



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

**ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES VP4, VP7 E NSP4 DE ROTAVÍRUS
DO TIPO G1 CIRCULANTES EM BELÉM E MARITUBA, PARÁ, BRASIL,
DE 1982 a 2008**

Luana da Silva Soares

**Belém-Pará
2011**

LUANA DA SILVA SOARES

**ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES VP4, VP7 E NSP4 DE ROTAVÍRUS
DO TIPO G1 CIRCULANTES EM BELÉM E MARITUBA, PARÁ, BRASIL,
DE 1982 a 2008**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Dr. Alexandre da Costa Linhares

Co-orientadora: Dra. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

Belém-PA

2011

Soares, Luana da Silva

Análise molecular dos genes VP4, VP7 e NSP4 de rotavírus do tipo G1 circulantes em Belém e Marituba, Pará, Brasil, de 1982 a 2008/Luana da Silva Soares. Belém: Universidade Federal do Pará, 2011.

105f.: il.; 30cm.

Tese (Doutorado de Patologia das Doenças Tropicais) – Núcleo de Medicina de Doenças Tropicais, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

1. Rotavirus. 2. crianças. 3. diarreia. 4. genótipo G1.
I. Universidade Federal do Pará. II. Núcleo de Medicina de Doenças Tropicais. III. Título

CDU: 616. 578

LUANA DA SILVA SOARES

**ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES VP4, VP7 E NSP4 DE ROTAVÍRUS
DO TIPO G1 CIRCULANTES EM BELÉM E MARITUBA, PARÁ, BRASIL,
DE 1982 a 2008**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais.

Banca examinadora:

Membro: Prof. Dr. Alexandre da Costa Linhares - Orientador
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

Membro: Prof^a. Dr^a. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas - Co-orientadora
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

Membro: Prof^a. Dr^a. Maísa de Sousa - Avaliadora
Instituição: Universidade Federal do Pará

Membro: Prof^a. Dr^a. Rosa Helena Porto Gusmão - Avaliadora
Instituição: Universidade do Estado do Pará

Membro: Prof. Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes - Avaliador
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

Membro: Prof. Dr. Rodrigo Vellasco Duarte Silvestre- Avaliador
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

Membro: Prof^a. Dr^a. Yvone Benchimol Gabbay - Suplente
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

Aprovado em: ____ / ____ / ____

A Deus, por todas as vitórias alcançadas. Aos meus pais, Messias e Klieds, pela graça de existir e incentivo. Aos meus irmãos, Daiany e Thiago, pelo carinho e amizade. Aos meus amores, Augusto, Ariela e Valentina, pelo amor, compreensão e por estarem sempre ao meu lado e em meu coração.

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais esta grande vitória em minha vida.

A minha família por todo incentivo e estímulo durante esta caminhada e compreenderam minha ausência.

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Linhares, pelo apoio, atenção e conhecimentos repassados.

A minha co-orientadora, Dra. Joana Mascarenhas, minha infinita gratidão pela confiança, paciência e amizade no decorrer da minha vida profissional.

A Universidade Federal do Pará e ao Núcleo de Medicina Tropical pela oportunidade em desenvolver este trabalho.

Ao Instituto Evandro Chagas pelo amparo técnico-científico proporcionado para execução desta investigação.

A todos da Seção de Virologia pelo estímulo e todo apoio prestado.

A equipe do Laboratório de Rotavírus, em especial a Euzeni, por toda ajuda e carinho.

Aos meus amigos Sylvia, Alessilva e Ian Carlos, pelo companheirismo e por estarem ao meu lado no desenvolvimento deste estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio que me foi dispensado.

Aos meus parentes e amigos, pela força, incentivo e por acreditarem nesta minha conquista.

A todos aqueles que participaram de alguma forma no desenvolvimento desta pesquisa.

“E é por isso que eu me alegro nas fraquezas, humilhações, necessidades, perseguições e angústias, por causa de Cristo. Pois quando sou fraco, então é que eu sou forte.”

2 Cor 12,10

RESUMO

Os rotavírus são os principais agentes virais causadores de gastroenterite aguda e responsáveis por 36% dos casos hospitalizações entre crianças menores de cinco anos, resultando em 453.000 óbitos anualmente, principalmente em países em desenvolvimento. Pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, possui RNA de dupla fita (dsRNA) com 11 segmentos codificando 12 proteínas. O genótipo G1 se apresenta geralmente com maior frequência nas investigações epidemiológicas, circulando em várias partes do mundo sob diferentes prevalências. Este estudo teve como objetivo analisar a variabilidade genética dos genes VP4, VP7 e NSP4 dos rotavírus G1 circulantes nos municípios de Belém e Marituba, Pará, Brasil, no período de 1982 a 2008. Foram selecionadas 83 amostras previamente caracterizadas como G1 e submetidas a RT-PCR. Os espécimes foram provenientes de sete estudos realizados no IEC. Foi possível a amplificação para os três genes em estudo de 63 (75,9%) espécimes. Foram detectadas as linhagens 1 (8/63, 12,7%), 2 (29/63, 46,0%), 3 (18/63, 28,6%) e 9 (8/63, 12,7%) para o gene VP7. Co-predominaram as sublinhagens 2E e 3A concorrendo com um total de 57,1% (36/63) das amostras. Foram observadas três substituições de aminoácidos (97 [D→E], 147 [S→N] e 218 [I→V]) no gene VP7 nas regiões antigênicas (A, B e C) nas amostras das linhagens 1, 2 e 9. Todas as amostras apresentaram a especificidade P[8] para o gene VP4 e as linhagens 2 (21/63, 33,3%) e 3 (42/63, 66,7%) foram detectadas. No gene da VP4 ocorreram duas alterações (35 [I→V] e 38 [S→G]) na região antigênica em todas as amostras analisadas. Para o gene NSP4, todas as amostras pertenceram ao tipo E1. Houve mudanças de nucleotídeos nas posições 47 (C→T) e 101 (T→C), resultando em alteração aminoacídica nos resíduos 16 (S→P) e 34 (L→P) em todas as amostras analisadas e nove espécimes demonstraram alteração no sítio de toxicidade da NSP4 (aa 131). Tal análise permitiu ampliar o conhecimento da diversidade genética e da circulação de variantes de rotavírus G1, representando o primeiro estudo da epidemiologia molecular deste genótipo no Brasil e confirmar a alta heterogeneidade que este tipo apresenta.

