

Fernando Vicentini

**“Utilização de culturas celulares para
a replicação de picobirnavírus”.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Microbiologia.

V662u

37272/BC



Fernando Vicentini

“Utilização de culturas celulares para a replicação de picobirnavírus”

**Orientadora:
Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti**

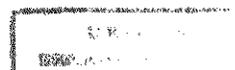
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) Fernando Vicentini e aprovada pela Comissão Julgadora. Maria Silvia Viccari Gatti

30/10/98

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Microbiologia.

1998

9908647



| | |
|--------------|-------------------------------------|
| UNIDADE | BC |
| N.º CHAMADA: | |
| V. | |
| T. | 37272 |
| PC | 229/99 |
| | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PR | R\$11,00 |
| DATA | 09/04/99 |
| N.º CPD | |

CM-00122034-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP

Vicentini, Fernando

V662u Utilização de culturas celulares para a replicação de picobirnavírus/ Fernando Vicentini. -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
75f: ilus.

Orientador: Maria Silvia Viccari Gatti
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

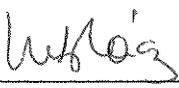
1. Virus. 2. Cultura celular. 3. Cultivo. I. Gatti, Maria Silvia Viccari. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

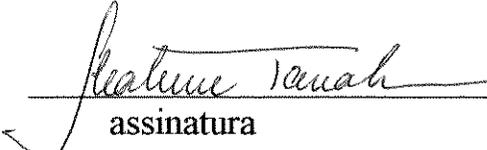
Campinas, 30 de Outubro de 1998.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti (orientador) 
assinatura

Profa. Dra. Maria Lúcia Barbosa de Oliveira RácZ 
assinatura

Profa. Dra. Hatune Tanaka 
assinatura

SUPLENTES:

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite
assinatura

" um verdadeiro cientista usa poucas palavras difíceis, e isto apenas quando nenhuma outra atende a seu propósito; enquanto aquele que conhece a ciência apenas superficialmente... pensa que, por utilizar palavras difíceis, compreende coisas difíceis".

Herman Melville.

Este trabalho foi desenvolvido junto ao Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Apoio financeiro: FAPESP.

Dedico à Silvia.

Dedico igualmente à minha esposa
Priscila, e aos meus pais Ireni e Ricardo.

Agradecimentos especiais:

Prof. Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro
Profa. Dra. Clarice Weis Arns
Prof. Dr. Domingos da Silva Leite
Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci
Prof. Dr. Tomomasa Yano
Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo
Profa. Dra. Hatune Tanaka
Profa. Dra. Iara Maria Silva de Luca
Profa. Dra. Lúcia F. Wada
Profa. Dra. Maria Lúcia Rác
Mirtis Maria Gianciani Ferraz
Prof. Dr. Paulo M. F. de Araújo
Rovilson Gilioli

Aos amigos:

Alessandra Roque Pancetti
Ana Lúcia Rodrigues da Soledade
Angela Bonifácio Barbosa de Oliveira
Daniele Masselli Rodrigues
Fabiana Estelles
Heloísa Helena Mithie Della Colleta
Ismar Rocha Haga
Jonas F. F. Chnaiderman
Marcia Okuda
Maria Ignês Batista
Patrícia Thomann
Sandra Soares Martins
Silvério Takao Hosomi

Aos meus irmãos:

Ricardo e Fábio

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com meu trabalho.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 2. Objetivos..... | 10 |
| 3. Material e Métodos..... | 11 |
| 3.1. Obtenção das amostras e suspensões fecais..... | 11 |
| 3.2. Detecção de amostras fecais positivas para PBV por eletroforese em gel de poliacrilamida..... | 11 |
| 3.2.1. Extração do ácido nucléico viral..... | 11 |
| 3.2.2. Preparo e coloração do gel de poliacrilamida..... | 12 |
| 3.3. Seleção das amostras fecais para a inoculação nas culturas celulares | 13 |
| 3.4. Obtenção de culturas primárias de rim de rato e camundongo..... | 13 |
| 3.5. Preparo das culturas celulares de linhagem contínua..... | 14 |
| 3.6. Proteases utilizadas, testes de citotoxicidade e testes de centrifugação..... | 15 |
| 3.7. Infecção das culturas primárias de rim de rato..... | 16 |
| 3.8. Infecção das culturas primárias de rim de camundongo..... | 17 |
| 3.9. Infecção das células da linhagem LLC-MK ₂ | 18 |
| 3.10. Infecção das células da linhagem MA104..... | 19 |
| 3.11. Infecção das células da linhagem HT-29..... | 20 |
| 3.12. Infecção das células da linhagem CaCo ₂ | 21 |
| 3.13. Monitoramento das infecções e coleta dos sobrenadantes de cultura..... | 22 |
| 3.14. Imunofluorescência indireta..... | 23 |
| 3.15. Microscopia eletrônica direta..... | 24 |
| 4. Resultados..... | 26 |
| 5. Discussão..... | 48 |
| 6. Conclusões..... | 62 |
| 7. Referências Bibliográficas..... | 63 |

Resumo.

O picobirnavírus (PBV) foi descrito por H.G. Pereira em amostras fecais de humanos no Brasil. Posteriormente, outros pesquisadores também detectaram o ácido nucléico dos PBV por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), que foi caracterizado como RNAds (fita dupla) e bissegmentado. Através de microscopia eletrônica foram detectadas partículas virais com aproximadamente 35 nm, que cossedimentavam em gradientes de cloreto de céσιο com o RNAds dos PBV, em uma densidade de 1,38-1,40g/ml. Com relação a sua patogenicidade, alguns autores têm tentado associá-los a quadros de gastroenterites. Entre outras características, conhece-se pouco sobre a constituição protéica do vírus e seu mecanismo de replicação. Essa falta de informações se deve em parte à dificuldade em purificar esses vírus de material fecal, onde os mesmos se apresentam em baixas concentrações. Nosso trabalho objetivou adaptar esse vírus para cultivo em sistemas de culturas celulares. Para tal, foram utilizadas culturas primárias de rim de rato e de camundongo, assim como as linhagens estabelecidas de rim de símios LLC-MK₂ e MA104, e as linhagens intestinais humanas HT-29 e CaCo₂. Na tentativa de promover a ativação viral, as amostras fecais positivas para PBV foram tratadas com as proteases tripsina e pancreatina para a infecção em células. Para otimizar a adsorção viral às células foram realizados três métodos de adsorção diferentes, sob agitação periódica, sob centrifugação e em sistemas “roller” de cultura. Das 51 amostras fecais de origem murina e/ou suína utilizadas, apenas os sobrenadantes de primeira passagem de quatro delas (3 murinas e 1 suína) foram positivas para o ácido nucléico de PBV por EGPA, sendo que a mesma amostra foi positiva por EGPA em mais de um experimento. Oito resultados positivos ocorreram quando as amostras foram adicionadas de proteases e um sem proteases. Contudo, em nenhum sobrenadante de passagem posterior à primeira obteve-se resultado positivo para o RNAds do PBV por EGPA. O único resultado sugestivo da adaptação viral ocorreu após análise por microscopia eletrônica de sobrenadante de uma quinta passagem em células de MA104, com a detecção de partículas virais com morfologia e diâmetro característicos de PBV. Contudo,

nenhum sobrenadante celular dessa amostra foi positivo para PBV por EGPA. Com todos os resultados obtidos, concluiu-se que não foi possível adaptar esses vírus em sistemas celulares, seguindo os protocolos de infecção realizados. Entretanto os resultados positivos em sobrenadantes de primeiras passagens reforçam os argumentos de H.G. Pereira sobre a possibilidade desses vírus estarem desenvolvendo um ciclo de replicação do tipo abortivo. Nesse caso, estaria ocorrendo apenas síntese do ácido nucléico e não a formação de partículas virais, ou talvez ocorrendo a replicação com formação de partículas virais defectivas.

Summary.

The picobirnavirus (PBV) was described by H.G. Pereira from human fecal samples in Brazil. Later, other researchers also detected the nucleic acid of PBV by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The nucleic acid was identified as RNAs (double-stranded) and bisegmented. Electron microscopy showed viral particles of approximately 35nm which co-sedimented in cesium chloride gradients together with the RNAs, at a density of 1.38-1.40g/ml. In relation to its pathogenicity, some authors have tried to associate this virus with gastroenteritis. Among other characteristics, very little is known about its protein composition and its replication mechanism. This lack of information is due in part to the difficulty in purifying this virus from fecal material, where it appears in very low concentrations. Our work was focused on adapting this virus to growth in cell culture systems. For this study, primary cultures of rat and mouse kidney cells were used, as well as established strains of monkey LLC-MK₂ and MA104, human intestine HT-29 and CaCo₂ cells. To try to promote viral activation, PBV positive fecal samples were treated with proteases (trypsin and pancreatin). Periodic shaking, centrifugation or "roller" culture systems were used to promote cell-virus attachment. Of the 51 murine and swine fecal samples used, four (3 murine and 1 swine) were positive for PBV nucleic acid. These results were verified only in first passages. The same samples were positive in more than one experiment. Eight positive results were found when proteases were added to the samples and one in the absence of proteases. However, no fecal sample was positive for RNAs of PBV after the first passage in the culture systems used. The only result which suggested viral adaptation was found after electron microscopy of the supernatant of the fifth passage in MA104 cells, where viral particles were found with morphology and diameter similar to those of PBV. However, no supernatant of this sample was positive for PBV by PAGE. Considering the results obtained, we conclude that it was not possible to adapt these viruses to cellular systems, according to the infection method used. On the other hand, the positive results obtained in the

first passages reinforced the arguments of H.G. Pereira that these viruses could develop an abortive type replication cycle. In this case, only nucleic acid synthesis would be occurring, or perhaps a replication of defective viral particles.

1. Introdução.

O picobirnavírus foi descrito por Pereira et al. em 1988⁵⁰. Utilizando-se da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) esses autores detectaram em fezes de crianças duas bandas de um provável RNA de dupla-fita, que poderiam estar associadas a partículas virais. Também pela utilização desta metodologia, outros pesquisadores brasileiros, visando o diagnóstico da rotavirose em aves^{1,40,48} e suínos²⁵, passaram a obter resultados semelhantes àqueles de Pereira et al.⁵⁰.

Em EGPA, também foi observado que os segmentos do material genômico viral se mostravam equimolares. Ao realizarem sua digestão enzimática verificaram a atividade apenas da RNase 1A e não da RNase T1 ou DNase, confirmando assim ser o ácido nucléico formado por RNAds (RNA double-stranded)^{42,51,52}, ou seja, RNA de fita dupla.

Simultaneamente aos experimentos de digestão enzimática também foi observado que o material genômico cossedimentava em gradientes de cloreto de céσιο (CsCl) em densidade ao redor de 1,40g/ml⁵², com partículas de aproximadamente 35nm de diâmetro, de capsídeo simples, sem envoltórios, e estruturas de superfície pouco definidas, visualizadas ao microscópio eletrônico.

A partir dos dados relatados foi sugerido o nome picobirnavírus⁵⁰ (pico, pelo fato deste vírus ser pequeno; e bi, por apresentar seu material genético bissegmentado e do tipo RNA).

Além da primeira descrição destes vírus no Brasil em fezes de crianças⁵⁰, logo surgiram na literatura novos relatos com a sua identificação em fezes de ratos⁵¹ e cobaios⁵² (ambos no Brasil); em suínos com detecções na Inglaterra¹¹, no Brasil²⁵, na Venezuela⁴² e no México⁵⁶; em bovinos com detecções na Inglaterra^{13,77} e na Bélgica⁷⁸; em aves^{1,40} no Brasil; em coelhos na Inglaterra²² e na Venezuela⁴⁴ e, posteriormente, novamente em humanos na Itália⁹, na Inglaterra^{23,24}, nos Estados Unidos da América²⁷ e na Venezuela⁴³. Mais recentemente o PBV foi identificado em alguns outros hospedeiros, como

tamanduá-bandeira* (Haga I.R., com. pessoal), símios** (Martins, S.S., com. pessoal), sendo ambas as detecções realizadas no Brasil, e em equinos na Inglaterra e Irlanda⁷ e no Brasil*** (Rácz M.L., com. pessoal).

Apesar dos diferentes hospedeiros em que os picobirnavírus já foram identificados até o momento, e do crescente interesse em pesquisá-los, aventa-se a possibilidade do PBV não infectar estes hospedeiros, mas sim possíveis microrganismos simbiotes de seus tratos gastrointestinais.

Portanto, o PBV não seria um vírus de origem animal, mas um bacteriófago, um micovírus, um vírus de protozoários ou ainda um vírus de plantas e, neste caso estaria sendo ingerido juntamente com a alimentação por esses hospedeiros, sendo apenas liberado em suas fezes⁵².

Por outro lado algumas características já descritas para esses vírus reforçam a tese dos mesmos serem de origem animal, ou seja:

1- O fato desses vírus serem eliminados nas fezes e, normalmente, com um período definido, é característico de infecções virais auto limitadas, embora haja relatos isolados de longos períodos de eliminação desses vírus em fezes de humanos²⁷ e de coelhos²²; 2- A bem sucedida experimentação em modelo animal onde ratos gnotobióticos foram infectados com amostras fecais positivas para PBV²⁶; 3- A detecção de coproanticorpos anti-PBV^{22,44}; 4- A eliminação de PBV em fezes de animais durante a amamentação e quando já ingerindo alimentos sólidos^{27,42}; 5- A detecção e a não detecção dos vírus em fezes de animais da mesma idade e local, portanto, sujeitos às mesmas condições de alimentação e de manejo^{27,42}; 6- A alta intensidade de impregnação das bandas de RNAs pela prata em EGPA; e, 7- Ainda, segundo Pereira et. al.⁵², o fato desses vírus desenvolverem uma infecção do tipo abortiva em alguns sistemas celulares.

Por outro lado vários outros vírus com materiais genômicos constituídos

* Haga, I.R. Lab. Virologia, Instituto de Biologia- UNICAMP.

** Martins, S.S. Lab. Virologia, Instituto de Biologia- UNICAMP.

*** Rácz, M.L. Lab. Virologia, Instituto de Ciências Biomédicas- USP.

de RNAs bissegmentados já foram descritos, como os *Birnavirus*^{49,53} detectados em vertebrados, insetos e moluscos; os *Criptomavirus*^{49,53}, relatados em plantas e os *Partitivirus*^{49,53}, dos fungos, além de alguns vírus de protozoários^{33,34}. Segundo as propriedades apresentadas pelos PBV, suas partículas virais possuem características que as diferenciam de outros vírus descritos anteriormente em animais, com material genômico constituído por RNAs bissegmentado, ou seja, os birnavírus^{20,49,53}. Com relação ao tamanho das partículas virais, os birnavírus têm aproximadamente 60-65nm de diâmetro sendo, portanto, maiores que o PBV; há a presença de estruturas de superfície bem definidas nas partículas dos birnavírus, estruturas estas ainda não detectadas nas partículas virais do PBV; a densidade em CsCl do PBV (1,38-1,40g/ml) é maior que a densidade apresentada pelos birnavírus (1,32-1,35g/ml) e, por outro lado, os pesos moleculares dos segmentos genômicos nos birnavírus (3.300-3.800 pares de bases) também são maiores que os apresentados pelo PBV (1.300-2.500 pares de bases)^{49,50,53}.

Mesmo com relação aos outros grupos que não infectam vertebrados, ou seja, os vírus de fungos e de protozoários, e que portanto poderiam estar presentes nos intestinos dos animais em que o PBV tem sido detectado, há diferenças principalmente no peso molecular dos segmentos dos ácidos nucléicos, no tamanho das partículas virais, na equimolaridade das duas bandas de RNAs dos PBV, e que não é característica em alguns desses vírus com RNAs bissegmentado, além das diferenças de densidade das partículas virais dos mesmos⁵³.

Em amostras de fezes de suínos Gatti et al.²⁵ e Gatti²⁶ verificaram uma certa heterogeneidade no peso molecular dos segmentos do RNA viral do PBV, revelando uma faixa de variação de 2.120 a 2.560 pares de bases para os segmentos maiores e de 1.330 a 1.610 pares de bases para os segmentos menores.

Em amostras fecais de humanos, estudadas por Gallimore et al.²⁴, os PBV apresentaram um perfil eletroforético onde a distância entre os segmentos genômicos, ou melhor, a diferença de peso molecular entre eles, era muito

menor que aquelas relatadas anteriormente, fato que levou os pesquisadores a se referirem a estes como picobirnavírus atípicos.

Com relação à patogenicidade deste novo grupo de vírus não há dados conclusivos sobre uma possível relação entre o diagnóstico do PBV e a caracterização, por exemplo, de um processo diarréico. Têm-se verificado, constantemente, sua presença em fezes diarréicas, assim como em fezes não diarréicas^{23,25,26,27,42}. Porém, os picobirnavírus têm sido incluídos em estudos epidemiológicos sobre agentes virais causadores de gastroenterites. Pereira et al.⁵⁰ e Ludert & Liprandi⁴³ observaram uma incidência de 0,45% do PBV em fezes de crianças imunocompetentes. Já Grohman et al.²⁷, em seus estudos em adultos imunodeficientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), observaram uma incidência do PBV de 9%, enquanto Gallimore et al.²³, estudando uma população de idade heterogênea e imunocompetente, observaram a distribuição dos PBV em 12,6% dos pacientes. Esses dados demonstram a distribuição desses vírus na população humana mundial, ainda que em nenhum desses trabalhos tenha ficado evidente a sua importância clínica.

Segundo os dados de Gatti²⁶, se os PBV não são capazes de induzir um quadro de gastroenterite em seus hospedeiros, ao menos em suínos poderiam potencializar os sintomas de uma infecção branda por rotavírus, agravando portanto, o quadro clínico dos mesmos.

