected 72 hpi demonstrating plaque size mutants is shown in fig. 3. For SA-11, small plaque mutants showed diameter of $0.73 \text{ mm} \pm 0.15$ and $1.63 \text{ mm} \pm 0.22$ for large ones. For 1154, small plaques measured $0.74 \pm 0.23 \text{ mm}$ and $2.02 \pm 0.36 \text{ mm}$ for large plaque mutants. The size and the number of large plaques in 1154 are bigger than SA-11 strain. We are attempting to isolate different plaque size mutant for future experiments. SA-11 was subjected to three-repeated plaque-to-plaque purification. One SA-11 small plaque mutant with $0.73 \text{ mm} \pm 0.15$, named SA-11 spm (small plaque mutant) was cloned.

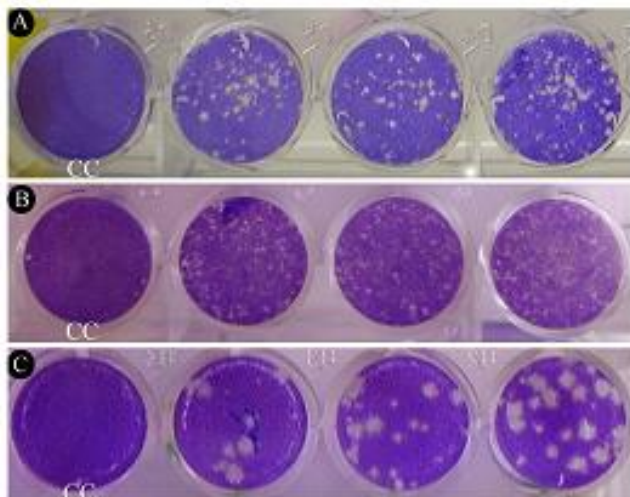


Fig. 3 - Rotavirus plaques in MA-104 cells, 72 hpi. The following strains are shown: (A) SA-11, (B) cloned SA-11 spm, (C) 1154, (CC) mock-infected cells.

The effect of trypsin in the replication of SA-11 and 1154 was assayed and it was demonstrated that in the absence of trypsin SA-11 produced clear, but small number of

plaques at day 5. Oppositely, however, 1154 was unable to form plaques without trypsin, even when cultures were maintained for longer period of time.

SA-11 was found to hemagglutinate to the titer of 1:8 the 0.5 % suspension of human O erythrocytes, however, was unable to hemmagglutinate the suspension at 0.25 %. Nevertheless, small plaque mutant SA-11 clone and 1154 were unable to hemagglutinate 1, 0.5 and 0.25% human O erythrocytes. All strains were unable to hemmagglutinate chicken erythrocytes.

The infectivity of SA-11 and 1154 was found to be reduced by NEU treatment in a dose-dependent manner, as shown in fig. 4. An inhibitory effect was clearly observed with as little as 1.2 mU of NEU for both strains. At the concentrations of 2.5 and 5 mU of NEU, 1154 was, at least, 20 % less infectious than SA-11 (Student test $P < 0.05$). Infectivity of both strain was completely abolish at higher concentration of NEU (data not show).

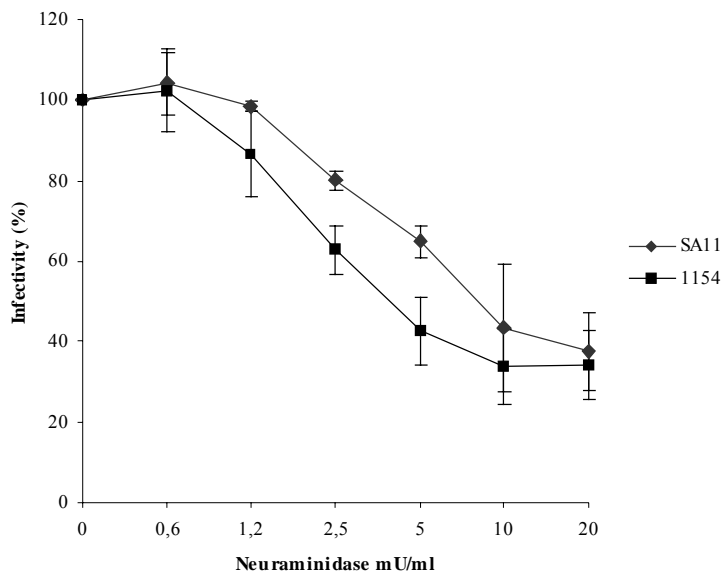


Fig. 4 – The effect of neuraminidase in the infectivity of SA-11(♦) and 1154 (■). Values shown are the average of at least three replicate experiments and difference between means analyzed by Student test ($*P < 0.05$).