Palavras chaves: Análise molecular. Rotavírus. Genótipo G1.

ABSTRACT

Rotaviruses are major viral agents of acute gastroenteritis and responsible for 36% of hospitalization for diarrhea among children less than five years of age, resulting in 453.000 deaths annually, mostly in developing countries. Rotavirus is a member of *Reoviridae* family, and its genome consists of 11 double-stranded RNA (dsRNA) which encode 12 proteins. G1 rotavirus is commonly detected in epidemiological investigations, occurring under different prevalence rates. The aim of this study was to analyze the VP4, VP7 and NSP4 diversity genetic of G1 rotavirus circulating in Belém and Marituba, Pará, Brazil, from 1982 to 2008. We selected 83 samples previously characterized as G1 type and submitted to RT-PCR. The samples were from seven studies conducted in IEC. It was possible amplification for 63 (75.9%) specimens. Lineages 1 (8/63, 12.7%), 2 (29/63, 46.0%), 3 (18/63, 28.6%) and 9 (8/63, 12.7%) of VP7 gene were detected. The sublineages 2E and 3A were co-predominant detected in 57.1% (36/63) of samples. Three amino acid substitutions (97 [D→E], 147 [S→N] and 218 [I→V]) were observed in VP7 antigenic regions (A, B and C) in samples of 1, 2 and 9 lineages. All samples showed P[8] specificity for VP4 gene and lineages 2 (21/63, 33.3%) and 3 (42/63, 66.7%) were detected. Two substitutions (35 [I→V] and 38 [S→G]) occurred in antigenic region of VP4 of samples analyzed. For NSP4 gene, all samples belonged to E1 type. Phylogenetic analysis of NSP4 gene revealed that occurred changes in nucleotide positions 47 (C→T) and 101 (T→C), resulting in amino acid substitutions at positions 16 (S→P) and 34 (L → P) in all samples and 9 specimens displayed amino acid substitution in NSP4 toxicity residue (aa 131). This study allowed us to broaden our understanding about genetic diversity and circulation of G1 variants and represents the first molecular epidemiology analyze of this genotype in Brazil corroborating the high heterogeneity of this genotype.

Key words: Molecular analysis. Rotavirus. G1 genotype.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Representação esquemática da partícula de rotavírus.....	21
FIGURA 2	Estrutura dos segmentos gênicos de rotavírus.....	22
FIGURA 3	Representação esquemática e tridimensional da partícula de rotavírus.....	23
FIGURA 4	Demonstração das regiões variáveis (VR) e das principais regiões antigênicas (RA) do gene VP7 de rotavírus.....	25
FIGURA 5	Modelo esquemático do ciclo de replicação dos rotavírus.....	28
FIGURA 6	Principais mecanismos envolvidos na patogênese da diarreia por rotavírus.....	30
FIGURA 7	Rearranjo no genoma de rotavírus.....	31
FIGURA 8	Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP7 envolvendo 63 amostras G1 dos municípios de Belém e Marituba.....	58
FIGURA 9	Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene VP7 das amostras do presente estudo e protótipo Wa nas regiões antigênicas A, B, C e F.....	62
FIGURA 10	Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP4 envolvendo 63 amostras G1 dos municípios de Belém e Marituba.....	65

FIGURA 11	Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene VP4 das amostras do presente estudo e protótipo Wa nas regiões antigênicas 2 a 5.....	66
FIGURA 12	Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene que codifica para a proteína NSP4 envolvendo 63 amostras G1 dos municípios de Belém e Marituba.....	68
FIGURA 13	Distribuição temporal das linhagens e sublinhagens do gene VP7 de rotavírus G1 que circularam no período de 1983 a 2008 em Belém e Marituba.....	69
FIGURA 14	Distribuição temporal das linhagens do gene VP4 de rotavírus G1 que circularam no período de 1983 a 2008 em Belém e Marituba.....	70

LISTA DE QUADROS E TABELAS

TABELA 1	Valores de <i>cut-off</i> de identidade nucleotídica para caracterizar os diferentes genótipos dos segmentos de rotavírus do grupo A.....	21
QUADRO 1	Características dos estudos sobre gastroenterite por rotavirus realizados no IEC no período de 1982 a 2008....	48
QUADRO 2	Iniciadores utilizados na RT-PCR para amplificação dos genes VP4, VP7 e NSP4 de rotavírus.....	52
QUADRO 3	Reagentes usados na RT-PCR para a obtenção do cDNA	53
QUADRO 4	Reagentes usados na PCR para a amplificação dos genes VP4, VP7 e NSP4 de rotavírus.....	53
QUADRO 5	Reagentes usados na reação de sequenciamento dos genes VP4 e VP7.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – Graus centígrados

µL – Microlitro

aa – aminoácido

Ca- íon cálcio

cDNA - DNA complementar

dsRNA - ácido ribonucléico de dupla cadeia

EGPA - eletroforese em gel de poliacrilamida

IEC – Instituto Evandro Chagas

IFN - interferon

IgA – Imunoglobulina A

IL- Interleucina

kDa- kilo Dalton

mA - milli-Ámperes

mg – miligrama

mL - mililitro

ng – nanogramas

nm – nanômetros

NSP – Proteína não estrutural

ORF - fase aberta de leitura

pb - pares de bases

RA – região antigênica

RE - retículo endoplasmático

RNA (-) – RNA de polaridade negativa

RNA (+) – RNA de polaridade positiva

RNA_m - RNA mensageiro

RPM - rotações por minuto

RT-PCR - Reação em cadeia mediada pela polimerase, precedida por transcrição reversa