Considerando os dados de Pereira et al.⁵¹, que identificaram o PBV em ratos de vida livre, Gatti²⁶ desenvolveu um modelo experimental em ratos gnotobióticos da linhagem Wistar. A infecção experimental foi feita por inoculação oral onde utilizou-se filtrados de fezes de origem murina, positivos para PBV, isentos de fungos, bactérias e protozoários. Os animais eram mantidos em isoladores pressurizados e com alguns parâmetros ambientais controlados. Apesar de bem sucedida em seus experimentos com relação à multiplicação dos vírus e sua liberação nas fezes, em nenhum dos ensaios a autora verificou a eliminação de fezes diarréicas nos animais em

experimentação. Com esses dados, a autora sugeriu a origem animal do PBV, ainda que não definindo sua patogenicidade.

Apesar do sucesso da infecção em ratos, esse poderia não ser o modelo animal mais adequado para estudos de patogenicidade. Em nosso laboratório tem sido usada a infecção experimental em suínos “specific pathogens free”, através de inoculações orais, mas até o momento sem sucesso.

A despeito da viabilidade do modelo experimental proposto, as fezes dos animais inoculados experimentalmente ou infectados na natureza, normalmente contêm uma concentração relativamente baixa de partículas virais, o que dificulta os trabalhos de purificação e, conseqüentemente, de estudos mais detalhados sobre sua constituição proteica, ou mesmo, do mecanismo de replicação adotado pelos picobirnavírus.

Em vista de todas essas dificuldades é que se buscou adaptar o PBV ao cultivo em sistemas de culturas celulares, onde seria possível obter maiores concentrações de partículas virais, num sistema mais propício à sua purificação e posteriores estudos de sua constituição.

Para tal, foram consideradas algumas características do PBV que, de alguma maneira, estão associadas aos rotavírus, quer seja por alguns hospedeiros comuns já identificados^{14,19}, quer pelo tipo de tecido infectado e via de eliminação, quer pelas características comuns de seus ácidos nucléicos^{14,26,50}, ou seja, ambos são compostos por RNAs segmentados.

Os rotavírus humanos foram identificados em 1973 por Bishop et. al.⁵ e por Flewett et al.²¹. Porém, Mebus et al.⁴⁶ já haviam relatado processos diarréicos possivelmente decorrentes de infecções por rotavírus no final da década de 60 em bovinos. Os primeiros relatos de replicação desses vírus em sistemas celulares foram publicados por Theil et al.⁷⁴ em 1977 e, a partir daí, principalmente os rotavírus do grupo A, tanto de origem animal quanto humana, foram adaptados ao cultivo em sistemas celulares e determinados protocolos de infecção têm sido, sistematicamente, utilizados para a sua replicação^{2, 62,69}.

Alguns autores têm utilizado culturas primárias de rim de porco^{61,74} e de macaco²⁹ para a adaptação de rotavírus do grupo A de origem humana²⁹, para os rotavírus não pertencentes ao grupo A^{65,73} e outros vírus entéricos, como os astrovírus⁸⁰. Outros testaram linhagens celulares que se mostraram capazes de permitir o cultivo de alguns vírus entéricos, tanto após passagens iniciais em culturas primárias, quanto para o isolamento viral diretamente das amostras fecais^{3, 62,80}.

As linhagens celulares que mais têm sido utilizadas para o isolamento dos rotavírus são aquelas originárias de rim de macaco (MA104^{10,12,57,62} e LLC-MK₂^{62,70}) e as linhagens intestinais humanas HT-29⁶⁹ e CaCo₂⁶⁷.

Outro fator que contribuiu para o isolamento desses vírus foi a introdução do sistema “roller” no cultivo de células^{62,63,60} que, além de aumentar a superfície de cultivo das células, ainda permite um maior contato vírus-células, uma vez que mantém o sistema em constante agitação.

O tratamento viral com proteases (tripsina e pancreatina)^{3,62,63,75} e outras enzimas, como a neuraminidase⁴⁵ e a elastase suína¹⁸, também tem sido empregado. A utilização dessas enzimas para promover o aumento da infectividade viral tem sido alvo de estudos e especulações desde o final da década de 70. O mecanismo que leva ao aumento da infectividade viral é particular para cada vírus, variando quanto ao sítio específico de clivagem. O fato é que muitos dos vírus conhecidos e cultiváveis podem ser ativados por tratamentos enzimáticos. Entre outros estão os rotavírus^{2,12,18}, os reovírus⁶, os coronavírus¹⁷, os paramixovírus³⁵, os astrovírus³⁹, os vírus da imunodeficiência humana⁴¹ e os poliovírus⁴⁷.

Para os rotavírus do grupo A, por exemplo, inicialmente postulou-se que as enzimas tripsina e pancreatina pudessem atuar não sobre as partículas virais, mas talvez sobre receptores celulares ou, ainda, digerindo moléculas que poderiam inibir a adsorção viral às células, como as imunoglobulinas^{3,12}. Clark et al.¹² sugeriram que essas proteases poderiam atuar fragmentando agregados virais de rotavírus, aumentando assim a quantidade de partículas virais infectivas livres e, por conseguinte, o número de unidades formadoras de placa.

Discutiu-se ainda o papel das proteases como moléculas que estariam clivando a proteína do capsídeo externo dos rotavírus (VP4) em duas subunidades, favorecendo assim a adsorção das partículas virais às células^{12,18}. Clark et al.¹² e Estes et al.¹⁹ também demonstraram que, para inóculos tratados ou não com protease, eram equivalentes as concentrações de partículas virais adsorvidas nos receptores celulares. Com o inóculo não tratado enzimaticamente não foi possível detectar a síntese do ácido nucléico viral, assim, os autores sugeriram que o papel das enzimas sobre o aumento da infectividade estaria mais relacionado ao processo de penetração ou desnudamento viral, do que à etapa de adsorção, como se pensava anteriormente.

Em trabalho de Estes et al.¹⁸ também ficou clara a efetiva atuação da tripsina sobre a proteína de capsídeo externo dos rotavírus, a VP4, sendo a clivagem da mesma alvo de especulações por parte dos autores como o possível mecanismo molecular que estaria favorecendo o aumento na infectividade dos rotavírus. Porém, com a evolução dos estudos, atualmente são conhecidos os sítios exatos de clivagem da proteína VP4 pela tripsina. Apesar de manter o conceito de a VP4 ser uma proteína envolvida na adsorção viral, sabe-se que a sua clivagem não tem papel algum nessa etapa e sim na penetração viral^{2,60}. Esses estudos ainda necessitam ser concluídos.

Bass et al.⁴ em trabalho infectando várias linhagens celulares com rotavírus do grupo A, objetivaram esclarecer quais seriam os mecanismos de restrição em algumas linhagens que se mostravam pouco permissivas ou não permissivas ao cultivo desses vírus. Em seus experimentos esses autores obtiveram resultados que confirmavam dados anteriores sobre os mecanismos de ativação dos rotavírus por enzimas.

Entretanto, na tentativa de detectar em que etapa do ciclo de replicação viral estaria ocorrendo a restrição, Bass et al.⁴ lançaram mão de uma técnica de transfecção com lipossomos catiônicos, introduzindo partículas virais com capsídeo simples (não infectivas) e partículas de capsídeo duplo, diretamente no citoplasma. Os autores demonstraram que após um único ciclo de replicação, as diferentes partículas comportavam-se de maneira idêntica, tanto

nas linhagens permissivas como nas pouco permissivas. Ficou claro que o mecanismo de restrição estaria envolvido com a liberação das partículas virais dos endossomos ou vacúolos endocíticos formados após a penetração viral. Como as partículas com capsídeo simples e duplo foram igualmente eficientes na indução da síntese proteica ficou evidente que o mecanismo de restrição celular não estava envolvido com o desnudamento viral.

Apesar dos vários vírus já adaptados ao cultivo em sistemas celulares, há outros vírus entéricos, como os próprios rotavírus não pertencentes ao grupo A^{63,73,75,79}, os coronavírus⁷¹ e os astrovírus^{39,66,80,81}, que ainda não são tão facilmente propagados, necessitando da utilização de recursos alternativos. Um desses vírus entéricos é o rotavírus do grupo C, que tem apresentado inúmeras dificuldades para ser cultivado, apesar de algumas amostras obtidas de suínos⁶³ e bovinos⁷⁵ já terem sido adaptadas. Segundo Terrett et al.⁷³, para se obter o cultivo de rotavírus do grupo C, devem ser utilizadas culturas primárias de rim de suíno no sistema "roller" de cultura e, após período de adsorção viral, o meio de manutenção deve conter pancreatina.

Outro artifício que tem sido empregado para o cultivo de rotavírus do grupo C é inocular inicialmente as amostras de fezes positivas para esses vírus em cultura primária de rim de suíno, a fim de aumentar o título viral e promover uma primeira adaptação para, posteriormente, transferi-la para células da linhagem MA104⁶³.

Uma outra variável já testada foi a utilização de proteases em altas concentrações que, apesar de dificultar ou até mesmo inviabilizar a observação da evolução de um possível efeito citopático, permite a adaptação à multiplicação viral^{63,73}. Nesses casos, para a caracterização de tal multiplicação utilizou-se a detecção do RNAs dos vírus por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Para o cultivo de astrovírus foram utilizadas culturas primárias no isolamento inicial, com posterior adaptação em linhagens celulares estabelecidas. Contudo, amostras humanas foram adaptadas somente em culturas primárias de mesma origem. Com a introdução da linhagem celular

CaCO₂, que simula condições bastante próximas às do intestino humano^{54,55,59}, astrovírus puderam ser isolados diretamente do material fecal⁸⁰.

Segundo Tahir et al.⁷¹ a utilização de força centrífuga pode facilitar o cultivo de coronavírus em sistemas celulares. Para tal, os autores têm cultivado as células em recipientes próprios que, no momento da infecção viral, são submetidos a uma força centrífuga relativa (FCR) de 700g por 1 hora. Apesar de utilizar FCR diferente, os experimentos são muito semelhantes àqueles desenvolvidos por Saif et al.⁶³ que usaram 1.200g por 1 hora para a adsorção viral de rotavírus do grupo C.

Considerando os experimentos de adaptação viral, principalmente de vírus entéricos, com as respectivas variáveis apresentadas, buscou-se neste trabalho, baseando-se em relatos da literatura, adaptar os picobirnavírus ao cultivo em sistemas de culturas celulares.

Por ainda não ter sido adaptado ao cultivo “in vitro” torna-se difícil a obtenção de outras técnicas para o seu diagnóstico, sorológicas ou não, hoje facilmente adaptáveis a vários laboratórios. Uma vez estabelecidas, estas técnicas poderiam permitir uma maior clareza em seus estudos epidemiológicos definindo assim sua importância.

2. Objetivos.

- 1-Detecção e seleção de amostras fecais positivas para picobirnavírus (PBV), de origem murina e suína, através da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA);
- 2-Utilização de culturas celulares primárias de rim de ratos e camundongos neonatos para a infecção com amostras fecais positivas para PBV;
- 3-Utilização de linhagens celulares estabelecidas (MA104, LLC-MK₂, HT-29 e CaCo₂) para a infecção com amostras fecais positivas para PBV;
- 4-Characterização da multiplicação viral "in vivo", por observação do efeito citopático (ECP);
- 5- Identificação da adaptação do picobirnavírus ao cultivo em sistemas celulares por eletroforese em gel de poliacrilamida, microscopia eletrônica direta e imunofluorescência indireta.

3. Material e Métodos.

3.1. Obtenção das amostras e suspensões fecais.

Amostras de fezes de origem suína foram coletadas em granjas da região de Campinas, S.P., diretamente de animais de 7 a 60 dias de idade.

Amostras de origem murina foram obtidas de infecções experimentais em ratos “specific pathogens free” (SPF) ou gnotobióticos, da linhagem Wistar, os quais foram mantidos em isoladores pressurizados e com ambiente controlado. Esses animais foram fornecidos pelo Centro Multiinstitucional de Bioterismo-CEMIB-UNICAMP.

As amostras fecais foram sendo coletadas ao longo do trabalho.

Todas as amostras coletadas foram mantidas a 4°C e, logo em seguida, diluídas a uma concentração de aproximadamente 10-20% em tampão salina fosfato (“PBS”) 0,01M pH 7,2, homogeneizadas em agitador tipo Vortex e centrifugadas a 1.200 g por 10 min. a 4°C¹⁹. Os sobrenadantes foram então coletados e mantidos a -20°C para serem testados quanto à presença de PBV e, uma vez positivos, serem utilizados como inóculos em culturas celulares.

3.2. Detecção de amostras fecais positivas para PBV por eletroforese em gel de poliacrilamida.

A detecção do PBV foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), de acordo com as recomendações de Laemmli et al.³⁸, com algumas adaptações³⁰.

3.2.1. Extração do ácido nucléico viral.

A 400 µl de suspensão fecal foram acrescentados 40 µl de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em água destilada e a solução foi homogeneizada e incubada a 37°C por 30 min.. Após este tempo, adicionou-se 400 µl de uma solução de fenol-clorofórmio (v/v) e, após agitação em Vortex por 10 min., a suspensão foi centrifugada a 12.000 g (centrífuga eppendorf-5402) por 10 min. a 4°C. Nesta etapa, a fase aquosa resultante foi coletada e à mesma foram acrescentados 40 µl de NaCl a 20% em água destilada e 1.000 µl de etanol. Após homogeneização os tubos foram incubados a -20°C por 18 horas, centrifugados novamente a 12.000 g por 10 min. a 4°C e, desta vez, os sobrenadantes foram eliminados totalmente. Utilizando-se uma câmara com “vácuo”, o precipitado foi seco por completo, sendo acrescido posteriormente de 20 µl de mistura dissociante (0,062M Tris/HCl, pH 6,8, 5M de uréia, 5% de 2-mercaptoetanol, 3% de SDS e 0,01% de azul de bromofenol). Os tubos foram incubados a 56°C por 10 min. e o volume total foi aplicado no gel de poliacrilamida para a corrida eletroforética.

3.2.2. Preparo e coloração do gel de poliacrilamida.

Os extratos do RNA viral foram analisados em gel de poliacrilamida, nas concentrações de 3,5 e 7,0 % para os géis concentrador e separador, respectivamente³⁸.

Após 18 horas de corrida eletroforética a uma corrente elétrica inicial de 10 mA, à temperatura ambiente, o gel foi corado pela técnica de impregnação pela prata, segundo o método de Sammons et al.⁶⁴.

O gel retirado das placas após a corrida eletroforética foi colocado em solução fixadora (solução aquosa a 0,5% de ácido acético e 10% de etanol), permanecendo sob agitação constante por 1 hora. Após esse período, o gel foi transferido para uma solução aquosa de nitrato de prata a 0,11M e, após 45 min., foi lavado por três vezes rapidamente em água destilada e então revelado em solução aquosa de hidróxido de sódio a 0,15M, acrescido de formalina a

0,2M. O gel foi mantido nessa solução por um período de 5 a 10 min., até o aparecimento nítido das bandas de ácido nucléico do controle positivo (amostra de rotavírus símio, obtida em cultivo celular) e também do ácido nucléico do PBV. A revelação foi interrompida pela transferência do gel para uma solução de ácido acético a 5%.

3.3. Seleção das amostras fecais para inoculação nas culturas celulares.

As amostras cujas bandas de RNAs estavam mais impregnadas pela prata, sugerindo alta concentração de ácido nucléico, foram selecionadas independentemente de apresentarem um ou mais eletroferótipos. As mesmas foram sendo utilizadas como inóculo logo após a sua seleção, de forma que não foram utilizadas amostras fecais armazenadas por longos períodos.

Foram selecionadas 25 amostras fecais positivas para PBV de origem suína e outras 31 de origem murina. Cada amostra foi utilizada mais de uma vez em diferentes experimentos de infecção, quer fossem em repetições, em diferentes protocolos de infecção ou em sistemas celulares diferentes, como poderá ser observado mais adiante.

Todas as suspensões fecais foram filtradas através de membranas com 0,45 μ m (Millipore), visando a eliminação total de fungos, bactérias e protozoários. Após a filtração, as amostras foram distribuídas em alíquotas em microtubos do tipo "ependorf" em volumes de 1,0 ml por tubo e congeladas a -20°C até o momento de uso.

3.4.Obtenção de culturas primárias de rim de ratos e camundongos.

Ratos e camundongos com no máximo oito dias de idade, obtidos no CEMIB/UNICAMP, foram anestesiados com éter etílico e em seguida mortos por decapitação. Após antissepsia da superfície dos corpos com álcool a 70°GL, os mesmos foram introduzidos na capela de fluxo laminar, onde os rins foram retirados e colocados em meio mínimo essencial (MEM) 199, contendo 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 1,25 µg/ml de anfotericina B. Em seguida, os rins foram triturados e colocados em frasco contendo tripsina a 0,25%. Após agitação de 5 a 10 min., a 37°C, foi desprezado o primeiro sobrenadante e adicionado outro volume de tripsina, agitando-se nas mesmas condições, sendo agora coletado o sobrenadante. Este procedimento foi repetido mais duas ou três vezes. Os sobrenadantes foram imediatamente filtrados em malha fina de gaze (5-6 camadas de gaze sobrepostas), em banho de gelo, e aos mesmos foram adicionados 10% de soro fetal bovino (SFB) para inativar a atividade da tripsina. O filtrado foi centrifugado a 1.500 g por 15 min., o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspensão e homogeneizado em meio de cultura MEM 199, suplementado com 10 % de SFB e acrescido dos antibióticos nas mesmas concentrações já referidas. As células, foram contadas em câmara de Neubauer e a suspensão foi ajustada para 200.000 células/ml⁵⁸. A suspensão foi distribuída em garrafas para a realização de passagens sucessivas, ou diretamente em placas de 24 concavidades para a infecção com as amostras fecais positivas para PBV.