The electropherotypes of both strains resolved by PAGE are similar with long pattern as for SA-11, as show in fig. 5. The results for G and P genotypes for SA-11 is G3P[1] and for 1154 is G5P[6].

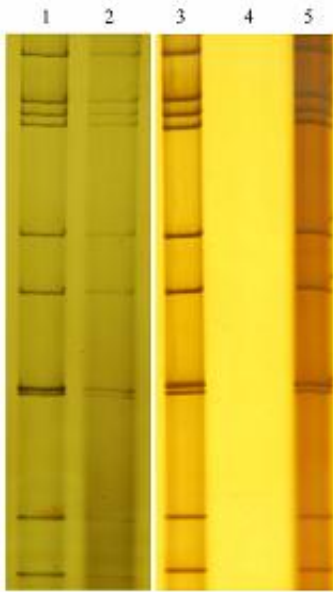


Fig. 5 - Electrophoretic migration pattern of dsRNA of (1) SA-11, (2) SA-11 spm, (3) SA-11 and (5) 1154 in 7.5% PAGE analysis at 13 mA for 7 h at 25 °C.

The DNA damage specifically induced by RV strains is demonstrated in fig. 6. A significant difference in DNA damage was found in active RV in comparison to those exposed to UV light or specific antibodies, at 72 hpi ($P < 0.05$, Bonferroni test). No significant difference in DNA damage (background) was observed in cells exposed to virus treated with UV light, antibodies or mock-infected cells. When comet assay was carried out with SA-11, 1154 and mock-treated cells at 24, 48 and 72 hpi, the DNA damage for both strains increased with time at maximum DNA damage at 48 hpi.

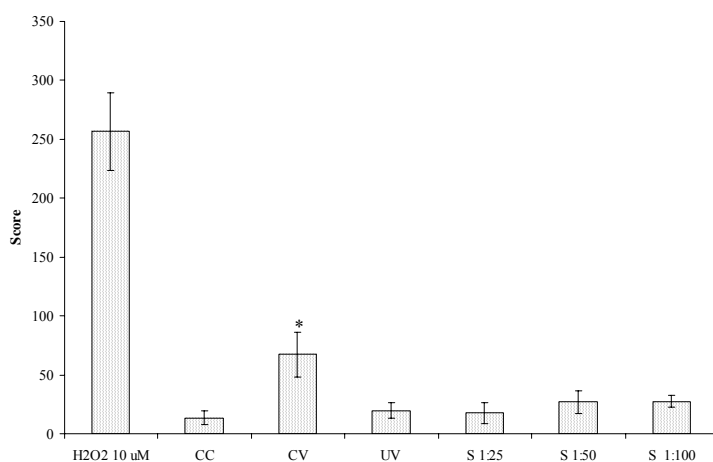


Fig. 6 - DNA fragmentation test (Comet assay) induced by RV. Active 1154 strain (CV), UV-inactivated (UV) and serum neutralized 1154 (S) 48 hpi and mock-infected cells (CC). Positive control for DNA fragmentation (H_2O_2). Values represent the average of three experiments and the differences between means analysed by Bonferroni test ($*P < 0.05$).

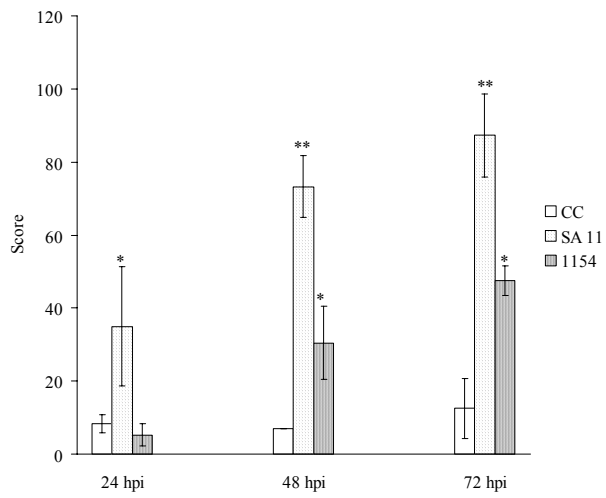


Fig. 7 - DNA fragmentation test (Comet assay) induced by RV. Cell cultures infected with SA-11 (◐) and 1154 (◑) RV strains at 24, 48 and 72 hpi, and mock-infected cells (◻). Results represent the average of three experiments and differences between means analyzed with Bonferroni test (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