SG - Subgrupo

TA - temperatura ambiente

TBE - tampão tris-borato-EDTA

TNF- Fator de necrose tumoral

TRO - terapia de reidratação oral

V – volts

VORH - Vacina Oral de Rotavírus Humano

VP – Proteína estrutural

VR – região variável

W – Watts

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	8
LISTA DE QUADROS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	18
3.1. BREVE HISTÓRICO.....	18
3.2. O ROTAVÍRUS.....	18
3.2.1. Classificação viral.....	18
3.2.2. Morfologia viral.....	20
3.2.3. Organização genômica.....	22
3.2.4. Proteínas.....	24
3.2.4.1. Proteínas estruturais.....	24
3.2.4.2. Proteínas não-estruturais.....	26
3.3. REPLICAÇÃO VIRAL.....	27
3.4. FISIOPATOLOGIA.....	29
3.5. MECANISMOS DE EVOLUÇÃO GENÉTICA.....	31
3.6. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR ROTAVÍRUS.....	32
3.6.1. Epidemiologia do genótipo G1.....	34
3.7. TRANSMISSÃO.....	35
3.8. QUADRO CLÍNICO.....	37
3.9. IMUNIDADE.....	37
3.10. TRATAMENTO.....	39
3.11. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	39
3.12. VACINAS.....	41
4. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA.....	44
5. OBJETIVOS.....	45
5.1. OBJETIVO GERAL.....	45
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
6.1. MATERIAL.....	46

6.1.1. Área de estudo.....	46
6.1.2. Pacientes e espécimes clínicos.....	46
6.2. MÉTODOS.....	50
6.2.1. Suspensão fecal.....	50
6.2.2. Extração do genoma viral	50
6.2.3. Reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).....	51
6.2.4. Eletroforese em gel de agarose.....	53
6.2.5. Purificação do produto da RT-PCR.....	53
6.2.6. Quantificação do DNA.....	53
6.2.7. Sequenciamento de nucleotídeos.....	54
6.2.8. Purificação do produto da reação de seqüenciamento.....	54
6.2.9. Eletroforese em sequenciador automático.....	55
6.2.10. Alinhamento e edição das sequências para construção dos dendogramas.....	55
7. RESULTADOS.....	57
7.1. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	57
7.2. ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO E AMINOÁCIDOS.....	57
7.2.1. Gene VP7.....	57
7.2.2. Gene VP4.....	63
7.2.3. Gene NSP4.....	67
7.3. DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DAS VARIANTES GENÉTICAS PARA O GENE VP7 DE AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS G1.....	69
7.4. DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DAS VARIANTES GENÉTICAS PARA O GENE VP4 DE AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS G1.....	70
8. DISCUSSÃO.....	71
9. CONCLUSÃO.....	77
10. PERSPECTIVAS.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXOS.....	100

1. INTRODUÇÃO

A mortalidade infantil permanece ainda como um grave problema de saúde pública, uma vez que aproximadamente 9 milhões de crianças menores de 5 anos morrem anualmente em todo mundo. Estima-se que as doenças infecciosas são responsáveis por aproximadamente 6 milhões de óbitos entre crianças nesta faixa etária, sendo que as diarreias agudas representaram 15% dos casos, a maioria nos países em desenvolvimento (BLACK et al., 2010).

A diarreia aguda é caracterizada pelo aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou semissólidas acompanhadas de febre, vômitos e cólicas, podendo perdurar por até 14 dias. O impacto que esta doença ocasiona está relacionado aos danos à saúde da população infantil, bem como no contexto da sociedade em geral (BRASIL, 2006a).

A etiologia das doenças diarreicas é ampla, englobando agentes de natureza diversa como vírus, bactérias, parasitas e toxinas. Os agentes bacterianos são relativamente mais importantes nos países em desenvolvimento, enquanto os agentes virais são relevantes tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, contribuindo para as elevadas taxas de hospitalização e pelos altos índices de morbi-mortalidade infantil, respectivamente (BRASIL, 2004; LINHARES et al., 2011; SOÁREZ et al., 2008).

Dentre os agentes virais, os rotavírus se destacam epidemiologicamente, uma vez que são responsáveis por 36% dos casos de gastroenterite que culminam em hospitalizações entre crianças menores de cinco anos, resultando em 453.000 óbitos anualmente, principalmente em países em desenvolvimento (CDC 2011; TATE et al., 2011a).

No Brasil, a mortalidade infantil associada a casos de diarreia aguda por rotavírus varia de acordo com a região geográfica, sendo que os estados do Norte e Nordeste do país são responsáveis por 4,9% e 6,5% dos óbitos, respectivamente (BRASIL, 2006b). Apesar da redução das hospitalizações por gastroenterite aguda após a introdução da vacina anti-rotavírus no Sistema Único de Saúde em 2006, verifica-se que esta situação ainda se mantém expressiva, uma vez que em tais regiões do país apresentam menor cobertura vacinal (LANZIERI et al., 2010).

Além dos seres humanos, os rotavírus podem infectar animais de várias espécies, incluindo bezerros, equinos, suínos, caninos, felinos e aves. (ESTES E KAPIKIAN, 2007; MÜLLER E JOHNE, 2007). As infecções sintomáticas, isto é, diarreias, geralmente ocorrem em indivíduos jovens e a faixa etária mais acometida é a de seis meses a dois anos, embora possam acometer indivíduos de todas as idades (BRASIL, 2004). O risco de morte por complicações desta doença aumenta nos casos de desnutrição, em que o paciente encontra-se com o sistema imunológico debilitado (PALUMBO et al., 2009).