3.5. Preparo das culturas celulares de linhagem contínua.

Foram utilizadas diferentes linhagens celulares estabelecidas, duas de origem intestinal humana, HT-29 e a CaCo₂ (carcinoma de colo), uma de rim fetal de macaco rhesus, a MA104, (gentilmente fornecidas pela Profa. Dra. Maria Lúcia Rác, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP) e outra de rim

de macaco, a LLC-MK₂ gentilmente fornecida por Rovilson Gilioli, do CEMIB/UNICAMP.

As linhagens celulares foram mantidas em meio Eagle (MEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina a 100 U/ml e estreptomicina a 100 µg/ml) e também, quando dos ensaios de infecção em placas, adicionou-se anfotericina B a 1,25 µg/ml.

Tanto as culturas primárias como as linhagens celulares estabelecidas foram cultivadas em passagens sucessivas em garrafas plásticas ou de vidro com posterior transferência para placas de 24 concavidades ou para tubos de vidro (16X160mm) com rosca, ou ainda para lâminas recobertas com teflon para os testes de imunofluorescência. Cultivos em placas e lâminas com teflon foram mantidos em atmosfera de CO₂ de 5%.

As células foram sempre cultivadas em sistemas estacionários até a confluência das monocamadas celulares. Para os ensaios de infecção, as células permaneceram ou não em sistemas estacionários, com alguns experimentos realizados em sistema “roller” de cultura, como será detalhado, caso a caso, posteriormente.

3.6. Proteases utilizadas, testes de citotoxicidade e testes de centrifugação.

De acordo com dados da literatura, optou-se pela utilização das proteases tripsina^{2,18} e pancreatina⁶³. A concentração máxima não citotóxica das mesmas foi determinada a cada novo lote preparado. Para tal, as culturas primárias e as linhagens estabelecidas foram expostas às concentrações de 0,1/0,2/0,5/1,0/2,0/5,0/10,0 e 15,0 µg/ml da protease em questão, em um volume de meio de 1,0 ml/concavidade ou 2,0 ml/tubo, que foram mantidos a 37°C, no mínimo por três dias.

Como poderá ser observado nos protocolos de infecção, um dos lotes das proteases pode ser utilizado na concentração de 10 µg/ml ainda sem levar ao aparecimento de efeito citotóxico (lote A). Entretanto, o lote B, permitiu no máximo a utilização de apenas 1 µg/ml.

Além dos testes de citotoxicidade, foram realizados também testes para definir a resistência das células frente aos processos de centrifugação utilizando-se várias FCRs diferentes, assim como tempos de rotação também diferentes, que seriam utilizados no período de adsorção.

Seguindo as condições de experimentação e o equipamento utilizado (Fanem-FR22), as células não resistiram a uma centrifugação com FCR superior a 150 g, o que impossibilitou a reprodução dos experimentos realizados por Tahir et al.⁷¹ e por Saif et al.⁶³ que utilizaram de FCRs de 700 e 1.200 g, respectivamente.

3.7. Infecção das culturas primárias de rim de rato.

Para os ensaios de infecção nas células de cultura primária de rim de rato foram utilizadas como inóculos 17 amostras de fezes, sendo todas de origem murina, seguindo cinco protocolos diferentes:

Protocolo 1-Suspensão fecal a 10%, sem utilização de qualquer enzima.

Protocolo 2-Suspensão fecal a 10% com 10 µg/ml de tripsina, no momento da adsorção e no meio de manutenção.

Protocolo 3-Suspensão fecal a 10% com 10 µg/ml de pancreatina, no momento da adsorção e no meio de manutenção.

Protocolo 4-Suspensão fecal a 10% pré-tratada com 10 µg/ml de tripsina por 1 hora a 37°C, antes da adsorção, mantendo-se essa concentração da protease no meio de manutenção.

Protocolo 5-Suspensão fecal a 10% pré-tratada com 10 µg/ml de pancreatina por 1 hora a 37°C, antes da adsorção, mantendo-se essa concentração da protease no meio de manutenção.

Antes de receber os inóculos, a monocamada celular foi lavada 3 vezes com PBS ou salina de Hanks, ambos em pH 7,4, visando a eliminação de células soltas e do SFB.

Todos os ensaios foram realizados em placas de 24 concavidades, com um volume de 250 µl de inóculo.

A adsorção viral foi realizada de duas maneiras diferentes: durante 1 hora a 37°C sob agitação periódica, ou sob centrifugação a uma força centrífuga relativa de 150g por 5 min., a aproximadamente 37°C. Os inóculos foram ou não mantidos nas concavidades após o período de adsorção, quando os volumes das mesmas foram completados para 1,0 ml, mantendo a mesma concentração das proteases.

Todos os experimentos foram sempre realizados em replicatas (de 2 a 5), e tiveram controles de células e de citotoxicidade das proteases.

As placas foram incubadas a 37°C a 5% de CO₂ e monitoradas diariamente por no mínimo três dias. Seguindo os protocolos propostos, os sobrenadantes das células foram ensaiados entre 3 e 9 passagens.

3.8. Infecção das culturas primárias de rim de camundongo.

Com as culturas primárias de rim de camundongos foram testadas 7 amostras fecais positivas para PBV, sendo 5 de origem suína e 2 de origem murina. Nenhuma das amostras utilizadas como inóculo nas células de cultura primária de rim de rato foi utilizada nesses experimentos.

Os protocolos de infecção utilizados nesse sistema celular foram semelhantes àqueles utilizados para as culturas de rim de rato, citados no item 3.7..

Nesses sistema celular os inóculos foram replicados até a quarta passagem.

3.9. Infecção das células da linhagem LLC-MK₂.

As células da linhagem LLC-MK₂ foram as primeiras a serem testadas nos ensaios de infecção celular. Foram realizados dois testes, com a utilização de seis amostras fecais positivas para PBV como inóculo, sendo 2 de origem murina (F4 e F5) e 2 de origem suína (F1 e F2) em uma primeira etapa, e duas amostras fecais positivas para PBV de origem murina (F9 e F10) na segunda etapa.

Na primeira etapa, as quatro amostras foram submetidas a ensaios seguindo os mesmos protocolos de infecção citados para as células de culturas primárias, exceto que todas as infecções foram realizadas em garrafas de vidro de 10 ml, portanto, sem o período de centrifugação na adsorção viral.

Essas amostras foram também utilizadas como inóculos nessa linhagem celular para os testes de imunofluorescência indireta, descritos posteriormente.

Em uma segunda etapa, foram testadas outras duas amostras positivas para PBV de origem murina (F9 e F10), seguindo protocolos de infecção diferentes:

Protocolo 6- As duas amostras fecais foram diluídas em Eagle-MEM a 1/5 e 1/20, partindo das suspensões fecais a 10%.

Protocolo 7-As suspensões fecais a 10% foram ultra-centrifugadas (Beckman-L8-80M) a 100.000 g/3horas, em tubos de 10 ml, e os precipitados foram ressuspensos em volumes de 1,0 ml cada, e também diluídos a 1/5 e 1/20 em Eagle-MEM.

Foi utilizado apenas o pré-tratamento com a protease tripsina e em uma concentração final (após adsorção) de 1µg/ml, concentração determinada como a máxima que ainda não causava efeito citotóxico nas células (lote B).

A etapa de adsorção foi realizada sob centrifugação a 150 g por 30 min.

Foram realizadas entre 5 e 6 passagens destes inóculos.

3.10. Infecção das células da linhagem MA104.

Na linhagem celular MA104 foram testadas, numa primeira etapa, 3 amostras, sendo uma de origem murina (F4) e duas de origem suína (F21 e F23), todas seguindo os três protocolos de infecção descritos abaixo:

Protocolo 8- As suspensões fecais positivas para PBV a 10%, livres de fungos, bactérias e protozoários, foram diluídas a 1/5, a fim de diminuir possível citotoxicidade do material, e associadas a 1 µg/ml de tripsina (lote B). Quando as monocamadas apresentavam confluência, as células foram lavadas exaustivamente com PBS pH 7,4 e/ou salina de Hanks, imediatamente antes da infecção. As amostras fecais foram inoculadas em um volume de 200 µl, com adsorção viral realizada em “roller”, por 60 min., a 37°C. Após esta etapa, o inóculo foi mantido e o volume de meio de cada tubo foi completado para 2,0 ml, com a mesma concentração de tripsina (1 µg/ml).

Protocolo 9- As suspensões fecais positivas para PBV a 10%, livres de fungos e bactérias, foram diluídas a 1/5 e adicionadas de 5 µg/ml de tripsina (lote B). Quando as monocamadas apresentavam-se confluentes, as células foram lavadas exaustivamente com PBS pH 7,4 imediatamente antes da infecção. As amostras foram inoculadas em 200 µl por tubo, com a adsorção viral realizada em sistema “roller” por 60 min. a 37°C. Após a adsorção viral, o inóculo foi mantido e os volumes dos tubos foram completados para 2,0 ml, mantendo-se a concentração de tripsina em 5,0 µg/ml.

Protocolo 10- As infecções foram realizadas seguindo os mesmos dados dos protocolos anteriores, exceto pela substituição da protease tripsina pelo soro fetal bovino (SFB) numa concentração de 2%, tanto no período da adsorção viral, quanto no meio de manutenção.

Independentemente do protocolo utilizado, todos os experimentos foram realizados em triplicata ou quadruplicata, mantendo-se sempre triplicatas de controles de células com a protease nas concentrações de 1 e 5 $\mu\text{g/ml}$, objetivando controlar a toxicidade da enzima sobre as células.

Foram realizadas entre 3 e 7 passagens nesse sistema celular.

A amostra F21 foi utilizada ainda em outro experimento, onde a sexta passagem em MA104 foi inoculada novamente seguindo o **protocolo 8**, em trinta tubos com a mesma célula, mantida em sistema “roller”. Após o aparecimento de efeito citopático, os tubos foram congelados e descongelados três vezes, e os sobrenadantes foram ultracentrifugados (Beckman-L8-80M) em colchão de sacarose a 45%, a 100.000 g /4horas. Os precipitados dos tubos foram coletados juntos em um volume de 500 μl , e 100 μl foram utilizados para análise em EGPA.

Essa mesma linhagem celular foi ainda inoculada com outras 18 amostras fecais positivas para PBV, sendo 10 amostras murinas e 8 suínas. Nesses experimentos, os inóculos foram testados apenas até a segunda passagem, utilizando-se o sistema “roller”, por um período de 60 min. para a adsorção viral, em associação a 1 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina (**protocolo 8**).

3.11. Infecção das células da linhagem HT-29.

As células dessa linhagem foram também utilizadas nos ensaios de infecção em três etapas, com protocolos diferentes.

Em uma primeira etapa, foram utilizados 8 inóculos, sendo 6 de origem suína e 2 de origem murina. Essas amostras fecais foram as mesmas utilizadas nas culturas primárias de rim de camundongo, à exceção de uma amostra de origem suína (F8).

Os protocolos de infecção utilizados nessa etapa foram idênticos àqueles dos ensaios de infecção nas culturas primárias de rim de rato e rim de camundongo (**protocolos 1 a 5**).

Numa segunda fase foram empregadas apenas duas amostras fecais positivas para PBV como inóculos sendo ambas de origem murina e denominadas de F9 e F10, ou seja, as mesmas amostras inoculadas na segunda etapa dos ensaios de infecção realizados na linhagem LLC-MK₂.

Assim como as amostras fecais, os protocolos de infecção também foram os mesmos, ou seja, os de números 6 e 7. Em outras palavras utilizou-se apenas a protease tripsina e o período de adsorção viral foi realizado a 150 g/30min., 37°C. As duas amostras fecais foram testadas na forma de suspensões fecais a 10% diluídas a 1/5 e 1/20, ou após ultra-centrifugação, para posteriormente serem diluídas nas mesmas proporções.

Numa terceira etapa dos ensaios com essa linhagem celular, foram utilizadas 14 amostras fecais positivas para PBV, todas de origem suína. Para esses experimentos, os protocolos de infecção foram os seguintes:

Protocolo 11-As suspensões fecais a 10% foram utilizadas sem associação a qualquer enzima;

Protocolo 12-As suspensões fecais a 10% foram adicionadas com 1 µg/ml de tripsina, tanto para a adsorção como para manutenção;

Protocolo 13-As suspensões fecais a 10% foram adicionadas de 1 µg/ml de pancreatina, tanto na adsorção quanto para manutenção.

Em todos esses ensaios as suspensões fecais a 10% foram diluídas a 1/10 e tiveram seus períodos de adsorção realizados através de centrifugação a 150 g/30min., 37°C. Os inóculos foram mantidos e os volumes completados para 1,0 ml.

Nesse sistema celular foram realizadas no máximo sete passagens.

3.12. Infecção das células da linhagem CaCo₂.

Os experimentos de infecção em CaCO₂ foram realizados distintamente, portanto serão relatados separadamente.

Inicialmente, cinco amostras fecais de origem suína foram submetidas a ensaios de acordo com os mesmos protocolos de infecção da terceira etapa de infecção da linhagem HT-29, ou seja, seguindo os **protocolos 11 a 13**.

O segundo grupo de experimentos foi semelhante aos ensaios de infecção realizados com as células de linhagem MA104, ou seja, os protocolos de infecção utilizados foram os mesmos (**8 a 10**), sendo testadas duas amostras de origem murina (F4 e F24) e duas de origem suína (F21 e F23).

Em um terceiro estágio, assim como nos ensaios com MA104, foram testadas 18 amostras, somente em primeira e segunda passagens. Destas 18 amostras, 10 eram de origem murina e 8 de origem suína, visando aumentar a amostragem de inóculos testados e, possivelmente, o número de amostras positivas para PBV em sobrenadantes de primeira passagem. Todas as amostras foram inoculadas em associação à tripsina na concentração de 1 µg/ml, portanto, seguindo apenas o **protocolo 8** de infecção, para a adsorção e para o meio de manutenção. Todos os experimentos foram realizados em sistema “roller”, obedecendo o mesmo tempo de adsorção, mesmo volume de amostra e volume final de meio nos tubos.

3.13. Monitoramento das infecções e coleta dos sobrenadantes de cultura.

Todos os experimentos de infecção foram observados diariamente ao microscópio óptico, por três dias no mínimo. Contudo, ao sinal de alteração celular que pudesse ser caracterizado como efeito citopático, as células foram congeladas e descongeladas três vezes. Após centrifugação rápida para a eliminação de “debris” celulares, parte do sobrenadante celular de cada amostra

foi utilizado como inóculo para as próximas passagens e parte para a extração de ácidos nucleicos para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.14. Imunofluorescência indireta^{31,36}.

Para a realização dessa técnica foram utilizados soros anti-PBV obtidos com imunizações em coelhos, realizadas anteriormente em nosso laboratório, com antígenos (partículas virais) purificados a partir de material fecal, seguindo protocolos de imunização já padronizados³¹, descritos a seguir:

Esquema de imunização:

Primeiro dia- sangria dos animais para obtenção de soro pré-imune; inoculação por via intradérmica de aproximadamente 50 µg de proteínas virais, diluídas em 1 volume de adjuvante de Freund completo e dois volumes de Tween 80 (0,1%);

Décimo quarto dia- Os animais foram novamente inoculados com aproximadamente 50 µg de proteínas virais, em 1 volume de adjuvante de Freund incompleto.

Vigésimo primeiro dia- sangria branca.

Três linhagens celulares foram utilizadas nos testes de imunofluorescência indireta:

- 1-Linhagem LLC-MK₂: nesta linhagem foram inoculadas quatro amostras fecais, sendo duas de origem suína (F1 e F2) e duas de origem murina, (F4 e F5) sempre em primeira passagem;
- 2-Células da linhagem HT-29: foram inoculadas com apenas uma amostra fecal de origem murina, a amostra F9, que foi inoculada em quarta passagem, com sobrenadante celular de infecções realizadas em placas de 24 concavidades e,

3-Linhagem MA104: também foi testada com apenas uma amostra fecal de origem suína, a F21, em sexta passagem, com sobrenadante celular obtido de infecções realizadas em tubos em sistema “roller”.

As células foram ressuspensas após tripsinização para uma concentração de aproximadamente 250.000 células/ml e foram adicionados 50µl por concavidade das lâminas com teflon.

As lâminas foram mantidas a 37°C, a 5% de CO₂, até a confluência da monocamada celular. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e as células foram expostas às amostras fecais positivas para PBV, num volume de 25 µl, associadas à concentração de tripsina a que a amostra fecal vinha sendo exposta nas infecções em placas ou tubos.

O período de adsorção foi realizado em sistema estacionário, por 1 hora a 37°C a 5% de CO₂, quando os inóculos foram retirados e os meios de cultura foram completados para 50 µl/concavidade, mantendo-se a mesma concentração final de tripsina.

Em média, as infecções foram mantidas por 48 horas, ou até o aparecimento de efeito citopático, quando os ensaios foram interrompidos e as células fixadas em acetona gelada por 10 min. Após secagem em temperatura ambiente, as células foram expostas aos antissoros anti-PBV, em diluições seriadas a partir de 1/5, seguindo a diluição em fator 2 até 1/160, por 20 min. a 37°C, e as lâminas foram lavadas com PBS 0,01M pH 7,2, por duas vezes. Após as lavagens as células foram expostas ao antissoro anti-IgG de coelho, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma-F-0382), por 20 min. a 37°C. Após duas lavagens sucessivas, como descrito anteriormente em PBS, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e lamínula e puderam ser lidas em microscopia óptica sob luz ultravioleta.