DISCUSSION

The present study demonstrates citopathological aspects of simian SA-11 and porcine 1154 RV strains in MA-104 cells. The cell shrinkage, rounding and well defined border are alterations observed in cell shape after infection with several RV strains (ESTES et al., 1979; SVENSSON et al., 1991). The reorganization of cytoskeleton elements, such as, vimetin and actin, and loss of intercellular contact were features also demonstrated (LONIEN et al., 2001; Castilho et al., 2004) as responsible for cell shape alteration among others (HOSHINO et al., 1983; CHAÏBI et al., 2005). It is thought that cell shape alteration is a sensitive element for the demonstration of any noxious effect. The alterations observed in cells infected with both strains of RV were observed at least 24 h before the detection of loss of cell viability. The progression of the CPE for both strains within 48 and 72 hpi is observed, however, cell viability and virus titers were maintained stable.

During the progression of the CPE it was noted that 1154 affected adjacent cells more than SA-11, especially at latter times. However, SA-11 demonstrated to be more cytolytic and affected overall cell monolayer more extensively than 1154 strain. In fact, difference in plaque sizes between the strains showed that 1154 are able to spread more efficiently, as demonstrated by the prevalence of large plaques.

It is accepted that the infectivity of RV is dependent on trypsin (ARIAS et al., 1996). It was determined the degree of dependence on trypsin of the strains. When trypsin was omitted from the agarose nutrient overlay, only SA-11 was able to form plaques, albeit with smaller size than normally. Taniguchi et al. (1992) demonstrated a trypsin independent SA-11 small plaque mutant in CV-1 cells and related it to the VP4 gene. The cleavage of VP4 by trypsin is an important step in RV infection and plaque formation. It was also demonstrated that a small plaque mutant of a bovine RV, strain A5, presented a large deletion of 500 pb in the genomic segment 5, the NSP1 gene (TANIGUCHI et al., 1996). NSP1 has been suggested to be responsible for segmented RNA binding, assortment and cellular interferon response, but its function in viral morphogenesis is not known (HUA et al., 1994; GRAFF et al., 2002; SILVESTRI et al., 2004). In our study it was not found any extra dsRNA band in SA-11 and 1154, as demonstrated for SA-11 and bovine strain A5 (TANIGUCHI et al., 1992; TANIGUCHI et al., 1996). It is possible that gene(s) mutation(s) associated with different plaque size in our strains could not be large enough to be detected with conventional PAGE. Variation in electropherotypes is a remarkable tool for the identification of mutants and a possible detection of mixed infections. Therefore, the genetic instability of the RV strains

seems to be a frequent event, and this could be also demonstrated by the emergency of new genotypes.

The strain 1154 was found to be G5P[6] genotype. The combination of G5 and P[6] is a frequent genotypes in pigs (MARTELLA et al., 2006). These porcine genotypes have been involved in interspecies transmission between human and animals, and regarded as a potential reservoir for genetic/antigenic diversity of human rotaviruses (SANTOS et al., 1999, AHMED et al., 2007).

Ciarlet et al. (2002) analyzed animal and human RV strains and demonstrated that, whether of animal or human origin, only genotypes P[1], P[2], P[3] and P[7] are dependent of Sia in cell surface. However, the strain 1154 (G5P[6]) was found to be Sia dependent. This is the first report of a P[6] Sia dependent. This disagreement could be a result of a possible variability within P[6]. In general, Sia dependent strains are hemagglutination positive. Our experiments demonstrated that SA-11 hemagglutinated at low titer and 1154 was unable to hemagglutinate. However, some strains, as feline (FRV64) and murine (EDIM, EW, EC, EB and EHP) have low or even absent hemagglutination activity, and are dependent of Sia (LEE et al., 2003; ISA et al., 2006).

It was demonstrated in this study that the infection by both RV strains was associated with nuclear DNA damage, as demonstrated with comet assay of infected cells. The degree of DNA fragmentation was dependent with time of infection and strain. The comet assay was able to detect nuclear fragmentation at early stage of infection, together with CPE, however, before the detection of loss of cell viability. The damage in cell-infected DNA was associated with RV replication, because, neither UV-treated nor serum-neutralized strains were able to induce fragmentation.