Os rotavírus são amplamente encontrados tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, e infectam crianças que pertencem a diferentes classes sociais. Os índices de mortalidade variam amplamente, de acordo com fatores demográficos e socioeconômicos, sendo muito mais elevados nas localidades com difícil acesso à atenção médica básica. Nesse contexto, apenas melhorias nas condições sanitárias e de higiene não são capazes de diminuir sua prevalência, tampouco determinar a sua prevenção e controle (CARVALHO-COSTA et al., 2011; KIRKWOOD et al., 2011).

2. JUSTIFICATIVA

A predominância de rotavírus G1 em todo mundo está relacionada à heterogeneidade antigênica e genética que este genótipo apresenta. Desta maneira, a existência de várias linhagens e sublinhagens pode contribuir com a emergência de novas amostras, bem como com o desaparecimento de outras variantes genéticas (PHAN et al., 2007).

Os rotavírus apresentam mecanismos de diversidade genética tais como mutações pontuais, rearranjo genômico e recombinação intramolecular, levando à evolução desses vírus. Desta maneira, estudos a respeito da epidemiologia molecular de tais agentes são necessários para detectar a ocorrência de novos tipos virais circulantes que possam interferir em uma possível falha vacinal.

Os genes que codificam as proteínas estruturais VP4 e VP7 dos rotavírus são amplamente estudados e baseados na caracterização dessas proteínas que tais agentes virais são classificados. Com relação à proteína não estrutural NSP4, existe relatos na literatura, porém estudos sobre sua diversidade genética associada ao tipo G1 são raros.

Análises sobre a diversidade intragenotípica são fundamentais para definir as variações genéticas e antigênicas dos rotavírus, proporcionando um perfil das amostras que podem apresentar potenciais efeitos sobre a eficácia vacinal. Este representa um estudo pioneiro de base molecular acerca das proteínas VP4, VP7 e NSP4 dos rotavírus G1 circulante em nossa região.

Desta forma, esta investigação proporcionará uma melhor compreensão acerca da complexidade genética dos rotavírus G1 e sobre a sua evolução ao longo de mais de duas décadas, já que esse genótipo se apresenta amplamente difundido em todo globo.

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1. BREVE HISTÓRICO

Os rotavírus foram descobertos há aproximadamente quatro décadas, a partir de estudos conduzidos por Bishop et al. (1973) em Melbourne, Austrália. Esses investigadores observaram pela primeira vez esses vírus no epitélio duodenal de crianças com diarreia de etiologia não-bacteriana, recebendo a denominação de Duovírus. Devido ao seu aspecto radiado, foram denominados posteriormente Rotavírus (FLEWETT E WOODE, 1978). Desde então esses vírus se têm configurado como os mais importantes agentes etiológicos da gastroenterite grave entre crianças, tanto em países de clima tropical como temperado, denotando a distribuição universal desses agentes (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

A primeira detecção de rotavírus no Brasil foi registrada por Linhares et al. (1977), a partir de um estudo-piloto realizado em Belém, Pará, que reuniu 25 crianças com quadro de gastroenterite aguda sob atendimentos ambulatorial e hospitalar. A partir de então, inúmeras investigações foram conduzidas em âmbito nacional, ressaltando os aspectos epidemiológicos de tais agentes virais (CARDOSO et al., 2003; CARNEIRO et al., 2005; DA SILVA et al., 2011; LINHARES, 1996; LUZ et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2010; SOARES et al., 2011).

3.2. O ROTAVÍRUS

3.2.1. Classificação viral

Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, subfamília *Sedoreovirinae*, a qual está organizada em 15 gêneros, entre eles o gênero *Rotavirus* (ESTES E KAPIKIAN, 2007; ICTV, 2005).

Os rotavírus são classificados em sete grupos sorologicamente distintos (A-G) designados pela proteína VP6, sendo que os grupos A, B e C têm sido detectados acometendo seres humanos e animais, enquanto os demais foram identificados apenas em animais (ESTES E KAPIKIAN, 2007). O grupo de maior relevância epidemiológica é o A, o qual é o responsável pelos episódios de diarreia

aguda em crianças em todo o mundo, apesar do grupo C já ter sido detectado em surtos e casos esporádicos na região amazônica (ESTES E KAPIKIAN, 2007; GABBAY et al., 1999; 2008).

Os rotavírus do grupo A são distribuídos ainda em subgrupos (SG) e genótipos segundo suas características sorológicas e moleculares. A proteína VP6 é responsável pela especificidade dos diferentes subgrupos, pela presença ou ausência de epítomos imunorreativos frente a determinados anticorpos monoclonais, denominados SGI, SGII, SGI+II e SG não I e não II (ESTES E KAPIKIAN, 2007; GREENBERG et al., 1983a). O SGII é o mais frequente entre os humanos, enquanto o SGI é mais detectado entre amostras de origem animal (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002).

A classificação dos genótipos baseia-se nos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7, denominados P (sensível à protease) e G (glicoproteína), respectivamente. Até o presente foram descritos 27 genótipos G e 35 genótipos P, dos quais 12 G e 15 P foram encontrados infectando os seres humanos (ESTES E KAPIKIAN, 2007; MATTHIJNSSENS et al., 2011). A classificação binária, envolvendo as proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7) é amplamente utilizada.

As combinações binárias dos genótipos de rotavírus podem ser usuais e não-usuais. As usuais reúnem os genótipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8]. As demais combinações, consideradas não-usuais, ocorrem principalmente nos países em desenvolvimento (LINHARES et al., 2011; SANTOS E HOSHINO, 2005).

Recentemente, Matthijnsens et al. (2008b) propuseram uma nova classificação dos rotavírus baseada na análise genotípica dos 11 genes virais, sendo recomendada pelo “Rotavirus Classification Working Group”, com a finalidade de proporcionar um melhor entendimento acerca da função de cada segmento genômico, bem como compreender o relacionamento evolucionário inter-espécies desses vírus. Para cada um dos 11 segmentos genômicos são descritos valores de *cut-off* específicos de identidade nucleotídica, baseados na caracterização molecular e análise filogenética do genoma de 53 protótipos (Tabela 1).

