

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LUDMILA NASCIMENTO ROCHA

ESTUDO DE AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS GENÓTIPO G3 NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO DE 1996 A 2006: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE COMPARATIVA

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Mello Volotão

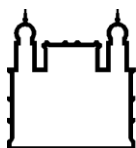
Rio de Janeiro

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LUDMILA NASCIMENTO ROCHA

ESTUDO DE AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS GENÓTIPO G3 NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO DE 1996 A 2006: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ANÁLISE COMPARATIVA

ORIENTADOR: Dr. Eduardo de Mello Volotão

Aprovada em: 12/04/2010

EXAMINADORES:

Dra. Caroline Cordeiro Soares – IOC – Fiocruz – Presidente

Dra. Norma Suely de Oliveira Santos – UFRJ

Dr. Filipe Anibal Carvalho-Costa – IOC – Fiocruz – Revisor

Dr. Gonzalo José Bello Bentancor – IOC – Fiocruz

Dra. Cláudia Lamarca Vitral – UFF

Rio de Janeiro, 12 de abril de 2010

Trabalho realizado no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz – RJ, Brasil, como pré-requisito para conclusão do curso de mestrado, do programa de pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, sob orientação do Dr. Eduardo de Mello Volotão.

“Não to mandei eu? Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque o SENHOR teu Deus é contigo, por onde quer que andares.”

Js 1:9

Aos meus pais e irmãos pelo amor incondicional,
confiança e incentivo em todo o tempo.

AGRADECIMENTOS

Concluir esse trabalho foi muito mais difícil do que o esperado. Em muitos momentos meus pés vacilaram e faltou-me o ânimo e a certeza de que seria possível chegar até aqui. Nesses momentos, a ajuda e o carinho de muitos me motivaram a prosseguir. E por isso, dedico minha profunda gratidão a essas pessoas tão queridas.

A Deus, que de maneira surpreendente abriu caminhos e colocou pessoas especiais para me acompanhar e ajudar na jornada.

Aos meus pais, Marcos Cesar Rocha e Aparecida Nascimento Rocha, meus maiores incentivadores.

Ao irmão Thiago por, mesmo longe, se fazer tão presente.

Ao irmão Marcos Cesar por toda a ajuda e carinho.

A todos os familiares que partilharam de todos os momentos, bons e ruins, e me apoiaram sempre.

Ao Leandro, pela paciência e compreensão nas horas mais difíceis. Seu amor e companheirismo tornam meus dias mais felizes.

Ao meu orientador, Eduardo de Mello Volotão, por antes de tudo ser meu amigo. Sem ele certamente meus caminhos seriam diferentes e jamais conseguirei expressar minha gratidão por ter me conduzido até aqui.

Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite pela oportunidade e confiança.

À Dra. Marize Miagostovich pela alegria contagiante.

Ao Alexandre Fialho, Rosane Assis, Fernando López, Tatiana Rose pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Marcelle Figueira pelo apoio e cuidado constante.

À Mariela Martínez, pelo carinho, alegria e ajuda fundamentais no desenvolvimento do projeto e elaboração da dissertação.

À Thaís Ramos, Júlia Fioretti, Juliana Bragazzi e Carol Sá, por tornarem a rotina muito mais divertida.

Ao Dr. Marcos Cesar Mendonça pela amizade e apoio.

À Carmen Baur pelas palavras de incentivo e ânimo.

À Ana Maria Pinto, Carol Tinga, Nilson Porto, Joeler Vargas, Matias Victoria, Alexandre Pina, Marilda Almeida, Túlio Fumian, Flávia Guimarães, Mônica Rocha, Maria da Penha Xavier, Silvana, Edson Pereira, Irene Araújo, Maru, Juliana Andrade, Hugo, Suellen, funcionários e alunos do Pavilhão Helio e Peggy Pereira, pelos bons momentos de convivência no laboratório, ajuda na bancada e nas análises dos meus dados.

Ao anjinho Chica, pelo incentivo e abraços apertados que me encham de ânimo e coragem.

Ao Laboratório de Viroses Respiratórias por toda a boa vontade e ajuda no seqüenciamento das amostras.

Aos alunos da turma 2008 de Mestrado em Biologia Parasitária pelos momentos tão alegres dentro e fora da sala de aula;

Aos amigos Alexandre Santos, Gentil Vasconcelos, Juan Sánchez e Vanessa Neves por dividirem todas as emoções do mestrado. Foi fundamental tê-los ao meu lado.

À Ana Carolina Ganime e Nathália Motta pela amizade e carinho.

Ao Dr. Filipe Anibal Costa-Carvalho, pelo trabalho de revisão desta dissertação e por ser sempre tão prestativo.

A todos os membros da banca examinadora, pela atenção dispensada a este trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

À Plataforma de Seqüenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ.

Ao Instituto Oswaldo Cruz e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa conquista.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A: Adenina

aa: Aminoácido

°C: Graus centígrados

C: Citosina

Ca²⁺: Íon cálcio

CaCl₂: Cloreto de cálcio

DA: Diarreia aguda

dATP: Desoxiadenosina trifosfato

dCTP: Desoxicitidina trifosfato

dGTP: Desoxiguanosina trifosfato

DLP: do inglês *Doble Layer Particles* – Partículas virais de camada dupla

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DNAc: DNA complementar

dTTP: Desoxitimidina trifosfato

dXTP: Desoxiribonucleotídeos

EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético

EUA: Estados Unidos da América

FDA: do inglês *Food and Drug Administration* – Administração de drogas e alimentos

g: Grama

G: Guanina

GA: Gastroenterite Aguda

HCl: Ácido clorídrico

H₂O: Água

IOC: Instituto Oswaldo Cruz

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

LVCA: Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

LRRRV – Laboratório de Referência Regional para Rotavíruses

ME: Microscopia eletrônica

M: Molar

μL: Microlitro

mL: Mililitro

mg: Miligrama

MgCl₂: Cloreto de magnésio

μg/mL: Micrograma por mililitro

mM: Milimolar

N: Normal

NaOH: Hidróxido de sódio

NCBI: do inglês *National Center for Biotechnology Information* – Centro Nacional de Informação em Biotecnologia

NIH: do inglês *National Institutes of Health* - Instituto Nacional de Saúde

nm: Nanômetros

NSP: do inglês *Non-Structural Proteins* - Proteínas não-estruturais

nt: Nucleotídeos

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORF: do inglês *Open reading frame* - Fase aberta de leitura

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

pb: Pares de bases

RE: Retículo endoplasmático

RER: Retículo endoplasmático rugoso

RNA: Ácido ribonucléico

RNA(+): RNA polaridade positiva

RNA(-): RNA polaridade negativa

RNAfd: RNA fita dupla

RNAm: RNA mensageiro

PCR: do inglês *Polymerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase

RT: do inglês *Reverse transcription* – Transcrição reversa

RT-PCR: do inglês *Reverse transcription-Polymerase chain reaction* – Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase

RV: Rotavírus

RV-A: Rotavírus do grupo A

RV-C: Rotavírus do grupo C

SG: Subgrupo

SG-I: Subgrupo um

SG-II: Subgrupo dois

SG-I+II: Subgrupo um mais dois

SG-não I-não II: Subgrupo não um - não dois

SRO: Sais de Reidratação Oral

T: Timina

TBE: Tris-Borato-EDTA

Tris: Hidroximetil-tris-aminometano

U/μL: Unidades por microlitro

VLS: do inglês *Viroplasm-like structures* - Estruturas similares a viroplasmas

VP: do inglês *Viral Proteins* - Proteínas estruturais

VP5*: Subunidade peptídica VP5 gerado por proteólise de VP4

VP8*: Subunidade peptídica VP8 gerada por proteólise de VP4

UNICEF/WHO: do inglês *World Health Organization* – Organização Mundial da Saúde (OMS)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais causas de morte em crianças de até 5 anos de idade em nível global.....	2
Figura 2. Representação esquemática e tridimensional da partícula de rotavírus A símio (SA11)	4
Figura 3. Esquema representativo da organização do gene de VP4 de rotavírus.....	6
Figura 4. Esquema representativo da organização do gene de VP7 de rotavírus.....	8
Figura 5. Representação esquemática da proteína NSP4 de rotavírus.....	9
Figura 6. Esquema representativo da organização do gene para a proteína NSP4 de rotavírus.....	10
Figura 7. Modelo esquemático do ciclo de replicação dos rotavírus	13
Figura 8. Esquema representativo dos eletroferotipos dos diferentes grupos de rotavírus analisados em gel de poliacrilamida	15
Figura 9. Esquema representativo da ocorrência das mutações pontuais.	18
Figura 10. Estruturas rearranjadas de segmentos de genoma de rotavírus contendo duplicação parcial da ORF	19
Figura 11. Esquema representativo dos eventos de reestruturação genômica.	20
Figura 12. Esquema representativo de um evento de recombinação genética.	21
Figura 13. Distribuição continental/subcontinental de rotavírus A humano com as combinações binárias G e P.....	23
Figura 14. Distribuição dos genótipos de rotavírus A no Brasil, por região. A: de 1982 a 1995, e B: de 1996 a 2005.....	24
Figura 15. Taxa de detecção dos diferentes genótipos G de rotavírus A no Brasil em diferentes períodos	24
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos da RT-PCR dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4 e NSP4	44
Figura 17. Árvore filogenética obtida a partir da análise da sequência nucleotídica parcial do gene que codifica para a proteína VP7 das amostras estudadas e de protótipos.....	47
Figura 18. Alinhamento das sequências parciais de aminoácidos da proteína VP7 das amostras incluídas nesse estudo e protótipos utilizados na análise filogenética	53
Figura 19. Árvore filogenética obtida a partir da análise da sequência nucleotídica parcial do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) das amostras estudadas e de protótipos	56
Figura 20. Alinhamento das sequências parciais de aminoácidos da proteína VP4 (VP8*) das amostras incluídas nesse estudo e protótipos utilizados na análise filogenética	60

Figura 21. Árvore filogenética obtida a partir da análise da sequência nucleotídica parcial do gene que codifica para a proteína NSP4 das amostras estudadas e de protótipos.....62

Figura 22. Alinhamento das sequências parciais de aminoácidos da proteína NSP4 das amostras incluídas nesse estudo e protótipos utilizados na análise filogenética65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação genética dos rotavírus A baseada na proteína não-estrutural NSP4.....	16
Quadro 2. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes NSP4, VP4 e VP7.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de cut-off de percentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus A considerando-se os 11 segmentos genômicos.....	17
Tabela 2. Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7.	34
Tabela 3. Lista de protótipos utilizados nas análises filogenéticas com seus respectivos números de acesso no GenBank, país, ano do isolamento, espécie de origem e genótipo.	40
Tabela 4. Amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4 e NSP4 das amostras incluídas nesse estudo.	43
Tabela 5. Identidade nucleotídica e aminoacídica baseada na sequência parcial do gene que codifica para a proteína VP7 das amostras incluídas nesse estudo.	48
Tabela 6. Identidade nucleotídica e aminoacídica baseada na sequência parcial do gene que codifica para a proteína VP7 das amostras incluídas nesse estudo e protótipos de Rotavírus A humano.....	49
Tabela 7. Identidade nucleotídica e aminoacídica baseada na sequência parcial do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) das amostras incluídas nesse estudo	57
Tabela 8. Identidade nucleotídica e de aminoácidos baseada na sequência parcial do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) das amostras incluídas nesse estudo e protótipos de Rotavírus A humano	58
Tabela 9. Identidade nucleotídica e aminoacídica baseada na sequência parcial do gene que codifica para a proteína NSP4 das amostras incluídas nesse estudo	63
Tabela 10. Identidade nucleotídica e aminoacídica baseada na sequência parcial do gene que codifica para a proteína NSP4 das amostras incluídas nesse estudo e protótipos de Rotavírus A humano	64

RESUMO

Em todo o mundo as gastroenterites infantis agudas causadas por rotavírus do grupo A (RV-A) estão associadas a cerca de 611.000 mortes por ano. RV-A pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, e são constituídos de onze segmentos de RNA dupla-fita que codificam para seis proteínas estruturais (VPs) e seis proteínas não-estruturais (NSPs). Os genótipos de RV-A são definidos por dois genes que codificam para as duas proteínas do capsídeo externo, VP4 (P) e VP7 (G). Estudos epidemiológicos demonstraram que mundialmente cinco genótipos G são mais frequentes: G1-G4 e G9; em associação com os genótipos P [8], P [4] ou P [6]. Em 2005 houve a re-emergência do genótipo G3 em crianças internadas em um hospital público no Rio de Janeiro, em concordância com a emergência desse genótipo em diversas partes do mundo, principalmente nos países asiáticos. O objetivo do presente estudo é determinar a relação entre os genes VP4, VP7 e NSP4 de RV-A genótipo G3 isoladas no Rio de Janeiro entre 1996 e 2009. A análise filogenética realizada a partir das seqüências de nucleotídeos dos genes do VP7, VP4 e NSP4 demonstrou que as amostras que circularam em 1996 e 1997 no Rio de Janeiro são distintas daquelas que foram isoladas em 2005 e 2006, sugerindo uma possível introdução deste genótipo no Rio de Janeiro. Em 2009, mais amostras de RV-A G3 foram detectadas no Rio Grande do Sul. A análise dos três genes estudados demonstrou estreita relação genética com as amostras isoladas em 2005. Recentemente, um novo sistema de classificação de rotavírus foi proposto, em que todos os 11 segmentos do genoma de RNA são utilizados e valores de *cut-off* foram determinados para diferenciar os genótipos. Segundo essa nova classificação, todas as amostras desse estudo foram classificadas como pertencentes aos genótipos G3 – P[8] – E1 para VP7, VP4 e NSP4, respectivamente. Em todos os genes estudados foram observadas mutações pontuais em regiões antigênicas, porém são necessários mais estudos para avaliar a importância na estrutura e função das proteínas. Foram evidenciados eventos de reestruturação genômica entre amostras humanas para o gene que codifica para VP4 (VP8*), os quais podem estar relacionados a uma vantagem adaptativa para o vírus. Os resultados do presente estudo confirmam a importância do monitoramento contínuo e da caracterização molecular das amostras de RV-A a fim de obter melhor entendimento da epidemiologia e a evolução dos RV-A genótipo G3.

ABSTRACT

Acute gastroenteritis caused by group A rotaviruses (RV-A) are associated to nearly 611,000 deaths of children worldwide per year. RV-A belong to the family *Reoviridae*, genus *Rotavirus*, and are characterized by having a segmented genome, composed of 11 segments of double-stranded RNA that encodes six structural proteins (VPs) and six non-structural proteins (NSPs). The genotypes of RV-A are defined by two genes that codify the two outer proteins, VP4 (P) and VP7 (G). Epidemiological studies in several parts of the world have indicated that there are five most common G genotypes: G1-G4 and G9; in association with P [8], P [4] or P [6] genotypes. In 2005, genotype G3 has emerged in hospitalized children in a public hospital in Rio de Janeiro, corroborating the global emergence of this genotype, especially in Asian countries. The present study aims to determine the relationship between the genes VP4, VP7 and NSP4 of stool samples positive for RV-A genotype G3 isolated in Rio de Janeiro between 1996 and 2006. Phylogenetic analyses carried out on the VP7, VP4 and NSP4 genes demonstrated that the samples that circulated in 1996 and 1997 in Rio de Janeiro are distinct from those that were detected in 2005 and 2006, which suggests a possible entering of a new G3 variant in Rio de Janeiro. In 2009, new samples of G3 were detected in Rio Grande do Sul. The analysis of the three studied genes demonstrated a straight genetic relation with the samples identified in 2005. A new rotavirus classification system has been recently proposed, in which all the 11 RNA genome segments are utilized and cut-off values were determined to differ the genotypes. According to this new classification, all the samples in this study were characterized as genotypes G3 – P[8] – E1 to VP7, VP4 and NSP4, respectively. In all studied genes there were amino acids substitutions in antigenic regions, although more studies are necessary to evaluate the importance in the structure and protein functions. Genomic restructuring events in the VP4 (VP8*) codifying gene between human samples have been described, which might be related to an adaptive advantage for the virus. The results of the current study confirm the importance of continuous monitoring and molecular characterization of RV-A samples with the purpose of a better understanding of RV epidemiology and evolution.

ÍNDICE

RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A doença diarréica e os rotavírus.....	1
1.2. Histórico	3
1.3. Partícula viral.....	3
1.4. Genoma viral	4
1.5. Proteínas Virais.....	5
1.5.1. Proteínas Estruturais	5
1.5.1.1. VP1	5
1.5.1.2. VP2	5
1.5.1.3. VP3	5
1.5.1.4. VP4	6
1.5.1.5. VP6	6
1.5.1.6. VP7	7
1.5.2. Proteínas Não-estruturais	8
1.5.2.1. NSP1	8
1.5.2.2. NSP2	8
1.5.2.3. NSP3	9
1.5.2.4. NSP4	9
1.5.2.5. NSP5	10
1.5.2.6. NSP6	11
1.6. Replicação viral.....	11
1.7. Classificação dos Rotavírus A	13
1.7.1. Classificação baseada nas proteínas estruturais.....	13
1.7.2. Classificação baseada na proteína não estrutural NSP4	15
1.7.3. Classificação baseada em todos os genes de Rotavírus A.....	16
1.8. Mecanismos de geração de diversidade genética	17
1.8.1. Mutação Pontual	17

1.8.2.	Rearranjos genéticos	18
1.8.3.	Reestruturação de segmentos genômicos	19
1.8.4.	Recombinação genética	20
1.9.	Transmissão interespécies	21
1.10.	Epidemiologia	22
1.10.1.	Distribuição mundial de genótipos de Rotavirus A	22
1.10.2.	Distribuição de genótipos de Rotavírus A no Brasil	23
1.10.3.	Genótipo G3 de Rotavirus	25
1.11.	Tratamento.....	25
1.12.	Prevenção e controle	26
1.12.1.	Vacinas contra Rotavirus A.....	26
1.12.1.1.	Abordagem Jenneriana Monovalente.....	26
1.12.1.1.1.	RIT 4237.....	27
1.12.1.1.2.	WC3.....	27
1.12.1.1.3.	RRV ou MMU18006.....	27
1.12.1.2.	Abordagem Jenneriana modificada	27
1.12.1.2.1.	Rhesus Rotavirus Vaccine- Tetravalent (RRV-TV) (Rotashield®).....	27
1.12.1.2.2.	Rotateq®.....	28
1.12.1.2.3.	Vacina UK	28
1.12.1.2.4.	RIX 4414 (Rotarix®)	29
2.	JUSTIFICATIVA	31
3.	OBJETIVOS	32
3.1.	Objetivo Geral	32
3.2.	Objetivos específicos.....	32
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1.	Amostras Clínicas	33
4.2.	Suspensão Fecal	33
4.3.	Extração de RNA.....	33
4.4.	Amplificação dos genes VP7, VP4 e NSP4 por RT-PCR.....	34
4.4.1.	Oligonucleotídeos	35
4.4.2.	Análise dos amplicons por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.....	36
4.5.	Soluções	36

4.5.1.	Tampão TRIS/HCl/Ca ⁺⁺ 0,01M pH 7,2	36
4.5.2.	EDTA 0,2M pH 8,0	36
4.5.3.	Tris-HCl 0,1M pH 6,4	37
4.5.4.	Tampão L6	37
4.5.5.	Sílica.....	37
4.5.6.	Tampão L2	38
4.5.7.	Tampão Tris-Boro-EDTA 10X pH 8,4 (TBE)	38
4.5.8.	Gel de agarose a 1,5%	38
4.6.	Purificação dos produtos da reação em cadeia pela polimerase.....	39
4.7.	Sequenciamento	39
4.8.	Análise das sequências.....	40
5.	RESULTADOS	42
5.1.	Amplificação por RT-PCR.....	42
5.2.	Genotipagem das Amostras	44
5.3.	Análise Filogenética.....	45
5.3.1.	Análise do Gene que Codifica para Proteína VP7	46
5.3.2.	Análise do Gene que Codifica para Proteína VP4	54
5.3.3.	Análise do Gene que Codifica para Proteína NSP4	61
6.	DISCUSSÃO	66
7.	CONCLUSÕES.....	70
8.	PERSPECTIVAS	70
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença diarréica e os rotavírus

A diarreia é a principal manifestação clínica das gastroenterites e pode ser acompanhada por outros sintomas como náusea, vômito e dor abdominal. É responsável pela perda significativa de fluidos, determinando o desequilíbrio eletrolítico e conseqüentemente desidratação, podendo levar à morte quando associado a fatores como desnutrição e ausência de assistência médica (UNICEF/WHO, 2009). Embora a diarreia aguda (DA) infantil seja uma doença comum entre crianças de todo o mundo, ela assume um significado especial, pois é responsável por um grande número de hospitalizações pediátricas, além de constituir a segunda principal causa de morbidade e mortalidade infantil fora do período neonatal, particularmente em países em desenvolvimento (Bern & Glass, 1994; Gentsch *et al.*, 1996; Kapikian, Hoshino & Chanock, 2001; Parashar *et al.*, 2006). Nesses países estima-se que a cada ano ocorram cerca de um bilhão de casos de diarreia, 3,3 milhões deles fatais em países da África, América Latina e Ásia, excluindo a China, em crianças com menos de cinco anos de idade (Kapikian, Hoshino & Chanock, 2001). A importância é ainda maior quando se soma o impacto da doença na população, que pode ser evidenciado por danos à saúde, afetando o desenvolvimento infantil, bem como à sociedade por custos gerados pela demanda aos serviços médicos, atendimento ambulatorial e hospitalizações (custos diretos), além dos gastos imediatos, por perdas de dias de trabalho, de escola, gastos com medicamentos, transportes, etc. (Instituto Adolfo Lutz e Centro de Vigilância Epidemiológica "Professor Alexandre Vranjac", 2004).

Ainda hoje, a DA é a segunda maior causa de mortalidade infantil em todo o mundo (Figura 1), sendo responsável por cerca de 1,5 milhões de óbitos a cada ano (UNICEF/WHO, 2009). No Brasil, as taxas de mortalidade infantil por DA são maiores nas regiões nordeste e norte do país, e apresentam variações nas regiões centro-oeste, sudeste e sul (Ministério da Saúde, 2010).

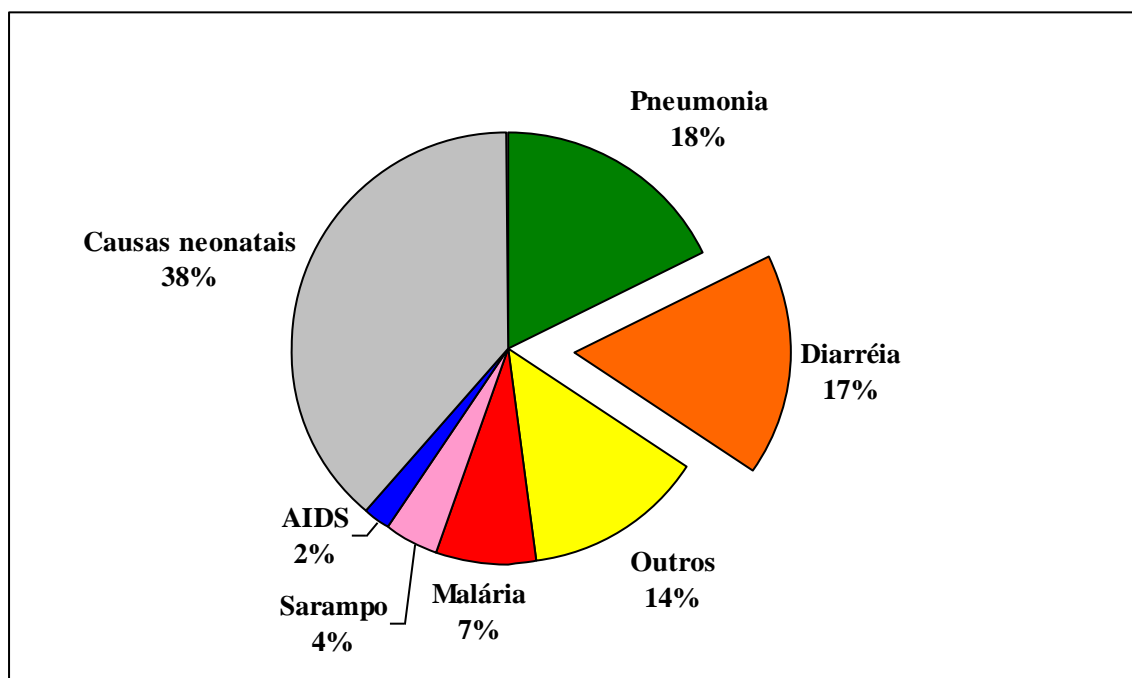


Figura 1. Principais causas de morte em crianças de até 5 anos de idade em nível global (adaptado de UNICEF/WHO, 2009).

Dentre os agentes infecciosos implicados na etiologia da doença diarreica, podemos destacar os vírus, as bactérias e os parasitos, sendo que a importância das infecções intestinais bacterianas e parasitárias está diretamente relacionada às condições sócio-econômicas da população. Com relação aos vírus, o mesmo não pode ser afirmado, visto que muitos destes permanecem como problema de saúde pública mesmo em países desenvolvidos.