3.15. Microscopia eletrônica direta.

Os sobrenadantes das culturas foram congelados a -20°C e enviados ao serviço de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, S.P., onde foram analisados pela Dra. Hatune Tanaka.

A técnica de microscopia eletrônica direta (MED) utilizada foi o método de gota reversa ³².

Grades de cobre de 300 mesh recobertas com película de “formvar” e carvão foram colocadas sobre as gotas de sobrenadantes celulares infectados, dispostas em um “parafilm” em porta “tip”. Os orifícios do porta “tip” serviram para individualizar cada reação quando recoberta pelo “parafilm” e pressionados por tubos de ensaio.

Após adsorção da suspensão por 30 min., a grade sensibilizada foi transferida para outro orifício que continha a gota de corante eletrônico (fosfotungstato de sódio a 2%, pH6,4) permanecendo por 2 min. para a coloração.

Após retirada da grade, secou-se o excesso do corante com papel filtro e a amostra assim preparada foi levada para ser analisada em um microscópio eletrônico de transmissão (Philips EM 400T), operando a 80 KV.

Devido à dificuldade de acesso ao equipamento, poucas amostras puderam ser avaliadas por essa técnica.

As amostras analisadas foram:

- cinco suspensões fecais de origem murina que foram utilizadas como inóculos;

- sobrenadantes das cinco primeiras passagens de uma amostra de origem murina, a F4, que foi inoculada adicionada de tripsina, em HT-29 (**protocolo 2**).

- uma amostra suína (F21), por desenvolver e reproduzir, por passagens sucessivas, um efeito citopático característico de replicação viral. Esta amostra, vinha sendo inoculada em células da linhagem MA104, em associação a 1 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina. Foi analisada apenas a sua quinta passagem (**protocolo 8**).

4. Resultados.

4.1. Seleção de amostras fecais positivas para PBV.

Foram selecionadas 31 amostras fecais de origem murina e 25 suínas positivas para PBV, cujas bandas de ácidos nucléicos foram mais intensamente impregnadas pela prata, sugerindo alta concentração viral. Amostras cujos eletroferótipos apresentaram uma certa variação de peso molecular também foram escolhidas (**Figura 1**).

Apesar da aparente alta concentração de ácido nucléico viral nas amostras fecais, suspensões de cinco amostras foram analisadas por MED e em nenhuma delas foi possível visualizar partículas virais sugestivas de PBV.

Todas as amostras selecionadas foram utilizadas em experimentos de infecção dentro de um prazo de no máximo 15 dias após a coleta, de maneira a tentar diminuir a possível perda da infectividade das partículas devido ao armazenamento prolongado. Inclusive, uma das amostras, a F24, foi selecionada por ter infectado ratos sob experimentação em nosso laboratório, e logo em seguida estava sendo inoculada em sistemas celulares.

4.2. Testes de infecção em cultura primária de rim de rato.

Foram testadas 17 (denominadas FA a FR) amostras fecais nesse sistema celular, sendo todas de origem murina, seguindo os protocolos 1-5, ou seja, os inóculos foram ensaiados em diferentes protocolos de infecção. Os resultados são apresentados na **tabela 1**.

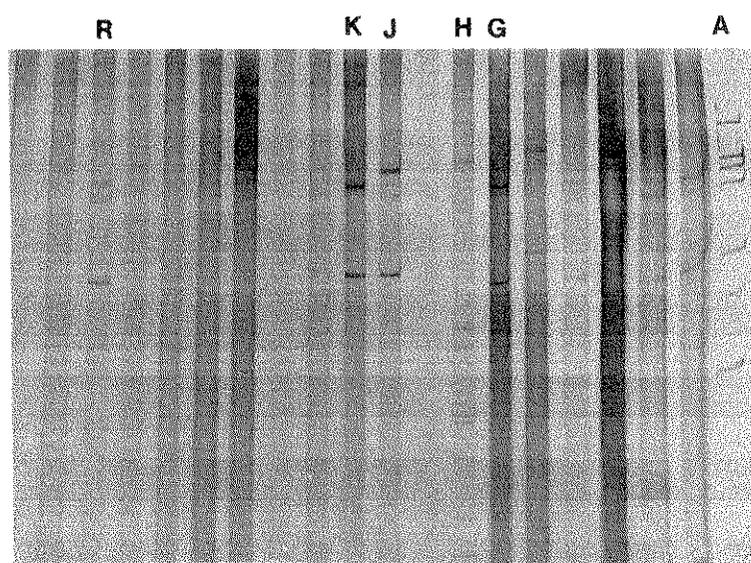


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNAs de picobirnavirus de origem suína, de rotavírus SA-11 (grupo A) e outros rotavírus (grupo não-A).

A- Padrão de rotavírus do grupo A;

G-Amostra fecal F15;

J-Amostra fecal F16;

K-Amostra fecal F17,

R-Amostra fecal F18.

H-Amostra fecal positiva para rotavírus do grupo não-A.

(As canaletas correspondentes às letras G,J,K e R equivalem às amostras selecionadas para serem utilizadas como inóculos).

Após 48-72 horas, mesmo sem o aparecimento de alterações celulares, as células foram congeladas e descongeladas três vezes e os sobrenadantes submetidos ao teste de EGPA.

Foram obtidos 4 resultados positivos de detecção do RNAds de PBV em sobrenadantes celulares, todos em primeira passagem. Os resultados são apresentados na **figura 2**.

Os 4 resultados positivos, apesar de terem ocorrido em experimentos de infecção diferentes, foram obtidos a partir de uma única amostra fecal, de origem murina, denominada por nós de FI. Os experimentos que obtiveram resultados positivos seguiram os seguintes protocolos de infecção:

a- Em duas oportunidades a amostra FI foi inoculada após pré-tratamento com a protease pancreatina numa concentração de 10 µg/ml por um período de 30 min. a 37°C (**protocolo 5**). Após o tratamento enzimático foi realizada a inoculação nas células de cultura primária de rim de rato, com um período de adsorção de 60 min., com agitação periódica. Ao final da adsorção, o meio de cultura foi completado, mantendo-se a concentração final de pancreatina.

Tabela 1. Resultados dos experimentos de infecção em células de cultura primária de rim de rato, com amostras de fezes murinas positivas para PBV, relacionando o número máximo de passagens realizadas, o desenvolvimento de efeito citopático (ECP) e o resultado em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).

| Amostras | Nº máximo de pass. ¹ | ECP | EGPA |
|-------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| FA – FF | 6 | neg. | neg. |
| FG, FH e FJ | 3 | neg. | neg. |
| FI | 3 | morte celular ² | positivo ³ |
| FL – FR | 9 | neg. | neg. |

1- O número máximo de passagens realizadas citado acima é referente aos ensaios seguindo os cinco protocolos de infecção propostos (1-5).

2- O resultado do efeito citopático foi considerado como positivo quando as alterações celulares ocorreram de forma reprodutível nas sucessivas passagens, não sendo considerados portanto casos esporádicos de alterações morfológicas celulares.

3- A amostra FI foi positiva para PBV em sobrenadantes de 4 experimentos, na primeira passagem, associada ou não às proteases tripsina e pancreatina.

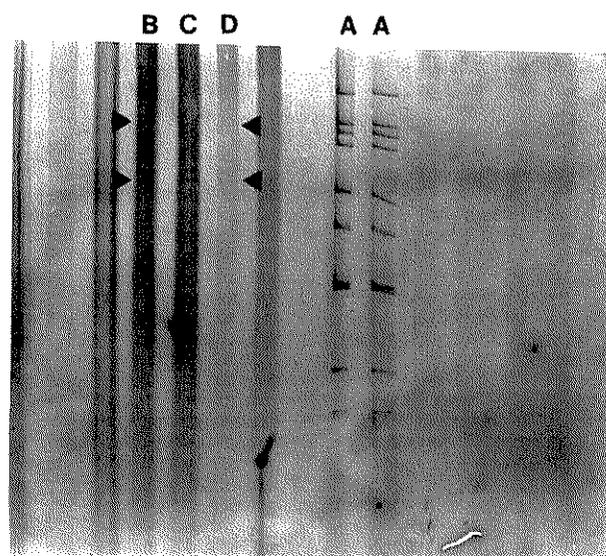


Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNAs de picobirnavírus de sobrenadantes de primeira passagem de culturas primárias de rim de rato, após inoculação com amostra murina FI, com diferentes proteases.

- A- Padrão de rotavírus do grupo A;
- B- Amostra inoculada com pancreatina;
- C- Amostra inoculada com tripsina, e
- D- Amostra inoculada sem proteases.

O experimento foi mantido por apenas 24 horas, quando houve morte celular intensa. Com o teste interrompido, as culturas foram congeladas e descongeladas por 3 vezes, quando os sobrenadantes celulares foram coletados para análise em EGPA.

b- O mesmo inóculo foi também positivo em sobrenadante de primeira passagem, quando foi utilizado o protocolo de infecção com a tripsina em uma concentração de 10 µg/ml (**protocolo 2**), com tempo e modo de adsorção viral idênticos ao anterior. Passadas 24 horas da infecção, com a ocorrência de morte celular, repetiram-se os procedimentos realizados com a amostra anterior.

c- A quarta detecção do RNAs do PBV em sobrenadante de primeira passagem com a amostra FI ocorreu quando foi inoculada sem qualquer enzima (**protocolo 1**). Da mesma forma, após 24 horas da infecção, o experimento foi interrompido, também em função de morte celular, procedendo-se da mesma maneira.

Esta amostra FI foi inoculada até a terceira passagem seguindo esses protocolos de infecção, sendo que em nenhuma outra passagem o ácido nucleico do PBV foi detectado.

Em todas as outras amostras testadas nesse sistema celular, das quais algumas foram inoculadas até a sexta passagem e outras até a nona passagem, o resultado em EGPA foi negativo (**Tabela 1**).

Nenhuma alteração celular, além da completa destruição da monocamada ocorrida com as amostras positivas em primeira passagem pode ser observada de forma que pudesse caracterizar um efeito citopático e/ou sugerisse replicação viral.

4.3. Testes de infecção em cultura primária de rim de camundongo.

Nesse sistema celular foram utilizadas 7 amostras fecais positivas para PBV (F1-F7) como inóculos, sendo 5 de origem suína e 2 de origem murina (F4 e F5). Os resultados são apresentados na **tabela 2**.

As infecções foram até a quarta passagem com todas as amostras utilizadas, seguindo os protocolos de infecção de números 1 a 5.

Apesar dos protocolos de infecção serem semelhantes aos utilizados para as culturas primárias de rim de rato, em nenhum sobrenadante de primeira ou de passagens posteriores, foi detectado o ácido nucléico característico do PBV.

Tabela 2. Resultados dos experimentos de infecção em células de cultura primária de rim de camundongo, com amostras de fezes positivas para PBV, relacionando o número máximo de passagens realizadas, o desenvolvimento de efeito citopático (ECP) e o resultado em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).

| Amostras | Nº máx. de pass. ² | ECP | EGPA |
|----------------------|-------------------------------|------|------|
| F1 - F7 ¹ | 4 | neg. | neg. |

1- As amostras fecais F4 e F5 são de origem murina, as outras são de origem suína.

2- O número máximo de passagens realizadas citado acima é referente aos ensaios seguindo os cinco protocolos de infecção propostos.

Nas observações diárias ao microscópio óptico, não foi detectada nenhuma alteração celular que pudesse sugerir um efeito citopático decorrente de replicação viral.

4.4. Testes de infecção com a linhagem celular LLC-MK₂.

Nessa linhagem celular foram testados, numa primeira etapa, quatro inóculos diferentes, sendo dois de origem suína (F1 e F2) e dois de origem murina (F4 e F5). Todos os ensaios de infecção foram realizados em garrafas e não em placas, logo o período de adsorção viral foi realizado sob agitação

periódica e não sob centrifugação como em outros protocolos já descritos. Os resultados são apresentados na **tabela 3**.

Todas as amostras foram inoculadas até a sexta passagem, seguindo os protocolos de 1 a 5.

Uma das amostras fecais de origem murina, a F4, teve seu sobrenadante de primeira passagem positivo para PBV, em eletroforese em gel de poliacrilamida (resultado não demonstrado). Essa amostra foi positiva quando foi inoculada após pré-tratamento com 10 µg/ml de tripsina (**protocolo 4**), tendo um período de adsorção de 90 min., sob agitação periódica, após os quais, o inóculo foi mantido na garrafa e o meio de cultura foi completado, mantendo-se a concentração enzimática.

Nos ensaios de infecção realizados com a amostra F4 não foi detectada qualquer alteração celular que pudesse ser caracterizada como efeito citopático, nem mesmo na primeira passagem.

Tabela 3. Resultados dos experimentos de infecção em células da linhagem LLC-MK₂, com amostras fecais positivas para PBV, relacionando o número máximo de passagens realizadas, o desenvolvimento de efeito citopático (ECP) e o resultado em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).

| Amostras | Nº máx. de pass. ¹ | ECP ² | EGPA |
|----------|-------------------------------|------------------|---------------------------------------|
| F1 | 6 | positivo | positivo p/ rotavírus ³ |
| F2 | 6 | neg. | neg. |
| F4 | 6 | neg. | positivo p/ PBV ⁴ |
| F5 | 6 | neg. | neg. |
| F9 e F10 | 5 | neg. | neg. |

1- O número máximo de passagens realizadas citados acima são referentes aos ensaios seguindo todos os protocolos de infecção propostos.

2- O resultado do efeito citopático foi considerado como positivo quando as alterações celulares ocorreram de forma reprodutiva nas sucessivas passagens, não sendo considerados, portanto, casos esporádicos de alterações morfológicas.

3- Essa amostra apresentou ECP logo nas primeiras passagens, contudo apenas no sobrenadante de quinta passagem foi detectado o RNAd característico de rotavírus do grupo A.

4- A amostra F4 teve seu sobrenadante de primeira passagem positivo para PBV por EGPA.

Por outro lado, uma das amostras fecais de origem suína (F1) levou a uma alteração celular logo nas primeiras passagens, contudo sem a detecção do ácido nucléico do PBV, podendo significar uma baixa concentração desses vírus ou a replicação de um outro vírus qualquer.

Com o desenvolvimento sucessivo de ECP, e a não detecção do ácido nucléico, optou-se por realizar a técnica de imunofluorescência indireta para todas as amostras fecais que vinham sendo utilizadas como inóculo nessa linhagem celular (F1, F2, F4 e F5). Entretanto, nenhuma das amostras reagiu com antissoro anti-PBV, levando a resultados negativos.

Posteriormente, em passagens sucessivas, pode-se detectar o RNAd característico dos rotavírus do grupo A

Numa segunda etapa dos ensaios de infecção com essa linhagem celular, foram testadas duas amostras fecais de origem murina, F9 e F10. Utilizou-se de força centrífuga para a realização do período de adsorção viral, seguindo os protocolos 6 e 7.

Apesar da baixa força centrífuga relativa aplicada ao sistema (150g), as células de LLC-MK₂ apresentaram, após algumas horas de ensaio, alterações morfológicas decorrentes da centrifugação, com morte celular após 24 a 48 horas em média.

Em função do comportamento das células dessa linhagem frente à centrifugação, ou seja, a monocamada celular não se manteve íntegra, os experimentos voltaram a ser realizados em garrafas.

Não foi possível observar qualquer alteração celular que pudesse sugerir uma replicação viral nas passagens subsequentes. Também não foi detectado o ácido nucléico viral do PBV por eletroforese em gel de poliacrilamida nos sobrenadantes celulares.

4.5.Experimentos de infecção com a linhagem celular HT-29.

Numa primeira etapa dos experimentos de infecção com essa linhagem, utilizando os inóculos de seis amostras fecais de origem suína (F1, F2, F3, F6-F8) e as duas de origem murina (F4 e F5), os mesmos foram inoculados até a sétima passagem, seguindo os protocolos 1 a 5 (Tabela 4).

Dentre os oito inóculos testados, dois tiveram sobrenadantes celulares positivos para PBV por EGPA, sendo uma amostra de origem suína denominada de F2 (Figura 3) e outra de origem murina denominada F4 (Figura 4), sendo essa última, a mesma amostra que foi positiva quando inoculada em células da linhagem LLC-MK₂.

A amostra F2 foi positiva quando inoculada seguindo o protocolo 2 de infecção, com tripsina numa concentração de 10 µg/ml, realizado em placas de 24 concavidades. A adsorção viral foi realizada durante 60 min., com agitação

Tabela 4. Resultados dos experimentos de infecção em células da linhagem HT-29, com amostras de fezes positivas para PBV, adicionadas ou não de pancreatina e tripsina, relacionando o número máximo de passagens realizadas, o desenvolvimento de efeito citopático (ECP) e o resultado em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).

| Amostras | Pass. Pré-trat. Tripsina | Pass. Pré-trat. Pancreatina | Associado à tripsina | Associado à pancreatina | Sem proteases | ECP ¹ | EGPA |
|-----------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------|-------------------------|---------------|------------------|------------------------------|
| F1 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | neg. | neg. |
| F2 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | positivo | positivo p/ PBV ² |
| F3 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | neg. | neg. |
| F4 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | positivo | positivo p/ PBV ³ |
| F5 - F8 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | neg. | neg. |
| F9 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | positivo | neg. |
| F10 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | neg. | neg. |
| F1, F2, F8, F13 e F14 | - | - | 5 | 6 | 5 | neg. | neg. |
| F15 - F18 | - | - | 5 | 5 | 5 | neg. | neg. |
| F19 | - | - | - | - | 3 | neg. | neg. |
| F20 - F23 | - | - | 3 | 3 | 3 | neg. | neg. |

- 1- O resultado do efeito citopático foi considerado como positivo quando as alterações celulares ocorreram de forma reprodutiva nas sucessivas passagens, não sendo considerados portanto casos esporádicos de alterações morfológicas.
- 2- A amostra F2, teve seu sobrenadante de primeira passagem positivo para PBV por EGPA, quando inoculada com tripsina.
- 3- A amostra F4 foi positiva para PBV em EGPA em duas oportunidades, quando foi inoculada com tripsina e com pancreatina.