Com base nesta classificação, são descritos até o momento 27 genótipos G (proteína glicosilada, VP7), 35 P (sensível à protease, VP4), 16 I (capsídeo intermediário, VP6), 9 R (RNA polimerase, VP1), 9 C (core, VP2), 8 M

(metiltransferase, VP3), 16 A (antagonista de interferon, NSP1), 9 N (NTPase, NSP2), 12 T (regulador da tradução, NSP3), 14 E (enterotoxina, NSP4), e 11 H (do inglês, *phosphoprotein*, NSP5) (MATHIJNSSENS et al., 2011).

Tabela 1: Valores de *cut-off* de identidade nucleotídica para caracterizar os diferentes genótipos dos segmentos de rotavírus do grupo A.

Gene	Valores <i>cut-off</i> de similaridade nucleotídica (%)	Genótipo	Designação do nome dos genótipos
VP7	80	27G	G licoproteína
VP4	80	35P	Sensível a P rotease
VP6	85	16I	Capsídeo Interno
VP1	83	9R	R NA polimerase – RNA dependente
VP2	84	9C	Proteína do C ore
VP3	81	8M	M etiltransferase
NSP1	79	16A	A ntagonista do Interferon
NSP2	85	9N	N T Pase
NSP3	85	12T	Intensificador da T radução
NSP4	85	14E	E nterotoxina
NSP5 ^a	91	11H	Fosfoproteína (pH osphoprotein)

^a ORF sobreposta a NSP6

3.2.2. Morfologia viral

A partícula viral completa do rotavírus mede cerca de 100 nm de diâmetro, é desprovida de envelope lipoproteico e apresenta nucleocapsídeo exibindo simetria icosaédrica. Possui uma tripla camada proteica constituindo os capsídeos externo, intermediário e interno; este, intimamente associado ao genoma viral, formado por 18.556 pares de base (pb), divididos em 11 segmentos de ácido ribonucleico de fita dupla, denominado de dsRNA (*double-stranded* RNA) (ESTES E KAPIKIAN, 2007) (Fig. 1).

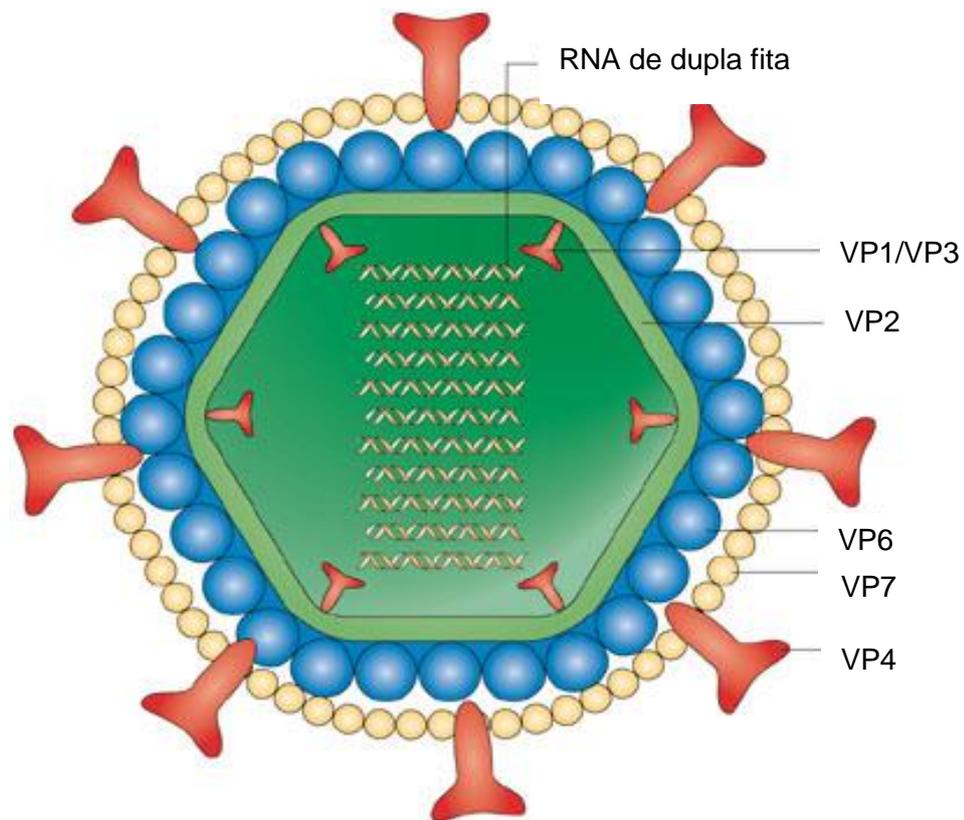


FIGURA 1: Representação esquemática da partícula de rotavírus.
Fonte: Adaptada de Angel et al., 2007.

O capsídeo externo é composto de 780 e 120 moléculas das proteínas VP7 e VP4, respectivamente. A glicoproteína VP7 apresenta massa molecular de 38 kDa e constitui 30% da partícula viral. A VP4 compõe as 60 projeções com cerca de 10 a 12 nm de comprimento, massa molecular de 88 kDa e compreende 1,5% do vírion. É clivada por ação de enzimas proteolíticas, dando origem a dois fragmentos, VP5 (60 kDa) e VP8 (28 kDa), processo envolvido no potencial infectante viral (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

O capsídeo intermediário é formado por 780 moléculas da proteína VP6, sendo esta a mais abundante e constitui 51% do vírion. Possui massa molecular de 41 kDa e interage tanto com as proteínas mais externas quanto com as do core. Este polipeptídeo parece estar envolvido no processo de entrada na célula hospedeira e também se associa à transcrição do RNA viral (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

O capsídeo interno é constituído pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, sendo que a VP2 é a mais abundante, encontra-se disposta em 120 moléculas; e interage

com a proteína VP6 e com o genoma viral (JAYARAM et al., 2004). Essas proteínas representam em conjunto aproximadamente 18% das proteínas virais.