Atualmente, os rotavírus A (RV-A), norovirus, astrovírus e adenovírus entéricos são reconhecidos como importantes agentes etiológicos de surtos de gastroenterite em países desenvolvidos e em desenvolvimento, embora os dados disponíveis nestes últimos estejam relacionados principalmente aos estudos sobre RV-A. Os rotavírus (RV) são os principais agentes etiológicos da DA, e estima-se que sejam responsáveis por cerca de 40% de todas as admissões hospitalares devido à diarreia em crianças de até cinco anos de idade em todo o mundo – levando a aproximadamente 100 milhões de episódios de DA a cada ano, que resultam em 350.000 a 600.000 mortes (UNICEF/WHO, 2009).

Devido à importância dos RV-A na etiologia da DA, em abril de 2009 foi recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a introdução da vacinação contra RV em todos os programas nacionais de imunização (UNICEF/WHO, 2009).

1.2. Histórico

Em 1973 Bishop e col. descreveram a ocorrência de partículas virais semelhantes aos orbivírus pela análise por microscopia eletrônica (ME), de células do epitélio de mucosa duodenal de crianças com quadro de DA não bacteriana. Inicialmente denominados *Orbivirus-like* (Bishop *et al.*, 1973), esses vírus foram ainda denominados *Reovirus-like* (Kapikian *et al.*, 1974) e *Duovirus* (Davidson *et al.*, 1975). Finalmente, em 1978 foram denominados *Rotavirus* devido ao aspecto semelhante ao de uma roda quando observados por ME, formando um novo gênero dentro da família *Reoviridae* (Flewett & Woode, 1978). No Brasil, a primeira detecção dos RV ocorreu em 1976 por Linhares e col. (1977).

1.3. Partícula viral

A partícula viral completa é não-envelopada, apresenta simetria icosaédrica e diâmetro de aproximadamente 100 nm. O capsídeo é formado por três camadas protéicas (Figura 2): capsídeo externo, capsídeo interno e o core, onde se encontram os 11 segmentos de RNA fita dupla (RNAfd) que constituem o genoma. No core encontram-se associadas ao RNAfd três proteínas estruturais: VP1, VP2 e VP3, codificadas pelos segmentos 1, 2 e 3, respectivamente. Juntas, essas proteínas representam aproximadamente 18% das proteínas virais. A proteína VP6, codificada pelo segmento 6, é a mais abundante (51%) e constitui o capsídeo interno. Formando o capsídeo externo encontram-se as proteínas VP4, codificada pelo gene 4; e VP7, codificada pelos genes 7 (Rhesus sp.), 8 (rotavírus bovino UK) ou 9 (SA-11). Outras seis proteínas não-estruturais são codificadas pelos segmentos genômicos restantes: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6 (Kapikian *et al.*, 2001).

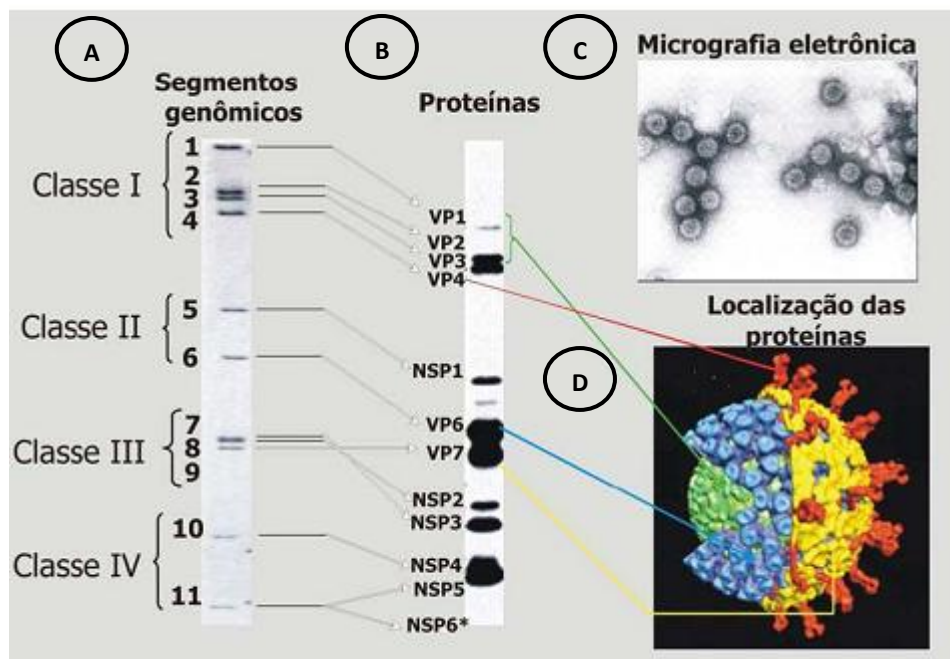


Figura 2. Representação esquemática e tridimensional da partícula de rotavírus A símio (SA11). A: Eletroforese em gel de poliacrilamida dos 11 segmentos do genoma do rotavírus A símio (SA11). B: Gel de poliacrilamida mostrando a separação das proteínas estruturais (NSP1 – NSP6) e não estruturais (VP1 – VP4, VP6 – VP7) sintetizadas pelo rotavírus A SA-11. C: Micrografia eletrônica de rotavírus A. D: Reconstrução em 3D do vírion de SA-11, mostrando a localização das VPs. (Adaptada de Conner & Ramig, 1997).

1.4. Genoma viral

O genoma dos RV é constituído por onze segmentos de RNA fita dupla (RNAfd) e cada um codifica para uma única proteína estrutural (VPs) ou não-estrutural (NSPs) específica. O segmento 11 é a exceção, visto que codifica para duas proteínas: NSP5 e NSP6. Os segmentos variam em número de nucleotídeos (nt), com tamanhos entre 663 e 3.302 pares de base (pb), totalizando 18.550 pb. Cada segmento de RNA de polaridade positiva (RNA (+)) inicia-se com uma guanidina (G) na extremidade 5', seguida de uma região conservada não-codificante, uma fase aberta de leitura (ORF, do inglês: *Open Reading Frame*) e outra região conservada não-codificante, que termina com duas citosinas (C) na extremidade 3'. A maioria termina com uma sequência consenso 5'-UGUGACC-3', e estas sequências contêm sinais importantes para a expressão gênica e replicação. Os tamanhos das regiões não-codificantes nas extremidades 5' e 3' variam para os diferentes genes, não há poliadenilação na extremidade 3' e todos os genes sequenciados possuem pelo menos uma longa ORF após o primeiro códon de iniciação (Estes, 2001). A grande conservação das sequências terminais nos segmentos genômicos sugere que elas possuem importantes sinais para a transcrição,

transporte de RNA, replicação, montagem ou empacotamento dos segmentos genômicos (Patton & Spencer, 2000).

1.5. Proteínas Virais

1.5.1. Proteínas Estruturais

1.5.1.1. VP1

RNA polimerase – RNA dependente. Juntamente com as proteínas VP2 e VP3 participa do complexo de replicação e de transcrição do vírion (Arnoldi *et al.*, 2007). Entre as proteínas do core é a única que possui uma seqüência específica de reconhecimento ao RNA viral, através de regiões conservadas de quatro bases, UGUG, na extremidade nucleotídica 3' (Lu *et al.*, 2008).

1.5.1.2. VP2

É a proteína em maior quantidade no core viral. Faz parte do complexo de replicação e liga-se tanto à VP1 quanto à VP3, através de um domínio na sua porção N-terminal. A interação protéica VP2/VP1/VP3 é crítica na replicação e transcrição do genoma viral (Heiman *et al.*, 2008). Ainda, a superfície externa da proteína VP2 interage com a proteína VP6 nos estágios iniciais da morfogênese viral. A interação VP2/VP6 é importante para a formação de partículas intermediárias de camada dupla de proteína (DLPs: *double layer particles*), também influenciando na atividade transcricional da partícula completa que será originada (Estes & Kapikian, 2007).

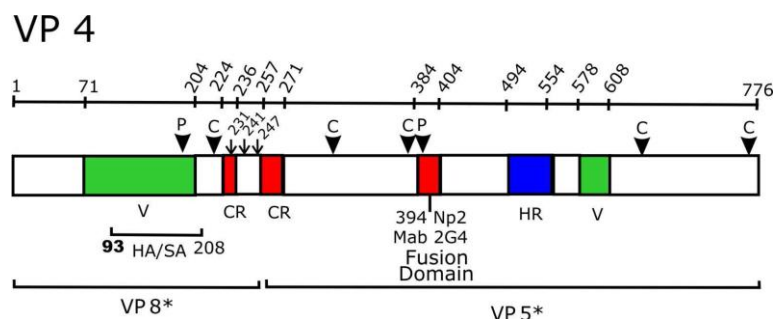
1.5.1.3. VP3

Também é constituinte do core. Embora não se tenha certeza do papel da VP3 na morfogênese dos RV vários estudos têm demonstrado suas atividades guanilil e metiltransferase (Patton, 1995; Mertens, 2004). Dados da análise de seqüências do gene que codifica para VP3 ainda são limitados, porém já foi demonstrado o elevado grau de

conservação deste gene em rotavírus obtidos a partir de amostras humanas e uma baixa conservação quando comparado a amostras obtidas de animais (Subodh *et al.*, 2006).

1.5.1.4. VP4

A proteína VP4 não é glicosilada e forma espículas inseridas no capsídeo externo de partículas virais maduras. Exerce funções essenciais no ciclo viral, como adesão à célula e internalização, além de executar funções de hemaglutinação e neutralização (Dunn *et al.*, 1995; Ludert *et al.*, 1996). É susceptível à proteólise, que está associada ao aumento da infecciosidade dos RV e à entrada do vírus na célula (Arias *et al.*, 1996; Estes, 2001). Durante a proteólise, a VP4 é clivada em VP5* e VP8*, que permanecem associadas ao vírion. O peptídeo VP5* está associado à atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4 e, provavelmente, possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula. Por outro lado, o peptídeo VP8* contém a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas (Jayaram *et al.*, 2004) (Figura 3). Cinco epítomos de neutralização foram recentemente mapeados dentro da subunidade VP8* da proteína VP4, localizados nas posições aminoacídicas M1-L10, I35-R44, I55-D66, V115-G123 e L223-P234 (Kovacs-Nolan *et al.*, 2003). Como a proteína VP4 está envolvida no processo de reconhecimento celular, o domínio de união a carboidrato de VP8* é considerado um alvo para o desenvolvimento de drogas. Poucos estudos têm reportado informação estrutural sobre o domínio da VP8* (Kraschnefski *et al.*, 2005; Dormitzer *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2005; Monnier *et al.*, 2006).



CR – Regiões conservadas HR – Regiões repetitivas P – Prolinas conservadas
V – Regiões variáveis C – Cisteínas conservadas

Figura 3. Esquema representativo da organização do gene de VP4 de rotavírus (adaptada de Estes, 2001).

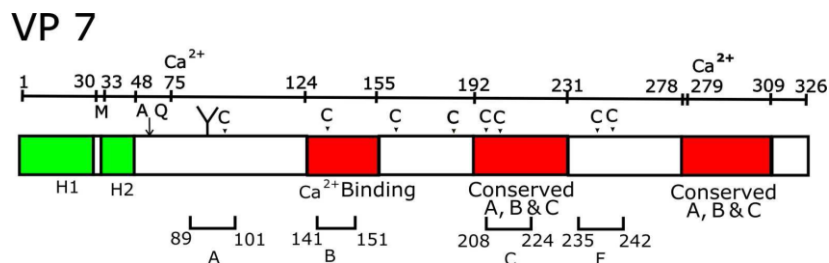
1.5.1.5. VP6

É a proteína viral mais abundante dos RV e possui na superfície determinantes antigênicos que permitem a classificação dos RV em diferentes grupos (A-G) e subgrupos de RV-A (I, II, I+II, não-I e não-II). Encontra-se no capsídeo interno e é composta por dois domínios, um que interage com as proteínas VP7 e VP4, e outro com a VP2. Desta forma, participa de duas importantes funções do vírus: a adsorção e penetração na célula, e a transcrição do RNAfd (Heiman *et al.*, 2008). O domínio de trimerização da VP6 com VP7/VP4 e VP2 está localizado entre os aminoácidos (aa) 246 e 315. Os resíduos 296 a 299 e 305 são importantes no reconhecimento pelos anticorpos monoclonais Mabs255/60 determinantes de subgrupo (Kapikian *et al.*, 2001).

1.5.1.6. VP7

É uma glicoproteína e, juntamente com VP4, forma o capsídeo externo. Altamente imunogênica, induz a síntese de anticorpos neutralizantes. Esta proteína pode modular a atividade da VP4 no processo de adsorção e entrada dos RV na célula, interagindo com moléculas da superfície celular, uma vez que a proteína VP4 tenha iniciado o processo de adsorção (Jayaram *et al.*, 2004).

A VP7 apresenta ORF composta por uma seqüência nucleotídica que codifica para 326 aa (Figura 4). Cada uma dessas regiões é precedida por domínios hidrofóbicos designados de H1 (aa 6 a 23) e H2 (aa 33 a 44), que podem funcionar com uma seqüência sinalizadora para dirigir a VP7 para o retículo endoplasmático (RE). Um terceiro códon de iniciação também está presente antes do segundo domínio hidrofóbico. Algumas amostras de RV contêm até três sítios potenciais de glicosilação. Contudo, aparentemente apenas dois sítios são glicosilados (Kapikian *et al.*, 2001). Análises da seqüência do gene que codifica para esta proteína, descrevem 9 regiões variáveis (VR1 – VR9), sendo 4 destas regiões variáveis consideradas principais sítios antigênicos: região A (aa 87 – 101), região B (aa 143 – 152), região C (aa 208 – 223) e região F (aa 235 – 242) (Kirkwood *et al.*, 1993). Os demais sítios antigênicos identificados são: região D (aa 291) e região E (aa 190) (Dunn *et al.*, 1993).



- H1 e H2 – Domínios hidrofóbicos
 Grupos A, B e C – Domínios conservados
 Ca^{2+} - Sítio de ligação com o cálcio
 C – Cisteínas conservadas
- P – Prolinas conservadas
 ↓ - Sítios de clivagem pela tripsina
 A, B e C – Epítomos de neutralização

Figura 4. Esquema representativo da organização do gene de VP7 de rotavírus (adaptada de Estes, 2001).

1.5.2. Proteínas Não-estruturais

1.5.2.1. NSP1

Apresenta associações com o citoesqueleto celular favorecendo a interação vírus-célula. É a proteína viral menos conservada, apresentando maior variabilidade de seqüências do que VP4 e VP7. A NSP1 possui domínios relativamente conservados, regiões ricas em cisteína, que determinam a formação de domínios de união ao RNA (*zinc finger domain*) (Estes, 2001; Mertens, 2004).

1.5.2.2. NSP2

Proteína extremamente conservada e expressa em altos níveis em células infectadas. É encontrada no viroplasma, região eletrodensa do citoplasma da célula infectada e adjacente ao RE onde ocorrem os processos de transcrição, tradução, replicação e empacotamento do RNAfd genômico viral. A NSP2 associa-se à NSP5, estando ambas as proteínas envolvidas na replicação, formação de viroplasmas e encapsidação viral. A NSP2 possui ainda atividade desestabilizadora de hélices de ácidos nucléicos e atividade NTPase (Estes, 2001; Mertens, 2004).

1.5.2.3. NSP3

Envolvida na regulação da tradução. A NSP3 tem conformação de um homodímero que reconhece a seqüência consenso 3' do RNA mensageiro (RNAm), o que favorece a tradução dos transcritos de RNAm aos ribossomos e ainda impede a degradação dos mesmos por nucleases celulares (Jayaram *et al.*, 2004).

1.5.2.4. NSP4

Única proteína não-estrutural que não se liga ao RNA, é muito estudada devido a sua importância na morfogênese viral e por sua função de enterotoxina (Estes, 2001).

Possui três domínios hidrofóbicos localizados na porção N-terminal, H1 - H3, dois sítios de glicosilação situados em uma pequena alça no lúmen do RE, um domínio transmembrana, um domínio de oligomerização, um sítio de ligação com a VP4 e uma região com cerca de 20 aa para a ligação com o capsídeo imaturo (Figura 5); (Bowman *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2004).

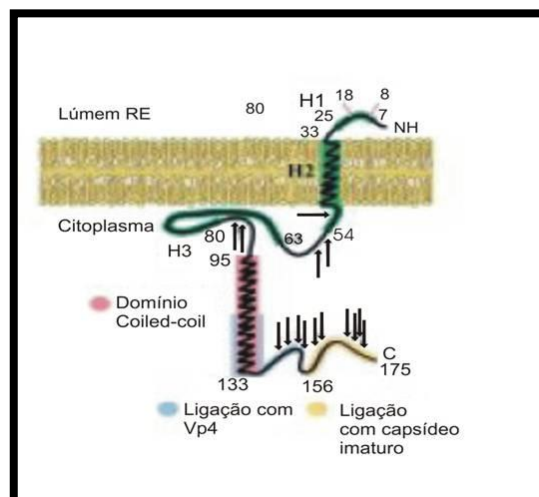


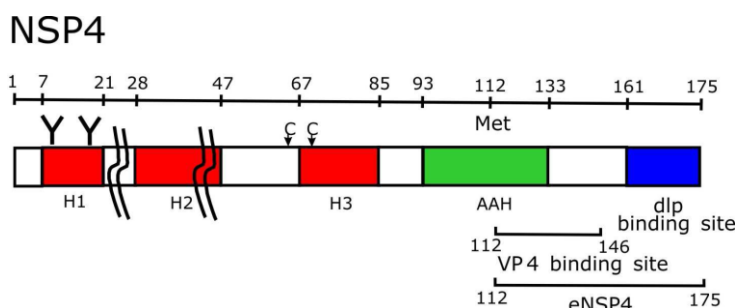
Figura 5. Representação esquemática da proteína NSP4 de rotavírus. Detalhes de sua localização na membrana do retículo endoplasmático (adaptada de Bowman *et al.*, 2000).

Na morfogênese do vírus, além de ser um receptor para a VP4, atua como receptor intracelular na membrana do RE para as DLPs durante o processo de maturação. Também participa do processo de transporte dessas partículas através do RE e na remoção do envoltório transitório durante a montagem de partículas maduras (Taylor & Bellamy, 2003). A

NSP4 é capaz de ativar os canais dependentes de Ca^{2+} no intestino e foi descrita como a primeira enterotoxina viral (Ball *et al.*, 1996). O peptídeo correspondente aos resíduos aa 48-91 de NSP4 é capaz de promover uma desestabilização da membrana do RE com consequente lise do mesmo, levando a um aumento do Ca^{2+} intracelular (Browne *et al.*, 2000). Por consequência, há o aumento de secreção de íons cloreto (Cl^-) e ocorrência de diarreia de natureza secretória (Tian *et al.*, 1995; Estes, 2001; Huang *et al.*, 2004).

Um resíduo de aa nas posições 114 até 135 da NSP4 foi descrito como sendo capaz de induzir a diarreia em camundongos recém-natos e que alterações dos aa neste resíduo podem levar a mudanças na atividade toxigênica e virulência dos RV (Figura 6) (Huang *et al.*, 2004). Quatro sítios antigênicos foram descritos para esta proteína: ASI (151 – 169), ASII (136 – 150), ASIII (112 – 133) e ASIV (1 – 24) (Borgan *et al.*, 2003).

Em um estudo com camundongos vacinados com esta proteína foi observada a indução de proteção homotípica e heterotípica contra diarreia por RV (Estes, 2001). Em humanos, a NSP4 foi descrita como sendo capaz de induzir reposta imune celular e humoral (Johansen *et al.*, 1999).



H1, H2 e H3 – Domínios hidrofóbicos

C – Cisteínas conservadas

Dip – Sítio de ligação com a VP4

P – Prolinas conservadas

Y – Sítios de glicosilação

Figura 6. Esquema representativo da organização do gene para a proteína NSP4 de rotavírus (adaptada de Estes, 2001).

1.5.2.5. NSP5

Possui atividade autoquinase e apresenta formas hipo e hiper fosforiladas em células infectadas (Taraporewala & Patton, 2004). Durante o processo de replicação, NSP2, NSP5 e

NSP6 estão associadas na formação de viroplasmas (Estes, 2001). Mesmo na ausência de outras proteínas virais, a interação com NSP2 leva à formação *in vitro* de estruturas semelhantes a viroplasmas (VLS, do inglês: *viroplasm-like structures*). Ambos os domínios N- e C-Terminais encontram-se implicados na formação das VLS (Fabbretti *et al.*, 1999).

1.5.2.6. NSP6

Codificada por uma ORF localizada no segmento 11, distinta da que codifica para NSP5, é encontrada principalmente nos viroplasmas. Interage com NSP5, evidenciando sua participação nos processos de replicação e encapsidação do vírus. Tem sido proposto que algumas variantes de RV-A e RV-C não codifiquem esta proteína (Taraporewala & Patton, 2004; Estes & Kapikian, 2007).

1.6. Replicação viral

A replicação ocorre no citoplasma das células absorptivas diferenciadas, localizadas no terço apical das vilosidades do intestino delgado. As partículas infecciosas são liberadas no lúmen intestinal e o processo replicativo tem continuidade na área distal do intestino delgado (Estes, 2001).

A infecciosidade dos RV *in vitro* é aumentada pela tripsina. A ação proteolítica desta enzima resulta na clivagem da proteína VP4, gerando dois polipeptídeos: VP5* e VP8*. Esta clivagem interfere no processo de adsorção, mas está associada à internalização das partículas de RV nas células. Uma vez que os RV estão expostos às secreções pancreáticas, presume-se que esta clivagem ocorra no lúmen intestinal do hospedeiro durante a infecção viral (Zarate *et al.*, 2000).

O início do processo de adsorção se dá por interação dos domínios VP8* e VP5* com ácido siálico e integrinas, respectivamente, presentes em receptores celulares. Estudos demonstraram que concentrações apropriadas de cálcio são necessárias para a estabilidade da partícula, aparentemente pela estabilidade de VP7. A remoção dos íons livres de Ca²⁺ dissocia os trímeros de VP7 em monômeros, liberando a VP7 do vírion, e resulta no início da penetração induzida por mudanças conformacionais que ocorrem em VP4 (Aoki *et al.*, 2009).

O mecanismo de penetração viral ainda não foi totalmente esclarecido. Ambos os mecanismos de penetração viral, endocitose mediada por receptor ou penetração direta através

da membrana celular, têm sido sugeridos para RV. Possivelmente ocorra mais de um mecanismo de penetração viral, como já foi descrito para os poliovírus e os reovírus (Estes & Kapikian, 2007).

No citoplasma ocorre a perda do capsídeo externo (desnudamento) liberando as DLPs no citoplasma celular (Figura 7). Os RNAs são transcritos pela RNA-polimerase RNA-dependente (VP1). Ocorre a síntese de RNA(+) a partir da fita negativa do RNA viral. As fitas de RNA(+) servirão de RNAm para a tradução das proteínas virais (estruturais e não-estruturais) e de molde para a produção de novas fitas de RNA(-). As proteínas recém sintetizadas (VP1, VP2, VP3 e VP6; NSP2, NSP5 e NSP6, esta última quando presente) e o RNA fita simples (RNAs) viral são reunidos no citoplasma da célula infectada, constituindo uma região eletrodensa denominada viroplasma (Kapikian *et al.*, 2001; Estes & Kapikian, 2007). O capsídeo interno (VP6) envolve o core (RNAd, VP1-VP3) formando a partícula viral incompleta, com aproximadamente 50 nm de diâmetro (DLPs). Esta deixa o viroplasma e vai para o interior do RE Rugoso (RER), onde adquire o capsídeo externo juntamente com um envoltório transitório. A maioria das proteínas estruturais e não-estruturais é sintetizada nos ribossomas livres, no entanto, as proteínas glicosiladas VP7 e NSP4 são sintetizadas em associação com o RE. A VP7 forma o capsídeo externo e a NSP4 possui domínio citoplasmático que funciona como receptor das DLPs, interagindo diretamente com VP6 e VP4 e viabilizando o brotamento das DLPs para o interior do RE. Durante o brotamento, as partículas adquirem um envoltório lipídico transitório que se perde durante a passagem no RE. Em seguida, ocorre a montagem das partículas com capsídeo externo, o que resulta na formação de partículas virais maduras com diâmetro aproximado de 100 nm (Patton & Gallegos, 1990). Finalmente, o ciclo infeccioso termina com a liberação da progênie viral por lise celular (Kapikian *et al.*, 2001; Estes & Kapikian, 2007).

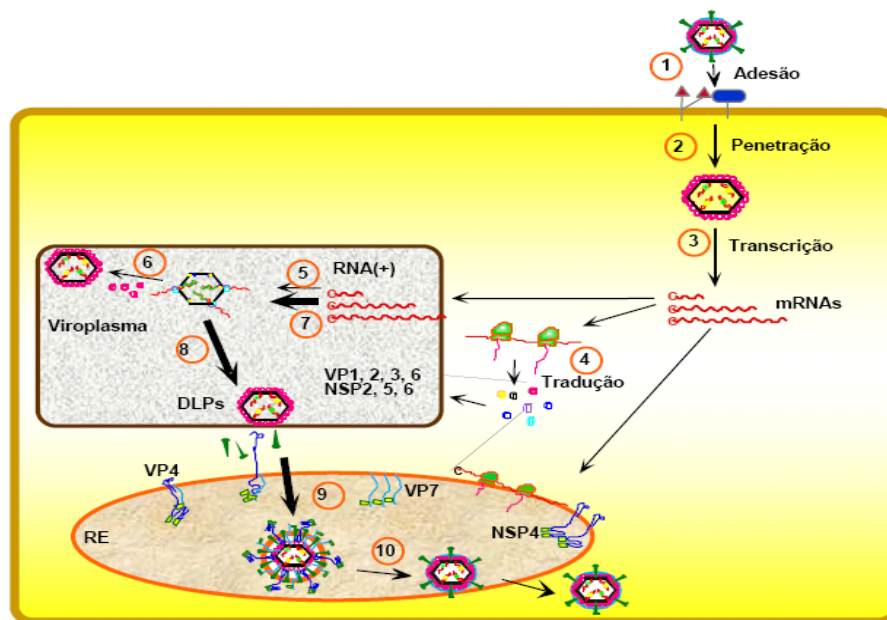


Figura 7. Modelo esquemático do ciclo de replicação dos rotavírus. As etapas de replicação estão indicadas nos números abaixo (Adaptada de Arias *et al.*, 2004). **1)** Adsorção do vírus à superfície celular, **2)** Penetração e liberação da partícula viral produzindo DLPs (Partículas de duplo capsídeo), **3)** Transcrição primária do RNAfd genômico, **4)** Síntese das proteínas virais, **5)** Síntese primária de fitas negativas de RNA, **6)** Montagem da partícula viral, **7)** Síntese secundária de fitas negativas de RNA, **8)** Montagem das DLPs, **9)** Aquisição das proteínas VP7 e VP4 no RE, **10)** Perda do envoltório transitório e geração de vírions maduros com triplo capsídeo.