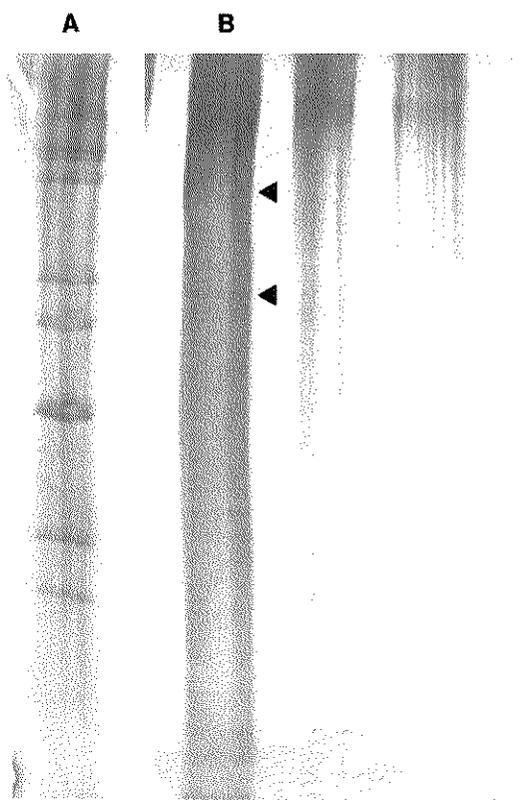


Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNAs de picobirnavírus de sobrenadantes de primeira passagem da linhagem HT-29, após inoculação com amostras de fezes positivas para PBV.

A- Padrão de rotavírus do grupo A.

B- Duas bandas de RNAs sugestivas de PBV onde o inóculo de origem suína foi utilizado com tripsina a $10\mu\text{g/ml}$.

periódica e, após a mesma, os inóculos foram mantidos completando-se os volumes do meio e mantendo-se a concentração final da enzima.

Após 48 horas de infecção, foi observado um arredondamento celular, quando então a infecção foi interrompida, as células congeladas e descongeladas por três vezes para realizar a coleta das amostras para a análise em EGPA (resultados não demonstrados).

A amostra murina F4 já tinha sido positiva para PBV por EGPA em sobrenadante de primeira passagem quando inoculada em LLC-MK₂, e agora em HT-29 foi detectada em sobrenadante de primeira passagem em duas oportunidades diferentes. A primeira delas ocorreu quando a amostra foi inoculada com tripsina em uma concentração de 10 µg/ml, com 60 min. de adsorção, mantendo-se o inóculo (**protocolo 2**). Após aproximadamente 48 horas da infecção houve uma alteração celular que levava ao arredondamento, quando o experimento foi interrompido para a coleta das amostras (**Figura 4**).

Em um segundo experimento, a amostra F4 foi inoculada com pancreatina em concentração também de 10 µg/ml (**protocolo 3**), sendo que após 48 horas de infecção também se detectou uma alteração celular com arredondamento, quando o experimento foi interrompido e procedeu-se de maneira semelhante às anteriores (resultado não demonstrado).

De maneira geral, nas seis passagens posteriores da amostra F4, as alterações celulares foram mantidas, entretanto com resultados negativos por EGPA. Os sobrenadantes das cinco primeiras passagens foram analisados por MED e foram todos negativos para partículas virais.

Em nenhum dos experimentos com as outras seis amostras fecais positivas para PBV utilizadas como inóculos que também foram até a sétima passagem, seguindo os vários protocolos de infecção, pode-se detectar o RNAs dos PBV, ou qualquer alteração celular que pudesse ser sugestiva de replicação viral.

Na segunda etapa dos experimentos de infecção com as células da linhagem HT-29 foram utilizadas apenas duas amostras fecais positivas para PBV como inóculos, sendo ambas de origem murina (F9 e F10). As amostras

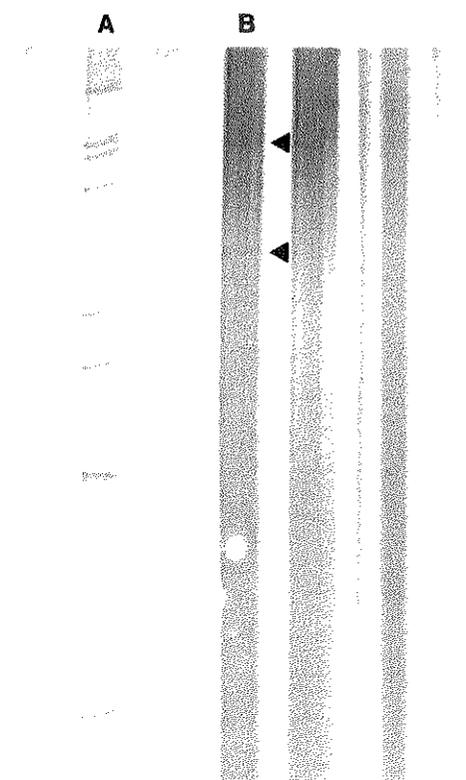


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNAds de picobirnavírus de sobrenadante de primeira passagem da linhagem celular HT-29, após inoculação com amostra de fezes positiva para PBV, onde o inóculo de origem murina foi utilizado com tripsina a 10 $\mu\text{g/ml}$.

A- Padrão de rotavírus do grupo A;

B- Duas bandas de RNAds sugestivas de PBV.

foram inoculadas com tripsina, com o período de adsorção viral sendo realizado sob centrifugação. As amostras fecais foram associadas à tripsina após terem sido diluídas a 1/5 e 1/20, e também quando ultracentrifugadas, visando a concentração viral.

As inoculações foram feitas até a sétima passagem e, entretanto, em nenhum dos experimentos pode-se detectar por EGPA o RNAd característico dos PBV.

Foram observadas algumas alterações celulares caracterizadas por aumento de granulação citoplasmática e arredondamento celular com a amostra F9 nas sucessivas passagens com diluição 1/5 (resultados não demonstrados). Já na diluição 1/20 as alterações foram mais tênues. Em função do provável ECP e da não detecção do ácido nucleico viral, optou-se pela realização dos testes de imunofluorescência indireta, que foram todos negativos.

Na terceira etapa de experimentos com as células dessa linhagem foram utilizadas 14 amostras fecais positivas para PBV, sendo todas de origem suína.

Todos os experimentos de infecção foram realizados em placas de 24 concavidades. Foram utilizadas inoculações com tripsina e pancreatina, na concentração de 1 µg/ml.

Quatro dessas amostras foram inoculadas até a terceira passagem, seguindo os três protocolos de infecção propostos; as demais foram inoculadas até, no mínimo a quinta passagem, e algumas até a sexta passagem.

Em nenhum dos sobrenadantes celulares dos experimentos realizados com essas amostras pode ser detectado o ácido nucléico característico dos PBV por EGPA. Também em nenhum dos experimentos ocorreu qualquer alteração celular que pudesse ser caracterizada como ECP.

4.6.Experimentos de infecção com a linhagem MA104.

Com o objetivo de utilizar-se a protease tripsina em concentrações sublimiáres ou não àquela que induzisse efeito citóxico, foram realizados testes com essa linhagem celular, e também com a CaCO_2 , como poderá ser observado mais adiante, frente às várias concentrações da enzima, como descrito no item 3.6 de material e métodos.

Ao microscópio óptico foi observado um comportamento muito semelhante à exposição à tripsina por parte das duas linhagens celulares. Com 1 $\mu\text{g/ml}$, não houve qualquer alteração celular e, a partir de 2 $\mu\text{g/ml}$ puderam ser observadas algumas células arredondadas e soltando-se da monocamada celular. Ocorreu uma destruição parcial da monocamada celular com a utilização da concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$. Concentrações superiores a essa levaram à destruição total da monocamada antes de 48 horas. Portanto, optou-se por trabalhar com as concentrações de 1 e de 5 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina, tanto para a adsorção viral quanto para a manutenção das células em experimentação.

Na **tabela 5** podem ser observados todos os resultados dos experimentos de infecção realizados com células da linhagem MA104.

Seguindo os parâmetros citados acima, três amostras foram testadas na linhagem MA104. A amostra de origem murina F4 foi ensaiada por sete passagens seguidas. Cada experimento foi mantido em média por três dias, após os quais os tubos foram congelados e descongelados por três vezes, para então os sobrenadantes serem utilizados como inóculos para passagens posteriores. Uma alíquota foi reservada para, após clarificação e retirada dos debris celulares, realizar-se a extração de ácidos nucléicos virais por fenol-clorofórmio.

Em nenhuma das sete passagens realizadas com essas amostras, nas três variáveis de infecção propostas, foi possível observar qualquer alteração celular, além do arredondamento celular causado quando da concentração de tripsina a 5 $\mu\text{g/ml}$. Também em nenhum dos sobrenadantes celulares pode ser detectado, por EGPA, o ácido nucléico característico dos picobirnavírus.

A segunda amostra testada na linhagem MA104 foi a F21, de origem suína, também já utilizada anteriormente. Essa amostra, em particular,

desenvolveu um ECP (dados não demonstrados) com alteração da granulação citoplasmática e da morfologia celular, com posterior morte e destruição total da monocamada celular.

Esse inóculo começou a induzir esse ECP a partir da terceira passagem, quando associado a 1 µg/ml de tripsina. Não foi possível observar efeito citopático semelhante pela própria citotoxicidade da enzima, em culturas com 5 µg/ml da mesma protease.

Como as amostras foram inoculadas sete vezes consecutivas nas células, pode-se observar o aumento de intensidade do ECP, principalmente quando o inóculo foi adicionado de 1 µg/ml de tripsina, tendo seu ECP máximo aparentemente ocorrendo entre as passagens de número seis e sete, nas

Tabela 5. Resultados dos experimentos de infecção em células da linhagem MA104, com amostras de fezes positivas para PBV, relacionando o número máximo de passagens realizadas para cada protocolo de infecção, o aparecimento de efeito citopático¹ (ECP) o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e da microscopia eletrônica direta² (MED).

| Amstras | Número de Passagens com | | | ECP | EGPA | MED |
|---------|-------------------------|------------------|--------|----------|------|-----------------------|
| | 1µg/ml tripsina. | 5µg/ml tripsina. | 2% SFB | | | |
| F4 | 7 | 7 | 7 | neg. | neg. | - |
| F21 | 7 | 7 | 7 | positivo | neg. | positivo ² |
| F23 | 7 | 7 | 7 | neg. | neg. | - |
| F25-F42 | 1 | - | - | neg. | neg. | - |

1. O resultado do efeito citopático foi considerado como positivo quando as alterações celulares ocorreram de maneira reprodutível nas sucessivas passagens, não sendo considerados, portanto, casos esporádicos de alterações morfológicas.
2. A única amostra analisada por microscopia eletrônica direta foi o sobrenadante de quinta passagem da amostra fecal F21, que foi positiva para partículas virais com diâmetro semelhantes ao do PBV em sobrenadante de quinta passagem quando inoculada seguindo o protocolo 8.

quais houve destruição mais violenta e de forma mais rápida da monocamada celular.

Entretanto, com a adição de SFB a 2%, a partir da quinta passagem, pode ser observado um ECP muito parecido, porém menos intenso e sem uma aparente evolução que pudesse sugerir um aumento de título viral como ocorreu com a adição de tripsina a 1 µg/ml.

Essa amostra, seguindo apenas a variável com 1 µg/ml de tripsina, foi inoculada até a décima passagem. Porém, a partir da oitava passagem não mais se utilizou o sistema “roller” de cultura para as infecções, que passaram então a serem feitas em garrafas de 10,0 ml e em fase estacionária, visando aumentar o volume da suspensão de vírus proveniente do sobrenadante celular. Contudo o ECP foi regredindo e interromperam-se então os experimentos na décima passagem.

Outro experimento realizado objetivando aumentar o volume da suspensão viral, foi a inoculação da sexta passagem desse inóculo em aproximadamente 30 tubos, onde, após o aparecimento do ECP, a infecção foi interrompida e os sobrenadantes foram ultracentrifugados em colchão de sacarose. O precipitado foi ressuspenso em um volume 100 vezes menor (50ml para 500µl). Do volume final foram utilizados 100µl para análise em EGPA.

Apesar de todas as evidências sugerirem a multiplicação viral, em nenhum dos sobrenadantes de todos esses experimentos, inclusive do material concentrado por ultracentrifugação, foi possível detectar o RNAs característico dos PBV.

O sobrenadante de quinta passagem foi clarificado e enviado para análise em microscopia eletrônica direta, no Instituto Adolfo Lutz, S.P.. Foram detectadas partículas virais de dois tamanhos diferentes, uma com aproximadamente 21nm e outras ao redor de 31 nm de diâmetro, essas últimas sugestivas de partículas de picobirnavírus (**figuras 5 e 6**). Os sobrenadantes celulares das passagens anteriores e posteriores à quinta não puderam ser analisados por microscopia eletrônica direta, assim como os sobrenadantes dos experimentos de infecção com adição de SFB.

A amostra fecal F21 foi ainda utilizada para infecção em sexta passagem para a realização de testes de imunofluorescência indireta. Contudo, apesar de

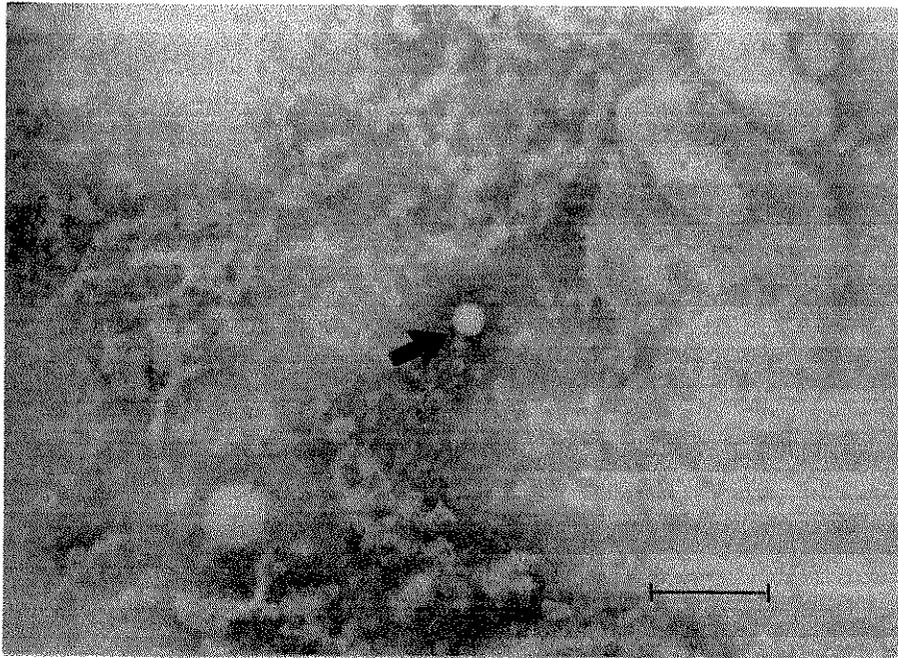


Figura 5. Fotomicrografia eletrônica de sobrenadante de quinta passagem da amostra fecal F21, inoculada em MA104, revelando partícula sugestiva de PBV com diâmetro aproximado de 30 nm, esférica e sem definição de estrutura de superfície. Aumento: 210.000 X. Barra = 100nm.

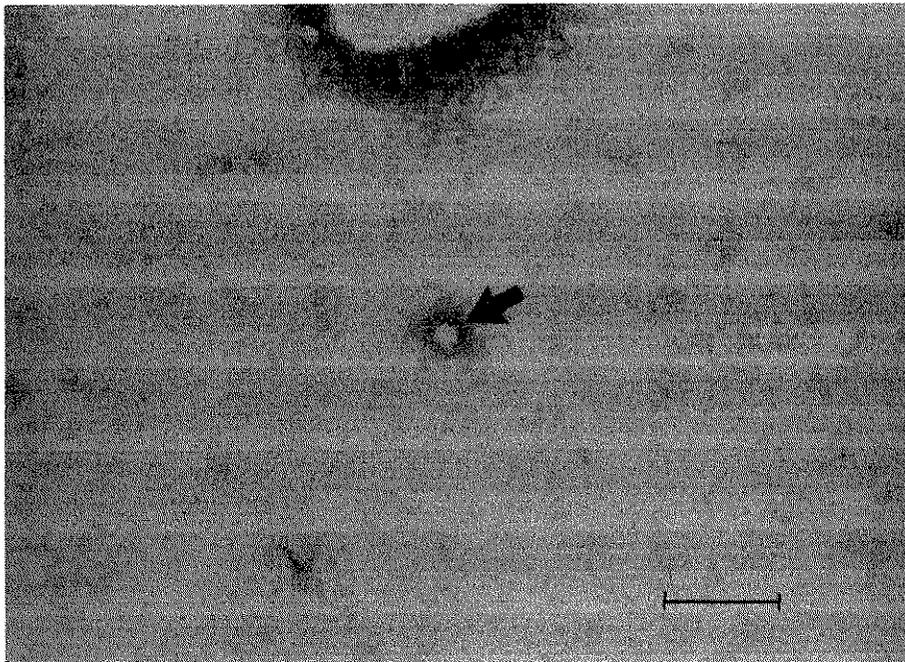


Figura 6. Fotomicrografia eletrônica de sobrenadante de quinta passagem da amostra fecal F21, inoculada em MA104, revelando partícula viral com diâmetro aproximado de 21 nm. Aumento 210.000 X. Barra = 100 nm.

todos os seus resultados positivos em MED, e apesar do desenvolvimento de ECP, seus resultados em IFI foram negativos.