As proteínas não estruturais não compõem o vírus morfologicamente, estando presentes apenas na célula infectada e exercem funções vitais para a infectividade e replicação das partículas virais (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

3.2.3. Organização genômica

O genoma do rotavírus possui 18.556 pb mostrando-se rico em adenina e uracila, e contém onze segmentos de dsRNA, com tamanho que variam de 667 a 3.302 pb. Cada segmento genômico sintetiza uma proteína, com exceção do 11º que está associado à codificação de dois polipeptídeos, totalizando doze, sendo seis não estruturais (NSP1 a NSP6) e seis estruturais (VP1 a VP4, VP6 e VP7). A fita positiva dos segmentos genômicos tem uma estrutura semelhante, e possui na sua extremidade uma sequência 5'-guanidina seguida de uma sequência conservada que faz parte da região 5' não-codificante. Cada um dos segmentos de dsRNA possui uma fase aberta de leitura (ORF) para codificação da proteína, seguida por um códon de finalização e outra região não codificadora, situada na extremidade 3', que é finalizada com 3'-citidina terminal (ESTES E KAPIKIAN, 2007) (Fig. 2).

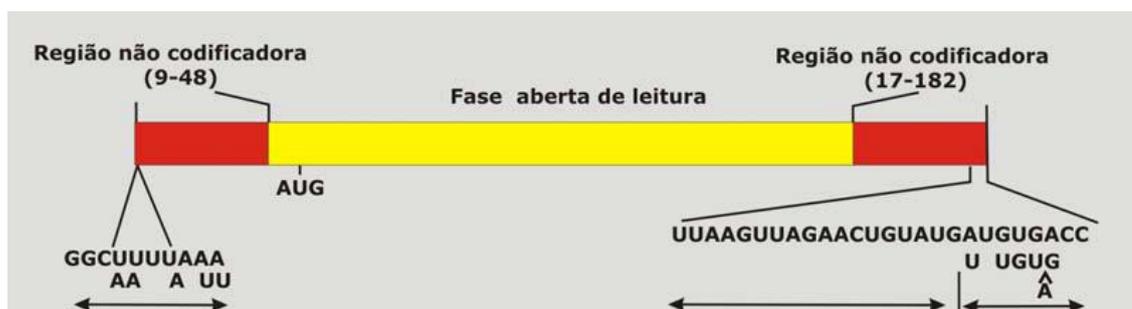


FIGURA 2: Estrutura dos segmentos gênicos de rotavírus
Fonte: Adaptada de Estes e Kapikian, 2007.

O genoma do rotavírus apresenta-se segmentado e devido a esta característica e a diferença de massa molecular dos segmentos genômicos, o RNA viral pode ser analisado pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). De acordo com a mobilidade de cada segmento dos rotavírus do grupo A, eles podem ser agrupados em quatro classes: classe I (segmentos 1, 2, 3 e 4), II (5 e 6), III (7, 8 e 9) e IV (10 e 11); ou 4:2:3:2 (Fig. 3). Os rotavírus pertencentes aos grupos B e D denotam padrão 4:2:2:3, e o C, por sua vez, 4:3:2:2.

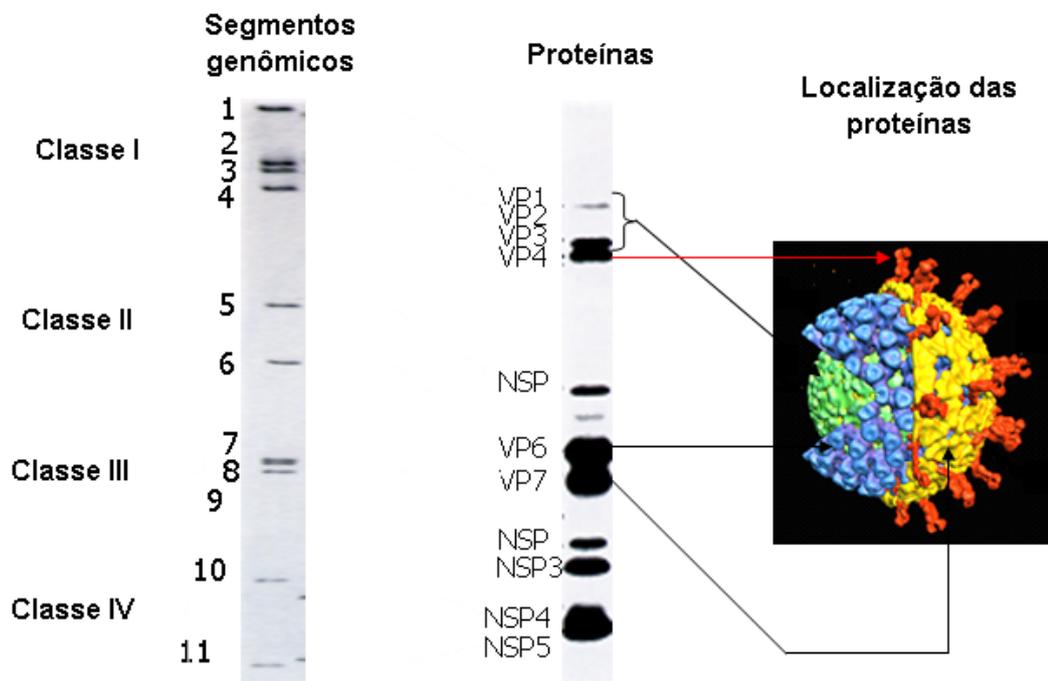


FIGURA 3: Representação esquemática, perfil eletroforético dos segmentos genômicos e proteínas de rotavírus. Fonte: Adaptada de Prasad et al., 1996.