1.7. Classificação dos Rotavírus A

1.7.1. Classificação baseada nas proteínas estruturais

Os RV estão classificados em sete sorogrupos distintos (A-G) pela presença de diferentes epítomos presentes na proteína estrutural VP6. Os grupos A, B, e C têm sido encontrados em humanos e em animais, enquanto os grupos D-G somente em animais (Figura 8). Os RV do grupo A (RV-A) são epidemiologicamente os mais importantes, porque são os principais responsáveis pelos episódios de diarreia aguda em crianças em todo o mundo (Kapikian *et al.*, 2001).

Os RV-A são definidos em subgrupos (SG) e sorotipos/genótipos segundo características sorológicas e moleculares, respectivamente. A proteína VP6 é a responsável pela especificidade de diferentes SG, através da presença ou ausência de epítomos imunorreativos frente a determinados anticorpos monoclonais, denominados como SGI, SGII,

SGI+II e SG não I e não II (Greenberg *et al.*, 1983; Estes, 2001). O SGII é o mais frequentemente encontrado em humanos, enquanto o SGI é mais detectado entre as amostras de origem animal (Iturriza-Gómara *et al.*, 2002).

A diferença do tamanho dos segmentos do genoma de RV (número de nt) permite que sejam visualizados separadamente através da utilização da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), apresentando um padrão típico e único para os RV. Esta característica permitiu a determinação de um padrão eletroforético (eletroferotipos) dos RV (A-G) e em particular para os RV-A, que apresentam quatro segmentos de RNAfd de alta massa molecular (1-4), dois segmentos de média massa molecular (5 e 6), seguidos de um grupo contendo três (7-9) e dois segmentos de baixa massa molecular (10 e 11). Os demais grupos de RV revelam migrações distintas (Figura 8) (Estes & Kapikian, 2007).

A classificação dos RV-A em genótipos/sorotipos consiste em um sistema binário baseado na especificidade das proteínas VP7 e VP4. Assim sendo, foram estabelecidos sorotipos/genótipos G (glicoproteína) e P (sensível à protease) para VP7 e VP4, respectivamente. Até o momento, foram descritos 24 genótipos G e 33 genótipos P (Matthijnssen *et al.* 2008a; 2008b; Abe *et al.* 2009; Maes *et al.* 2009; Solberg *et al.* 2009; Ursu *et al.* 2009).

Devido à grande diversidade de genótipos existentes, tornou-se necessária uma nomenclatura consenso entre os autores para definir tanto sorotipos como genótipos de RV-A. Cabe ressaltar que para a classificação de G, os sorotipos e genótipos têm números correlacionados, e enquanto que para os genótipos P não existe correlação. Descreve-se o P-tipo com o P acompanhado do número do sorotipo e o número do genótipo correspondente entre colchetes. O G-tipo é descrito com o G acompanhado do número (amostra de RV-A humano Wa: **P1A[8]G1**).

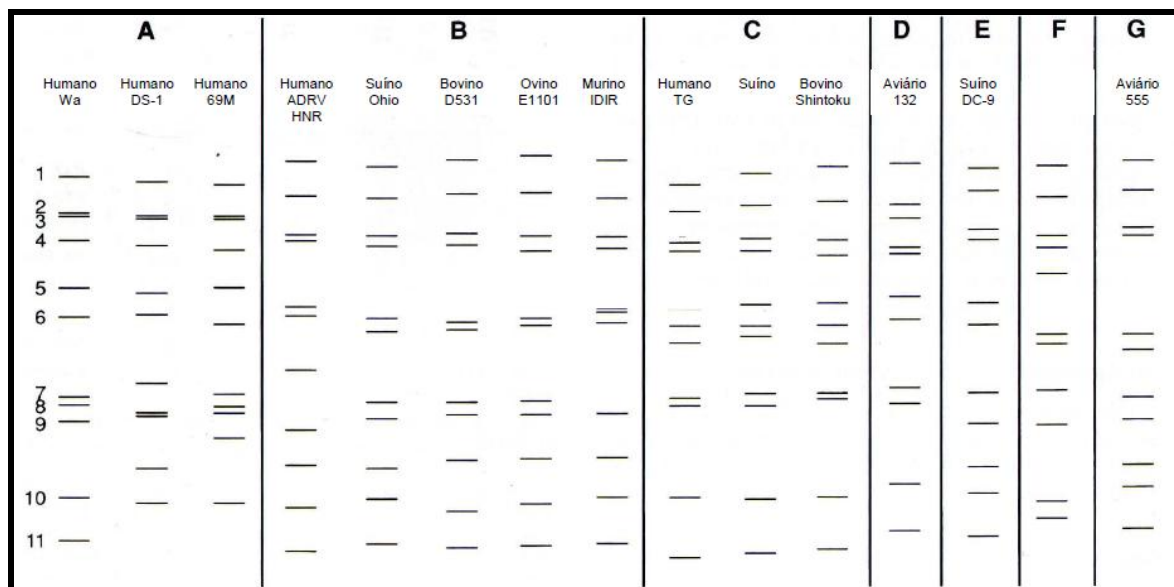


Figura 8. Esquema representativo dos eletroferotipos dos diferentes grupos de rotavírus analisados em gel de poliacrilamida (adaptada de Kapikian *et al.*, 2001).

1.7.2. Classificação baseada na proteína não estrutural NSP4

Análises de seqüências do gene que codifica para a enterotoxina viral, NSP4, identificaram a presença de seis genótipos, A – F, (Quadro 1) entre RV-A de origem humana e animal (Mori *et al.*, 2002).

Quadro 1. Classificação genética dos rotavírus A baseada na proteína não-estrutural NSP4 (adaptado de Estes & Kapikian, 2007).

Classificação de RV-A pela Proteína NSP4		
Nome das cepas seguido da espécie das quais foram isoladas		
Genótipo	Humanas	Animais^a
A	1076, RV5, S2, DS-1 A28, E210, E201, B37, KUN, CHW17, US1205, L26, B4106	Bo/UK, Bo/NCDV-Lincoln, Bo/BRV023, Bo/B223, Bo/A5, Bo/A3, Bo/CBNU-2, Bo/WC3, Si/SA11-SEM, La/ALA, La/C-11, La/BAP-2, La/R-2, La/30/96, La/160/01, La/229/01, La/308/01, Eq/H-2, Eq/F114, Eq/F123, Eq/Bl, Bu/10733, Ov/Lp14, Ov/OVR762
B	Wa, ST3, RV3, RV4, AU32, M37, VA70, 116E, Ai-75, F45, CH-32, CH55, CHW2, CH927A, J-12, TK08, TK28, YO, MO, ITO	Po/OSU, Po/Gottfried, Po/YM, Po/A34, Po/A253, PO/A131, Po/A411, Po/AT/76, Po/CRW-8, Po/BEN-144, Po/34461-4, Po/134/04-15, Po/134-04-8, Po/134/4-10 Po/RU172, Eq/H-1
C	AU-1, 02/92	Ca/RS15, Ca/CU-1, Si/RRV, Fe/FRV-1, Fe/FRV64
D		Mu/EW, Mu/EC, Mu/EHP
E		Pi/PO-13, Ty/Ty-1; Ty/Ty-3
F?		Ch/Ch-1

^a Abreviações de espécies: Si, Simio; La, Coelho; Po, Porcino; Ca, Canino; Mu, Murino; Eq, Equino; Fe, Felino; Bo, Bovino; Pi, Pombo; Ty, Peru; Ch, Galinha; Bu, Bufalo; Ov, Ovino

1.7.3. Classificação baseada em todos os genes de Rotavírus A

Recentemente, Matthijnsens e col. (2008b) propuseram um novo sistema de classificação para os RV-A, tendo como base as propriedades moleculares dos 11 segmentos genômicos. Este novo sistema de classificação foi baseado na caracterização molecular e análise filogenética do genoma completo de 53 protótipos. Os diferentes genótipos descritos para cada um dos segmentos são divididos segundo valores de cut-off específicos de identidade nucleotídica para cada um destes genes (Tabela 1). A partir da análise filogenética dos genes que codificam para as proteínas estruturais e não-estruturais, foi evidenciado um consistente padrão evolutivo entre certos vírus de origem humana e animal. Segundo os autores, esta nova classificação permitirá definir a função de cada gene na transmissão interespecie, evidenciando os eventos de reestruturações genômicas (*reassortment*) entre amostras humanas e entre amostras humanas e animais, que podem levar ao surgimento de novos genótipos de RV-A. Estas análises permitirão ainda um melhor entendimento da origem e padrão evolutivo dos RV-A.

Tabela 1. Valores de cut-off de percentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus A considerando-se os 11 segmentos genômicos (adaptada de Matthijssens *et al.*, 2008b).

Gene	Valores cut-off		Designação dos nomes dos genótipos
	de identidade nucleotídica (%)	Genótipos	
VP7	80	24G	Glicoproteína
VP4	80	33P	Sensível a Protease
VP6	85	11I	Capsídeo Interno
VP1	83	4R	RNA polimerase – RNA dependente
VP2	84	5C	Proteína do Core
VP3	81	6M	Metiltransferase
NSP1	79	14A	Antagonista do Interferon
NSP2	85	5N	NTPase
NSP3	85	7T	Intensificador da Tradução
NSP4	85	11E	Enterotoxina
NSP5	91	6H	Fosfoproteína (<i>pHosphoprotein</i>)

1.8. Mecanismos de geração de diversidade genética

Devido à natureza do genoma dos RV, RNAfd segmentado, estes virus podem evoluir por diferentes mecanismos genéticos. A evolução pode ocorrer devido ao acúmulo de mutações pontuais (*genetic drift*), ou mediante mudanças ocasionadas de forma repentina no genoma do vírus (*genetic shift*). Estas mudanças repentinas podem ser determinadas por rearranjos genéticos, reestruturação de segmentos genômicos ou recombinação genética (Ramig, 1997; Estes & Kapikian. 2007).

1.8.1. Mutação Pontual

Modificação genética mais frequente em RV-A. A ausência de mecanismo de correção de erros (remoção de bases mal pareadas) pela RNA polimerase - RNA dependente facilita a ocorrência de mutações, que ao se acumularem no genoma podem definir novas linhagens e sublinhagens dentro de um mesmo genótipo. As mutações podem ser sinônimas ou

silenciosas, não provocando nenhuma mudança na sequência de aa, e conseqüentemente na proteína, ou podem ser não-sinônimas, podendo desta forma provocar uma mudança genética que forneça uma vantagem evolutiva para o vírus ou provocando uma perda de função ou estrutura do mesmo. (Figura 9).

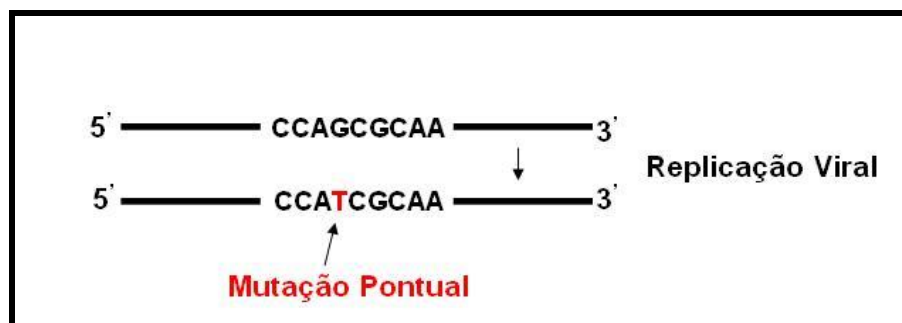


Figura 9. Esquema representativo da ocorrência das mutações pontuais.

1.8.2. Rearranjos genéticos

Os rearranjos representam alterações na sequência do segmento genômico, algumas vezes na forma de deleção ou mais freqüentemente como duplicação (Figura 10). A visualização deste tipo de mecanismo pela PAGE caracteriza-se pela ausência de alguns segmentos da sua posição usual e/ou o aparecimento de bandas adicionais com mobilidades diferentes (Taniguchi & Urasawa, 1995). Pedley e cols. (1984) investigaram RV isolados de crianças imunodeficientes e observaram variação na mobilidade dos segmentos do RNAfd pela PAGE. Com isso, vieram as primeiras descrições de que tais variações ocorriam não somente em crianças imunodeficientes, mas também em animais e crianças saudáveis (Desselberger, 1996). Os rearranjos resultam de erros de transcrição de um único segmento e possuem nada mais do que a sequência de um gene. Na maioria das vezes os genomas com rearranjos surgem como produtos de uma duplicação parcial da ORF do genoma dos RV-A, com variadas conseqüências relativas a sua expressão. Provavelmente no momento da transcrição, por uma falha da RNA polimerase – RNA dependente, ela retorne a sua fita molde (*template*) reiniciando a transcrição a partir de diferentes estágios. As regiões codificantes são mantidas em todos os rearranjos observados, apesar de alguns produzirem proteínas de tamanho anormal. Os vírus com segmentos de genoma rearranjados são geneticamente estáveis e reestruturam seus segmentos em infecções mistas (Desselberger, 1996).

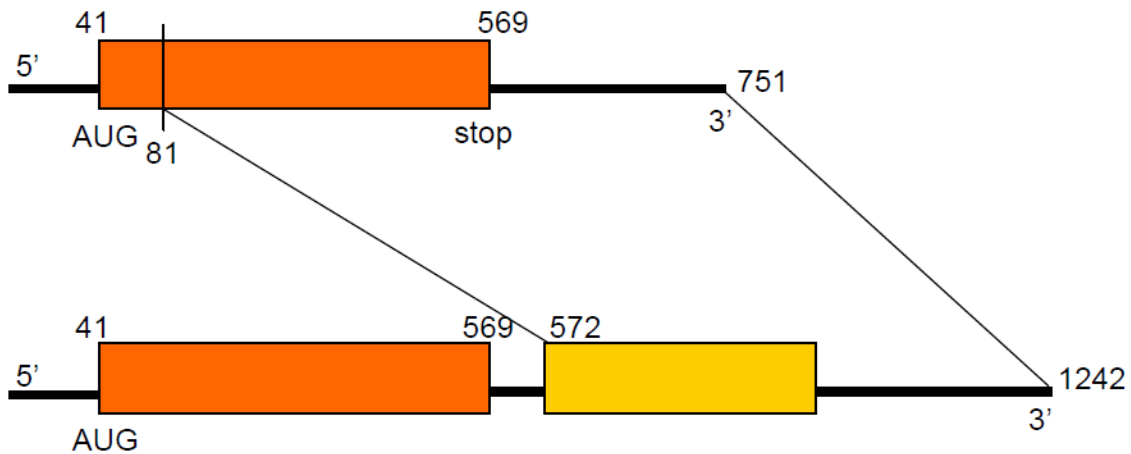


Figura 10. Estruturas rearranjadas de segmentos de genoma de rotavírus contendo duplicação parcial da ORF. (adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).

1.8.3. Reestruturação de segmentos genômicos

Nas reestruturações de segmentos genômicos ocorre uma troca de material genético entre dois vírus similares durante infecções mistas (Figura 11). No caso dos RV-A em humanos, esta troca ocorre entre dois ou mais segmentos genômicos de duas amostras pertencentes a genótipos diferentes, podendo ser de origens diferentes e gerando uma amostra com segmentos de RV-A, por exemplo, de origem animal e humana. As reestruturações foram observadas por Matsuno e col. (1980) quando obtiveram o primeiro clone reestruturado através da co-infecção em cultura celular de RV-A bovino (Lincoln) e RV símio (SA-11). A estreita associação entre eletroferotipos, subgrupo, G e P tipos implica que, pelo menos na natureza, os segmentos ou as proteínas por eles codificadas sejam interdependentes. Isto resulta na seleção de certos grupos de segmentos durante a formação de um genoma reestruturado (Taniguchi & Urasawa, 1995). As reestruturações *in natura* contendo combinações genótípicas não usuais têm sido descritas (Mascarenhas *et al.* 1989; Krishnam *et al.* 1994; Heiman *et al.* 2008). Assim como isolados com especificidade animal podem ser encontrados em outras espécies (Nakagomi & Nakagomi, 1991; Beards *et al.* 1992; Brussow *et al.* 1992; Taniguchi *et al.* 1994; Palombo & Bishop. 1995; Alfieri *et al.* 1996; Timenetsky *et al.* 1997). No entanto, esses isolados parecem ser mais frequentes nos países em desenvolvimento, provavelmente facilitados pelas precárias condições de saneamento básico e higiene, defesas imunológicas limitadas, co-infecções com parasitas e desnutrição, além do estreito relacionamento entre o homem, animais domésticos e outros animais. Nessas

condições, há favorecimento de infecções mistas e, conseqüentemente, maior possibilidade de ocorrer as reestruturações genômicas (Desselberger, 1996).

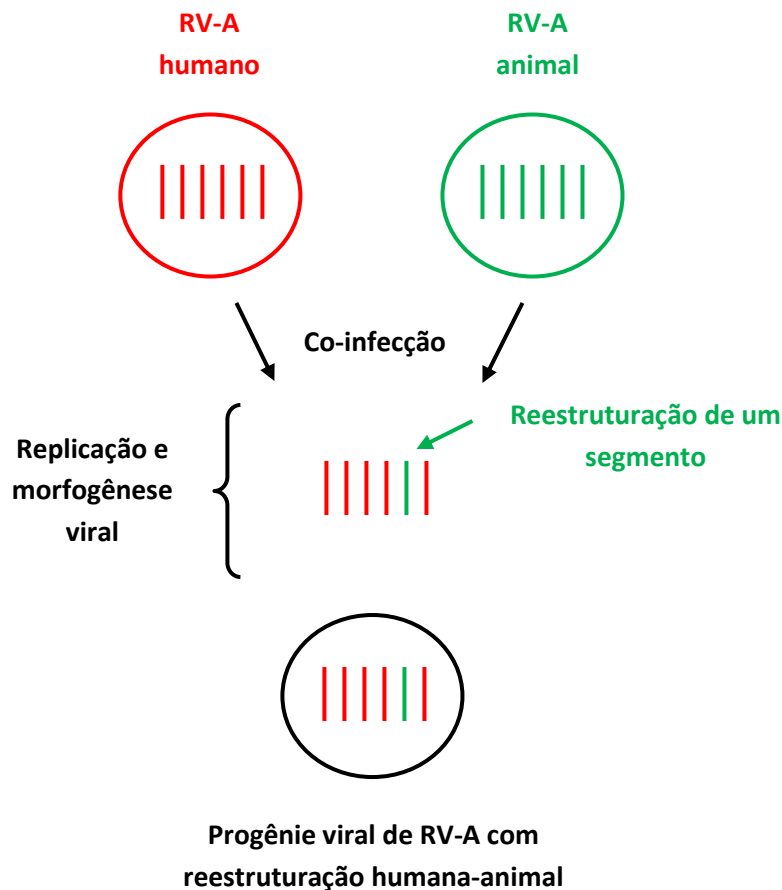


Figura 11. Esquema representativo dos eventos de reestruturação genômica.

1.8.4. Recombinação genética

Embora sejam poucos os relatos de eventos de recombinação genética (Figura 12) em RV-A, tem sido descrita sua importância na geração de variabilidade genética e evolução dos vírus (Worobey & Holmes, 1999). Além disto, vários estudos descrevem a ocorrência de infecções mistas com amostras de diferentes genótipos de RV-A ou diferentes linhagens de um mesmo genótipo ocorrendo em um mesmo indivíduo, aumentando desta forma as probabilidades de ocorrência de eventos de *reassortment* e/ou recombinação genética (Gouvea & Brantly, 1995; Jain *et al.* 2001).

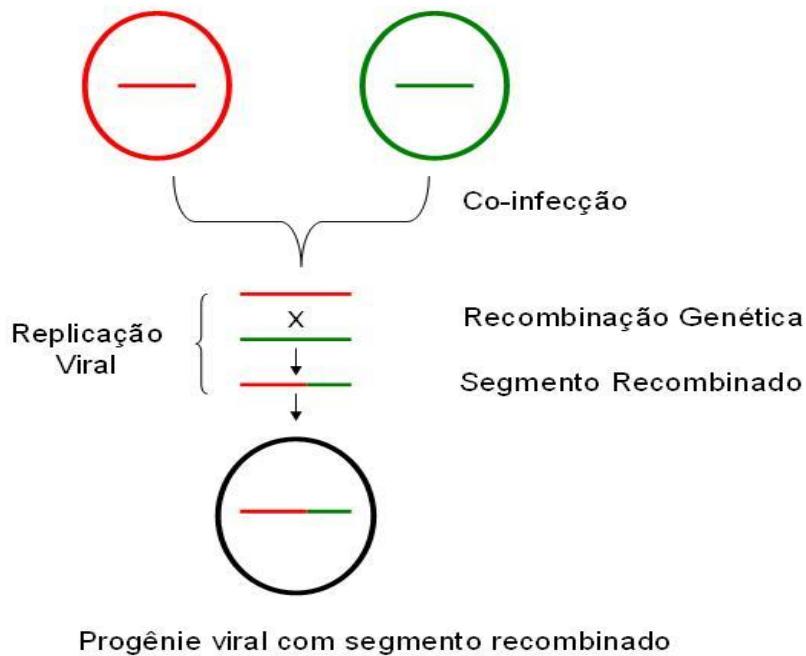


Figura 12. Esquema representativo de um evento de recombinação genética.

1.9. Transmissão interespécies

A ocorrência de transmissão de RV-A animal para humanos é mais descrita nos países em desenvolvimento, onde além da carência de saneamento básico e precariedade no sistema de saúde pública, é mais frequente o estreito contato entre humanos e animais, principalmente bovinos, suínos e aves (Jain *et al.* 2001).

Vários segmentos genômicos dos RV-A parecem ser potenciais determinantes de restrição ao hospedeiro e virulência. O seqüenciamento completo do genoma de amostras de RV-A tem permitido um melhor entendimento da base molecular na restrição das espécies e a virulência dos RV-A (Matthijnssens *et al.* 2008a; Tsugawa & Hoshino. 2008; Heiman *et al.* 2008).

No Brasil, vários trabalhos têm demonstrado o envolvimento de amostras de origem suína, especificamente os genótipos G5 e G9, causando diarreia em crianças, sugerindo uma constante troca de material genético entre as amostras de RV-A humano e animal (Alfieri *et al.* 1996; Leite *et al.* 1996; Timenetsky *et al.* 1997; Gouvea & Santos, 1999; Araújo *et al.* 2001; Mascarenhas *et al.* 2002; Santos *et al.* 2005).

1.10. Epidemiologia

Os RV-A são os principais agentes etiológicos da DA, em crianças menores de cinco anos em todo o mundo, sendo responsáveis por 40% das hospitalizações. Os países em desenvolvimento – principalmente os asiáticos e africanos - são os que apresentam maiores taxas de mortalidade devido à DA por esses vírus (UNICEF/WHO, 2009). No entanto, apesar do número limitado de óbitos, nos países desenvolvidos observa-se uma elevada morbidade (Parashar *et al.*, 2006), revelando o impacto global das infecções por RV-A.

1.10.1. Distribuição mundial de genótipos de Rotavirus A

O padrão de sazonalidade das infecções por RV-A nos diversos países varia de acordo com a região. Nas regiões de clima temperado observa-se um padrão tipicamente sazonal, caracterizado pela ocorrência de surtos e epidemias durante os meses mais frios e secos do ano, sendo que nas regiões de clima tropical as infecções por RV-A ocorrem ao longo de todo o ano (Kapikian *et al.*, 2001).

Estudos de epidemiologia molecular têm demonstrado que diferentes genótipos P e G podem co-circular dentro de uma mesma região, e que o genótipo prevalente em uma determinada região pode mudar anualmente. Outra observação é que os genótipos prevalentes em diferentes regiões de um país podem ser diferentes dentro do mesmo período epidêmico (Perez-Vargas *et al.* 2006). O genótipo prevalente (50% ou mais dos casos registrados) pode variar em intervalos de 1-3 anos, provavelmente como resultado do acúmulo progressivo dos indivíduos imunes (Castello *et al.* 2004).

Santos & Hoshino (2005) realizaram ampla revisão de artigos descrevendo genótipos de RV-A circulantes no mundo e demonstraram que mais de 90% das infecções por RV-A na América do Norte, Europa e Austrália eram associadas a combinações dos genótipos P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4. Na América do Sul e Ásia, elas representaram 68% e na África 50%. A combinação P[8]G1 ocorreu em mais de 70% das infecções na América do Norte, Europa e Austrália, e em 34% e 23% das infecções na América do Sul e na África, respectivamente (Figura 13).