Com a terceira amostra utilizada (F23) para os ensaios de infecção nas células da linhagem MA104, e que foi inoculada até a sétima passagem seguindo as três variáveis, em nenhum dos experimentos pode ser observada qualquer alteração celular que pudesse ser caracterizada como efeito citopático. Igualmente, em nenhum dos sobrenadantes celulares analisados por EGPA, foi possível detectar o RNAds característico dos PBV.

Com os experimentos de infecção realizados nas duas linhagens celulares com as 10 amostras murinas e 8 suínas, nenhuma alteração celular foi detectada que pudesse ser caracterizada como efeito citopático e, após corrida eletroforética, todos os sobrenadantes celulares foram negativos para PBV.

4.7.Experimentos de infecção com a linhagem CaCo₂.

Nos primeiros experimentos realizados com essa linhagem foram testadas cinco amostras fecais positivas para PBV de origem suína (F16-F20), sendo as amostras ensaiadas até a segunda passagem.

Nesses experimentos de infecção realizados, não foi detectado o RNAds dos PBV em nenhum sobrenadante celular, assim como nenhuma alteração celular de forma progressiva, nas passagens sucessivas, que pudessem caracterizar efeito citopático.

Em um segundo período de infecções nessa linhagem celular, quando foram testadas as duas amostras fecais de origem murina (F4 e F24), e as duas de origem suína (F21 e F23), todas chegaram a ser ensaiadas por sete passagens (**Tabela 6**).

Como já relatado em material e métodos, os protocolos (**8 a 10**) utilizados para os ensaios de infecção nas células da linhagem celular CaCo₂ são fundamentalmente iguais aos utilizados para as células da linhagem MA104.

Em nenhum dos experimentos realizados com as quatro amostras foi possível detectar qualquer alteração celular que pudesse ser caracterizada como um efeito citopático e, em nenhum dos sobrenadantes celulares pode-se detectar, através de EGPA, o ácido nucléico característico dos PBV.

Também com a amostra fecal F24, que foi incluída em função de ter infectado experimentalmente ratos em nosso laboratório, contendo portanto partículas virais infectivas, não foi observada qualquer alteração celular que pudesse ser interpretada como efeito citopático, nem nos sobrenadantes celulares houve a detecção, através de EGPA, de ácidos nucléicos que sugerissem o RNAds típico dos PBV.

Com os experimentos de infecção realizados nas duas linhagens celulares com as 10 amostras murinas e 8 suínas, nenhuma alteração celular foi detectada que pudesse ser caracterizada como efeito citopático e, após corrida eletroforética, uma das amostras fecais de origem murina, a F31, teve seu sobrenadante de primeira passagem positivo para PBV por EGPA (**protocolo 8**), ainda que de maneira muito sutil, o que impossibilitou o registro do resultado através de fotografia.

Essa amostra foi ainda ensaiada até a terceira passagem seguindo as mesmas condições de experimentação e os sobrenadantes de segunda e terceira passagens foram negativos por EGPA para o RNAds característico dos PBV.

TABELA 6. Resultados dos experimentos de infecção em células da linhagem CaCo₂, relacionando as amostras fecais utilizadas como inóculo, adicionadas ou não de pancreatina e tripsina, o número máximo de passagens realizadas para cada protocolo de infecção, o aparecimento de efeito citopático¹ (ECP) e o resultado em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).

| Amostras | Passagens s/ proteases | Passagens c/1µg/ml tripsina | Passagens c/1µg/ml pancreatina | Passagens c/5µg/ml tripsina | Passagens c/ 2% SFB | ECP | EGPA |
|----------|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|------|-----------------------|
| F16-F20 | 2 | 2 | 2 | | | neg. | neg. |
| F4 | | 7 | | 7 | 7 | neg. | neg. |
| F21 | | 2 | | 2 | 2 | neg. | neg. |
| F23 | | 7 | | 7 | 7 | neg. | neg. |
| F24 | | 4 | | 4 | 4 | neg. | neg. |
| F25-F30 | | 1 | | | | neg. | neg. |
| F31 | | 3 | | | | neg. | positivo ² |
| F32-F42 | | 1 | | | | neg. | neg. |

1. O resultado do efeito citopático foi considerado como positivo quando as alterações celulares ocorreram de forma reprodutível nas passagens sucessivas, não sendo considerados, portanto, casos esporádicos de alterações morfológicas.
2. A amostra F31 teve apenas o sobrenadante de primeira passagem positiva para PBV por EGPA, quando inoculada seguindo o protocolo 8.

Para finalizar, serão apresentados de forma sucinta, os resultados mais expressivos, que podem ser visualizados na **tabela 7**.

Quatro amostras fecais quando inoculadas nos sistemas celulares tiveram os sobrenadantes de primeira passagem positivos para PBV por EGPA: a amostra murina FI, seguindo os protocolos 1, 2 e em duas oportunidades seguindo o protocolo 5, todos em cultura primária de rim de rato.

A amostra suína F2, seguindo o protocolo 2, em HT-29.

A amostra murina F4, seguindo o protocolo 4 em LLC-MK₂, e em outros dois experimentos seguindo os protocolos 2 e 3 em HT-29.

A amostra F31, também de origem murina, seguindo o protocolo 8, em CaCo₂.

Logo, 3 (FI, F4 e F31) das 31 amostras fecais de origem murina testadas, foram positivas para PBV em sobrenadantes de primeira passagem, e

em 8 ensaios diferentes, enquanto das 25 amostras suínas testadas, apenas uma (F2) foi positiva, e em apenas um experimento.

Com relação à presença de proteases nas inoculações, os inóculos FI, F2, F4 e F31 tiveram seus sobrenadantes de primeira passagem positivos para PBV por EGPA quando adicionados de tripsina, enquanto os inóculos FI e F4, também tiveram resultados positivos, quando adicionados de pancreatina. Apenas o inóculo FI, teve resultado positivo em sobrenadante de primeira passagem, quando inoculado sem a adição de qualquer protease.

Entretanto apenas as amostras FI e F4 foram positivas após pré-tratamento com proteases.

Tabela 7. Lista das amostras que tiveram resultados positivos para picobirnavírus (PBV) em sobrenadantes de primeira passagem, relacionando os sistemas celulares, os protocolos em que as mesmas foram inoculadas e que resultaram em resultados positivos e negativos por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), e em microscopia eletrônica direta (MED).

| Sistema celular | Amostra | Protocolo positivo para PBV por EGPA | Protocolo negativo para PBV por EGPA | Protocolo positivo por MED |
|---------------------------------|--------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Cultura primária de rim de rato | F1 - murina | 1, 2 e 5 | 3 e 4 | Não analisado |
| LLC-MK ₂ | F4 - murina | 4 | 1, 2, 3 e 5 | Não analisado |
| | F2 - suína | | 1, 2, 3, 4 e 5 | Não analisado |
| HT-29 | F4 - murina | 2 e 3 | 1, 4 e 5 | Negativo |
| | F2 - suína | 2 | 1, 3, 4 e 5 | Não analisado |
| CaCo ₂ | F4 - murina | | 8, 9 e 10 | Não analisado |
| | F31 - murina | 8 | 9 e 10 | Não analisado |
| MA104 | F4 - murina | | 8, 9 e 10 | Não analisado |
| | F21 - suína | | 8, 9 e 10 | Positivo para partículas c/ 21 e 31nm |

5. Discussão.

Considerando que os picobirnavírus foram descobertos e relatados pela primeira vez em 1988⁵⁰ e, em seguida, vários pesquisadores, tanto brasileiros como de outros países, o detectaram em fezes de vários hospedeiros^{1,25,40,42,51,52}, seria de se esperar que os estudos sobre suas características estruturais, bem como de replicação tivessem sido melhor elucidados, assim como, estivessem disponíveis várias técnicas para o seu diagnóstico.

Contudo, em função de haver uma única fonte de vírus conhecida até o momento, que são as fezes dos animais onde os vírus são liberados, e esse tipo de material ser de constituição muito complexa, aliado ao fato de, caracteristicamente, os PBV serem eliminados nas fezes em baixas concentrações, tem sido de extrema dificuldade estudá-los.

Logo nos primeiros relatos foram identificados seus dois segmentos genômicos como sendo constituídos por RNAs e os seus respectivos pesos moleculares^{1,42,50,51,52}. O tamanho, a morfologia das partículas virais, e suas densidades em gradientes de cloreto de céσιο, foram também definidos^{50,52}.

Estudos relativos a seus hospedeiros, sejam humanos^{9,14,27,43} ou outros animais^{25,26} também têm sido descritos com certa frequência. Entretanto, seu papel como agente associado a alguma patogenia ainda permanece indefinido, sendo que vários pesquisadores têm tentado associá-los a quadros de gastroenterites. Porém, como esses vírus têm sido identificados tanto em amostras fecais normais como diarréicas, ainda não há uma conclusão sobre seu verdadeiro papel nesses quadros clínicos^{9,26,42}.

Na tentativa de elucidar algumas das suas características, e pensando na dificuldade de obtenção de vírus em animais de vida livre, Gatti²⁶, desenvolveu um modelo animal para a replicação desses vírus. A autora baseou-se nos dados de Pereira et al.⁵¹ que haviam detectado, através de EGPA, o PBV em fezes de ratos de vida livre, para infectar experimentalmente ratos gnotobióticos com suspensões fecais positivas para PBV, livres de fungos, bactérias e de protozoários, oriundas também de ratos. Apesar da liberação viral nas fezes, em

nenhum momento foram detectadas fezes diarréicas nos animais sob experimentação.

A partir destes experimentos foi obtido um modelo experimental para a produção de vírus, contudo mantinha-se o fato de contar com os mesmos apenas em fezes. Mesmo nesses animais onde foram observadas, através de EGPA, altas impregnações das bandas de ácido nucléico viral, sugestivas de altas concentrações de partículas virais, quando tais suspensões fecais foram analisadas por MED, novamente foi constatado que a concentração de partículas era muito baixa^{22,23,24}, mesmo após purificação em gradientes de CsCl ou após concentração em colchão de sacarose.

Já pensando nessas dificuldades Pereira et al.⁵², assim como Gatti* (com. pessoal), tentaram adaptar esses vírus em sistemas de culturas celulares, visando obter altos títulos virais e simplificar o processo de purificação das partículas virais. Para isso, esses autores utilizaram tanto culturas primárias, como algumas linhagens estabelecidas de célula de origem animal, bem como a utilização da protease tripsina, na tentativa de promover a ativação viral. Já nesses experimentos os autores conseguiram identificar o RNAds característico dos PBV em sobrenadantes de primeira passagem, porém, sem a detecção dos mesmos em passagens subsequentes.

Segundo Pereira et al.⁵² a detecção do RNAds de PBV em sobrenadante de cultura celular de primeira passagem para algumas das amostras testadas, e a não detecção de outras, sempre retirando os inóculos após a adsorção, é sugestivo de replicação viral provavelmente do tipo abortiva, e possivelmente com formação de partículas virais defectivas, no primeiro ciclo, interrompendo assim a replicação dos mesmos. Ainda seria possível que essas células não fossem permissivas a todas as etapas da multiplicação viral.

Apesar da bem sucedida multiplicação desses vírus em modelos animais²⁶ e da sua provável replicação, ainda que somente em primeira passagem em

* Gatti, M.S.V. Lab. Virologia, Instituto de Biologia- UNICAMP.

sistemas celulares⁵², sugerindo a origem animal dos PBV, muitos trabalhos têm aventado a possibilidade desses vírus não estarem infectando os hospedeiros nos quais têm sido identificados, mas sim microrganismos simbiotes do trato intestinal dos animais^{1,22,23,24,25,26,27}. Os autores têm sugerido que esses vírus, cujo ácido nucléico é constituído por RNAs, sejam possíveis bacteriófagos, micovírus, vírus de protozoários ou, até mesmo, aventa-se a hipótese de serem vírus de plantas que estariam sendo ingeridos juntamente com os alimentos e eliminados nas fezes, sem que sejam replicados nas células intestinais^{26,51}.

Alguns trabalhos que surgiram na literatura, logo após a descoberta desses vírus, contrapõem fortemente as argumentações anteriores, que, além das já relatadas na introdução, seriam: **1-** A detecção das bandas de RNAs altamente impregnadas pela prata nos géis de poliacrilamida e apresentando-se de forma equimolar⁵⁰, o que não é característica dos vírus de fungos e de protozoários uma vez que os segmentos genômicos são encapsidados separadamente^{33,34,53}; **2-** No caso desses vírus terem sido ingeridos juntamente com a alimentação, muito provavelmente não seriam detectados por EGPA em função de suas baixas concentrações nas fezes²⁶; **3-** Os animais adultos, tanto ratos como suínos, são alimentados à base de ração normalmente industrializada, o que dificulta ainda mais as possibilidades dos PBV estarem sendo ingeridos com a alimentação, e não sendo, portanto, vírus de plantas; **4-** Um outro fator é a detecção, na luz intestinal, de complexos PBV-anti-PBV, provando que esses vírus induzem a formação de coproanticorpos^{22,44}, o que é normalmente característico dos vírus que se replicam nas células do epitélio intestinal, apesar de já terem sido relatados na literatura coproanticorpos anti-bacteriófagos²⁸.

De qualquer maneira, os picobirnavírus permanecerão sendo considerados como possíveis vírus de origem não-animal até que sejam definitivamente estabelecidas suas características. Para se concluir pela real origem animal, seria fundamental sua replicação em sistemas celulares adequados. Daí o objetivo principal desse trabalho.

Para atingir esse objetivo, lançou-se mão de alguns artificios que foram utilizados com sucesso em períodos anteriores para a adaptação ao cultivo em

sistemas celulares de outros vírus entéricos, como será considerado caso a caso adiante.

As proteases foram utilizadas tanto adicionadas às amostras fecais no momento da adsorção, como em pré-tratamento dos inóculos, 30 minutos antes da adsorção. É interessante relatar que os sobrenadantes das amostras fecais FI e F4 foram positivos para PBV, em primeira passagem, após pré-tratamento enzimático (FI com pancreatina e F4 com tripsina), seguindo os protocolos 5 (em duas oportunidades) e 4, respectivamente, totalizando 3 detecções. Todas as outras detecções se deram quando as proteases foram adicionadas no momento da adsorção, sugerindo que se houve alguma interação mais efetiva entre as partículas virais e as proteases, não foi de fundamental importância que esse contato ocorresse previamente à adsorção.

Com relação ao período de adsorção viral, o mesmo foi realizado seguindo três protocolos diferentes: a agitação periódica, a centrifugação e o sistema “roller” de cultura. Contudo, é importante ressaltar que em nenhum dos sistemas celulares foram utilizados os três protocolos de adsorção, de maneira que é impossível fazer comparações quanto à eficiência de um ou de outro.

As quatro detecções de PBV, em sobrenadantes de primeira passagem de cultura primária de rim de rato, assim como aquela em sobrenadante de LLC-MK₂ e as três detecções em HT-29 ocorreram quando a adsorção foi realizada sob agitação periódica. O único resultado positivo associado ao período de adsorção em “sistema roller” se deu na linhagem CaCo₂.

Como já relatado, não foi possível realizar comparações entre os três métodos de adsorção. Contudo, os dois primeiros métodos foram utilizados simultaneamente em grande parte dos experimentos nas culturas primárias, e nas linhagens LLC-MK₂ e HT-29, onde ocorreu a maioria dos resultados positivos. Em outras palavras, pode-se considerar que nesses casos, a utilização de agitação periódica foi mais efetiva que o processo de centrifugação, ao contrário do observado por Thair et al.⁷¹ para coronavírus. Esses resultados podem ser devidos à diferença de força centrífuga relativa aplicadas em nossos

experimentos (150g), e pelos outros pesquisadores⁷¹ (700g), em função da resistência das células ao processo de centrifugação, como já colocado.

É importante ressaltar ainda que no único sobrenadante celular de primeira passagem positivo para PBV testado por MED, nenhuma partícula viral foi detectada que pudesse ser sugestiva de PBV.

Apesar de em nenhum sobrenadante das diversas passagens realizadas com a amostra fecal de origem suína (F21) ter sido positivo por EGPA para PBV, quando analisada por MED foi positiva para dois tamanhos de partículas virais diferentes, uma menor, com aproximadamente 21 nm, e outra com aproximadamente 31 nm, essas últimas sugestivas de PBV.

Com todos os resultados positivos em sobrenadanes de primeiras passagens obtidos, confirmaram-se os dados anteriormente relatados por Pereira et al.⁵² e por Gatti* (com. pessoal).

Apesar de terem sido utilizados protocolos de infecção que há algum tempo têm sido empregados para a replicação de vários vírus entéricos^{3,18} e sendo alguns deles considerados como de difícil cultivo, como os rotavírus do grupo C^{73,75}, os coronavírus⁷¹ e os astrovírus^{80,81}, não foi possível obter a adaptação dos PBV à replicação nos sistemas celulares utilizados, apesar da sua replicação na primeira passagem.

Teoricamente, tentou-se estabelecer analogias sob o ponto de vista dos sistemas celulares que seriam permissivos aos vírus que se replicam nos intestinos dos animais^{65,69}, assim como sobre as proteases utilizadas nas amostras virais de maneira a torná-las infectivas^{2,45}.