The RV-induced cell death has been discussed on the ground of apoptosis and necrosis paradigm. Necrosis is a passive and accidental cell death resulting from environmental perturbations with uncontrolled release of inflammatory cellular components. Apoptosis, on the other hand, is active and programmed process of cellular dismantling that avoids eliciting inflammation. Superti et al. (1996) demonstrated fragmentation of RV-infected cells by TUNEL assay attributing this mechanism to apoptosis, as was later shown also by Chaïbi et al., (2005), and, recently, by Martin-Latil et al. (2007). Castilho et al. (2004) also demonstrated nuclear damage in RV-infected cells using microscopy, however, the effect was studied on the ground of necrosis. The use of comet assay to show DNA breaks was done in influenza and swine fever virus infection (LAKSHMI et al., 1999; GENGHINI et al., 2006). In our study, it was detected DNA fragmentation induced by both strains of RV by comet

assay. It is supposed that necrosis is the event that takes place after infection with both strains, however, the mechanism that leads DNA fragmentation and cell death remains to be explored. It seems that cell damage after RV infection is a combination of several pathophysiological events.

BIBLIOGRAFY

- Arias, C.F., Romero, P., Alvarez, V. & López, S. (1996) Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol*, **70**:5832-5839
- Ahmed, K., Anh, D.D. & Nakagomi, O. Rotavirus. (2007) G5P[6] in child with diarrhea, Vietnan. *Emerg Infec Dis*, **13**:1232-1235.
- Castilho, J.G., Botelho, M.V.J., Lauretti, F., Taniwaki, N.; Linhares, R.E.C. & Nozawa, C. (2004) The in vitro cytopathology of a porcine and the simian (SA-11) strains of rotavirus. *Mem inst Oswaldo Cruz*, **99**:1-5.
- Chaïbi, C., Cotte-Laffitte, J., Sandré, C., Esclatine, A., Servin, A.L., Quéro, A. & Géniteau-Legendre, M. (2005) Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Virology*, **322**:480-490.
- Chan-it, W., Khamrin, P., Saekhow, P., Pantip, C., Thongprachum, A., Peerakome, S., Ushijima, H. & Maneekarn, N. (2007) Molecular characterization of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a novel P[28] genotype in porcine rotaviruses. *J Clin Microbiol*, JCM.01709-06v2.
- Ciarlet, M., Ludert, J.E., Iturriza-Gómara, M. Liprandi, F., Gray, J.J., Desselberger, U. & Estes, M.K. (2002) Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *J Virol*, **76**:4087-4095.
- Estes, M.K., Graham, D.Y., Gerba, C.P. & Smith, E.M. (1979) Simian rotavirus SA-11 replication in cell cultures. *J Virol*, **31**:810-815.
- Genghini, R., Tiranti, I., Bressán, E., Zamorano-Ponce, E., Fernández, J. & Dulout, F. (2006) Determination of genotoxicity of classical swine fever vaccine in vitro by cytogenetic and comet tests. *Mutagenesis*, **21**:213-217.
- Graff, J.W., Mitzel, D.N., Weisend, C.M., Flenniken, M.L. & Hardy, M.E. (2002) Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *J Virol*, **76**:9545-9550.
- Gulati, B.R., Deepa, R., Singh, B.K. & Rao, C.D. (2007) Diversity in indian equine rotaviruses: identification of genotype G10,P6[1] and G1 strains and a new VP7 genotype (G16) strain in specimens from diarrheic foals in India. *J Clin Microbiol*, **45**:972 - 978.
- Heide, R., Koopmans, M.P.G., Shekary, N., Houwers, D.J., Duynhoven, Y.T.H.P & Poel, W.H.M. (2005) Molecular characterizations of human and animal group A rotaviruses in the Netherlands. *J Clin Microbiol*, **43**:669-675.