Também por meio da EGPA se pode fazer a classificação do perfil eletroforético, baseada na migração do 11^o segmento, em longo, curto e super-curto. Existe uma correlação consistente entre esses perfis com subgrupo e tipo G de rotavírus, já que espécimes com perfil longo pertencem ao subgrupo II e denotam os tipos G1, G3, G4 ou G9. O perfil curto, por sua vez, é subgrupo I e tipo G2. Já ao perfil supercurto pertencem ao subgrupo I e tipo G8 (ESTES E KAPIKIAN, 2007; TANIGUCHI E URASAWA, 1995).

3.2.4. Proteínas

3.2.4.1. Proteínas estruturais

A proteína VP1, codificada pelo segmento 1, é uma RNA polimerase RNA dependente e está envolvida nos processos de transcrição e replicação virais. Encontra-se no capsídeo interno, além de ser a única proteína do core que possui uma sequência específica de reconhecimento ao RNA viral (LI et al., 2009; MERTENS, 2004).

A VP2 (segmento 2) é a proteína que recobre o capsídeo interno, interagindo com o RNA viral e atuando no processo de replicação viral devido a sua capacidade de ligar-se ao dsRNA através de seus resíduos N-terminais (JAYARAM et al., 2004).

A proteína VP3 (segmento 3), também encontrada no capsídeo interno, possui atividade de metilguanililtransferase participando da transcrição juntamente com a proteína VP1 ligando-se ao RNA fita simples (LI et al., 2009).

A VP6 (segmento 6) compõe o capsídeo intermediário e está organizada em 260 trímeros, sendo a proteína mais abundante e principal portadora dos determinantes antigênicos que permitem classificar os rotavírus em diferentes grupos e subgrupos. Essa proteína exerce um papel importante na estrutura da partícula viral devido à interação com as proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7) e interno (VP2). Está envolvida nas duas principais funções do vírus, quais sejam, o processo de entrada na célula hospedeira e transcrição do dsRNA (ESTES E KAPIKIAN, 2007; RUIZ et al., 2009).

A proteína VP4 contém 776 aminoácidos, não é glicosilada e forma 60 projeções a partir do capsídeo externo de partículas virais maduras (SHAW et al., 1996; YEAGER et al., 1994). É codificada pelo quarto segmento genômico e assim como a VP7, induz a formação de anticorpos. É uma hemaglutinina e sofre clivagem proteolítica por ação da tripsina, resultando na formação dos peptídeos VP5 (60 kDa, aa 248-776) e VP8 (28 kDa, aa 1-247), proporcionando o aumento da infectividade viral e a entrada do vírus na célula. O peptídeo VP5 está associado com a atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4 e, possivelmente, possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula. O

peptídeo VP8, por outro lado, contém a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas. Esta proteína tem importante papel na aderência e penetração do vírus na célula hospedeira, também estando implicada na hemaglutinação, neutralização e virulência (ESTES E KAPIKIAN, 2007; JAYARAM et al., 2004; RUIZ et al., 2009).

A VP7 é uma glicoproteína do capsídeo externo capaz de induzir a síntese de anticorpos neutralizantes e encontra-se disposta em 260 trímeros. Ela é sintetizada pelo segmento 7, 8 ou 9 dependendo da amostra viral (GREENBERG et al., 1983b; MATTION et al. 1994). Acredita-se que a proteína VP7 interaja com a VP4 durante o processo de aderência e penetração, podendo também atuar com as moléculas da superfície celular do hospedeiro, após a adsorção (ESTES E KAPIKIAN, 2007; JAYARAM et al., 2004; RUIZ et al., 2009).

A especificidade do genótipo/sorotipo G é devido ao elevado grau de divergência na sequência do gene que codifica a proteína VP7, a qual apresenta uma *ORF* composta de 326 resíduos de aminoácido (aa) com dois códons de iniciação. Estudos com anticorpos monoclonais possibilitaram a identificação no gene da VP7 de nove regiões variáveis (VR) e seis regiões antigênicas, assim definidas: A (do aa 87 ao 101), B (do aa 143 ao 152), C (aa 208 até o 221), D (aa 291), E (do aa 189 ao 191) e F (do aa 235 até o 242) (CIARLET E LIPRANDI, 1994; COULSON E KIRKWOOD, 1991; DUNN et al., 1993; DYALL-SMITH et al., 1986; KIRKWOOD et al., 1993; KOBAYASHI et al., 1991b; LAZDINS et al., 1995) (Fig. 4).

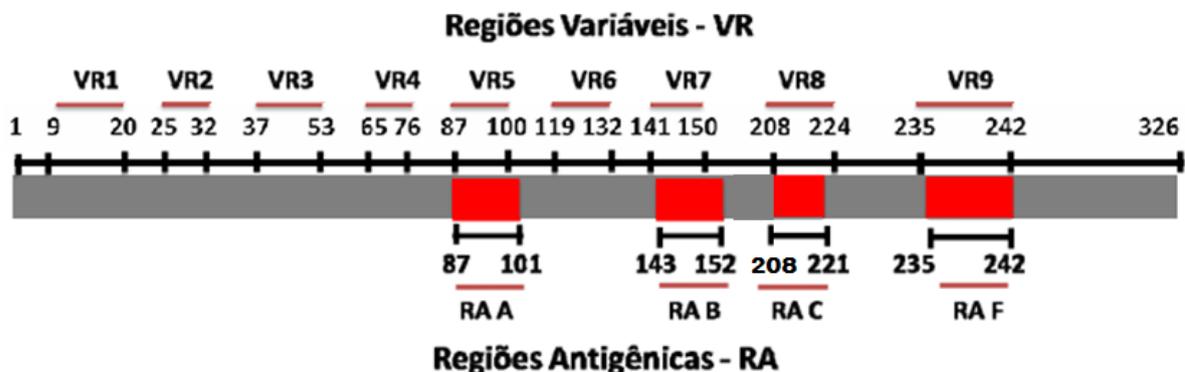


FIGURA 4. Demonstração das regiões variáveis (VR) e das principais regiões antigênicas (RA) do gene VP7 de rotavírus.