Na impossibilidade da adaptação dos PBV, alguns aspectos devem ser discutidos, e o primeiro deles é o grau de infectividade das amostras fecais utilizadas como inóculo, ou seja, o estado de conservação dessas amostras, ou o grau de integridade das partículas virais.

No transcorrer dos experimentos foram utilizadas, sempre que possível, amostras recém coletadas e imediatamente congeladas a -20°C, procedimentos

* Gatti, M.S.V. Lab. Virologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.

esses que deveriam manter estável a infectividade das partículas. Isso foi comprovado em uma ocasião quando a amostra utilizada como inóculo em sistemas celulares foi simultaneamente utilizada em infecções experimentais bem sucedidas em ratos, onde ocorreu replicação viral e sua eliminação nas fezes dos mesmos.

Mesmo considerando a integridade das partículas, não se pode desprezar um aspecto muito importante que é o microambiente intestinal dos animais em que as infecções experimentais foram realizadas. Não se sabe quais os microconstituintes do bolo fecal, as mais variadas enzimas, fatores solúveis, até mesmo moléculas de imunoglobulinas⁷⁶, poderiam estar atuando de maneira efetiva para promover a ativação viral, ou favorecer a adsorção. Como não se sabe quais células são infectadas por esses vírus, os mesmos podem tanto se beneficiar da presença de proteases na luz intestinal para promover sua ativação, como no caso dos rotavírus, ou mesmo se beneficiar da presença de imunoglobulinas para invadir determinadas células, a exemplo do que acontece com os poliovírus⁷⁶.

Quando se pensa em interação vírus-célula, os receptores celulares específicos para esses vírus e os anti-receptores virais têm que ser considerados.

A relação vírus-hospedeiro deve ser obedecida, para que a multiplicação viral ocorra.

A ligação vírus-célula é a etapa inicial dos processos de multiplicação viral, ou seja, a adsorção. Para muitos vírus, esta associação só é definitiva mediante a clivagem e/ou alteração estrutural, ou conformacional, do componente viral envolvido no processo, ou mesmo do receptor celular^{12,16,18}. Para muitos vírus são conhecidos os pontos de clivagem enzimática de algumas moléculas da superfície das partículas, que favorecem uma disposição espacial dos receptores para que os mesmos possam realizar a adsorção viral^{12,16,18}.

Uma vez tendo ocorrido a adsorção, a próxima etapa da multiplicação viral, ou seja, a penetração do vírus na célula será possível.

Nestes experimentos, foram utilizadas duas proteases: a tripsina e a pancreatina, que têm sido empregadas com sucesso para a replicação de outros vírus entéricos. Como já relatado, se forem consideradas as detecções em sobrenadantes de primeiras passagens como sendo resultados de replicação do ácido nucléico viral, podemos sugerir que a tripsina foi mais eficiente em promover uma adaptação viral que a pancreatina, (foram 5 detecções com tripsina e 3 com pancreatina), o que também foi descrito por Estes et al.¹⁸ para os rotavírus.

Segundo Saif et al⁶³ um tratamento mais enérgico com proteases em altas concentrações poderia ser mais eficiente na ativação viral. Este fato foi observado para os rotavírus do grupo C. Em nossos experimentos, com altas concentrações de proteases, os resultados nas sucessivas passagens foram sistematicamente negativos, não sendo detectado, em nenhum sobrenadante celular, o ácido nucléico característico dos PBV. Em função das altas concentrações enzimáticas não foi possível observar o desenvolvimento de ECP.

Por outro lado, não pode ser desconsiderado o fato de que um inóculo também teve seu sobrenadante de primeira passagem positivo para PBV sem associação às proteases citadas. Isso pode sugerir que a ativação proteolítica não seja essencial para a adsorção desses vírus. Contudo há a possibilidade de que nessa amostra fecal ainda poderia haver enzimas proteolíticas naturais do hospedeiro em concentrações suficientes para promover tal ativação, ao menos em primeira passagem. Essa hipótese é coerente uma vez que uma única amostra (FI) foi positiva sem a utilização de proteases.

Além de considerar os anti-receptores virais, deve ser analisado também o receptor celular. As células da linhagem HT-29^{69,76} e CaCo₂^{54,55} são originárias de adenocarcinoma do colon humano. Se os PBV já foram identificados em fezes tanto de crianças como de adultos, e se o PBV é um vírus de origem animal, a possibilidade de que esses vírus sejam replicados no intestino é alta. Era de se esperar então que essas células apresentassem receptores celulares para o PBV. Sem deixar de considerar que a não interação

do PBV com estas células de origem humana possa ser em decorrência da não relação vírus/hospedeiro (uma vez que amostras positivas para PBV provenientes de material fecal humano não foram testadas), outros fatores podem ter contribuído. Um deles seria o fato dessas células não exporem de maneira efetiva os seus receptores. Neste caso, uma das maneiras para fazer com que as células apresentem de maneira mais eficiente os seus receptores, seria adicionar ácidos graxos⁷⁰ aos meios de culturas de modo a alterar a fluidez das membranas celulares, aumentando assim as chances de contato anti-receptor viral-receptor celular.

Segundo Saif et al.⁶³ e Tahir et al.⁷¹, um tratamento mecânico poderia favorecer o contato entre anti-receptores virais e receptores celulares. Esses autores utilizaram de força centrífuga durante o período de adsorção, com 1.200 g e 700 g, para a adaptação de rotavírus do grupo C e coronavírus, respectivamente. Esse tratamento aumenta a energia cinética do sistema, favorecendo assim o contato vírus-célula, ainda que o mesmo continue sendo aleatório. Em nossos experimentos trabalhamos com até 150g de força centrífuga relativa. Dessa maneira, nenhum resultado positivo foi obtido, ou seja, a adsorção dos picobirnavírus nas células não foi estimulada.

Uma outra variável aplicada nos experimentos de infecção, e que tem influência direta sobre a adsorção viral, foi a manutenção ou não dos inóculos após esse período. Como todos os resultados positivos em sobrenadantes de primeiras passagens foram obtidos quando os inóculos foram mantidos, surge uma questão: Qual a possibilidade dos RNAs detectados em sobrenadantes de primeiras passagens serem apenas restos de inóculo e não produto de replicação viral?

Contra essa possibilidade, há todos os experimentos onde amostras só foram positivas quando inoculadas seguindo alguns protocolos, mas em outros não (**Tabela 7**). Se realmente os ácidos nucleicos detectados fossem apenas restos de inóculos, ao menos as amostras que foram positivas deveriam ter apresentado resultados semelhantes quando inoculadas seguindo todos os protocolos propostos, o que não foi observado.

Ainda deve ser considerado que uma mesma amostra teve seu sobrenadante de primeira passagem positivo em mais de um sistema celular, porém não em todos os quais a mesma foi testada (**Tabela 7**). Um exemplo foi a amostra fecal murina F4, que foi inoculada nos sistemas celulares de cultura primária de rim de camundongo, LLC-MK₂, HT-29, MA104 e CaCo₂, e teve os sobrenadantes de primeiras passagens positivos apenas quando ensaiado em células LLC-MK₂ e HT-29. Deve ser considerado ainda que foram positivas quando inoculadas seguindo apenas dois dos cinco protocolos de infecção realizados.

Logo, esses resultados reforçam a idéia de que houve, em primeira passagem, replicação do ácido nucléico viral e, portanto, que as bandas de RNAs detectadas são produto de síntese durante a infecção, assim como sugerido por Pereira et al.⁵¹.

Aceitando portanto a condição de replicação do ácido nucléico viral em primeira passagem, devem ser considerados dois aspectos: 1- A baixa eficiência de infecção, visto que foram testadas mais de 50 amostras fecais positivas para PBV, seguindo vários protocolos de infecção; 2- qual foi o mecanismo de restrição que impediu a adaptação viral ao cultivo nesses sistemas celulares, uma vez que não houve detecções de PBV em sobrenadantes de passagens posteriores à primeira?

Sobre a questão da baixa eficiência de infecção, pode ser alegado que realmente os sistemas celulares são pouco permissivos a esses vírus. Entretanto, se houve pelo menos adsorção, as células apresentam receptores específicos para os mesmos

Como já relatado anteriormente, há sempre uma baixa concentração de partículas virais nesse material. Esse fato é confirmado pela dificuldade em detectar partículas virais de PBV em MED. Logo, o número de partículas virais seria muito pequeno e não permitiria uma boa relação de vírus X número de receptores celulares que favorecesse o processo de multiplicação. Também, essa infectividade poderia estar dependente de outros fatores tais como a

presença de determinados íons que viriam a favorecer processos adequados para a penetração viral.

Além disso, há de se considerar a forma de conservação das amostras fecais a servirem como inóculos, ou seja, -20°C . No entanto, a amostra F4, positiva em LLC-MK₂ e HT-29 foi testada nessas linhagens celulares com intervalo de aproximadamente seis meses, mostrando, pelo menos em parte, a manutenção de sua capacidade de adsorver-se às células em teste.

Por outro lado, a amostra F24 foi negativa em sobrenadante de CaCo₂, e havia sido inoculada dias antes em ratos gnotobióticos, onde foi possível detectar o ácido nucléico viral em suas fezes.

Com essas considerações, pode-se concluir que os mecanismos de susceptibilidade e/ou restrição⁴ à multiplicação do PBV em sistemas celulares “in vitro” são muito mais complexos e envolvem outros fatores além dos receptores apresentados pelos vários sistemas celulares, origem das amostras fecais positivas para PBV, presença ou pré-tratamento por proteases, período e modo de realização da adsorção viral. Isto obriga-nos a procurar um sistema celular permissivo, que seja de origem até exótica para possibilitar estudos que auxiliem nos esclarecimentos dessas questões.

Considerando apenas os resultados positivos para os RNAds virais em EGPA, dos sobrenadantes de primeiras passagens como sendo decorrentes de replicação viral, sugere-se, que as fases iniciais do ciclo de replicação foram realizadas, ou seja, a adsorção, a penetração, assim como o desnudamento ainda que parcial, como é característico dos vírus de RNAds¹². Por outro lado, voltando à questão da baixa eficiência nas infecções, o mecanismo de penetração pode não ter sido eficiente, se forem lembrados os fatores que podem interferir.

Poderia existir a necessidade da presença de um co-receptor celular para que ocorresse a penetração viral, assim como já descrito para o vírus da imunodeficiência humana⁴¹.

A penetração do PBV seria ou não dependente da formação de vesículas com enzimas lisossomais que favorecessem o desnudamento total ou parcial

das partículas virais¹⁹. A penetração do PBV poderia ser temperatura ou pH dependente. Ou, como os poliovírus, seria dependente de imunoglobulinas para penetrar nas células M do epitélio intestinal⁷⁶.

Essas considerações são coerentes com os dados obtidos por Bass et al.⁴, para rotavírus do grupo A. Após análise dos mecanismos de restrição impostos por linhagens pouco susceptíveis a esses vírus, perceberam que quando partículas virais, infectivas ou não, são transfectadas em células, e após um único ciclo de replicação viral, a multiplicação se deu de maneira tão eficiente nas células permissivas quanto nas pouco permissivas. Com esses resultados, os autores determinaram que os mecanismos de restrição celular à multiplicação dos rotavírus estão associados ao processo de penetração viral.

De qualquer maneira, quando pensamos nos mecanismos de restrição celular à replicação dos picobornavírus, temos que considerar separadamente os resultados onde houve detecções do RNAs viral, ainda que apenas em sobrenadante de primeira passagem, sugerindo portanto a replicação desses ácidos nucléicos, como já colocado. Numa outra situação estão as amostras que foram sistematicamente negativas, que poderiam ser consideradas como não hábeis, ao menos quando comparadas com as acima referidas, sobre as primeiras etapas do ciclo de replicação viral até a replicação dos ácidos nucléicos.

O mecanismo de restrição poderia estar ligado às últimas fases do ciclo de replicação, ou seja, montagem, maturação ou mesmo liberação das partículas⁴, o que seria coerente com a não detecção de partículas virais nos sobrenadantes celulares observados ao MED. No entanto, após finalização dos experimentos, sistematicamente as células foram congeladas e descongeladas três vezes para liberação de possíveis partículas internalizadas ou de suas proteínas.

Há uma outra possibilidade para explicar a não adaptação dos PBV à multiplicação em sistemas celulares, além dos possíveis mecanismos de restrição impostos pelas células.

Alguns vírus dependem de vírus "helper" para realizar alguma etapa do seu ciclo de multiplicação, através de enzimas que os vírus dependentes não

são capazes de sintetizar ou o fazem de maneira deficiente. Até mesmo dependem do “helper” para sintetizar proteínas de capsídeo como é o caso da dependência do ácido nucléico satélite, ou vírus-satélite da hepatite D, em relação ao vírus da hepatite B⁷². Logo, os mesmos não podem ser isolados separadamente nem do hospedeiro, nem em culturas celulares, estando sempre na presença do “helper”^{8,15,37,72}.

É possível que os PBV dependam de outros vírus. Aliás, Gallimore et al.²² relataram a presença de dois tamanhos diferentes de partículas virais em purificado de amostras fecais positivas para PBV. As partículas menores teriam aproximadamente 26nm e as maiores aproximadamente 30nm.

Em estudos de purificação de PBV de material fecal de origem suína, que estão sendo realizados em nosso laboratório, Haga, I.R.* (com. pessoal) detectou por MED partículas virais com dois diâmetros diferentes, semelhantemente ao relatado por Gallimore et al.²². É importante considerar que, em ambos os experimentos relatados acima, as partículas virais foram detectadas em frações de purificação que foram positivas para o RNAd característico de PBV por EGPA.

Em nossos experimentos de infecção com células da linhagem MA104, uma amostra de origem suína, denominada F21, foi analisada por MED, por ter desenvolvido em sucessivas passagens alterações celulares que poderiam ser decorrentes de replicação viral. Embora os sobrenadantes das dez passagens realizadas tenham sido sistematicamente negativos para PBV por EGPA, no sobrenadante de quinta passagem foram detectadas partículas virais com dois tamanhos diferentes: as menores com aproximadamente 21 nm e as maiores com aproximadamente 31 nm, sendo essas últimas sugestivas de PBV.

Em função da detecção ter ocorrido em sobrenadante de quinta passagem, sugere-se que ambos os vírus tenham se replicado nas passagens anteriores, uma vez que restos de inóculo dificilmente estariam em concentrações detectáveis por MED em sobrenadante de quinta passagem. Poder-se-ia

* Haga, I.R. Lab. Virologia, Instituto de Biologia- UNICAMP.

argumentar que a não detecção do ácido nucléico relativo ao PBV nesse sobrenadante seria uma questão apenas de concentração. Porém, em outro experimento, partindo de um volume relativamente grande de sobrenadante de sexta passagem, após ultracentrifugação e análise por EGPA, o resultado foi igualmente negativo. Como os sobrenadantes das passagens posteriores não foram analisados por MED, é impossível dizer se a replicação dos dois vírus com tamanho de partículas diferentes foi realmente concomitante.

Vários autores relataram as baixas concentrações em que os PBV^{22,26} são encontrados nas amostras fecais. Entretanto, ao contrário do observado em nossos sobrenadantes celulares dos experimentos com amostra fecal F21, o ácido nucléico tem sido detectado por outros pesquisadores com muito maior facilidade que as partículas virais.

Apesar das semelhanças de tamanho de partículas assim como de morfologia^{22,42,43,44}, não é possível afirmar que as partículas observadas ao MED sejam de picobirnavírus, podendo ser um outro vírus qualquer, mesmo porque a amostra fecal é de origem suína e coletada no campo, portanto, sujeita a outros vírus contaminantes.

Com todas essas questões expostas, e apesar das muitas tentativas de buscar adaptar o PBV ao cultivo em sistemas celulares, seguindo diferentes protocolos de infecção desde o início do projeto, visando adicionar variáveis que de alguma maneira auxiliassem na replicação viral, não foi possível concluir por isso. Resta-nos assim assumir esses resultados como definitivos e concluir que o PBV, pelo menos seguindo os protocolos realizados por nós, não foi adaptado à multiplicação nos sistemas celulares utilizados neste trabalho.

Através da experiência acumulada durante a execução desse trabalho, podem ser sugeridas diretrizes para estudos posteriores com esses vírus: 1- Utilizar outros sistemas celulares; 2- Trabalhar com um painel de amostras fecais relativamente grande, objetivando selecionar amostras que tenham resultados positivos em primeiras passagens, mas acima de tudo que esses resultados sejam reprodutíveis; 3- Para amostras murinas, utilizar os sistemas celulares que pareceram mais susceptíveis, a cultura primária de rim de rato e a

linhagem intestinal humana HT-29, enquanto que essa última linhagem foi a única permissiva à amostra de origem suína; 4- Utilizar de associações a outras enzimas como a neuraminidase e a elastase¹⁸; 5- Utilizar-se de marcadores radioisotópicos ^{16,34,68}, em primeira passagem, para elucidar a questão da origem do PBV; 6- Buscar suplementar os meios de manutenção com moléculas que poderão favorecer a replicação viral⁷⁰, e 7- Tentar transfectar os picobirnavírus nas células através de lipossomos catiônicos, determinando se o mecanismo de restrição celular estaria relacionado com o processo de adsorção ou penetração viral⁴.