- Herring, A.J., Inglis, N.F., Ojeh, C.K., Snodgrass, D.R. & Menzies, J.D. (1982) Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gel. *J Clin Microbiol*, **16**:473-477.
- Hoshino, Y., Wyatt, R.G., Greenberg, H.B., Kalica, A.R., Flores, J. & Kapikian, A. (1983) Isolation and characterization of an equine rotavirus. *J Clin Microbiol*, **18**:585-591.
- Hua, J., Chen, X. & Patton, J.T. (1994). Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding. *J Virol*, **68**:3990-4000.
- Isa, P., Arias, C.F. & López, S. (2006) Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj J*, **23**:27-37.
- Jones, R.W., Ross, J. & Hoshino, Y. (2003) Identification of parental origin of cognate dsRNA genome segment(s) of rotavirus reassortants by constant denaturant gel electrophoresis. *J Clin Virol*, **26**:347-354.
- Kalica, A.R., James, H.D. & Kapikian, A.Z. (1978) Hemagglutination by simian rotavirus. *J Clin Microbiol*, **7**:314-315.
- Lakshmi, A.N.V., Ramana, M.V., Vijayashree, B., Ahuja, Y.R. & Sharma, G. (1999) Detection of influenza virus induced DNA damage by comet assay. *Mutat Res*, **442**:53-58.
- Lee, J.B., Youn, S.J., Nakagomi, T., Park, S.Y., Kim, T.J., Song, C.S., Jang, H.K., Kim, B.S. & Nakagomi, O. (2003) Isolation, serologic and molecular characterization of the first G3 caprine rotavirus. *Arch Virol*, **148**:643-657.
- Lonien, S.C.H., Bolognini, A.M., Linhares, R.E.C. & Nozawa, C.Mm. (2001) The *in vitro* comparative cytopathology of a porcine rotavirus and the simian prototype (SA-11). *Arq Bras Med Vet Zootec*, **53**:406-409.
- Lundgren, O. & Svensson, L. (2001) Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect*, **3**:1145-1156.
- Martella V., Bányai, K., Ciarlet, M., Iturriza-Gómara, M., Lorusso, E., De Grazia, S., Arista, S., Decaro, N., Elia, G., Cavalli, A., Corrente, M., Lavazza, A., Baselga, R. & Buonavoglia, C. (2006) Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: Evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology*, **344**:509-519
- Martin-Latil, S., Mousson, L., Autret, A., Colbére-Garapin, F. & Blondel, B. (2007) Bax Is Activated during rotavirus-induced apoptosis through the mitochondrial Pathway. *J Virol*, **81**:4457-4464
- Parashar, U.D., Hummelman, E.G., Bresee, J.S., Miller, M.A. & Glass, R.I. (2003) Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*, **9**:565-72.

- Phan, T.G., Maneekarn, N. & Ushijima, H. (2007) Possible misidentification of G5P[6] rotavirus as a novel strain detected in humans for the first time. *J Clin Microbiol*, **45**:2098-2099.
- Ramig, R.F. (2004) Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol*, **78**:10213-10220.
- Ramos, A. P., Stefanelli, C. C., Linhares, R. E., Brito, B. G, Santos, N., Gouvea, V., Cassia, L. R. & Nozawa, C. (2000). The stability of porcine rotavirus in feces. *Vet Microbiol*, **71**:1-8.
- Santos, N., Lima, R.C.C, Nozawa, C.M., Linhares, R.E.C. & Gouvea, V. (1999) Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of Types G1 and G5 associated with Wa-Like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment *J Clin Microbiol*, **37**:2734–2736.
- Santos, N. Volotão, E.M., Soares, C.C., Albuquerque, M.C., Silva, F.M., Chizhikov, V. and Hoshino, Y. (2002) VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on genotype determination by PCR. *Virus Res*, **90**:1–14.
- Silvestri, L.S., Taraporewala, Z.F. and Patton, J.T. (2004) Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J Virol*, **78**:7763-7774.
- Superti, F., Ammendolia, M.G., Tinari, A., Bucci, B., Giammarioli, A.M., Rainaldi, G., Rivabene, R. & Donelli, G. (1996) Induction of apoptosis in HT-29 cells infected with SA-11 rotavirus. *J Med Virol*, **50**:325-334.
- Svensson, H., Finlay, B.B., Bass, D., Bonsdorff, C.H.V. & Greenberg, H.B. (1991) Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Virol*, **65**:4190-4197.
- Taniguchi, K., Kojima, K., & Urusawa, S. (1996) Nondefective rotavirus mutants with an NSP1 gene which has a deletion of 500 nucleotides, including a cysteine-rich zinc finger motif-encoding region (nucleotides 156 to 248), or which has a nonsense codon at nucleotides 153 to 155. *J virol*, **70**:4125-4130.
- Taniguchi, K., Nishikawa, K., Kobayashi, N., Urasawa, T., Wu, H., Gorziglia, M. & Urasawa, S. (1994) Differences in plaque size and VP4 sequence found in SA11 virus clones having simian authentic VP4. *Virology*, **198**:325-330.
- Taniguchi, K., Wakasugi, F., Pongsuwanna, Y., Urasawa, T., Ukae, S., Chiba, S. & Urasawa S. (1992) Identification of human and bovine rotavirus serotypes by polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect*, **109**:303-312.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y. F. (2000) Single-cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, **35**:206–221.

Urusawa, S.; Urusawa, T. & Taniguchi, K. (1982) Three human rotavirus serotypes demonstrated by plaque neutralization of isolated strains. *Infect Immun*, **38**:781-784.

Winiarczyk, S., Paul, P.S., Mummidi, S., Panek, R. & Gradzki, Z. (2002) Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland in the United States using RT-PCR. *J Vet Med*, **49**:373-378.