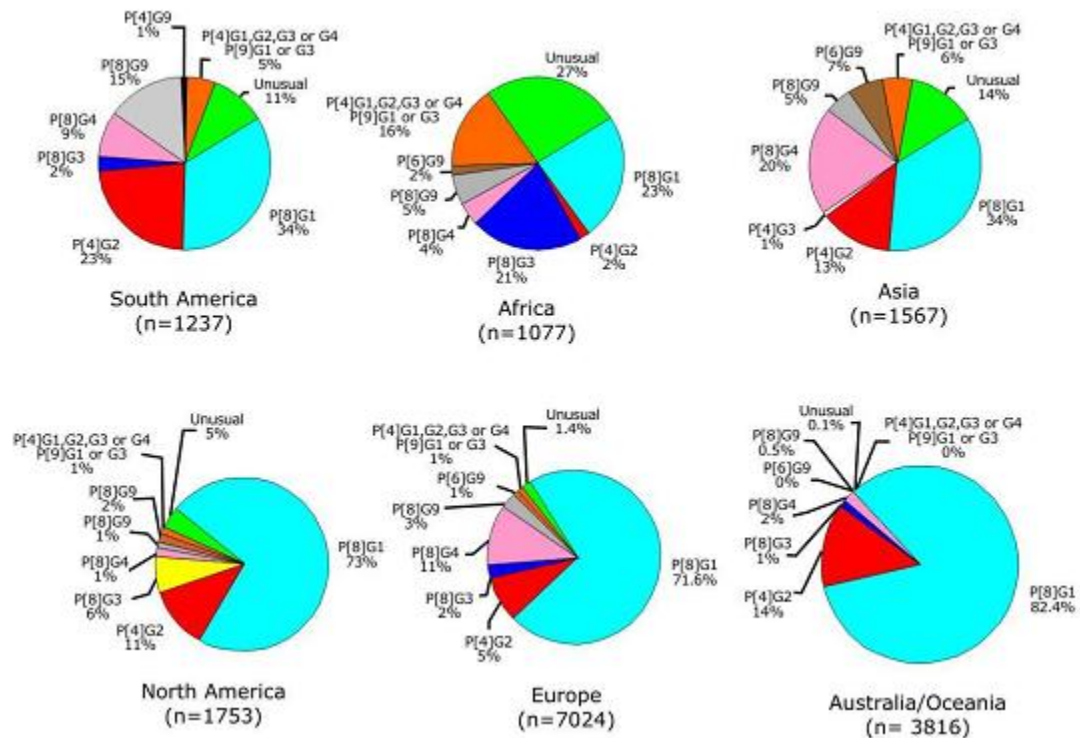


Figura 13. Distribuição continental/subcontinental de rotavírus A humano com as combinações binárias G e P (adaptada de Santos & Hoshino, 2005).

1.10.2. Distribuição de genótipos de Rotavírus A no Brasil

Em março de 2006 foi introduzida no Brasil, dentro do Calendário Nacional de Imunizações, a vacina monovalente contra RV-A (Rotarix® - GlaxoSmithKline, Rixensart, Bélgica). Trata-se de uma vacina preparada a partir de uma cepa humana atenuada genótipo G1P[8]. Leite e col. (2008) descreveram a genotipagem de RV-A no Brasil em dois períodos pré-vacinais, 1982-1995 e 1996-2005. Esse estudo demonstrou que as combinações mais frequentemente encontradas foram: G1P[8]/G1P[?] (43%), G9P[8]/ G9P[?] (20%), G2P[4]/G2P[?] (9%), G3P[8]/ G3P[?] (6%), G4P[8]/ G4P[?] (4%) e G5P[8]/ G5P[?] (4%) (Figuras 14 e 15). Também foi possível observar que no período 1982 – 1995 a distribuição do genótipo G3 era maior nas regiões centro-oeste e nordeste, com detecção também nas regiões norte e sudeste. No entanto, nos anos seguintes a circulação desse genótipo foi restrita à região sudeste.

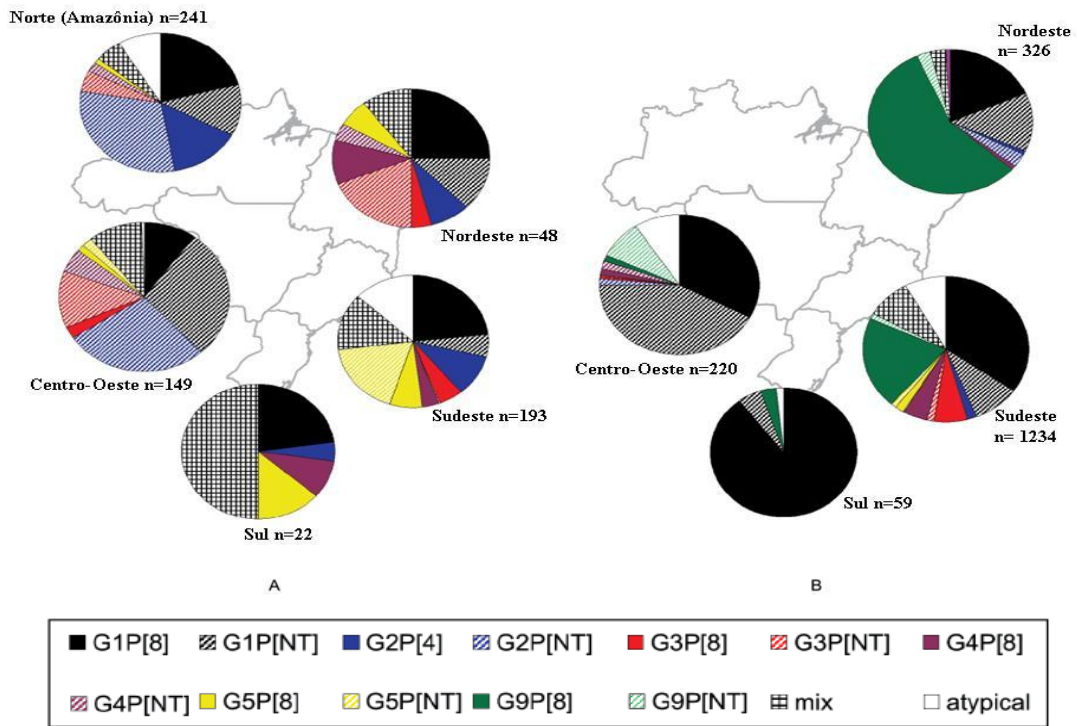


Figura 14. Distribuição dos genótipos de rotavírus A no Brasil, por região. A: de 1982 a 1995, e B: de 1996 a 2005 (adaptada de Leite et al, 2008).

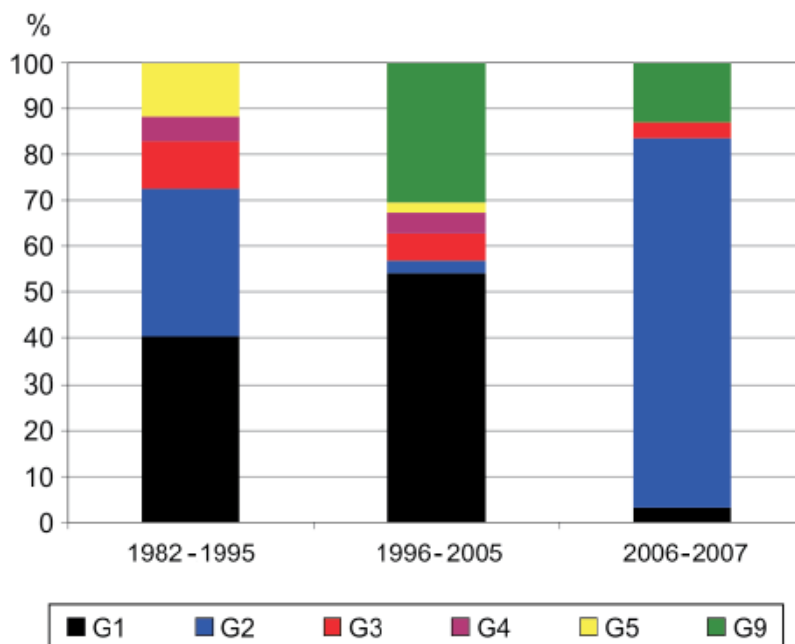


Figura 15. Taxa de detecção dos diferentes genótipos G de rotavírus A no Brasil em diferentes períodos (adaptada de Leite et al, 2008)

1.10.3. Genótipo G3 de Rotavirus

Dentre os genótipos de RV-A descritos até o momento, o genótipo G3 possui a maior variedade de hospedeiros. Diversas espécies já foram descritas, incluindo macacos, coelhos, porcos, aves, cães, gatos, cavalos, camundongos, ovelhas e humanos (Gentsch et al., 1996, 2005; Martella et al., 2001, 2003; Lee et al., 2003; McNeal et al., 2005; Khamrin et al., 2006). McDonald e colaboradores (2009) caracterizaram o genoma completo de 51 amostras de RV-A genótipo G3P[8] de origem humana a fim de avaliar a diversidade e evolução dos rotavírus. Os resultados dessa análise sugerem que, embora os reagrupamentos ocorram, a seleção natural favoreça a manutenção de determinadas constelações genômicas – prevalecendo reagrupamentos intra-genogrupos.

Embora poucos relatos tenham descrito a associação do genótipo G3P[8] com a diarreia aguda na década de 90, nos últimos anos estudos em diversas partes do mundo têm registrado a re-emergência de G3, principalmente nos países asiáticos (De Grazia et al., 2007; Chen et al., 2007, Xu et al., 2009; Mishra et al., 2010; Wang et al., 2009; O’Ryan, 2009; Vainio et al., 2009). No Brasil, foi observada a emergência do genótipo G3 em crianças hospitalizadas em um hospital público no município do Rio de Janeiro em 2005, sendo responsável por 30% dos casos (Carvalho-Costa et al., 2009). Em estudo conduzido na Austrália (Gentsch, Parashar & Glass, 2009), observou-se um aumento na frequência de G2 e G9 nos estados em que a vacina Rotarix® foi administrada. No entanto, nos estados em que a vacina administrada foi a RotaTeq® observou-se um aumento na frequência de G3, corroborando dados obtidos nos Estados Unidos. Esses relatos indicam a possibilidade de pressão seletiva dos genótipos G2 e G3 pela vacinação.

A re-emergência de G3 e ampla gama de hospedeiros indicam a relevância dos estudos de prevalência, transmissão inter-espécie desse genótipo, além da possibilidade de escape vacinal.

1.11. Tratamento

O tratamento da DA preconizado pela OMS está baseado, principalmente, na terapia de reidratação oral com sais de baixa osmolaridade (SRO) a fim de prevenir a desidratação; na utilização de zinco, que diminui a severidade e a duração da diarreia; e na alimentação contínua. No entanto, em países em desenvolvimento apenas 39% das crianças com até cinco anos recebem o tratamento recomendado (UNICEF/WHO, 2009).

O profissional de saúde pode optar por um de três planos de tratamento de acordo com o estado de hidratação do paciente: o plano “A” é aplicado a pacientes sem sinais de desidratação e se baseia na prevenção da desidratação em domicílio; o plano “B” é indicado para pacientes levemente desidratados, e o tratamento consiste na hidratação por via oral na unidade de saúde; o plano “C” é utilizado para tratar a desidratação severa, em que os pacientes são hidratados por via venosa (Ministério da Saúde, 1993).

1.12. Prevenção e controle

A prevalência da DA causada por RV-A tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento sugere que, ao contrário de outros enteropatógenos de transmissão fecal-oral, não seria possível controlar a infecção de RV-A somente através de melhorias na infra-estrutura sanitária das populações. Conseqüentemente, acredita-se na possibilidade de que uma vacina possa ser a única forma de prevenção possível (Glass *et al.* 2006).

Alguns estudos demonstraram que as infecções por RV-A naturalmente adquiridas conferem proteção contra reinfecções de formas graves (Ward & Bernstein 1994; Moulton *et al.* 1998) e a exposição assintomática de recém-nascidos ao RV-A é associada a chances reduzidas de desenvolvimento de formas graves da gastroenterite na infância (Bishop *et al.* 1983; Bhan *et al.* 1993). Estudos realizados no México demonstraram que o grau de proteção aumenta com as sucessivas reinfecções, tendo sido relatado, que após duas infecções por RV-A, as crianças não desenvolvem diarreia aguda pelo patógeno (Velazquez *et al.* 1996). Estes fatos têm servido de base para as tentativas de desenvolvimento de vacinas contra os RV-A.

Devido ao impacto global da DA causada por RV-A, vários grupos de pesquisa têm trabalhado no desenvolvimento de vacinas contra o RV-A, e diferentes abordagens têm sido utilizadas.

1.12.1. Vacinas contra Rotavirus A

1.12.1.1. Abordagem Jenneriana Monovalente

Baseada na premissa das amostras animais de RV-A serem naturalmente atenuadas para seres humanos e que, administradas por via oral, poderiam mimetizar a infecção natural pelo patógeno e desencadear uma resposta imune protetora.

1.12.1.1.1. RIT 4237

Derivada do isolado de rotavírus bovino NCDV de genótipo G6 P[1]. Apresentou eficácia na Finlândia, conferindo até 80-90% de proteção contra casos graves de diarreia por RV-A (Vesikari *et al.* 1985). Contudo, na África a eficácia dessa vacina após 3 doses foi de 33% (Hanlon *et al.* 1987). A fabricação dessa vacina foi descontinuada devido à sua imunogenicidade e eficácia insuficientes.

1.12.1.1.2. WC3

Também de origem bovina, genótipo G6P[2]. Em ensaio conduzido na Filadélfia, após uma única dose, induziu 76% de proteção (Clark *et al.* 1996). Contudo, em avaliações posteriores em Ohio, Estados Unidos (EUA), a vacina mostrou somente 20% de eficácia. Sua produção e aplicação também foram descontinuadas.

1.12.1.1.3. RRV ou MMU18006

De origem símia, genótipo G3, foi isolada de fezes de macaco *Rhesus sp* com diarreia aguda. Provou ser imunogênica, porém foi associada a reação febril importante (Vesikari *et al.* 1986).

1.12.1.2. Abordagem Jenneriana modificada

1.12.1.2.1. Rhesus Rotavirus Vaccine-Tetravalent (RRV-TV) (Rotashield®)

Seguindo o princípio da imunidade sorotipo-específica o Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH) desenvolveu a vacina oral RRV-TV, obtida através da incorporação de material genético codificante de VP7 de RV-A humano em RV-A símio. Esta vacina

contempla as especificidades genotípicas G1, G2 e G4, adicionadas ao já representado G3 da amostra original de macaco. Desta forma, a RRV-TV representa uma mistura de três vírus reestruturados símio-humanos (G1, G2 e G4) com a amostra de macaco *Rhesus* G3 original. Esta vacina (Rotashield®) foi licenciada pelo órgão norte-americano *Food and Drug Administration* (FDA) em 1998, sendo recomendada para uso em três doses, aos dois, quatro e seis meses de idade, tendo a distribuição se iniciado em outubro daquele ano nos EUA.

Entretanto, em julho de 1999, após a administração de quase 1,5 milhão de doses, sua aplicação foi suspensa por estar associada a 15 casos de intussuscepção (obstrução intestinal) envolvendo crianças que haviam tomado a vacina (Hoshino *et al.* 2003). Após este fato, motivou-se o desenvolvimento de estudos epidemiológicos onde foram caracterizados os riscos quanto ao desenvolvimento de intussuscepção, principalmente nas duas semanas após a primeira e segunda doses. Os riscos estimados são da ordem de 1 evento obstrutivo intestinal para cada 4.500 crianças vacinadas (Murphy *et al.* 2001). O risco assumia maiores proporções quando a vacina era administrada em idade superiores a 90 dias, quando comparadas a crianças imunizadas aos 2 meses (Fischer *et al.* 2004). Além da intussuscepção, evidências indicam que a vacina foi indutora de outros eventos adversos importantes, como a diarreia sanguinolenta (Haber *et al.* 2004).

1.12.1.2.2. Rotateq®

A amostra vacinal bovina WC3 também foi alvo de reestruturação seguindo-se os princípios utilizados para a criação da RRV-TV, dando origem a uma vacina pentavalente reestruturada bovino-humana. Foi primeiramente licenciada pela Merck (Merck Research Laboratories, West Point, PA) em fevereiro de 2006 nos Estados Unidos. Esta vacina é constituída por RV bovino expressando na superfície VP7 correspondente aos sorotipos G1, G2, G3 e G4, além de VP4 correspondente ao sorotipo P[8]. A vacina deve ser administrada em três doses, aos dois, quatro e seis meses de idade (Vesikari *et al.* 2006).

Os estudos em fase III incluíram 4.512 crianças, sendo 2.207 vacinadas e 2.305 pertencentes ao grupo controle. A eficácia da vacina contra estes sorotipos, analisados em conjunto foi de 74% para gastroenterite aguda de qualquer gravidade e de 98% para gastroenterite aguda grave (Vesikari *et al.* 2006).

1.12.1.2.3. Vacina UK

Esta vacina foi desenvolvida também pelo NIH e consiste em uma amostra de RV-A de origem bovina (UK), reestruturada por possuir o gene codificante de VP7 de RV-A de origem humana com especificidades genóticas G1, G2, G3 e G4 e os demais genes da amostra UK (P[7]G6). Desta forma, com tecnologia obtida através de estudos com reestruturação, se torna possível desenvolver vacinas para regiões geográficas específicas, com alta prevalência de genótipos emergentes e/ou com co-circulação de diferentes genótipos. Em 2004, o NIH transferiu a patente de produção da vacina para Índia, Brasil e China (Dennehy, 2008). No Brasil, a licença para produção foi dada ao Instituto Butantan, em São Paulo (Ferguson, 2004).

1.12.1.2.4. RIX 4414 (Rotarix®)

A vacina Rotarix® foi introduzida no calendário brasileiro de imunizações em março de 2006, porém já estava disponível desde 2005 em clínicas e consultórios particulares. Esta vacina, desenvolvida pela *GlaxoSmithKline Biologicals*, contém em torno de 10⁶ unidades formadoras de foco da amostra de RV-A humano RIX 4414, de especificidade genotípica G1P[8] (Vesikari *et al.* 2004).

A eficácia da vacina foi avaliada em vários países, como Finlândia (Vesikari *et al.* 2004), México, Venezuela e Brasil (Salinas *et al.* 2005). Considerando duas doses da vacina, sua eficácia para episódios de diarreia grave causada por RV-A variou entre 68,5 e 90,0%. Para diarreia de qualquer gravidade, a eficácia variou entre 55,7 e 73%. Para hospitalizações devido à doença causada por RV-A, a eficácia variou entre 65,4 e 93%. A eficácia na redução de hospitalizações de uma forma geral foi de 42% (Ruiz-Palacios *et al.* 2006). Os dados da América Latina (Brasil, México e Venezuela) mostraram uma eficácia protetora contra gastroenterite, gastroenterite grave e hospitalizações por RV-A de 62,9%, 78,3% e 86,0%, respectivamente. A partir da primeira dose, a vacina mostrou eficácia na prevenção da doença. Para qualquer gastroenterite a eficácia foi de 63,5% e para gastroenterite grave foi de 73% (Salinas *et al.* 2005).

A vacina foi especialmente eficaz na prevenção de gastroenterite por RV-A de genótipo G1, porém, estudos descrevem a ocorrência de proteção cruzada para gastroenterite e gastroenterite grave causada por outros genótipos (G3, G4 e G9), normalmente associados ao genótipo P[8]. Esta eficácia variou entre 65% e 100%. Em relação ao genótipo G2 foi

observada uma eficácia de 41% (a menor proteção cruzada verificada), visto que o mesmo, geralmente está associado ao genótipo P[4] (Ruiz-Palacios *et al.* 2006).

2. JUSTIFICATIVA

Sucessões de genótipos de RV-A vêm ocorrendo em diversas partes do mundo e características genéticas podem comprovar a relação entre esses genótipos e sua forma de evolução em períodos diferentes de tempo. Estudos anteriores demonstraram baixa frequência ou ausência da detecção do genótipo G3 de RV-A em fezes de crianças com DA na década de 90, no entanto, nos anos seguintes observou-se a re-emergência do genótipo em diversas partes do globo. Em 2005, Carvalho-Costa e col. (2009) demonstraram a associação de RV-A G3 a 30% das crianças com DA em um hospital público do Rio de Janeiro.

Em 2006, foi introduzida a vacina monovalente Rotarix® (G1P[8]) pelo PNI no Brasil. Estudos de eficácia descreveram a ocorrência de proteção cruzada para gastroenterite e gastroenterite grave causada por outros genótipos (G3, G4 e G9), normalmente associados ao genótipo P[8]. No entanto, em 2009 o Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Laboratório de Referência Regional de Rotavírus (LRRRV) do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz recebeu amostras de fezes originadas do Rio Grande do Sul de crianças vacinadas com DA. Essas amostras foram caracterizadas como pertencentes ao genótipo G3.

Neste contexto, análises filogenéticas e estudos de caracterização molecular do genótipo G3 de RV-A no Brasil tornam-se relevantes na avaliação da relação genética das amostras isoladas antes e depois da introdução da vacina contra rotavírus.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a relação genética de amostras de RV-A genótipo G3 isoladas no período de 1996 a 2009, antes e após a introdução da vacina monovalente Rotarix[®] (G1P[8]) no calendário nacional de imunizações do Brasil, através da análise dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4 e NSP4.

3.2. Objetivos específicos

- ❖ Confirmação do genótipo G3 e determinação os genótipos de VP4 e NSP4 segundo o novo sistema de classificação dos RV-A nas amostras isoladas na cidade do Rio de Janeiro.
- ❖ Comparação das amostras incluídas no estudo com outras seqüências dos mesmos genes disponíveis em base de dados.
- ❖ Análise da ocorrência de possíveis eventos geradores de variabilidade genética em RV-A genótipo G3.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras Clínicas

Foram selecionadas 73 amostras fecais de crianças menores de 5 anos de idade com quadro de GA, obtidas da coleção do LVCA, IOC – FIOCRUZ entre 1996 e 2009. As amostras foram previamente genotipadas como G3 utilizando RT-PCR, de acordo com o protocolo descrito por Das e cols. (1994). As amostras detectadas em 2005 e 2006 foram genotipadas por Carvalho-Costa e colaboradores (2009). No período compreendido entre 1998-2004 e 2007-2008 não foram recebidas no LVCA amostras pertencentes a esse genótipo. Foram analisadas amostras provenientes dos seguintes estados: Bahia (n=2), Espírito Santo (n=2), Rio de Janeiro (n=58) e Rio Grande do Sul (n=11).

4.2. Suspensão Fecal

A partir das amostras clínicas foram preparadas suspensões fecais a 10% em tampão Tris-HCl Ca²⁺ 0,01M pH 7,2 (ver item 4.5). Após homogeneização em vortex, as suspensões foram submetidas à centrifugação a 3000 x g por 10 min, os sobrenadantes coletados e armazenados a -20°C.

4.3. Extração de RNA

A partir dos sobrenadantes obtidos conforme descrito no item 4.2, extraiu-se RNA pelo método descrito por Boom e cols. (1990), incluindo modificações de Araújo e cols. (2001). As soluções utilizadas estão descritas no item 4.5. Em tubo plástico tipo Eppendorf® de 1,5mL foram adicionados 1 mL de tampão L6 e 400µL de suspensão fecal a 10%. Após homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 5 minutos, adicionou-se 15µL de sílica. Após agitação orbital por 20 minutos, as suspensões foram centrifugadas a 16.000 x g por 1 minuto, descartando-se o sobrenadante em solução de NaOH 10N. Adicionou-se 1 mL de tampão L2, seguido de agitação em vortex para homogeneização do sedimento formado. Novamente os tubos foram centrifugados a 16.000 x g por 1 minuto e o sobrenadante descartado em solução de NaOH 10N. A seguir foram realizadas duas etapas de lavagens:

adição 1 mL de etanol a 70% gelado, e posterior adição de 1 mL de acetona P.A (Merck®) gelada. Nas duas etapas de lavagem foram utilizados os mesmos procedimentos de homogeneização e sedimentação descritos nas etapas anteriores, desprezando-se o sobrenadante em recipiente plástico próprio, que aguardou descarte adequado provido pela instituição. Após a última lavagem, os tubos foram incubados a 56° C por 15 minutos com as tampas abertas para completa evaporação da acetona. Após esse período, foram adicionados 60µL de água livre de endo e exonucleases (Invitrogen®) em cada tubo. Os tubos foram novamente homogeneizados em vortex e incubados a 56° C por 15 minutos com as tampas fechadas. Após a centrifugação a 16.000 x g por 3 minutos, 50µL do sobrenadante contendo RNA foram coletados cuidadosamente e transferidos para outro tubo, sendo armazenados a -70°C.

4.4. Amplificação dos genes VP7, VP4 e NSP4 por RT-PCR

A partir da extração de RNA realizou-se a transcrição reversa com a utilização do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA) de acordo com as instruções do fabricante, seguida da amplificação com iniciadores específicos.

A mistura de reagentes utilizada para a amplificação dos genes que codificam as proteínas VP4, VP7 e NSP4 estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7.