6. Conclusões.

- 1- Seguindo os protocolos de infecção propostos, não foi possível adaptar os PBV à multiplicação nos sistemas celulares utilizados;
- 2- Em 9 experimentos foi detectado por EGPA o RNAds característico do PBV em sobrenadantes de primeira passagem;
- 3-Em nenhum sobrenadante celular de passagem posterior à primeira foi detectado o RNAds dos PBV;
- 4-Os sistemas celulares que se mostraram mais susceptíveis foram a cultura primária de rim de rato e a linhagem celular HT-29;
- 5-As amostras fecais de origem murina apresentaram um maior número de resultados positivos que as suínas;
- 6-A presença das proteases não é de fundamental importância para a adsorção dos PBV, nas condições de cultivo utilizadas nesse trabalho;
- 7-As detecções do RNAds característico do PBV em primeira passagem são decorrentes de replicação. Assim, esses resultados dizem a favor da teoria da origem animal do PBV;
- 8-Uma amostra apresentou em MED partículas virais com 31nm de diâmetro com morfologia característica de PBV. Como não houve detecção concomitante de seu RNAds, não é possível afirmar que essas partículas sejam de PBV.

7. Referências Bibliográficas.

1. ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A.; RESENDE, J.S. and RESENDE, N.A. A novel bisegmented double-stranded RNA virus in avian faeces. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 40:437-440, 1988.
2. ARIAS, C.F.; ROMERO, P.; ALVAREZ, V. and LOPEZ, S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. **J. Virol.**, 70:5832-5839, 1996.
3. BABIUK, L.A.; MOHAMED, K.; SPENCE, L.; FAUVEL, M. and PETRO, R. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. **J. Clin. Microbiol.**, 6:610-617, 1977.
4. BASS, D.M.; BAYLOR, M.R.; CHEN, C.; MACKOW, E.M.; BREMONT, M. and GREENBERG, H.B. Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. **J. Clin. Invest.**, 90:2313-2320, 1992.
5. BISHOP, R.F.; DAVIDSON, G.P.; HOLMES, I.H. and RUCK, B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, ii:1281-1283, 1973.
6. BODKIN, D.K.; NIBERT, M.L. and FIELDS, B.N. Proteolytic digestion of reovirus in the intestinal lumens of neonatal mice. **J. Virol.**, 63:4676-4681, 1989.

7. BROWING, G.F.; CHALMERS, R.M.; SNODGRASS, D.R.; BATT, R.M.; HART, C.A.; ORMAROD, S.E.; LEADON, D.; STONEHAM, S.J. and ROSSDALE, P.D. The prevalence of enteric pathogens in diarrhoeic thoroughbred foals in Britain and Ireland. **Equine Vet. J.**, 23:405-409, 1991.
8. BOS, E.C.W.; LUYTJES, W.; VAN DER MUELEN, H.; KOERTEN, H.K. and SPAAN, W.J.M. The production of recombinant infectious DI-particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus. **Virology**, 218:52-60, 1996.
9. CASCIO, A.; BOSCO, M.; VIZZI, E.; GIAMMANCO, A.; FERRARO, D. and ARITA, S. Identification of picobirnavirus from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea. **Europ. J. Epidemiol.**, 12:545-547, 1996.
10. CHASEY, D. and BANKS, J. Replication of atypical ovine rotavirus in small intestine and cell culture. **J. Gen. Virol.**, 67:567-576, 1986.
11. CHASEY, D. Porcine picobirnavirus in U.K.. **Vet. Rec.**, 5:465, 1990.
12. CLARK, S.M.; ROTH, J.R.; CLARK, M.L.; BARNETT, B.B. and SPENDOVE, R.S. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. **J. Virol.**, 39:816-822, 1981.
13. CHANDRA, R. Effect of prolonged colostrum feeding on systemic and intestinal antibody response and virus excretion/protection of calves against subclinical and/or challenge rotavirus infection. **Summary of final report of commonwealth academic staff fellow**. Association of commonwealth Universities, London, 1991.

14. CHANDRA, R. Picobirnavirus, a novel group of undescribed viruses of mammals and birds: a minireview. **Acta Virol.**, 41:59-62, 1997.
15. CHARPENTIER, N.; DÁVILA, M.; DOMINGO, E. and ESCARMÍS, C. Long-term, large-population passage of aphtovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. **Virology**, 223:10-18, 1996.
16. CUADRAS, M.A.; ARIAS, C.F. and LOPEZ, S. Rotavirus induce an early membrane permeabilization of MA-104 cells and do not require a low intracellular Ca²⁺ concentration to initiate their replication cycle. **J. Virol.**, 71:9065-9074, 1997.
17. CYR-COATS, K.S. and STORZ, J. Bovine coronavirus-induced cytopathic expression and plaque formation: host cell and virus strains determine trypsin dependence. **Zentralbl. Veterinarmed. [B]**, 35:48-56, 1988.
18. ESTES, M.K., GRAHAM, D.Y. and MASON, B.B. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. **J. Virol.**, 39:879-888, 1981.
19. ESTES, M.K. Rotavirus and their replication. In: FIELDS, B.N. *Virology*. 3. ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Press, 1996. p. 1625-1655.
20. DOBOS, P.; HILL, B.J.; HALLET, R.; KELLS, D.T.C.; BECHT, H. and TENINGES, D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. **J. Virol.**, 32:593-605, 1979.
21. FLEWETT, T.H., BRYDEN, A.S. and DAVIES, H.A. Virus particles in gastroenteritis. **Lancet**, ii:1497, 1973.

22. GALLIMORE, C.I.; LEWIS, D. and BROWN, D.W.G. Detection and characterization of a novel bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. **Arch. Virol.**, 133:63-73, 1993.
23. GALLIMORE, C.I.; APPLETON, H.; LEWIS, D.; GREEN, J. and BROWN, D.W.G. Detection and characterization of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnaviruses) in human faecal specimens. **J. Med. Virol.**, 45:135-140, 1995.
24. GALLIMORE, C.I.; GREEN, J. CASEMORE, D.P. and BROWN, D.W.G. Detection of a picobirnavirus associated with *Cryptosporidium* positive stools from humans. **Arch. Virol.**, 140:1275-1278, 1995.
25. GATTI, M.S.V.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; FERRAZ, M.M.G.; FIALHO, A.M. and PEREIRA, H.G. Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. **Res. Vet. Sci.**, 47:397-398, 1989.
26. GATTI, M.S.V. Picobirnavirus um novo vírus animal. Características gerais, infecção experimental em ratos e estudos epidemiológicos em suínos. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina, 1994.
27. GROHMANN, G.S.; GLASS, R.I.; PEREIRA, H.G.; MONROE, S.S.; HIGHTOWER, A.W.; WEBER, R. and BRYAN, R.T. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. **New Engl. J. Med.**, 329:14-20, 1993.
28. HAMBLIN, T.J.; VERRIER, J. and PEACOCK, D.B. The immune response in man. IV. Primary and secondary antibody production in patients with chronic lymphatic leukaemia. **Clin. Exp. Immunol.**, 21:101-108, 1975.

- 29.HASEGAWA, A.; MATSUNO, S.; INOUE, S.; KONO, R.; TSURUKUBO, Y.; MUKOYAMA, A. and SAITO, Y. Isolation of rotaviruses in primary cultures of monkey kidney cells. **J. Clin. Microbiol.**,16:387-390, 1982.
- 30.HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEN, C.K.; SNODGRASS, D.R. and MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. **J. Clin. Microbiol.**,29:473-477, 1982.
- 31.HUDSON, L. and HAY, F.C. Practical Immunology. Blackwell Sci. Publications Ltda, 1989.
- 32.HUMPHREY, C.D.; COOK Jr, E.H. and BRADLEY, D.W. Identification of enterically transmitted hepatitis virus particles by solid phase immune electronmicroscopy. **J. Med. Virol.**,29:177-188, 1990.
- 33.KHOSHANAN, A. and ALDERETE, J.F. Multiple double-stranded RNA segments are associated with virus particles infecting *Trichomonas vaginalis*. **J. Virol.**,67:6950-6955, 1993.
- 34.KHOSHANAN, A. and ALDERETE, J.F. Characterization of double-stranded RNA satellites associated with the *Trichomonas vaginalis* virus. **J. Virol.**,69:6892-6897, 1995.
- 35.KLENK, H.-D. and GARTEN, W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. **Trends Microbiol.**,2:39-43, 1994.
- 36.KRAFT, V. and MEYER, B. Diagnosis of murine infections in relation to test of methods employed. **Lab. Anim. Sci.**,36:271-276, 1986.

- 37.KUPFERMANN, H.; THEIL, H.J.; DUBOVI, E.J. and MEYERS, G.
Bovine viral diarrhea virus: characterization of a cytopathogenic
defective interfering particles with two internal deletions. **J.
Virol.**,70:8175-8181, 1996.
- 38.LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly for
the head of bacteriophage T4. **Nature**,227:680-685, 1970.
- 39.LEE, T.W. and KURTZ, J.B. Serial propagation of astrovirus in tissue
culture with the aid of trypsin. **J. Gen. Virol.**,57:421-424, 1981.
- 40.LEITE, J.P.G.; MONTEIRO, S.P.; FIALHO, A.M. and PEREIRA, H.G. A
novel avian with trisegmented double-stranded RNA and further
observations on previously described similar viruses with bisegmented
genome. **Vir. Res.**,16:119-126, 1990.
- 41.LUCIW, P.A. Human immunodeficiency viruses and their replication. In:
FIELDS, B.N. Virology. 3. ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Press,
1996. p. 1881-1952.
- 42.LUDERT, J.E.; HIDALGO, M.; GIL, F. and LIPRANDI, F. Identification
in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double-stranded
RNA genome. **Arch. Virol.**,117:97-107, 1991.
- 43.LUDERT, J.E. and LIPRANDI, F. Identification of viruses with bi- and
trisegmented double-stranded RNA genome in faeces of children with
gastroenteritis. **Res. Virol.**,144:219-224, 1993.
- 44.LUDERT, J.E.; ABDUL-LATIFF, L.; LIPRANDI, A. and LIPRANDI, F.
Identification of picobirnavirus, viruses with bisegmented double-
stranded RNA in rabbit faeces. **Res. Vet. Sci.**,59:222-225, 1995.

45. LUDERT, J.E.; FENG, N.; YU, J.H.; BROOME, R.L.; HOSHINO, Y. and GREENBERG, H.B. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. **J. Virol.**, 70:487-493, 1996.
46. MEBUS, C.A.; UNDERDHAL, N.R.; RHODES, M.B. and TWIEHAUS, M.J.. Calf diarrhea (scours) reproduced with a virus from a field outbreak. **Univ. Nebraska Res. Bull.**, 233:1-16, 1969.
47. MELNICK, J.L. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: FIELDS, B.N. Virology. 3. ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Press, 1996. p. 655-712.
48. MONTEIRO, S.G.; PEREIRA, H.G.; FIALHO, A.M. and LEITE, J.P.G. Viruses with segmented double-stranded RNA genomes in chickens. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 42:141-146, 1991.
49. MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHARIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A. and SUMMERS, M.D. Virus taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, Wien New York. **Arch. Virol.**, Suppl. 10, 1995.
50. PEREIRA, H.G.; FIALHO, A.M.; FLEWETT, T.H.; TEIXEIRA, J.M.S. and ANDRADE, Z.P. Novel virus in human faeces. **Lancet**, 2:102-104, 1988.
51. PEREIRA, H.G.; FLEWETT, T.H.; CANDEIAS, J.A.N. and BARTH, O.M. Virus with bi-segmented double-stranded RNA in rats faeces. **J. Gen. Virol.**, 69:2749-2754, 1988.

52. PEREIRA, H.G.; de ARAÚJO, H.P.; FIALHO, A.M.; de CASTRO, L. and MONTEIRO, S.P. A virus with bi-segmented double-stranded RNA genome in guinea pig intestines. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 84:137-140, 1989.
53. PEREIRA, H.G. Double-stranded RNA viruses. **seminars in Virology**, 2:39-53, 1991.
54. PETERSON, M.D. and MOOSEKER, M.S. An in vitro model for the analysis of intestinal brush border assembly. I. Ultrastructural analysis of cell contact-induced brush border assembly in CaCo-2Bbe cells. **J. Cell Sci.**, 105:445-460, 1993.
55. PINTO, M.; ROBINE-LEON, S.; APPAY, M.D.; KEDINGER, M.; TRIADOU, N.; DUSSAULX, E.; FOGH, J. and ZWEINBAUM, A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma line CaCo-2 in culture. **Biol. Cell**, 47:323-330, 1983.
56. PUERTO, S.M.; PUERTO, M.F.I.; VALADEZ, G.N.; DEL-REFUGIO, G.L.M. and POLANCO, M.G. Picobirnaviruses: New viral agent as cause of acute infection disease in pig farms in the state of Yucatan, Mexico. **Veterinaria – Mexico**, 28:309-311, 1998.
57. RÁCZ, M.L.; MUNFORD, V.; FERNANDES, M.J.B.; KROEFF, S.S. and KOTAIT, I. Identification, propagation and subgroup characterization of a equine rotavirus isolated in São Paulo, Brasil. **Rev. Microbiologia**, 24:161-165, 1993.
58. RIZZO, E.; TUCHIYA, H.N.; MARTINEZ, C.H. Técnicas básicas de cultura celular. Instituto Butantã e Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 1983.

- 59.ROUSSET, M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and CaCo-2: two *in vitro* models for study of intestinal differentiation. **Biochimie**,68:1035-1040, 1986.
- 60.RUIZ, M.C.; TORRE, S.R.A.; CHARPILLENNE, A.; VASSEUR, M.; MICHELANGELI, F.; COHEN, J. and ALVARADO, F. Rotavirus interaction with isolated membrane vesicles. **J. Virol.**,68:4009-4016, 1994.
- 61.SAIF, L.J.; THEIL, K.W. and BOHL, E.H. Morphogenesis of porcine rotavirus in kidney cell cultures and intestinal epithelial cells. **J. Gen. Virol.**,39:205-217, 1978.
- 62.SAIF, L.J.; ROSEN, B.I.; KANG, S.Y. and MILLER, K.L. Cell culture propagation of rotaviruses. **J. Tis. Cult. Meth.**,11:147-156, 1988.
- 63.SAIF, L.J.; TERRETT, L.A.; MILLER, K.L. and CROSS, R.F. Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) in a continuous cell line and characterization of the passaged virus. **J. Clin. Microbiol.**,26:1277-1282, 1988.
- 64.SAMMONS, D.N.; ADDAMS, J.D. and MISHIKAWA, E.E. Ultrasensitive silverbase color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**,2:135-141, 1981.
- 65.SATO, K.; INABA, Y.; MIURA, Y.; TOKUHISA, S. and MATUMOTO, M. Isolation of lapine rotavirus in cell cultures. **Arch. Virol.**,71:267-271, 1982.

66. SHIMIZU, M.; SHIRAI, J.; NARITA, M. and YAMANE, T. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. **J. Clin. Microb.**, 28:201-206, 1990.
67. SHINOZAKI, K.; YAMUNAKA, T.; TOKIEDA, M.; SHIRASAWA, H. and SIMIZU, B. Isolation and serial propagation of human group C rotaviruses in a cell line (CaCo-2). **J. Med. Virol.**, 48: 48-52, 1996.
68. SOMOGYI, P. and DOBOS, P. Virus-specific RNA synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. **J. Virol.**, 33:129-139, 1980.
69. SUPERTI, F.; TINARI, A. BALDASSARI, L. and DONELLI, G. HT-29 cells: a new substrate for rotavirus growth. **Arch. Virol.**, 116:159-173, 1991.
70. SUPERTI, F.; MARZIANO, M.L.; DONELLI, G.; MARCHETTI, M. and SEGANTI, L. Enhancement of rotavirus infectivity by saturated fatty acids. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, 18:129-135, 1995.
71. TAHIR, A.R.; POMEROY, K.A. and GOYAL, S. M. Evaluation of shell vial cell culture technique for the detection of bovine coronavirus. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 7:301-304, 1995.
72. TAYLOR, J.M. Hepatitis delta virus and its replication. In: FIELDS, B.N. Virology. 3ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Press, 1996. p.2809-2818.

73. TERRETT, L.A. and SAIF, L.J. Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) in primary porcine kidney cell cultures. **J. Clin. Microbiol.**, 25:1316-1319, 1987.
74. THEIL, K.W.; BOHL, E.H. and AGNES, A.G. Cell culture propagation of porcine rotavirus (reovirus-like agent). **Am. J. Vet. Res.**, 38:1765-1768, 1977.
75. TSUNEMITSU, H.; SAIF, L.J.; JIANG, B. SHIMIZU, M.; HIRO, M.; YAMAGUSHI, H.; ISHIYAMA, T. and HIRAI, T. Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA-104). **J. Clin. Microbiol.**, 29:2609-2613, 1991.
76. TUCKER, S.P. and COMPANS, R.W. Virus infection of polarized epithelial cells. **Ad. Vir. Res.**, 42:187-247, 1998.
77. VANOPDENBOSCH, E. and WELLENMANS, G. Birna-type virus in diarrhoeic calf faeces. **Vet. Rec.**, 9:610, 1989.
78. VANOPDENBOSCH, E. and WELLEMANS, G. Bovine-type virus: a new etiological agent of neonatal calf diarrhoea? **Vlaams Dierg. Tijdsch.**, 59:222-225 (in dutch), 1990.
79. WELTER, M.W.; WELTER, C.J.; CHAMBERS, D.M. and SVENSSON, L. Adaptation and serial passage of group C rotavirus in ST-cells, an established diploid swine testicular cell line. **Arch. Virol.**, 120:297-304, 1991.

80. WILLCOCKS, M.M.; CARTER, M.J.; LAIDLER, F.R. and MADELEY, C.R. Growth and characterisation of human faecal astrovirus in a continuous cell line. **Arch. Virol.**, 113: 73-81, 1990.
81. WILLCOCKS, M.M.; ASHTON, N.; KURTZ, J.B.; CUBITT, W.D. and CARTER, M.J. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. **J. Virol.**, 68:6057-6058, 1994.