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (Invitrogen®)	-	31,25 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen®)	10x	5 MI
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen®)	2,5mM	4 MI
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50mM	2,5 µL
Taq DNA polimerase Platinum II (Invitrogen®)	5U/MI	0,25 MI
Oligonucleotídeos específicos para:		
VP7 Beg9 ¹ – End9 ¹	20µM (cada)	2 µL

VP4 4con3² – 4con2²

NSP4 jrg30³ – jrg31³

Total

45 µL

¹Gouvea *et al.* 1990. ²Gentsch *et al.* 1992. ³Cunliffe *et al.* 1997.

Para a PCR do gene que codifica para VP7 realizou-se uma etapa de desnaturação prévia a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 50°C por 1 minuto para o pareamento dos iniciadores e 72°C por 2 minutos para a extensão das de DNA. A etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos.

As condições de termociclagem para VP4 e NSP4 consistiram de: uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 47°C por 30 segundos para o anelamento dos iniciadores e 72°C por 1 minuto para extensão das fitas de DNA. A extensão final da fita de DNA foi a 72°C por 10 minutos.

4.4.1. Oligonucleotídeos

No Quadro 2 estão descritos os oligonucleotídeos utilizados nas diferentes reações de PCR para a amplificação dos genes em estudo. Para amplificação do gene que codifica para a proteína VP7 foram utilizados os oligonucleotídeos Beg9 e End9, obtendo-se um *amplicon* de 1062pb. Para o gene que codifica para a proteína VP4 foram utilizados os oligonucleotídeos: 4con3 e 4con2, obtendo-se um *amplicon* de 877pb. E para o gene que codifica para a proteína NSP4 foram utilizados os oligonucleotídeos jrg30 e jrg31, obtendo-se um *amplicon* de 738 pb. Os mesmos oligonucleotídeos foram utilizados no seqüenciamento.

Quadro 2. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes NSP4, VP4 e VP7.

Gene	Nome do oligonucleotídeo	Seqüência sentido 5´ - 3´	Posição do nucleotídeo (nt)
VP7	Beg9 (+)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	1 - 28

VP7	End9 (-)	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	1062-1036
VP4	4 con 2 (-)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	887 – 868
VP4	4con3 (+)	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11-32
NSP4	Jrg30 (+)	GGCTTTTAAAAGTTCTGTT	1-19
NSP4	Jrg31 (-)	ACCATTCCTTCCATTAAC	738-721

4.4.2. Análise dos amplicons por eletroforese em gel de agarose a 1,5%

Os *amplicons* obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (GIBCO-BRL[®]) a 1,5% em tampão TBE 0,5% (GIBCO-BRL[®]; ver item 4.5) por 1 hora a 100 volts. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), os *amplicons* foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Labnet[®]) e as imagens registradas em sistema de captura de imagem (BioImaging Systems[®]) utilizando o programa Labworks 4.0.

4.5. Soluções

4.5.1. Tampão TRIS/HCl/Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2

Tris - hidroximetil-tris-aminometano (SIGMA [®])	1,21g
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) 0,0015M (Vetec [®])	0,02g
Água destilada q.s.p.	1000mL

Os reagentes foram adicionados, homogeneizados com agitador magnético e ajustado o pH (7,2) com HCl PA (Merck[®]). Em balão volumétrico de 1000mL completou-se o volume final. A solução foi transferida para um frasco com vedação, autoclavada a 121°C por 20 minutos e armazenada entre 2 - 4°C.

4.5.2. EDTA 0,2M pH 8,0

EDTA-ácido etilenodiamino tetracético-(SIGMA®)	37,22mg
Água destilada q.s.p.	500mL

A solução de EDTA e água destilada foi homogeneizada e o pH (8,0) ajustado com NaOH. O volume final foi ajustado em balão volumétrico, e o armazenamento se deu em frasco com tampa a 22°- 25°C.

4.5.3. Tris-HCl 0,1M pH 6,4

Tris (hidroximetil-tris-aminometano) (SIGMA®)	12,11 g
Água destilada q.s.p.	1000mL

Após homogeneização, o pH (6,4) foi ajustado com HCl e completou-se o volume final em balão volumétrico. A solução foi armazenada a 22°- 25°C.

4.5.4. Tampão L6

Isotiocianato de guanidina (Invitrogen®)	120g
Triton X-100 (SIGMA®)	2,6g
EDTA 0,2M pH 8,0 (SIGMA®)	22mL
Tris-HCl 0,1M pH 6,4 (SIGMA®) q.s.p	100mL

Os reagentes foram adicionados e homogeneizados com agitador magnético. Após o ajuste de volume e pH (6,4), a solução foi transferida para frasco âmbar e conservada entre 22°- 25°C.

4.5.5. Sílica

Dióxido de silício (SIGMA [®])	60g
Água destilada q.s.p.	500mL

Após homogeneizada, a solução permaneceu em repouso por 24 horas para que a sílica sedimentasse. Foram desprezados 430mL do sobrenadante e adicionados 500mL de água destilada à sílica. Após sedimentação por 5 horas, 440mL do sobrenadante foram desprezados. O pH (2,0) foi ajustado com adição de HCl 37% (Merck[®]). Alíquotas de 10mL em frascos de cor âmbar foram autoclavadas a 121°C por 20 minutos e estocadas entre 22°-25°C.

4.5.6. Tampão L2

Isotiocianato de guanidina (Invitrogen [®])	120g
Tris-HCl 0,1M pH 6,4 (SIGMA [®]) q.s.p.	100mL

Os reagentes foram adicionados e homogeneizados com agitador magnético. Após o ajuste de volume, a solução foi transferida para frasco âmbar e conservada entre 22°- 25°C.

4.5.7. Tampão Tris-Boro-EDTA 10X pH 8,4 (TBE)

Tris-base (Invitrogen [®])	108g
Ácido bórico (Reagen [®])	55g
EDTA 0,5M pH 8, 8 (Sigma [®])	40mL
Água Milli-Q q.s.p.	1000mL

Os reagentes foram adicionados e homogeneizados com agitador magnético. A solução foi transferida para frasco com tampa e armazenada a 2°- 4°C.

4.5.8. Gel de agarose a 1,5%

Agarose (Invitrogen®)	1,2g
Tampão TBE 0,5 X pH 8,4 (Invitrogen®)	80mL

Adicionou-se a agarose à 80mL de tampão TBE 0,5X. O erlenmeyer foi levado ao forno de microondas em intervalos de 30 segundos seguidos de agitação branda, até que a agarose fosse dissolvida, deixando resfriar até +/- 50°C. Em seguida a agarose foi despejada na cuba de eletroforese, observando-se a ausência de bolhas.

4.6. Purificação dos produtos da reação em cadeia pela polimerase

Para a purificação dos *amplicons* foram utilizados os kits comerciais “QIAquick® PCR Purification Kit” (QIAGEN™, Valencia, CA, USA), quando apenas a banda esperada foi obtida. Na presença de bandas inespecíficas, foi realizada a purificação do produto pela extração em gel de agarose utilizando o “QIAquick® Gel Extraction Kit” (QIAGEN™, Valencia, CA, USA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. A quantificação do DNA purificado para as reações de seqüenciamento foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Scientific, USA).

4.7. Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pela Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/Fiocruz (Otto *et al.* 2008). Segundo orientação da plataforma de sequenciamento, 6,5 µL de DNA purificado e 3,2 pmoles (1,6 µL) de iniciadores utilizados na PCR foram adicionados em tubo tipo Eppendorf™ de 1,5 mL. A reação foi realizada utilizando o Kit Big Dye Terminator® v 3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems®, CA, USA), conforme recomendado pelo fabricante. Os produtos da reação de seqüência foram purificados com as colunas CENTRI-SEP® (Princeton Separations®, CA, USA) conforme orientação do fabricante. A quantificação do DNA amplificado foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Scientific, USA). Os cromatogramas das seqüências foram obtidos a partir do sequenciador automático de 48 capilares “ABI Prism 3730 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) do serviço da “Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ” (Otto *et al.* 2008).

Os oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento foram os mesmos utilizados nas reações de PCR.

4.8. Análise das sequências

Os cromatogramas das seqüências recebidos da Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, foram analisados com a programa *BioEdit*® versão 7.0.9.0 (Hall 1999) e as sequências consenso geradas. O alinhamento de nucleotídeos e aminoácidos foi realizado utilizando o *CLUSTAL W* (Thompson *et al.* 1994), e as matrizes de identidade obtidas com BioEdit® versão 7.0.9.0.

As seqüências protótipos representantes dos diferentes genótipos de RV-A de origem humana e animal, descritas em diferentes países, foram obtidas no GenBank (NCBI, National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os protótipos foram selecionados de acordo com a disponibilidade e identidade com as amostras incluídas no presente estudo, e seus números de acesso encontram-se descritos na Tabela 3.

As relações filogenéticas entre as diferentes sequências foram determinadas mediante a utilização do pacote de programas MEGA v. 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) através do método de reconstrução filogenética *Neighbor-joining*. As distâncias genéticas entre as diferentes amostras foram calculadas mediante o modelo *Kimura-dois-parâmetros* como modelo de substituição nucleotídica, e o modelo *Poisson Correction* como modelo de substituição aminoacídica. A fim de corroborar os resultados obtidos através dessa análise, também foram construídas árvores filogenéticas por diferentes modelos de determinação de distância genética entre as sequências nucleotídicas, entre os quais os modelos de *Tajima-Nei* e *Maximum Composite Likelihood*, disponíveis no programa MEGA v. 4.0 (dados não mostrados). A significância estatística das diferentes filogenias obtidas foi estimada através de 2.000 réplicas de *bootstrap*. O mapeamento das diferentes mutações sinônimas e não-sinônimas foi realizado através da análise direta dos alinhamentos de aminoácidos obtidos para os genes que codificam para VP7, VP4 e NSP4 das amostras analisadas e protótipos disponíveis no *GenBank*.

Tabela 3. Lista de protótipos utilizados nas análises filogenéticas com seus respectivos números de acesso no GenBank, país, ano do isolamento, espécie de origem e genótipo.

PROTÓTIPO	PAÍS	ANO	ORIGEM ^a	GENÓTIPO	Acesso <i>GenBank</i>		
					VP7	VP4	NSP4
30/96	Itália	1996	La	G3-P[14]-E5	DQ205229.1		
A131	Venezuela	1989	Po	G3-P[7]-E1	L35055.1		
Ai-75	Japão		Hu	G3-P[8]-E1	D86270.1	AB008285.1	
Arg5812	Argentina	2007	Hu	G3-P[8]-E?	GQ282614.1		
AU-1	Japão		Hu	G3-P[9]-E3	D86271.1		D89873.1
B3458	Bélgica	2003-2004	Hu	G9-P[8]-E?		EF990707.1	
ba12537	Brasil	2006	Hu	G9-P[8]-E?		FN179485.1	
BrzPhim	Brasil		Hu	G1-P[8]-E?		AF061361	
BrzH8	Brasil		Hu	G5-P[8]-E?		U41006	
Cat2	Austrália	1984	Fe	G3-P[9]-E?	EU708961.1		
CU-1	Estados Unidos	1980	Ca	G3-P[3]-E3	EU708917.1		
DC5544	Estados Unidos	1991	Hu	G3-P[8]-E1	FJ947513.1	FJ947508.1	FJ947514.1
DC5549	Estados Unidos	1991	Hu	G3-P[8]-E1	FJ947524.1	FJ947519.1	FJ947525.1
DS-1	Estados Unidos		Hu	G2-P[4]-E2	AB118023.1	EF672577.1	EF672582.1
E885	China	2007	Hu	G3-P[8]-E?	EU708578.1		
es12588	Brasil	2006	Hu	G9-P[8]-E?		FN179482.1	
F45	Japão		Hu	G9-P[8]-E?		U30716	
ITO	Japão		Hu	G3-P[8]-E?		AB008280	
Hun9	Hungria		Hu	G9-P[8]-E?		AJ605320	
KMR061	Coréia	2000-2001	Hu	G?-P[8]-E?		EF077343.1	
L174	China	2004	Hu	G3-P[8]-E?	DQ873670.1		
L695	China	2006	Hu	G3-P[8]-E?	EU708575.1		
Mo	Japão		Hu	G3-P[8]-E1	D86280.1		AB008235.1
MW670	Malauí	1999	Hu	G4-P[8]-E?		AJ302146	
Nov06-988	Rússia	2006	Hu	G3-P[8]-E1			GQ465015.1
Nov09-D74	Rússia	2009	Hu	G1+G4-P[8]-E?		GQ453429.1	
OP351	Malauí	1998		G1-P[8]-E?		AJ302147	
OP354	Malauí	1998		G4-P[8]-E?		AJ302148	
PA46/03	Itália	2003	Hu	G3-P[8]-E1			EU872171.1
Py04SR644	Paraguai	2004	Hu	G9-P[8]-E?		EU045243.1	
R11	Austrália	2000	Hu	G9-P[?]-E1			DQ339149.1
R1455	China	2007	Hu	G3-P[8]-E?	EU708581.1		
R15	Índia	2007	Hu	G?-P[?]-E1			EU847639.1
rj36076/88	Brasil	1988	Hu	G?-P[8]-E1			DQ498200.1
rj5412/02	Brasil	2002	Hu	G9-P[8]-E1			DQ498180.1
rj9473/04	Brasil	2004	Hu	G9-P[8]-E1			DQ498197.1
rs11126	Brasil	2005	Hu	G9P[8]	FJ793997.1	FN179473.1	
RRV	Estados Unidos	1980	Si	G3-P[3]-E3	EU636932.1		
RUBV3	Índia		Bo	G3-P[3]-E2	EF200549.1		
Rus-41	Rússia	2001-2003	Hu	G3-P[?]-E?	EF495125.1		
RV198/95	Itália	1995	Ca	G3-P[3]-E8	AF271089.1		
SA11-5S			Si	G3-P[1]-E2	DQ838617.1		
SA11-H96	África do Sul	1958	Si	G3-P[2]-E2	DQ838620.1		
SP1.9-3	Espanha	2004-2006	Hu	G3-P[?]-E?	EU159186.1		
VN-582	Vietnã	2001-2003	Hu	G3-P[?]-E?	EF495122.1		
Wa	Estados Unidos		Hu	G1-P[8]-E1	K02033	L34161.1	AF093199
YO	Japão	1977	Hu	G3-P[8]-E1	D86284.1	AB008279.1	AB008236.1
Z033	China	2000	Hu	G3-P[?]-E?	DQ873673.1		
Z411	China	2006	Hu	G3-P[?]-E?	EU708583.1		

^a La: coelho, Po: suína, Hu: humana, Fe: felina, Ca: canina, Si: símia, Bo: bovina

5. RESULTADOS

5.1. Amplificação por RT-PCR

Foram selecionadas 73 amostras fecais de crianças menores de 5 anos de idade com quadro de GA, obtidas da coleção do LVCA, IOC – FIOCRUZ entre 1996/1997, 2005/2006 e 2009. No entanto, apenas as amostras das quais foram obtidas as sequências do gene que codifica para proteína VP7 e cujo genótipo foi confirmado foram incluídas nesse estudo, totalizando 43 amostras.

Foram obtidas 93 sequências nucleotídicas a partir da amplificação por RT-PCR dos genes que codificam para as proteínas VP7 (n=43), VP4 (n=22) e NSP4 (n=28) (Tabela 4).

Os géis de agarose representativos da amplificação por RT-PCR dos genes incluídos nesse estudo estão apresentados na Figura 16.

Tabela 4. Amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4 e NSP4 das amostras incluídas nesse estudo.

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	MÊS/ANO	INSTITUIÇÃO	ESTADO	VP7	VP4	NSP4
Hu rj416/96	05/1996	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj442/96	06/1996	HSN	RJ	X		X
Hu rj444/96	06/1996	C-IOC	RJ	X	X	X
Hu rj538/96	06/1996	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj736/96	09/1996	PART	RJ	X		X
Hu rj841/96	12/1996	HMJ	RJ	X		X
Hu rj1058/97	06/1997	HMJ	RJ	X		X
Hu rj1210/97	08/1997	HSN	RJ	X		X
Hu rj10547/05	03/2005	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj10573/05	03/2005	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj10577/05	03/2005	HSN	RJ	X	X	
Hu rj10604/05	03/2005	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj10657/05	04/2005	HSN	RJ	X	X	
Hu rj10658/05	04/2005	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj10723/05	04/2005	HSN	RJ	X		X
Hu rj10752/05	05/2005	HSN	RJ	X	X	
Hu rj10790/05	05/2005	HSN	RJ	X		X
Hu rj10908/05	06/2005	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj10910/05	06/2005	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj10911/05	06/2005	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj10915/05	06/2005	HSN	RJ	X		X
Hu rj10916/05	06/2005	HSN	RJ	X		X
Hu rj10959/05	07/2005	HSN	RJ	X		X
Hu rj10960/05	07/2005	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj10963/05	07/2005	HSN	RJ	X	X	
Hu rj10974/05	07/2005	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj10978/05	07/2005	HMJ	RJ	X		
Hu rj10983/05	07/2005	HUPE	RJ	X		
Hu rj10999/05	07/2005	HMJ	RJ	X		
Hu rj11004/05	07/2005	HMJ	RJ	X	X	
Hu rj11104/05	08/2005	HMJ	RJ	X		
Hu rj11164/05	08/2005	SMS-VR	RJ	X		
Hu rj11190/05	09/2005	HSN	RJ	X		
Hu rj11207/05	09/2005	HSN	RJ	X		X
Hu rj11777/05	12/2005	HSN	RJ	X		
Hu rj11856/06	01/2006	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj11857/06	01/2006	HSN	RJ	X	X	
Hu rj11875/06	01/2006	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj11916/06	02/2006	HSN	RJ	X	X	X
Hu rj12025/06	04/2006	HSN	RJ	X		
Hu rj12058/06	04/2006	HSN	RJ	X		
Hu rs 16928/09	09/2009	LACEN-RS	RS	X		X
Hu rs 16929/09	09/2009	LACEN-RS	RS	X	X	X

As instituições das quais foram recebidas as amostras estão representadas por HSN: Hospital Salles Neto; C-IOC: Creche IOC; PART: particular; HMJ: Hospital Menino Jesus; HUPE: Hospital Universitário Pedro Ernesto; SMS-VR: Secretaria Municipal de Saúde de Volta Redonda; LACEN-RS: Laboratório Central do Rio Grande do Sul.

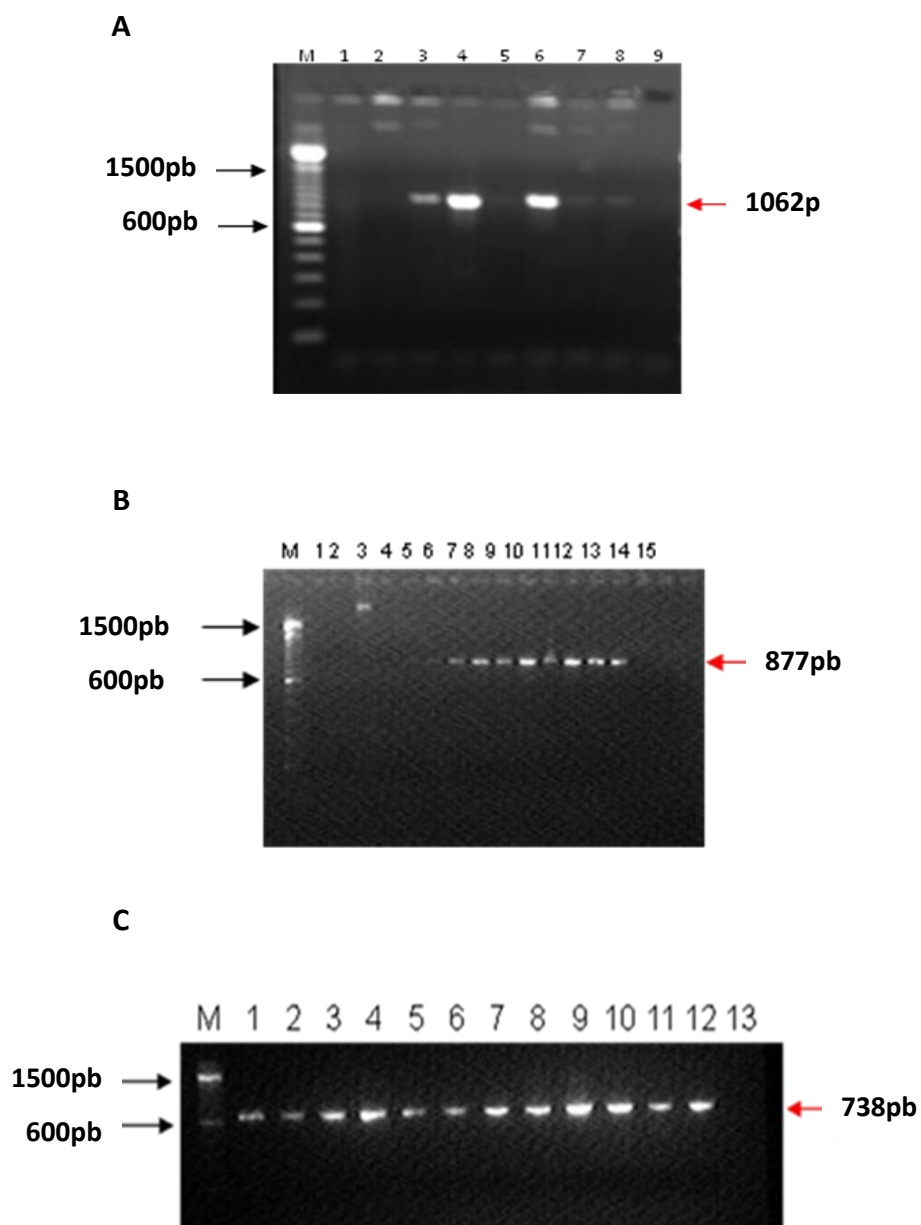


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos da RT-PCR dos genes que codificam para as proteínas VP7 (A), VP4 (B) e NSP4 (C).

5.2. Genotipagem das Amostras

Segundo a nova classificação proposta por Matthijnsens e colaboradores (2008b), as amostras foram caracterizadas como pertencentes ao genótipo G3, P[8], E1, de acordo com as sequências nucleotídicas que codificam para as proteínas VP7, VP4 e NSP4, respectivamente.

5.3. Análise Filogenética

Foram obtidas árvores filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas para os genes VP7, VP4 e NSP4 das amostras incluídas nesse estudo, de amostras protótipos e de amostras detectadas em diferentes regiões do mundo disponíveis no *GenBank*. As árvores filogenéticas construídas por diferentes métodos de inferência filogenética e modelos evolutivos de determinação de distância genética entre as sequências apresentaram a mesma topologia e valores de *bootstrap* similares (dados não mostrados).

A análise filogenética dos genes estudados revelou que três variantes gênicas de RV-A genótipo G3 circularam no Brasil em períodos diferentes: de 1996 a 1997, de 2005 a 2006, e em 2009. Observou-se que as amostras detectadas no período de 1996 a 1997 são filogeneticamente distantes das demais, enquanto que as de 2009 são filogeneticamente muito próximas às de 2005 e 2006.

5.3.1. Análise do Gene que Codifica para Proteína VP7

A árvore filogenética baseada na sequência parcial de nucleotídeos (933pb) da região do gene que codifica para proteína VP7 está representada na Figura 17.

As identidades nucleotídicas e aminoacídicas de amostras representantes dos diferentes *clusters* observados e de protótipos RV-A G3 estão descritas nas Tabelas 6 e 7.

As amostras pertencentes aos anos de 1996 e 1997 apresentaram 97 - 100% de identidade nucleotídica e 100% de aminoacídica entre si, e com as demais amostras identidade de 93,6 – 94,7% e 97,1 – 97,7%, respectivamente. Dois protótipos isolados nos EUA em 1991 (DC5544 e DC5549) apresentaram a maior identidade com essas amostras, aproximadamente 99% nt e 100% aa. As amostras detectadas em 2005 e 2006 agruparam com amostras da China, Rússia e Vietnã, detectadas entre 2001 e 2007. A identidade de nt e de aa entre os representantes deste *cluster* foi de 99,5 - 100% e 99,3 - 100%, respectivamente.

As amostras provenientes do Rio Grande do Sul, detectadas em 2009, agruparam com uma amostra da Espanha (2004/2006) e da Argentina (2007) – apresentando 100% de identidade nucleotídica e aminoacídica. Esse *cluster* mostrou uma relação genética próxima com as detectadas em 2005 e 2006, e a identidade de nt entre elas foi de aproximadamente 99% e a de aa 99 – 99,6%.

A análise das sequências parciais de aminoácidos (311 aa), representada na Figura 18, evidenciou a ocorrência de várias substituições de aa nas amostras isoladas em 1996/1997 quando comparadas com o protótipo Z411. Destas substituições, duas situaram-se em sítio antigênico da proteína: 238 N[→]K e 242 N[→]D. Ainda em regiões antigênicas, houve substituição N[→]T na posição 242 nas amostras rj11164/05 e rj11190/05 e A[→]T na posição 90 nas amostras rj11777/05, rj11856/06, rj11857/06 e rj11875/06. Essas últimas quatro amostras também apresentaram a substituição V[→]M na posição 307.

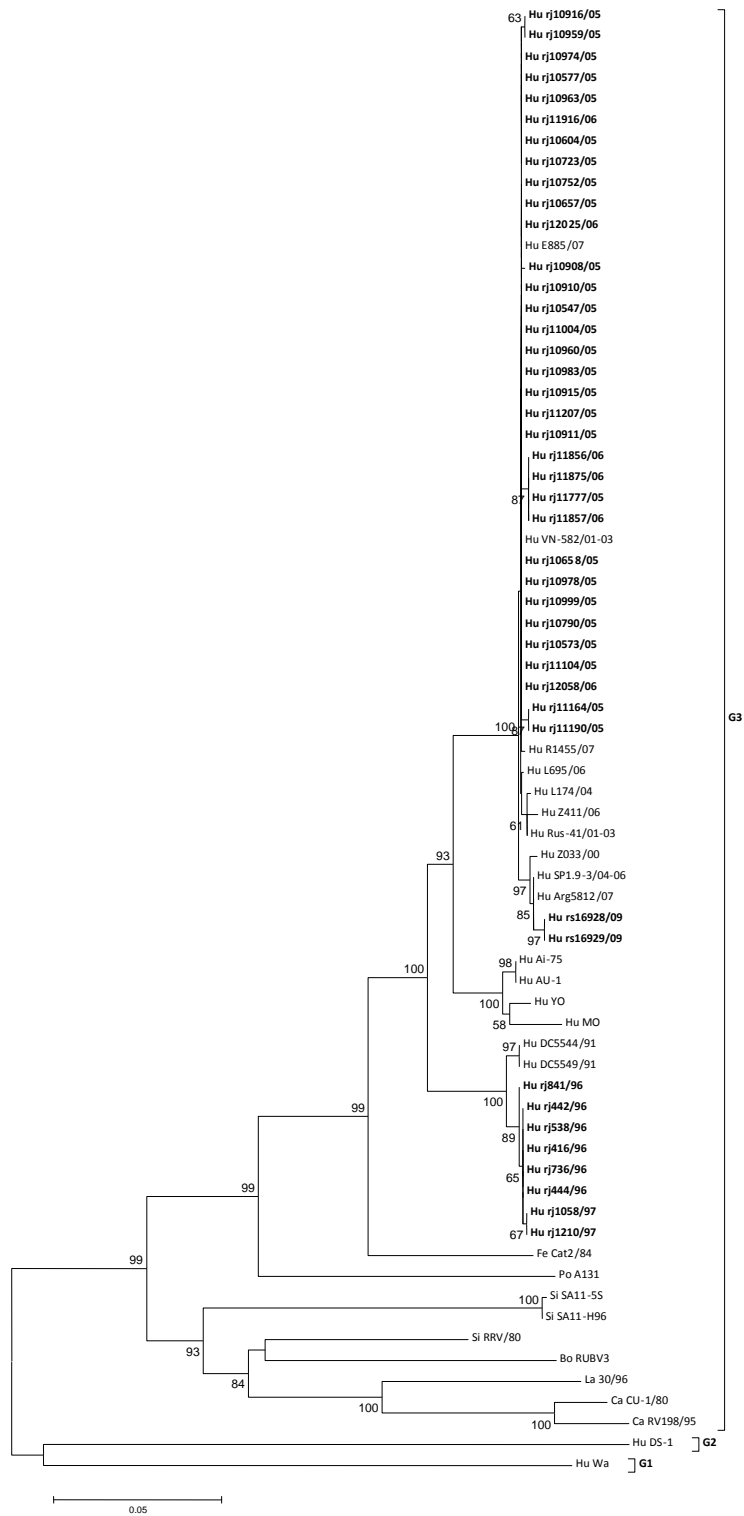


Figura 17. Árvore filogenética obtida a partir da análise da sequência nucleotídica parcial do gene que codifica para a proteína VP7 das amostras estudadas (em negrito) e de protótipos. Os valores de Bootstrap (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore e valores menores que 50% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética

110 120 130 140 **B** 150 160 170 180 190 200

Hu Z411 FLIKGNPTGSIYFKDYTDIASPSVDPLCYCDYLVLMKYDATALQDDMSELADLLNEWLCNPMDDITLYYYQQTDEANKWISMGSSCTIKVCPINTQTLGI
 Hu Z033
 Hu DC5544 .T.....
 Hu DC5549 .T.....
 Hu E885
 Hu L174
 Hu L695
 Hu Ai-75 .CT.....N.....
 Hu Arg5812
 Hu SP1_9-3
 Hu VN-582
 Hu R1455
 Hu Rus-41
 Hu YO .T.....A..N.....
 Hu MO .T.....A..N.....
 Fe Cat2 .T.....A.....
 Ca CU-1 .T.....V..E.....I.....A.....I.....
 Ca RV198/95 .T.....V..E.....I.....A.....I.....
 Si RRV .T.....V..E.....V.....I.....
 Si SA11-5S .T.....V..E..N.....V.....I.....
 Si SA11-H96 .T.....V..E..N.....V.....I.....
 Bo RUBV3 .T.....V..E..N.....V.....N.....I.....T.....
 La 30/96 .T.....V..RE..V.....V.....A.....I.....
 Po A131 .T.....AN.....I.....V.....A.....
 Hu AU-1 .CT.....N.....
 Hu DS-1 .T.....I..V.....N..NT..N.....V..R..N..SE..A.....I.....S.....SS.S.....TD..V.....
 Hu Wa .T.....V..E..SN..VD.....QS.E.....I.....V.....SG.S.....V.....
 Hu rj416/96 .T.....
 Hu rj442/96 .T.....
 Hu rj444/96 .T.....
 Hu rj538/96 .T.....
 Hu rj736/96 .T.....
 Hu rj841/96 .T.....
 Hu rj1058/97 .T.....
 Hu rj1210/97 .T.....
 Hu rj10547/05
 Hu rj10573/05
 Hu rj10577/05
 Hu rj10604/05
 Hu rj10657/05
 Hu rj10658/05
 Hu rj10723/05
 Hu rj10752/05
 Hu rj10790/05
 Hu rj10908/05
 Hu rj10910/05
 Hu rj10911/05
 Hu rj10915/05
 Hu rj10916/05
 Hu rj10959/05
 Hu rj10960/05
 Hu rj10963/05
 Hu rj10974/05
 Hu rj10978/05
 Hu rj10983/05
 Hu rj10999/05
 Hu rj11004/05
 Hu rj11104/05
 Hu rj11164/05
 Hu rj11190/05
 Hu rj11207/05
 Hu rj11777/05
 Hu rj11856/06
 Hu rj11857/06
 Hu rj11875/06
 Hu rj11916/06
 Hu rj12025/06
 Hu rj12058/06
 Hu rs16928/09
 Hu rs16929/09

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300							
Hu Z411	GCLTTDTNTFE	EVA	AEKLVITD	VVDRVN	HKLNVT	NTCTIRNCK	KLGP	RENVAVIQ	VGGPDVLD	ITADPTT	MPQTERMM	RNVN	HWQV	FYTI	VDYV	NQ	
Hu Z033				G													
Hu DC5544				G		K	D			S						A	
Hu DC5549				G		K	D			S						A	
Hu E885				G													
Hu L174				G													
Hu L695				G													
Hu Ai-75				G					S	I						A	
Hu Arg5812				G													
Hu SP1_9-3				G													
Hu VN-582				G													
Hu R1455				G													
Hu Rus-41				G													
Hu YO			D	G						S	I					A	
Hu MO				G						S	I					A	
Fe Cat2		S								S	N	I				A	
Ca CU-1		VS		T		G		D		T		S	I		A	I	V
Ca RV198/95		VS		T		G		D		T		S	I		A	I	V
Si RRV		A				G		D		A		S			A	I	V
Si SA11-5S		AT				G		D		A		S	I		A	I	V
Si SA11-H96		AT				G		D		A		S	I		A	I	V
Bo RUBV3		A	NAA		D			G		D		S			A	I	V
La 30/96		NAA				G		D		A		S	I		A	I	V
Po A131			I	N	A			G		S		S	I		A	K	I
Hu AU-1						G						S	I		A		
Hu DS-1		K	V		I	SS		NG		I	ISI		N		I	NA	V
Hu Wa		Q	NVDS		MI	EN		A	V		GI		I	L	T	SN	N
Hu rj416/96						G		K		D		S			A		
Hu rj442/96						G		K		D		S			A		
Hu rj444/96						G		K		D		S			A		
Hu rj538/96						G		K		D		S			A		
Hu rj736/96						G		K		D		S			A		
Hu rj841/96						G		K		D		S			A		
Hu rj1058/97						G		K		D		S			A		
Hu rj1210/97						G		K		D		S			A		
Hu rj10547/05						G											
Hu rj10573/05						G											
Hu rj10577/05						G											
Hu rj10604/05						G											
Hu rj10657/05						G											
Hu rj10658/05						G											
Hu rj10723/05						G											
Hu rj10752/05						G											
Hu rj10790/05						G											
Hu rj10908/05						G											
Hu rj10910/05						G											
Hu rj10911/05						G											
Hu rj10915/05						G											
Hu rj10916/05						G											
Hu rj10959/05						G											
Hu rj10960/05						G											
Hu rj10963/05						G											
Hu rj10974/05						G											
Hu rj10978/05						G											
Hu rj10983/05						G											
Hu rj10999/05						G											
Hu rj11004/05						G											
Hu rj11104/05						G											
Hu rj11164/05						G											
Hu rj11190/05						G											
Hu rj11207/05						G											
Hu rj11777/05						G											
Hu rj11856/06						G											
Hu rj11857/06						G											
Hu rj11875/06						G											
Hu rj11916/06						G											
Hu rj12025/06						G											
Hu rj12058/06						G											
Hu rs16928/09						G											
Hu rs16929/09						G											


```

310
.....|.....|
Hu Z411      IVQAMSKRSRS
Hu Z033      .....
Hu DC5544    .....
Hu DC5549    .....
Hu E885      .....
Hu L174      .....
Hu L695      .....
Hu Ai-75     .....
Hu Arg5812   .....
Hu SP1.9-3   .....
Hu VN-582    .....
Hu R1455     .....
Hu Rus-41    .....
Hu YO        .....
Hu MO        .....
Fe Cat2     .....
Ca CU-1     .I.....
Ca RV198/95 .I.....
Si RRV      .I.....
Si SA11-5S  .I.V.....
Si SA11-H96 .I.V.....
Bo RUBV3    .I.....
La 30/96    .I.L.....
Po A131     .I.....
Hu AU-1     .....
Hu DS-1     VI.V.....
Hu Wa       .V.....
Hu rj416/96 .....
Hu rj442/96 .....
Hu rj444/96 .....
Hu rj538/96 .....
Hu rj736/96 .....
Hu rj841/96 .....
Hu rj1058/97 .....
Hu rj1210/97 .....
Hu rj10547/05 .....
Hu rj10573/05 .....
Hu rj10577/05 .....
Hu rj10604/05 .....
Hu rj10657/05 .....
Hu rj10658/05 .....
Hu rj10723/05 .....
Hu rj10752/05 .....
Hu rj10790/05 .....
Hu rj10908/05 .....
Hu rj10910/05 .....
Hu rj10911/05 .....
Hu rj10915/05 .....
Hu rj10916/05 .....
Hu rj10959/05 .....
Hu rj10960/05 .....
Hu rj10963/05 .....
Hu rj10974/05 .....
Hu rj10978/05 .....
Hu rj10983/05 .....
Hu rj10999/05 .....
Hu rj11004/05 .....
Hu rj11104/05 .....
Hu rj11164/05 .....
Hu rj11190/05 .....
Hu rj11207/05 .....
Hu rj11777/05 .M.....
Hu rj11856/06 .M.....
Hu rj11857/06 .M.....
Hu rj11875/06 .M.....
Hu rj11916/06 .....
Hu rj12025/06 .....
Hu rj12058/06 .....
Hu rs16928/09 .....
Hu rs16929/09 .....

```

Figura 18. Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos da proteína VP7 das amostras incluídas nesse estudo e protótipos utilizados na análise filogenética. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com o protótipo Z411 (China, 2006). Os retângulos indicam as regiões antigênicas A - F.

5.3.2. Análise do Gene que Codifica para Proteína VP4

A árvore filogenética baseada na sequência parcial de nucleotídeos (743 pb) da região do gene que codifica para proteína VP4 (VP8*) está representada na Figuras 19.

As identidades nucleotídicas e aminoacídicas das amostras incluídas nesse estudo e de protótipos RV-A estão descritas nas Tabelas 8 e 9.

Assim como observado nas árvores filogenéticas baseadas no gene que codifica para VP7, as amostras detectadas em 1996 agruparam com os protótipos DC5544 e DC5549 isolados nos EUA em 1991, apresentando identidade nucleotídica e aminoacídica de aproximadamente 99%. A identidade de nt e de aa entre as amostras que compõem este *cluster* foi de aproximadamente 100% e com as demais amostras 93 e 93,5 – 95,1%, respectivamente.

As amostras detectadas em 2005 e 2006 apresentaram identidade de nt e de aa de 99 - 100% com protótipos do Paraguai (2004), Bélgica (2003/2004), e com amostras brasileiras do Espírito Santo, Bahia e Rio Grande do Sul, detectadas entre 2005 e 2006. Todos esses protótipos e amostras pertencem ao genótipo G9P[8], sugerindo a ocorrência de reestruturação genômica. Em duas amostras, rj10910/05 e rj11916/06, foi observada maior divergência na sequência de aa e a identidade entre elas foi de 98%.

Das amostras provenientes do Rio Grande do Sul detectadas em 2009, as sequências nucleotídica e aminoacídica de apenas uma foram obtidas. Essas amostras apresentaram relação filogenética muito próxima daquelas detectadas em 2005 e 2006, e identidade de nt e aa de 97 – 98% e 99%, respectivamente (a identidade aminoacídica com as amostras rj10910/05 e rj11916/06 foi de 98%). Verificou-se a formação de *cluster* com protótipo da Coreia (2000/2001) e da Rússia (2009). A identidade de nt e de aa com esses protótipos foi de 99% e 100%, respectivamente. Embora o protótipo da Coreia não possua sequência do gene de VP7 disponível no GenBank, o protótipo da Rússia pertence a uma infecção mista por RV-A genótipos G1/G4P[8]. Esses dados sugerem que também houve a ocorrência de reestruturação genômica entre essas amostras.

As amostras de 1996 agruparam com protótipos da linhagem P[8]-II (*F45-like*). No entanto, as amostras detectadas em 2005-2006 e 2009 agruparam com protótipos da linhagem P[8]-III.

A análise das sequências parciais de aminoácidos (247 aa), representada na Figura 20, evidenciou a ocorrência de várias substituições de aa quando comparadas com o protótipo

rs11126/05, principalmente nas amostras de 1996. Entre outras, essas amostras apresentaram a substituição N[→]T na posição 120 – que faz parte de uma das regiões antigênicas de VP4 (VP8*).

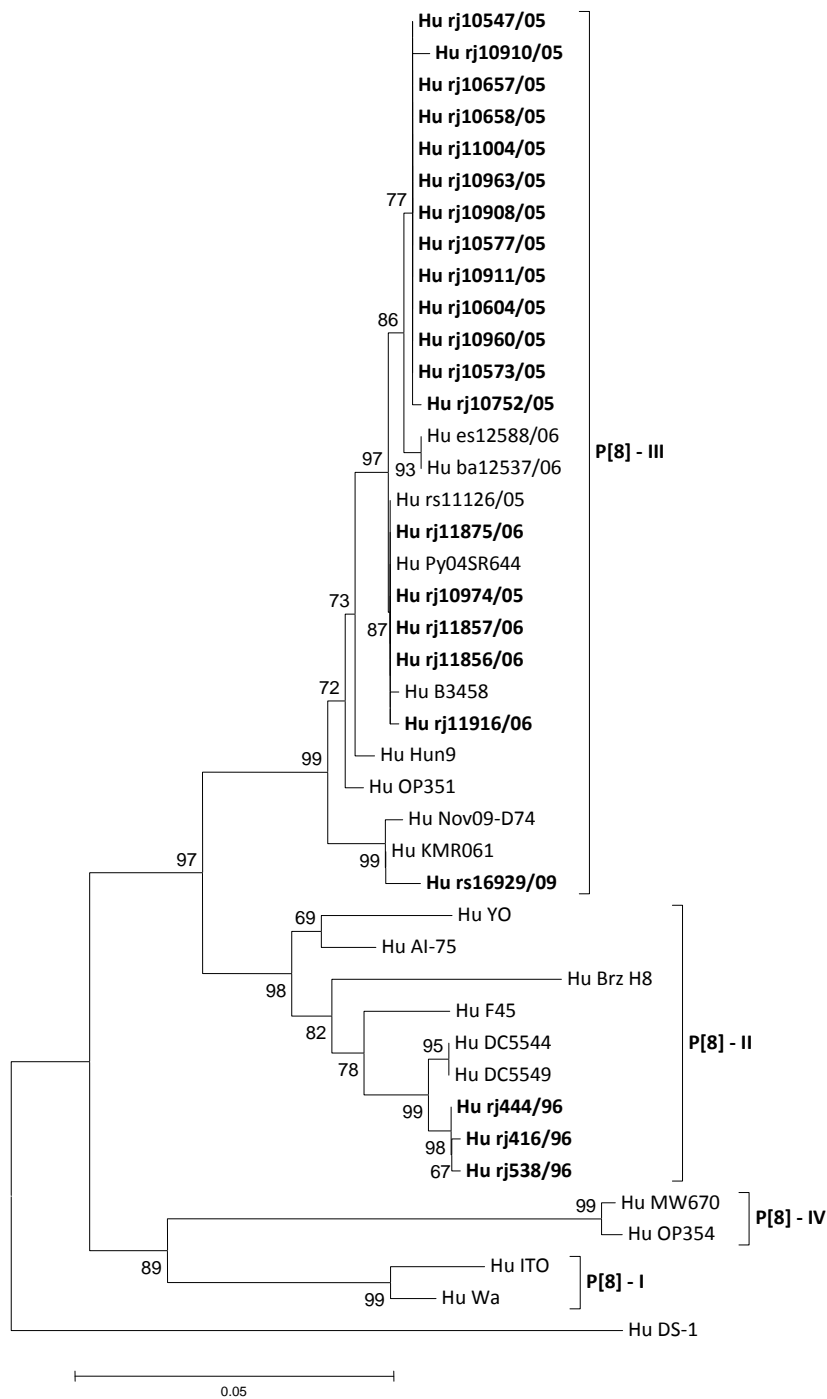


Figura 19. Árvore filogenética obtida a partir da análise da sequência nucleotídica parcial do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) das amostras estudadas (em negrito) e de protótipos. Os valores de Bootstrap (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore e valores menores que 50% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Tabela 7. Identidade nucleotídica e aminoacídica baseada na sequência parcial do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) das amostras incluídas nesse estudo. A percentagem de identidade de nucleotídeos e a de aminoácidos estão indicadas acima e abaixo da diagonal, respectivamente.

VP4	416	444	538	10547	10573	10577	10604	10658	10752	10908	10910	10911	10960	10963	10974	11004	11856	11857	11875	11916	16929
416		99,8%	99,7%	93,1%	93,1%	93,1%	93,1%	93,1%	93,0%	93,1%	92,8%	93,1%	93,1%	93,1%	93,2%	93,1%	93,2%	93,2%	93,2%	93,1%	93,5%
444	99,5%		99,8%	93,2%	93,2%	93,2%	93,2%	93,2%	93,1%	93,2%	93,0%	93,2%	93,2%	93,2%	93,4%	93,2%	93,4%	93,4%	93,4%	93,2%	93,6%
538	99,5%	100,0%		93,1%	93,1%	93,1%	93,1%	93,1%	93,0%	93,1%	92,8%	93,1%	93,1%	93,1%	93,2%	93,1%	93,2%	93,2%	93,2%	93,1%	93,5%
10547	94,3%	94,7%	94,7%		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,8%	100,0%	99,7%	100,0%	100,0%	100,0%	99,5%	100,0%	99,5%	99,5%	99,5%	99,4%	97,3%
10573	94,3%	94,7%	94,7%	100,0%		100,0%	100,0%	100,0%	99,8%	100,0%	99,7%	100,0%	100,0%	100,0%	99,5%	100,0%	99,5%	99,5%	99,5%	99,4%	97,3%
10604	94,3%	94,7%	94,7%	100,0%	100,0%		100,0%	100,0%	99,8%	100,0%	99,7%	100,0%	100,0%	100,0%	99,5%	100,0%	99,5%	99,5%	99,5%	99,4%	97,3%
10657	94,3%	94,7%	94,7%	100,0%	100,0%	100,0%		100,0%	99,8%	100,0%	99,7%	100,0%	100,0%	100,0%	99,5%	100,0%	99,5%	99,5%	99,5%	99,4%	97,3%
10658	94,3%	94,7%	94,7%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		99,8%	100,0%	99,7%	100,0%	100,0%	100,0%	99,5%	100,0%	99,5%	99,5%	99,5%	99,4%	97,3%
10752	94,3%	94,7%	94,7%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		99,8%	99,5%	99,8%	99,8%	99,8%	99,4%	99,8%	99,4%	99,4%	99,4%	99,3%	97,1%
10908	94,3%	94,7%	94,7%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		99,7%	100,0%	100,0%	100,0%	99,3%	100,0%	99,3%	99,3%	99,3%	99,4%	97,0%
10911	94,3%	94,7%	94,7%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,1%		99,7%	99,7%	99,7%	99,3%	99,7%	99,3%	99,3%	99,3%	99,4%	97,0%
10960	94,3%	94,7%	94,7%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,1%	99,1%		100,0%	100,0%	99,5%	100,0%	99,5%	99,5%	99,5%	99,4%	97,3%
10963	94,3%	94,7%	94,7%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,1%	99,1%	100,0%		100,0%	99,5%	100,0%	99,5%	99,5%	99,5%	99,4%	97,3%
10974	94,7%	95,1%	95,1%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	98,7%	98,7%	99,5%	99,5%		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,8%	97,5%
11004	94,3%	94,7%	94,7%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,1%	99,1%	100,0%	100,0%	100,0%		99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	99,4%	97,3%
11856	94,7%	95,1%	95,1%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	98,7%	98,7%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%		100,0%	100,0%	100,0%	99,8%	97,5%
11857	94,7%	95,1%	95,1%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	98,7%	98,7%	99,5%	99,5%	99,5%	100,0%	100,0%		100,0%	100,0%	99,8%	97,5%
11875	94,7%	95,1%	95,1%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	98,7%	98,7%	99,5%	99,5%	99,5%	100,0%	100,0%	100,0%		100,0%	99,8%	97,5%
11916	94,7%	95,1%	95,1%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	98,3%	99,1%	99,1%	99,1%	99,5%	99,1%	99,5%	99,5%		99,5%	97,4%
16929	95,1%	95,5%	95,5%	98,7%	98,7%	98,7%	98,7%	98,7%	98,7%	97,9%	97,9%	98,7%	98,7%	98,7%	98,7%	98,7%	98,7%	98,7%	98,7%		98,3%

	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Hu rs11126/05	GSEKTQNTV	NPGPFAQTR	KAPVNWGHGE	INDSTTVEPILDG	QPYQPTTFT	PTDYWILINSNT	NGIVYESTNNS	DFWTAVIAVE	PHVDP	DRQYNVFGEN
Hu es12588/06										
Hu ba12537/06										
Hu Py04SR644										
Hu B3458										
Hu Hun9							V			
Hu OP351							V	S		
Hu KMR061						S	V			
Hu Nov09-D74						S	V			
Hu DC5544							V		N	T
Hu DC5549							V		N	T
Hu F45				L			V		V	N
Hu Brz H8	I				S		V		V	NQ
Hu YO			T				V		V	N
Hu AI-75							V		V	N
Hu MW670	D		V			K	V			TI
Hu OP354	D		V			K	V			TI
Hu ITO			V		I		N		V	I
Hu Wa	S	S			M		N		V	I
Hu DS-1	S				V		K	N	L	S
Hu rj416/96							N		V	N
Hu rj444/96							V		V	N
Hu rj538/96							V		V	N
Hu rj10547/05							A			
Hu rj10573/05							A			
Hu rj10577/05							A			
Hu rj10604/05							A			
Hu rj10657/05							A			
Hu rj10658/05							A			
Hu rj10752/05							A			
Hu rj10908/05							A			
Hu rj10910/05							A			
Hu rj10911/05							A			
Hu rj10960/05							A			
Hu rj10963/05							A			
Hu rj10974/05							A			
Hu rj11004/05							A			
Hu rj11856/06										
Hu rj11857/06										
Hu rj11875/06										
Hu rj11916/06									T	
Hu rs16929/09						S	V			

	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
Hu rs11126/05	KQFNVRNDS	DKWKFL	EMFRGSSQ	NDFYNRRLT	SDTRLVGL	KYGGRIW	TFHG	ETPRAT	DDSSNTAN	LNGISIT
Hu es12588/06										
Hu ba12537/06			G							
Hu Py04SR644										
Hu B3458			D							
Hu Hun9										
Hu OP351										
Hu KMR061										
Hu Nov09-D74										
Hu DC5544			SN	E		K			D	I
Hu DC5549			SN	E		K			D	I
Hu F45		N	S	E		K			N	
Hu Brz H8			S	E		K		R	D	M
Hu YO			S	E		K	M		D	I
Hu AI-75			S	E		K			D	I
Hu MW670		N	F		SE		K	G	V	G
Hu OP354		N	F		SE		K	G	V	G
Hu ITO		S	N		S	E		V		S
Hu Wa		S	N		S	E		F		V
Hu DS-1		E	N		F	K		G	S	SN
Hu rj416/96			SN	E		K			D	I
Hu rj444/96			SN	E		K			D	I
Hu rj538/96			SN	E		K			D	I
Hu rj10547/05			SN	E		K			D	I
Hu rj10573/05										
Hu rj10577/05										
Hu rj10604/05										
Hu rj10657/05										
Hu rj10658/05										
Hu rj10752/05										
Hu rj10908/05										
Hu rj10910/05					H					S
Hu rj10911/05										
Hu rj10960/05										
Hu rj10963/05										
Hu rj10974/05										
Hu rj11004/05										
Hu rj11856/06										
Hu rj11857/06										
Hu rj11875/06										
Hu rj11916/06										
Hu rs16929/09										

	230	240	250	260	270
Hu rs11126/05	I Q N T R N V V P L S L S S R S I Q Y T R A Q V N E D I T I S K T S L W K E M Q Y N R D I I I				
Hu es12588/06				
Hu ba12537/06				
Hu Py04SR644				
Hu B3458				
Hu Hun9				
Hu OP351			K	
Hu KMR061			K	
Hu Nov09-D74			K	
Hu DC5544			HK	
Hu DC5549			HK	
Hu F45			K	
Hu Brz H8	P . G P K Q T				
Hu YO			K	C
Hu AI-75			K	
Hu MW670			K	IV
Hu OP354			K	IV
Hu ITO	. I P K IV				
Hu Wa	. P K IV				
Hu DS-1	. S P R IV				
Hu rj416/96				HK
Hu rj444/96				HK
Hu rj538/96				HK
Hu rj10547/05				
Hu rj10573/05				
Hu rj10577/05				
Hu rj10604/05				
Hu rj10657/05				
Hu rj10658/05				
Hu rj10752/05				
Hu rj10908/05				
Hu rj10910/05				
Hu rj10911/05				
Hu rj10960/05				
Hu rj10963/05				
Hu rj10974/05				
Hu rj11004/05				
Hu rj11856/06				
Hu rj11857/06				
Hu rj11875/06				
Hu rj11916/06				
Hu rs16929/09			K	

Figura 20. Alinhamento das sequências parciais de aminoácidos da proteína VP4 (VP8*) das amostras incluídas nesse estudo e protótipos utilizados na análise filogenética. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com o protótipo rs11126/05. Os retângulos indicam os sítios antigênicos da proteína VP8*

5.3.3. Análise do Gene que Codifica para Proteína NSP4

A árvore filogenética baseada na sequência parcial de nucleotídeos (432 pb) da região do gene que codifica para a proteína NSP4 está representada na Figura 21.

As identidades nucleotídicas e de aminoácidos de amostras representantes dos diferentes *clusters* observados e de protótipos RV-A G3 estão descritas nas Tabelas 10 e 11.

As amostras detectadas nos anos de 1996 e 1997 agruparam, em sua maioria, com os protótipos DC5544 e DC5549 (EUA, 1991). A identidade de nt e de aa entre os representantes do *cluster* foi de 99 - 100%. A amostra rj841/96 formou outro *cluster* com uma amostra isolada também no Rio de Janeiro em 1988. A identidade nucleotídica e aminoacídica desta amostra com as demais de 1996/1997 foi de 94 -95% e 95 - 96%, respectivamente.

As amostras detectadas em 2005 e 2006 agruparam com protótipos da Austrália, Itália e Rússia detectadas no período que variou entre 2000 e 2006; e também com uma amostra brasileira, do Rio de Janeiro, de 2004. A identidade de nt e de aa entre os representantes deste *cluster* foi de 99 - 100% e 98 - 100%, respectivamente.

As amostras provenientes do Rio Grande do Sul, detectadas em 2009, agruparam com um protótipo da Índia (2007) e do Rio de Janeiro (2002). A identidade nucleotídica dos representantes do *cluster* foi de 98 - 99% e a aminoacídica 97 - 98%.

A análise das sequências parciais de aminoácidos (143 aa), representado na Figura 22, evidenciou a ocorrência de várias substituições de aa quando comparadas com o protótipo Nov06-988. Dessas substituições, situaram-se em sítios antigênicos da proteína:

1996/1997 - 138 P[→]T, 141 T[→]V, 145 T[→]S, 161 N[→]S, 169 I[→]S

2009 - 131 H[→]Y, 139 V[→]A, 141 V[→]I, 142 I[→]V, 161 N[→]S

A amostra rj841/96 apresentou substituições em sítios antigênicos que não ocorreram nas demais amostras pertencentes aos anos 1996 e 1997. Essas substituições estão localizadas nas posições 137 R[→]K e 139 V[→]G. Outro dado que deve ser observado é que na posição 169 não houve a substituição I[→]S, mas I[→]L.

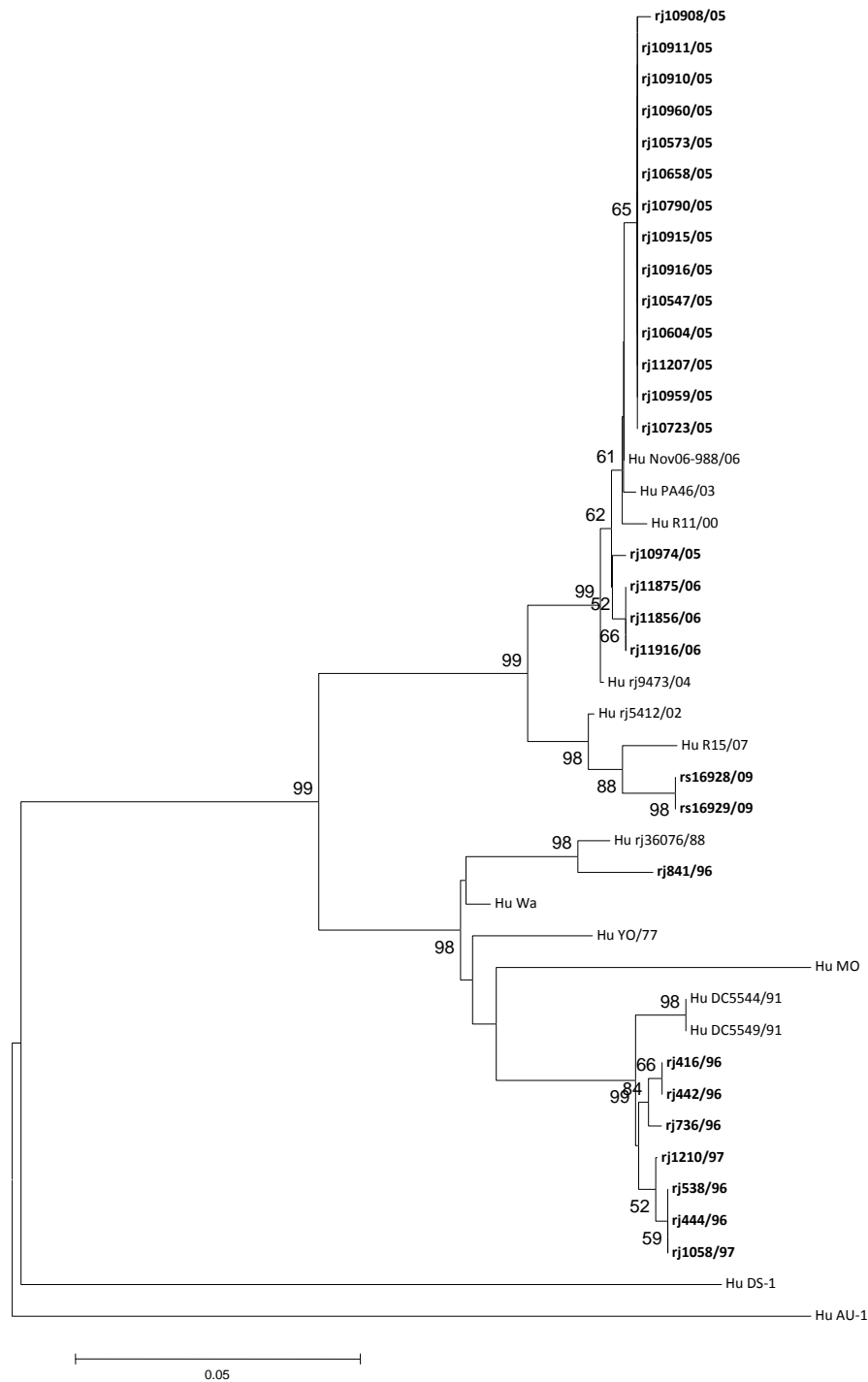


Figura 21. Árvore filogenética obtida a partir da análise da sequência nucleotídica parcial do gene que codifica para a proteína NSP4 das amostras estudadas (em negrito) e de protótipos. Os valores de Bootstrap (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore e valores menores que 50% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

6. DISCUSSÃO

Em decorrência da natureza segmentada do genoma de RV-A (RNAfd), encontram-se atualmente descritos quatro mecanismos de geração de variabilidade genética e evolução destes vírus: mutação pontual, reestruturação genômica, rearranjos genéticos e recombinação genética. No presente estudo foi possível evidenciar a ocorrência de dois destes mecanismos em amostras de RV-A genótipo G3 detectadas no período de 1996 a 2009: mutação pontual em todos os genes analisados, e reestruturações envolvendo o gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*).

As análises filogenéticas obtidas a partir da seqüência nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP7 revelaram uma relação temporal das amostras de RV-A genótipo G3, detectadas no Brasil no período de 1996 a 2009, mostrando que diferentes variantes de RV-A circularam no Brasil neste período.

No período 1996/1997 circulou uma variante de VP7 que mostrou uma relação filogenética distante de outras amostras brasileiras, apresentando identidade de nt de 94-95% com as amostras brasileiras detectadas em 2005/2006 e 2009 (Tabela 5). Ficou demonstrado que estas amostras mostraram maior identidade nucleotídica com dois protótipos isolados nos EUA em 1991 (McDonald *et al.*, 2009) (Figura 17). Nos anos seguintes não foram recebidas no LVCA amostras pertencentes ao genótipo G3.

Em 2005, foi descrita a re-emergência de RV-A G3 no Rio de Janeiro e a alta frequência dos casos de DA, associados a esse genótipo (Carvalho-Costa *et al.*, 2009). A análise das seqüências das amostras detectadas em 2005 e 2006 revelou 100% de identidade nucleotídica entre elas, demonstrando a origem comum dessas amostras. As análises filogenéticas demonstraram a relação genética próxima com amostras que circularam no período de 2001 a 2007 na China, Rússia e Vietnã (Wang *et al.*, 2009, 2007).

Em 2009 foram detectadas no Rio Grande do Sul amostras de RV-A genótipo G3. As análises filogenéticas revelaram que essas amostras agruparam muito próximas às amostras brasileiras detectadas em 2005 e 2006, entretanto formando um *cluster* com amostras detectadas na Espanha e Argentina no período de 2004 a 2007 (Martínez-Laso *et al.*, 2009; Stupka *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm demonstrado a alta prevalência de RV-A genótipo G3 nos países asiáticos nos últimos anos (De Grazia *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007, Xu *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009; O’Ryan, 2009; Vainio *et al.*, 2009). Os dados obtidos no presente estudo evidenciam que as amostras de RV-A genótipo G3 que circularam no Rio de

Janeiro nos períodos 2005/2006 e 2009 apresentam relação genética muito próxima com amostras da China, Rússia, Vietnã, Argentina e Espanha. Stupka e col. (2009) relatam que, embora em baixa frequência, foram detectadas na Argentina amostras filogeneticamente muito próximas de amostras que circularam na China e em Taiwan no mesmo período. Em conjunto com esses dados, os resultados obtidos nesse estudos, corroboram os indícios do fluxo de variantes virais de G3 no mundo, ainda que em alguns países sejam detectados em menor frequência. Além disso, esses dados sugerem que este genótipo pode ter sido introduzido no Brasil em várias oportunidades. No entanto, mais sequências de G3 de outros estados e países devem ser investigadas, e estudos mais profundos realizados a fim de melhor compreender a dinâmica desse genótipo no Brasil e no mundo.

Através da análise das sequências de aa da proteína VP7 foi possível observar substituições aminoacídicas tanto em regiões antigênicas (A e F) quanto fora das mesmas (Figura 18). Mais estudos deverão ser realizados para avaliar a importância destas mudanças de aa em nível biológico.

Baseando-se no gene de VP4, o genótipo P[8] de RV-A tem sido classificado em quatro linhagens distintas: P[8]-I, P[8]-II, P[8]-III e P[8]-IV (Arista et al., 2005; Cunliffe et al., 2001; Gouvea & Santos, 1999). No presente estudo foi possível evidenciar a ocorrência da linhagem P[8]-II nas amostras detectadas em 1996 e 1997, e da linhagem P[8]-III nas amostras detectadas em 2005/2006 e 2009 (Figura 19). Esses dados sugerem que ao longo dos anos a linhagem P[8]-III substituiu a linhagem P[8]-II nas amostras de RV-A G3. Devido à linhagem P[8]-III ser a mesma que circula no Brasil em combinação com outros genótipos G (Araújo *et al.*, 2007), é possível que essa mudança de linhagem de P[8] em amostras de RV-A genótipo G3 esteja associada à adaptação destes vírus na população brasileira.

As análises filogenéticas baseadas nesse gene mostraram que as amostras detectadas no Rio de Janeiro em 2005 e 2006 agruparam junto com amostras G9P[8] detectadas no Paraguai em 2004 (Espínola *et al.*, 2008) e no Brasil, Espírito Santo e Bahia, em 2006 (Tort *et al.*, 2010), apresentando identidade nucleotídica de 99 - 100% entre elas. A amostra detectada no Rio Grande do Sul em 2009, por sua vez, agrupou com uma amostra proveniente de uma infecção mista com os genótipos G1 e G4 associados à P[8] na Rússia. Esses resultados sugerem a ocorrência de reestruturação genômica entre amostras humanas de RV-A no gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) nessas amostras, e a substituição da linhagem de P[8] através destes eventos de reestruturação.

A análise das sequências parciais de aminoácidos de VP4 (VP8*) das amostras do estudo e amostras protótipos revelou a ocorrência de substituições em diferentes posições aminoacídicas, incluindo uma das regiões hiper-variáveis descritas por Kovacs-Nolan e

colaboradores (2003). No entanto, como dito para VP7, serão necessários mais estudos para determinar a importância dessas substituições em nível biológico.

A análise do gene que codifica para a NSP4 demonstrou que as amostras detectadas nos anos de 1996 e 1997 agruparam, em sua maioria, com dois protótipos isolados nos EUA em 1991 (DC5544 e DC5549) (Mc Donald *et al.*, 2009). No entanto, a amostra rj841/96 agrupou-se distante das demais, e constatou-se que apresentava maior identidade de nt e aa com uma amostra que circulou no Rio de Janeiro em 1988 (Araújo *et al.*, 2007).

As amostras detectadas em 2005 e 2006 agruparam com protótipos da Austrália, Itália e Rússia detectadas no período que variou entre 2000 e 2006; e também com uma amostra brasileira, do Rio de Janeiro, de 2004 (Araújo *et al.*, 2007; Bányai *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2006).

As amostras do Rio Grande do Sul, detectadas em 2009, agruparam com amostras do Rio de Janeiro e da Índia que circularam nos anos de 2002 e 2007, respectivamente (Araújo *et al.*, 2007).

A análise das sequências parciais de aminoácidos (143 aa) evidenciou a maior variabilidade do gene de NSP4 em comparação com os genes de VP4 e VP7 para as amostras deste estudo. Através do alinhamento das sequências de aminoácidos foram observadas várias substituições em sítios antigênicos da proteína. Ball e colaboradores (1996) descreveram a importância na atividade enterotóxica da tirosina na posição 131 da sequência aminoacídica de NSP4. Estudos relatam que as amostras pertencentes ao genótipo E2 apresentam com maior frequência uma tirosina na posição 131, enquanto que as amostras pertencentes ao genótipo E1 apresentam com maior frequência uma histidina nessa posição (Cunliffe *et al.*, 1997; Mascarenhas *et al.*, 2007). Corroborando esses dados, no presente estudo observou-se que, enquanto as amostras detectadas em 1996/1997 e 2005/2006 possuem histidina na posição 131, as amostras de 2009 apresentam tirosina nessa mesma posição. Mais estudos são necessários para demonstrar se esta substituição na posição 131 será mantida nas amostras mais recentes e qual a importância biológica dessa mudança na proteína.

Em 2005 ocorreu no Rio de Janeiro a re-emergência do genótipo G3, com aumento considerável dos casos de DA causados por esse genótipo. Os dados obtidos no presente estudo sugerem que o aumento da ocorrência deste genótipo pode estar relacionado à substituição da linhagem II pela linhagem III de P[8], que teria ocorrido mediante eventos de reestruturação genômica. A aquisição de uma variante de P[8] que se encontra circulando na população brasileira significaria uma vantagem adaptativa para o vírus.

As análises filogenéticas e de sequências de aa de amostras detectadas no Rio Grande do Sul em 2009 demonstraram que as mesmas representariam uma nova variante de RV-A

genótipo G3P[8]. Estudos complementares de seqüenciamento genômico e análise filogenética, assim como de análise de estrutura molecular e infecciosidade devem ser realizados a fim de melhor compreender a natureza e o padrão evolutivo dessas amostras.

No decorrer deste estudo foram recebidas no LVCA duas amostras coletadas de crianças com DA que haviam recebido a vacina monovalente Rotarix[®], G1P[8]. Foi descrita a ocorrência de proteção cruzada para gastroenterite e gastroenterite grave causada por outros genótipos (G3, G4 e G9), normalmente associados ao genótipo P[8] (Ruiz-Palacios *et al.* 2006). O seqüenciamento dessas amostras permanece como perspectiva para melhor compreensão do comportamento desse genótipo e possível escape vacinal.

O monitoramento da diversidade genética dos RV-A é fundamental para a compreensão do padrão evolutivo desses vírus e avaliação do impacto de novas variantes na efetividade da vacina.

7. CONCLUSÕES

- ❖ Mediante a análise filogenética dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4 (VP8*) e NSP4, todas as amostras analisadas nesse estudo foram classificadas dentro dos genótipos G3 – P[8] – E1, respectivamente;
- ❖ A análise filogenética dos genes estudados revelou que três variantes gênicas de RV-A genótipo G3 circularam no Brasil em períodos diferentes: de 1996 a 1997, de 2005 a 2006, e recentemente em 2009;
- ❖ Foram identificadas mutações pontuais sinônimas e não-sinônimas, com algumas das substituições de aminoácidos ocorrendo em regiões antigênicas, em todas as sequências dos genes analisados;
- ❖ Foram evidenciados eventos de reestruturação genômica entre amostras humanas para o gene que codifica para VP4 (VP8*).

8. PERSPECTIVAS

- ❖ Obter sequências melhores que permitam a análise filogenética das amostras que precisaram ser excluídas do estudo;
- ❖ Realizar a análise filogenética de todos os genes de RV-A das amostras genótipo G3 analisadas neste estudo;
- ❖ Realizar estudos de coalescência para melhor compreensão do padrão evolutivo de RV G3.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE M., ITO N., MORIKAWA S., TAKASU M., MURASE T., KAWASHIMA T., KAWAI Y., KOHARA J., SUGIYAMA M. **Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes.** *Virus Res.* Sep;144(1-2):250-7. **2009.**

ALFIERI A. A., LEITE J. P., NAKAGOMI O., KAGA E., WOODS P. A., GLASS R. I., GENTSCH J. R. **Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence.** *Arch Virol.* 141, 2353-2364. **1996.**

ARAUJO I. T., FERREIRA M. S., FIALHO A. M., ASSIS R. M., CRUZ C. M., ROCHA M., LEITE J. P. **Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil.** *J Clin Microbiol.* 39, 1999-2001. **2001.**

ARAUJO I. T., ASSIS R. M., FIALHO A. M., MASCARENHAS J. D., HEINEMANN M. B., LEITE J. P. **Brazilian P[8],G1, P[8],G5, P[8],G9, and P[4],G2 rotavirus strains: nucleotide sequence and phylogenetic analysis.** *J Med Virol.* 79, 995-1001. **2007.**

ARIAS C.F., ROMERO P., ALVAREZ V., LOPEZ S. **Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity.** *J Virol.* 70(9):5832-9. **1996.**

ARIAS C. F., DECTOR M. A., SEGOVIA L., LOPEZ T., CAMACHO M., ISA P., ESPINOSA R., LOPEZ S. **RNA silencing of rotavirus gene expression.** *Virus Res.* 102(1), 43-51. **2004.**

ARISTA S, GIAMMANCO GM, DE GRAZIA S, COLOMBA C, MARTELLA V. **Genetic variability among serotype G4 Italian human rotaviruses.** *J Clin Microbiol* 43:1420–1425. **2005.**

ARNOLDI F., CAMPAGNA M., EICHWALD C., DESSELBERGER U., BURRONE O.R.

Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. *J Virol.* 81(5):2128-37. 2007.

AOKI S.T., SETTEMBRE E.C., TRASK S.D., GREENBERG H.B., HARRISON S.C., DORMITZER P.R. **Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science.* Jun 12;324(5933):1444-7. 2009.**

BALL J.M., TIAN P., ZENG C.Q.Y. **Age-dependent diarrhea induced by rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* 272: 101- 104. 1996.**

BÁNYAI K, BOGDÁN A, SZÜCS G, ARISTA S, DE GRAZIA S, KANG G, BANERJEE I, ITURRIZA-GÓMARA M, BUONAVOGLIA C, MARTELLA V. **Assignment of the group A rotavirus NSP4 gene into genotypes using a hemi-nested multiplex PCR assay: a rapid and reproducible assay for strain surveillance studies. *J Med Microbiol.* 58(Pt 3):303-11. 2009.**

BEARDS G., XU L., BALLARD A., DESSELBERGER U., MCCRAE M. A. **A serotype 10 human rotavirus. *J Clin Microbiol* 30(6), 1432-5. 1992.**

BERN C. & GLASS R. I. **Impact of diarrheal diseases worldwide.** In: Kapikian, A. Z. (Ed.). *Viral infections of the gastrointestinal tract. 2nd.* New York: Marcel Dekker; p.1-26. **1994.**

BHAN M. K., LEW J. F., SAZAWAL S., DAS B. K., GENTSCH J. R., GLASS R. I. **Protection conferred by neonatal rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhea. *J Infect Dis* 168(2), 282-7. 1993.**

BISHOP R.F., DAVIDSON G.P., HOLMES I.H., RUCK B.J. **Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 2(7841):1281-3. 1973.**

BISHOP, R. F., BARNES, G. L., CIPRIANI, E., AND LUND, J. S. **Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children.** *N Engl J Med* 309(2), 72-6. **1983.**

BOOM R., SOL C. J., SALIMANS M. M., JANSEN C. L., WERTHEIM-VAN DILLEN P. M., VAN DER NOORDAA J. **Rapid and simple method for purification of nucleic acids.** *J Clin Microbiol.* 28, 495-503. **1990.**

BORGAN M.A., MORI Y., ITO N., SUGIYAMA M., MINAMOTO N. **Antigenic analysis of nonstructural protein (NSP) 4 of group A avian rotavirus strain PO-13.** *Microbiol Immunol.* 47(9):661-8. **2003.**

BOWMAN G. D., NODELMAN I. M., LEVY O., LIN S. L., TIAN P., ZAMB T. J., UDEM S. A., VENKATARAGHAVAN B., SCHUTT C. E. **Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site.** *J Mol Biol.* 304, 861-871. **2000.**

BROWNE E. P., BELLAMY A. R., TAYLOR J. A. **Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipathic domain.** *J Gen Virol* 81, 1955-1959. **2000.**

BRUSSOW H., NAKAGOMI O., GERNA G., EICHHORN W. **Isolation of an avianlike group A rotavirus from a calf with diarrhea.** *J. Clin. Microbiol.* 30(1):67-73. **1992.**

CARVALHO-COSTA, F. A., ARAUJO, I. T., SANTOS DE ASSIS, R. M., FIALHO, A. M., DE ASSIS MARTINS, C. M., BOIA, M. N., AND LEITE, J. P. **Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil.** *Emerg Infect Dis* 15(1), 95-7. **2009.**

CASTELLO A. A., ARVAY M. L., GLASS R. I., GENTSCH J. **Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years.** *Pediatr Infect Dis J* 23, S168-172. **2004.**

CDC. **Rotavirus surveillance worldwide, 2001-2008.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 57, 1255-1257. **2008.**

CLARK H. F., OFFIT P. A., ELLIS R. W., EIDEN J. J., KRAH D., SHAW A. R., PICHICHERO M., TREANOR J. J., BORIAN F. E., BELL L. M., PLOTKIN, S. A. **The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants.** *J Infect Dis* 174 Suppl 1, S73-80. **1996.**

CHEN SY, CHANG YC, LEE YS, CHAO HC, TSAO KC, LIN TY, KO TY, TSAI CN, CHIU CH. **Molecular epidemiology and clinical manifestations of viral gastroenteritis in hospitalized pediatric patients in Northern Taiwan.** *J Clin Microbiol.* Jun;45(6):2054-7. **2007.**

CONNER M.E. & RAMIG, R.F. **Viral Enteric Diseases.** In: *Viral Pathogenesis*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 713-743. **1997.**

CUNLIFFE N.A., WOODS P.A., LEITE J.P.G., DAS B.K., RAMACHANDRAN M., BHAN M.K., HART CA, GLASS RI, GENTSCH JR. **Sequence analysis of NSP4 gene of human rotavirus allows classification into two main genetic groups.** *J Med Virol.* 53(1): 41-50. **1997.**

CUNLIFFE NA, GONDWE JS, GRAHAM SM, THINDWA BD, DOVE W, BROADHEAD RL, MOLYNEUX ME, HART CA. **Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999.** *J Clin Microbiol* 39:836-843. **2001.**

DAS B. K., GENTSCH J. R., CICIRELLO H. G., WOODS P. A., GUPTA A., RAMACHANDRAN M., KUMAR R., BHAN M. K., GLASS R. I. **Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India.** *J Clin Microbiol* 32, 1820-1822. **1994.**

DAVIDSON G.P., BISHOP R.F., TOWNLEY R.R., HOLMES I.H. **Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children.** *Lancet.* 1(7901):242-6. **1975.**

DE GRAZIA S, RAMIREZ S, GIAMMANCO GM, COLOMBA C, MARTELLA V, LO BIUNDO C, MAZZOLA R, ARISTA S. **Diversity of human rotaviruses detected in Sicily, Italy, over a 5-year period (2001-2005).** *Arch Virol.* 152(4):833-7. **2007.**

DENNEHY P. H. **Rotavirus vaccines: an overview.** *Clin Microbiol Rev* 21(1), 198-208. **2008.**

DESSELBERGER U. **Genome rearrangements of rotaviruses.** *Adv Virus Res* 46, 69-95. **1996.**

DORMITZER P.R., SUN Z.Y., WAGNER G., HARRISON S.C. **The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site.** *EMBO J.* Mar 1;21(5):885-97. **2002.**

DUNN SJ, WARD RL, MCNEAL MM, CROSS TL, GREENBERG HB. **Identification of a new neutralization epitope on VP7 of human serotype 2 rotavirus and evidence for electropherotype differences caused by single nucleotide substitutions.** *Virology.* 197(1):397-404. **1993.**

DUNN S. J., FIORE L., WERNER R. L., CROSS T. L., BROOME R. L., RUGGERI F. M., GREENBERG H. B. **Immunogenicity, antigenicity, and protection efficacy of baculovirus expressed VP4 trypsin cleavage products, VP5(1)* and VP8* from rhesus rotavirus.** *Arch Virol.* 140, 1969-1978. **1995.**

ESPINOLA EE, PARRA GI, RUSSOMANDO G, ARBIZA J. **Genetic diversity of the VP4 and VP7 genes affects the genotyping of rotaviruses: analysis of Paraguay an strains.** *Infect Genet Evol* 8:94-99. **2008.**

ESTES M. **Rotaviruses and their replication.** In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. *Fields Virology 4th ed.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 1426-1454. **2001.**

ESTES M.K. & KAPIKIAN A.Z. **Rotaviruses.** In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. *Fields Virology. 5th.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.1917-1975. **2007.**

FABBRETTI E., AFRIKANOVA I., VASCOTTO F., BURRONE O.R. **Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo.** *J Gen Virol.* Feb;80 (Pt 2):333-9. **1999.**

FERGUSON S. M. **Prospective Grant of Partially-Exclusive Licenses: Human-Bovine Reassortant Rotavirus Vaccine.** *Federal Register.* 69: 57335-57336. **2004.**

FISCHER T. K., BRESEE J. S., GLASS R. I. **Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children.** *Vaccine.* 22 Suppl 1, S49-54. **2004.**

FLEWETT T.H. & WOODE G.N. **The rotaviruses.** *Arch Virol.* 57(1):1-23. **1978.**

GENTSCH J. R., GLASS R. I., WOODS P., GOUVEA V., GORZIGLIA M., FLORES J., DAS B. K., BHAN M. K. **Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction.** *J Clin Microbiol.* 30, 1365-1373. **1992.**

GENTSCH J.R., WOODS P.A., RAMACHANDRAN M., DAS B.K., LEITE J.P., ALFIERI A., KUMAR R., BHAN M.K., GLASS R.I. **Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development.** *J Infect Dis.* 174 Suppl 1:S30-6. **1996.**

GENTSCH J.R., LAIRD A.R., BIELFELT B., GRIFFIN D.D., BANYAI K., RAMACHANDRAN M., JAIN V, CUNLIFFE NA, NAKAGOMI O, KIRKWOOD CD, FISCHER TK, PARASHAR UD, BRESEE JS, JIANG B, GLASS RI. Serotype diversity and reassortment between **human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus**

vaccine programs. *J Infect Dis.* 192(Suppl.1):S146-59. 2005.

GENTSCH JR, PARASHAR UD, GLASS RI. Impact of rotavirus vaccination: the importance of monitoring strains. *Future Microbiol.* 4:1231-1234. 2009.

GLASS R. I., PARASHAR U. D., BRESEE J. S., TURCIOS R., FISCHER T. K., WIDDOWSON M. A., JIANG B., GENTSCH J. R. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet.* 368, 323-332. 2006.

GREENBERG, H., MCAULIFFE, V., VALDESUSO, J., WYATT, R., FLORES, J., KALICA, A., HOSHINO, Y., SINGH, N. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 39, 91-99. 1983.

GOUVEA V., GLASS R.I., WOODS P., TANIGUCHI K., CLARK F.H., FORRESTER B., FANG ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 28(2):276-82. 1990.

GOUVEA V. & BRANTLY M. Is rotavirus a population of reassortants? *Trends Microbiol.* 3(4), 159-62. 1995.

GOUVEA V. & SANTOS N. Rotavirus serotype G5: an emerging cause of epidemic childhood diarrhea. *Vaccine.* 17, 1291-1292. 1999.

HABER P., CHEN R. T., ZANARDI L. R., MOOTREY G. T., ENGLISH R., BRAUN M. M. An analysis of rotavirus vaccine reports to the vaccine adverse event reporting system: more than intussusception alone? *Pediatrics.* 113, e353-359. 2004.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98. 1999.

HANLON P., HANLON L., MARSH V., BYASS P., SHENTON F., HASSAN-KING M., JOBE O., SILLAH H., HAYES R., M'BOGE B. H. *et. al.* Trial of an attenuated bovine

rotavirus vaccine (RIT 4237) in Gambian infants. *Lancet.* 1, 1342-1345. **1987.**

HEIMAN E.M., MCDONALD S.M., BARRO M., TARAPOREWALA Z.F., BAR-MAGEN T., PATTON J.T. **Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions.** *J Virol.* 82(22):11106-16. **2008.**

HOSHINO Y., WAGNER M., YAN X. Y., PEREZ-SCHAEL I., KAPIKIAN A. Z. **Horizontal transmission of rhesus monkey rotavirus-based quadrivalent vaccine during a phase 3 clinical trial in Caracas, Venezuela.** *J Infect Dis.* 187, 791-800. **2003.**

HUANG H., SCHROEDER F., ESTES M. K., MCPHERSON T., BALL J. M. **Interaction(s) of rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) C-terminal peptides with model membranes.** *Biochem J.* 380, 723-733. **2004.**

INSTITUTO ADOLFO LUTZ E CENTRO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA "PROFESSOR ALEXANDRE VRANJAC". **Diarrhea and rotavirus.** *Rev. Saúde Pública* [online]. **2004.** Disponível em:
http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102004000600014&lng=en&nrm=iso

ITURRIZA GOMARA, M., WONG, C., BLOME, S., DESSELBERGER, U., AND GRAY, J. **Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation.** *J Virol* 76(13), 6596-601. **2002.**

JAIN V., DAS B. K., BHAN M. K., GLASS R. I., GENTSCH J. R. **Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India.** *J Clin Microbiol.* 39, 3524-3529. **2001.**

JAYARAM, H., ESTES, M. K. & PRASAD, B. V. **Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication.** *Virus Res.* 101, 67-81. **2004.**

JOHANSEN, K., HINKULA, J., ESPINOZA, F., LEVI, M., ZENG, C., RUDEN, U., VESIKARI, T., ESTES, M., AND SVENSSON, L. **Humoral and cell-mediated immune**

responses in humans to the NSP4 enterotoxin of rotavirus. *J Med Virol* 59(3), 369-77. 1999.

KHAMRIN P, MANEEKARN N, PEERAKOME S, YAGYU F, OKITSU S, USHIJIMA H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J Med Virol.* 78(7):986-94. 2006

KAPIKIAN A.Z., KIM H.W., WYATT R.G., RODRIGUEZ W.J., ROSS S., CLINE W.L., PARROTT RH, CHANOCK RM. Reovirus like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science.* 185(156):1049-53. 1974.

KAPIKIAN A.Z., HOSHINO Y., CHANOCK R.M. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. *Fields Virology. 4th.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.1787-833. 2001.

KIRKWOOD C., MASENDYCH P.J., COULSON B.S. Characteristics and location of cross-reactive and serotype-specific neutralization sites on VP7 of human G type 9 rotaviruses. *Virology.* 196(1):79-88. 1993.

KOVACS-NOLAN J., YOO D., MINE, Y. Fine mapping of sequential neutralization epitopes on the subunit protein VP8 of human rotavirus. *Biochem J.* 376(Pt 1), 269-75. 2003.

KRASCHNEFSKI M.J., SCOTT S.A., HOLLOWAY G., COULSON B.S., VON ITZSTEIN M., BLANCHARD H. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the VP8* carbohydrate-binding protein of the human rotavirus strain Wa. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 61(Pt 11):989-93. 2005.

KRISHNAN T., BURKE B., SHEN S., NAIK T. N., DESSELBERGER U. Molecular

epidemiology of human rotaviruses in Manipur: genome analysis of rotaviruses of long electropherotype and subgroup I. *Arch Virol.* 134, 279-292. **1994.**

LEITE J.P.G., ALFIERI A.A., WOODS P.A., GLASS R.I., GENTSCH J.R. **Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis.** *Arch Virol.* 141, 2365-2374. **1996.**

LEITE J. P., CARVALHO-COSTA F. A., LINHARES A. C. **Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 103, 745-753. **2008.**

LEE JB, YOUN SJ, NAKAGOMI T, PARK SY, KIM TJ, SONG CS, JANG HK, KIM BS, NAKAGOMI O. **Isolation, serologic and molecular characterization of the first G3 caprine rotavirus.** *Arch Virol.* 148(4):643-57. **2003.**

LINHARES A.C., PINHEIRO F.P., SCHMETZ C., MULLER G., PETERS D. **Duovirus (Rotavirus) in Belem, State of Para, Brazil (preliminary report).** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 19(4):278-9. **1977.**

LU X., MCDONALD S.M., TORTORICI M.A., TAO Y.J., VASQUEZ-DEL CARPIO R., NIBERT M.L., PATTON JT, HARRISON SC. **Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1.** *Structure.* 16(11):1678-88. **2008.**

LUDERT J. E., FENG N., YU J. H., BROOME R. L., HOSHINO Y., 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.**

MAES P., MATTHIJNSSENS J., RAHMAN M. & RANST M. V. **RotaC: A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses.** *BMC Microbiology* 9:238, **2009.**

MARTELLA, V., PRATELLI, A., GRECO, G., GENTILE, M., FIORENTE, P., TEMPESTA, M. & BUONAVOGLIA, C. **Nucleotide sequence variation of the VP7 gene of two G3-Type rotaviruses isolated from dogs.** *Virus Res* 74, 17–25. **2001.**

MARTELLA, V., CIARLET, M., CAMARDA, A., PRATELLI, A., TEMPESTA, M., GRECO, G., CAVALLI, A., ELIA, G., DECARO, N. **Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotavirus identified in Italy: emergence of a novel VP4 genotype.** *Virology* 314, 358–370. **2003.**

MARTÍNEZ-LASO J, ROMÁN A, RODRIGUEZ M, CERVERA I, HEAD J, RODRÍGUEZ-AVIAL I, PICAZO JJ. **Diversity of the G3 genes of human rotaviruses in isolates from Spain from 2004 to 2006: cross-species transmission and inter-genotype recombination generates alleles.** *J Gen Virol.* 90(Pt 4):935-43. **2009**

MASCARENHAS J.D.P., LINHARES A.C., GABBAY Y.B., FREITAS R.B., MENDEZ E., LÓPEZ S. ARIAS C.F. **Naturally occurring serotype 2/ subgroup II rotavirus reassortants in Northern Brazil.** *Virus Res.* 14(3):235-40. **1989.**

MASCARENHAS J.D.P., LEITE J.P., GABBAY Y.B., FREITAS R.B., OLIVEIRA C.S., MONTEIRO T.A., LINHARES A.C. **Rotavirus G serotypes and P[,G genotypes identified in cases of reinfection among children participating in a trial with rhesus-human reassortant tetravalent vaccine (RRV-TV) in Belem, Brazil.** *J Trop Pediatr.* 48(2):93-7. **2002.**

MASCARENHAS J. D., LINHARES A. C., GABBAY Y. B., LIMA C. S., GUERRA SDE F., SOARES L. S., OLIVEIRA D. S., LIMA J. C., MACEDO O., LEITE J. P. **Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belem, Brazil.** *Virus Res.* 126(1-2), 149-58. **2007.**

MATSUNO S, HASEGAWA A, KALICA AR, KONO R. **Isolation of a recombinant between simian and bovine rotaviruses.** *J Gen Virol;*48(1):253-6. **1980.**

MATTHIJNSSENS J., CIARLET M., HEIMAN E., ARIJS I., DELBEKE T., MCDONALD S. M., PALOMBO E. A., ITURRIZA-GOMARA M., MAES P., PATTON J. T., RAHMAN M., VAN RANST M. **Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains.** *J Virol.* 82, 3204-3219. **2008a.**

MATTHIJNSSENS J., CIARLET M., RAHMAN M., ATTOUI H., BANYAI K., ESTES M. K., GENTSCH J. R., ITURRIZA-GOMARA M., KIRKWOOD C. D., MARTELLA V., MERTENS P. P., NAKAGOMI O., PATTON J. T., RUGGERI F. M., SAIF L. J., SANTOS N., STEYER A., TANIGUCHI K., DESSELBERGER U., VAN RANST M. **Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments.** *Arch Virol.* 153, 1621-1629. **2008b**

MCDONALD SM, MATTHIJNSSENS J, MCALLEN JK, HINE E, OVERTON L, WANG S, LEMEY P, ZELLER M, VAN RANST M, SPIRO DJ, PATTON JT. **Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations.** *PLoS Pathog.* 5(10):e1000634. doi:10.1371/journal.ppat.1000634. **2009.**

MCNEAL, M. M., SESTAK, K., CHOI, A. H., BASU, M., COLE, M. J., AYE, P. P., BOHM, R. P. WARD, R. L. **Development of a rotaviruss shedding model in rhesus macaques, using a homologous wild-type rotavirus of a new P genotype.** *J Virol* 79, 944–954. **2005.**

MERTENS P. **The dsRNA viruses.** *Virus Res.* 101, 3-13. **2004.**

MINISTÉRIO DA SAÚDE. [on line]. Brasil. [capturado 25 Fev. 2010]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL – SECRETARIA DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE – COORDENAÇÃO DE SAÚDE MATERNO INFANTIL. **Assistência e controle das**

doenças diarréicas. Brasília, 1993. Disponível em:
http://bvsmms.saude.gov/bvs/publicacoes/partes/doencas_diarreicas1.pdf

MISHRA V, AWASTHI S, NAG VL, TANDON R. **Genomic diversity of group A rotavirus strains in patients aged 1-36 months admitted for acute watery diarrhoea in northern India: a hospital-based study.** *Clin Microbiol Infect*;16(1):45-50. **2010.**

MONNIER N, HIGO-MORIGUCHI K, SUN ZY, PRASAD BV, TANIGUCHI K, DORMITZER PR. **High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain.** *J Virol* 80(3):1513-23. **2006.**

MORI Y., BORGAN M. A., ITO N., SUGIYAMA M., MINAMOTO N. **Diarrhea-inducing activity of avian rotavirus NSP4 glycoproteins, which differ greatly from mammalian rotavirus NSP4 glycoproteins in deduced amino acid sequence in suckling mice.** *J Virol* 76(11), 5829-34. **2002.**

MOULTON L. H., STAAT M. A., SANTOSHAM M., WARD R. L. **The protective effectiveness of natural rotavirus infection in an American Indian population.** *J Infect Dis* 178(6), 1562-6. **1998.**

MURPHY T. V., GARGIULLO P. M., MASSOUDI M. S., NELSON D. B., JUMAAN A. O., OKORO C. A., ZANARDI L. R., SETIA S., FAIR E., LEBARON C. W., WHARTON M., LIVENGOOD J. R. **Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine.** *N Engl J Med.* 344, 564-572. **2001.**

NAKAGOMI O. & NAKAGOMI T. **Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus.** (). *Arch Virol* 120(1-2), 43-55. **1991.**

O'RYAN M. **The ever-changing landscape of rotavirus serotypes.** *Pediatr Infect Dis J.* 28(3 Suppl):S60-2. **2009.**

OTTO T.D., VASCONCELLOS E.A., GOMES L.H., MOREIRA A.S., DEGRAVE W.M., MENDONCA-LIMA L., ALVES-FERREIRA M. **ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility.** *Genet Mol Res.* 7(3):861-71. **2008.**

PALOMBO E. A. & BISHOP R. F. **Genetic and antigenic characterization of a serotype G6 human rotavirus isolated in Melbourne, Australia.** *J Med Virol* 47, 348-354. **1995.**

PARASHAR U. D., GIBSON C. J., BRESSE J. S., GLASS R. I. **Rotavirus and severe childhood diarrhea.** *Emerg Infect Dis.* 12, 304-306. **2006.**

PATTON J.T. & GALLEGOS C.O. **Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle.** *J Gen Virol.* 71 (Pt 5):1087-94. **1990.**

PATTON J. T. **Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins.** *J Gen Virol.* 76 (Pt 11), 2633-44. **1995.**

PATTON J.T. & SPENCER E. **Genome replication and packaging of segmented doublestranded RNA viruses.** *Virology.* 277(2):217-25. **2000.**

PEDLEY S., HUNDLEY F., CHRYSTIE I., MCCRAE M. A., DESSELBERGER U. **The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children.** *J Gen Virol* 65 (Pt 7), 1141-1150. **1984.**

PEREZ-VARGAS J., ISA P., LOPEZ S., ARIAS C. F. **Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits.** *Arch Med Res* 37, 1-10. **2006.**

RAMIG R.F. **Genetics of the rotaviruses.** *Annu Rev Microbiol.* 51:225-55. **1997.**

RUIZ-PALACIOS G. M., PEREZ-SCHAEL I., VELAZQUEZ F. R., ABATE H., BREUER T., CLEMENS S. C., CHEUVART B., ESPINOZA F., GILLARD P., INNIS B. L., CERVANTES Y., LINHARES A. C., *et al.* **Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis.** *N Engl J Med.* 354, 11-22. **2006.**

SALINAS B., PEREZ SCHAEL I., LINHARES A. C., RUIZ PALACIOS G. M., GUERRERO M. L., YARZABAL J. P., CERVANTES Y., COSTA CLEMENS S., DAMASO S., HARDT K., DE VOS B. **Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants.** *Pediatr Infect Dis. J* 24, 807-816. **2005.**

SANTOS N. & HOSHINO Y. **Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine.** *Rev Med Virol* 15, 29-56. **2005.**

SANTOS N., VOLOTAO E. M., SOARES C. C., CAMPOS G. S., SARDI S. I., HOSHINO Y. **Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies.** *J Clin Microbiol.* 43, 4064-4069. **2005.**

SCOTT S.A., HOLLOWAY G., COULSON B.S., SZYCZEW A.J., KIEFEL M.J., VON ITZSTEIN M., BLANCHARD H. **Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the sialic acid-binding domain (VP8*) of porcine rotavirus strain CRW-8.** *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 61(Pt 6):617-20. **2005.**

SHAH K, KIRKWOOD CD, BHAVE M, PALOMBO EA. **Genetic variation of NSP1 and NSP4 genes among serotype G9 rotaviruses causing hospitalization of children in Melbourne, Australia, 1997-2002.** *J Med Virol.* 78(8):1124-30. **2006.**

SOLBERG O.D., HASING M.E., TRUEBA G., EISENBERG J.N. **Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus.** *Virology.* 385(1):58-67. **2009.**

STUPKA JA, CARVALHO P, AMARILLA AA, MASSANA M, PARRA GI; ARGENTINEAN NATIONAL SURVEILLANCE NETWORK FOR DIARRHEAS. **National Rotavirus Surveillance in Argentina: high incidence of G9P[8] strains and detection of G4P[6] strains with porcine characteristics.** *Infect Genet Evol.* 9(6):1225-31. **2009.**

SUBODH S., BHAN M. K., RAY P. **Genetic characterization of VP3 gene of group A rotaviruses.** *Virus Genes.* 33(2), 143-5. **2006.**

TAMURA K., DUDLEY J., NEIM., KUMAR S. **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** *Mol Biol Evol.* 24, 1596-1599. **2007.**

TANIGUCHI K., URASAWA T., URASAWA S. **Species specificity and interspecies relatedness in VP4 genotypes demonstrated by VP4 sequence analysis of equine, feline, and canine rotavirus strains.** *Virology.* 200(2), 390-400. **1994.**

TANIGUCHI K. & URASAWA S. **Diversity in rotavirus genomes.** *Seminars in Virology* 6, 123 - 131. **1995.**

TARAPOREWALA Z. F. & PATTON J. T. **Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae.** *Virus Res.* 101, 57-66. **2004.**

TAYLOR J. A. & BELLAMY A. R. **Interaction of the rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 with the viral and cellular components.** *Amsterdam: Elsevier Science.* **2003.**

TIAN P., ESTES M. K., HU Y., BALL J. M., ZENG C. Q., SCHILLING W. P. **The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum.** *J Virol* 69, 5763-5772. **1995.**

TIMENETSKY M.C., GOUVEA V., SANTOS N., CARMONA R. C., HOSHINO Y. A

novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. *J Gen Virol.* 78 (Pt 6), 1373-1378. 1997.

THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*22(22):4673-80. 1994.

TORT, L.F.L., VOLOTÃO, E.M., MENDONÇA, M.C.L., SILVA, M.F.M., SIQUEIRA, A.A., ASSIS, R.M.S., MORATORIO, G., CRISTINA, J., LEITE, J.P.G. Phylogenetic analysis of human P[8]G9 rotavirus strains circulating in Brazil reveals the presence of a novel genetic variant. *J. Clin. Virol*, doi:10.1016/j.jcv.2009.12.018. 2010.

TSUGAWA T. & HOSHINO Y. UNICEF/WHO genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology.* 380, 344-353. 2008.

UNICEF/WHO, Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009

URSU K., KISFALI P., RIGÓ D., IVANICS E., ERDÉLYI K., DÁN A., MELEGH B., MARTELLA V., BÁNYAI K. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. *Arch Virol.* 154(8):1365-9. 2009.

VAINIO K, NORDBØ SA, NJØLSTAD G, STØRVOLD G, DØLLNER H, MIDGAARD C, BOSSE FJ, ROGNLIEN AG, ROJAHN A, WATHNE KO, FLEM E. Detection and characterization of group A rotaviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Norway, 2006-2008. *J Med Virol.* 81(10):1839-44. 2009.

VELAZQUEZ F. R., MATSON D. O., CALVA J. J., GUERRERO L., MORROW A. L., CARTER-CAMPBELL S., GLASS R. I., ESTES M. K., PICKERING, L. K., RUIZ-PALACIOS, G. M. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 335(14), 1022-8. 1996.

VESIKARI T., ISOLAURI E., DELEM A., D'HONDT E., ANDRE F.E., BEARDS G.M.,

FLEWETT TH. **Clinical efficacy of the RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine in infants vaccinated before a rotavirus epidemic.** *J Pediatr.* 107(2):189-94. **1985.**

VESIKARI T., KAPIKIAN A.Z., DELEM A., ZISSIS G. **A comparative trial of rhesus monkey (RRV-1) and bovine (RIT 4237) oral rotavirus vaccines in young children.** *J Infect Dis.* 153(5):832-9. **1986.**

VESIKARI T., KARVONEN A., PUUSTINEN L., ZENG S.Q., SZAKAL E.D., DELEM A., DE VOS B. **Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in Finnish infants.** *Pediatr Infect Dis J.* 23(10):937-43. **2004.**

VESIKARI T., CLARK H. F., OFFIT P. A., DALLAS M. J., DISTEFANO D. J., GOVEIA M. G., WARD R. L., SCHODEL F., KARVONEN A., DRUMMOND J. E., DINUBILE M. J., HEATON P. M. **Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants.** *Vaccine.* 24(22), 4821-9. **2006.**

WANG YH, KOBAYASHI N, ZHOU DJ, YANG ZQ, ZHOU X, PENG JS, ZHU ZR, ZHAO DF, LIU MQ, GONG J. **Molecular epidemiologic analysis of group A rotaviruses in adults and children with diarrhea in Wuhan city, China, 2000-2006.** *Arch Virol.*152(4):669-85. **2007.**

WANG YH, KOBAYASHI N, ZHOU X, NAGASHIMA S, ZHU ZR, PENG JS, LIU MQ, HU Q, ZHOU DJ, WATANABE S, ISHINO M. **Phylogenetic analysis of rotaviruses with predominant G3 and emerging G9 genotypes from adults and children in Wuhan, China.** *J Med Virol.* 81(2):382-9. **2009.**

WARD R. L., & BERNSTEIN, D. I. **Protection against rotavirus disease after natural rotavirus infection.** US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *J Infect Dis.* 169(4), 900-4. **1994.**

WOROBAY M. & HOLMES E.C. **Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses.** *J Gen Virol.* 80 (Pt 10):2535-43. **1999.**

XU J, YANG Y, SUN J, DING Y, SU L, FANG Z, GLASS RI. **Molecular epidemiology of rotavirus infections among children hospitalized for acute gastroenteritis in Shanghai, China, 2001 through 2005.** *J Clin Virol.* 44(1):58-61. **2009.**

ZARATE S., ESPINOSA R., ROMERO P., MENDEZ E., ARIAS C. F., LOPEZ S. **The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells.** *J Virol.* 74, 593-599. **2000.**

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)