3.2.4.2. Proteínas não-estruturais

As proteínas não estruturais não são encontradas no vírion, situando-se apenas nas células infectadas e estão envolvidas na replicação, além de interagir com o ácido nucléico.

A proteína NSP1 (segmento 5) age como antagonista do interferon e facilita o crescimento dos rotavírus por supressão da apoptose. Ela se associa ao citoesqueleto celular favorecendo a ligação do vírus à célula. É a proteína viral menos conservada, por apresentar elevada diversidade, e não está presente em todas as amostras (BAGCHI et al., 2010; GRAFF et al., 2009; MERTENS, 2004).

A NSP2 (segmento 8) tem atividade de NTPase e helicase. Se expressa em altos níveis em células infectadas e está localizada nos viroplasmas (sítio de montagem das partículas virais no citoplasma). Sua associação com a NSP5 faz com que essas duas proteínas estejam envolvidas na replicação e encapsidação do RNA (ESTES E KAPIKIAN, 2007; JAYARAM et al., 2004; TARAPOREWALA et al., 1999; TARAPOREWALA E PATTON, 2001).

A NSP3 (segmento 7) está relacionada com o processo de regulação da tradução e reconhece a sequência consenso 3' do RNA mensageiro, favorecendo a tradução dos transcritos de RNAm aos ribossomos e ainda previne a degradação dos mesmos por nucleases celulares (KERYER-BIBENS et al., 2009). Há estudos sugerindo a ação dessa proteína no processo de disseminação extra-intestinal (FUJITA et al., 2010; MOSSEL E RAMIG, 2002; 2003).

A NSP4 (segmento 10) é uma glicoproteína transmembrana localizada no retículo endoplasmático (RE), com 175 aa e massa molecular de 28 KDa, sendo a única proteína não-estrutural que não se liga ao RNA. Ela apresenta importante papel na morfogênese viral, uma vez que atua como receptor intracelular na membrana do RE para as partículas incompletas durante o processo de maturação. A NSP4 é capaz de ativar os canais dependentes de Ca^{++} no intestino e vem sendo descrita como a primeira enterotoxina viral com capacidade de induzir diarreia de natureza secretora com ação semelhante ao que se observa com a enterotoxina lábil da *Escherichia coli* (BALL et al., 1996; 2005; ESTES E KAPIKIAN, 2007; HUANG et al., 2004; JAGANNATH et al., 2006).

A NSP5 (segmento 11) apresenta formas fosforiladas e com ação de autoquinase (TARAPOREWALA E PATTON, 2004). Quando a NSP5 é expressa em células não infectadas, a NSP2 induz a hiperfosforilação de NSP5, mostrando a interação dessas duas proteínas. Durante o processo de replicação a NSP2, NSP5 e NSP6 estão associadas na formação de viroplasmatas (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

A NSP6 é uma proteína cuja ORF encontra-se sobreposta à NSP5 e não está presente em todos os espécimes (TARAPOREWALA E PATTON, 2004). As proteínas NSP2, NSP5 e NSP6 estão envolvidas no processo de replicação e encapsidação do RNA (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

3.3. REPLICAÇÃO VIRAL

O sítio de replicação dos rotavírus é o intestino delgado. As partículas virais apresentam afinidade química pelos enterócitos maduros das vilosidades intestinais. As partículas infecciosas são aquelas que apresentam triplo capsídeo e conseguem aderir-se às células do hospedeiro, uma vez que o capsídeo externo está diretamente envolvido no processo infeccioso, atuando na adesão celular, penetração da membrana e entrada na célula (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP4 tem função essencial no ciclo de replicação do vírus, pois o processo de penetração inicia-se pela clivagem desta proteína por ação da tripsina, gerando os polipeptídeos VP5 e VP8, os quais interagem com receptores contendo ácido siálico e com integrinas, respectivamente (ESTES E KAPIKIAN, 2007; GUERRERO et al., 2000; LÓPEZ E ARIAS, 2004; ZARATE et al., 2000).

O processo de penetração dos rotavírus na célula pode ocorrer por entrada direta pela clivagem da VP4 por ação da tripsina pancreática ou por endocitose, sem acidificação do endossoma (BAKER E PRASAD, 2010). A endocitose depende da concentração de Ca^{++} intracelular. A ligação rotavírus-receptor celular induz a formação de uma vesícula endocítica, isolando a partícula viral completa em um compartimento intracelular. Ocorre a remoção dos íons Ca^{++} do interior da vesícula e o equilíbrio da concentração de Ca^{++} no citoplasma, fazendo com que os trímeros de VP7 tornem-se monômeros e o vírus perca o capsídeo externo e haja a lise vesicular, iniciando o processo de transcrição viral pelas partículas com duplo capsídeo (AOKI et al. 2009, RUIZ et al., 2000).

A transcrição ocorre pela ativação da transcriptase viral, promovendo a produção de RNA mensageiro (RNAm) tanto para formação das proteínas virais bem como servir de molde para a síntese da fita negativa do material genético (ESTES E KAPIKIAN, 2007). Todas as atividades inerentes à replicação do genoma e montagem dos vírions se desenvolvem sob ação das enzimas virais (RUIZ et al., 2009).

A montagem das partículas virais e replicação dos segmentos do genoma acontecem nos viroplasmas, estruturas localizadas próximas ao retículo endoplasmático (RE) e constituídas por grande quantidade de RNA e proteínas virais. Há a formação das partículas de duplo capsídeo que atravessam para o interior do RE por brotamento, por ação da NSP4, que atua como um receptor intracelular. As partículas adquirem um envelope transitório devido à membrana do RE, que posteriormente é perdido e substituído por uma fina camada de proteína que constitui o capsídeo externo. Por fim, partículas virais maduras, são liberadas por meio da lise celular (BALL et al., 2005; ESTES E KAPIKIAN, 2007; JAYARAM et al., 2004; RUIZ et al., 2009) (Fig. 5).

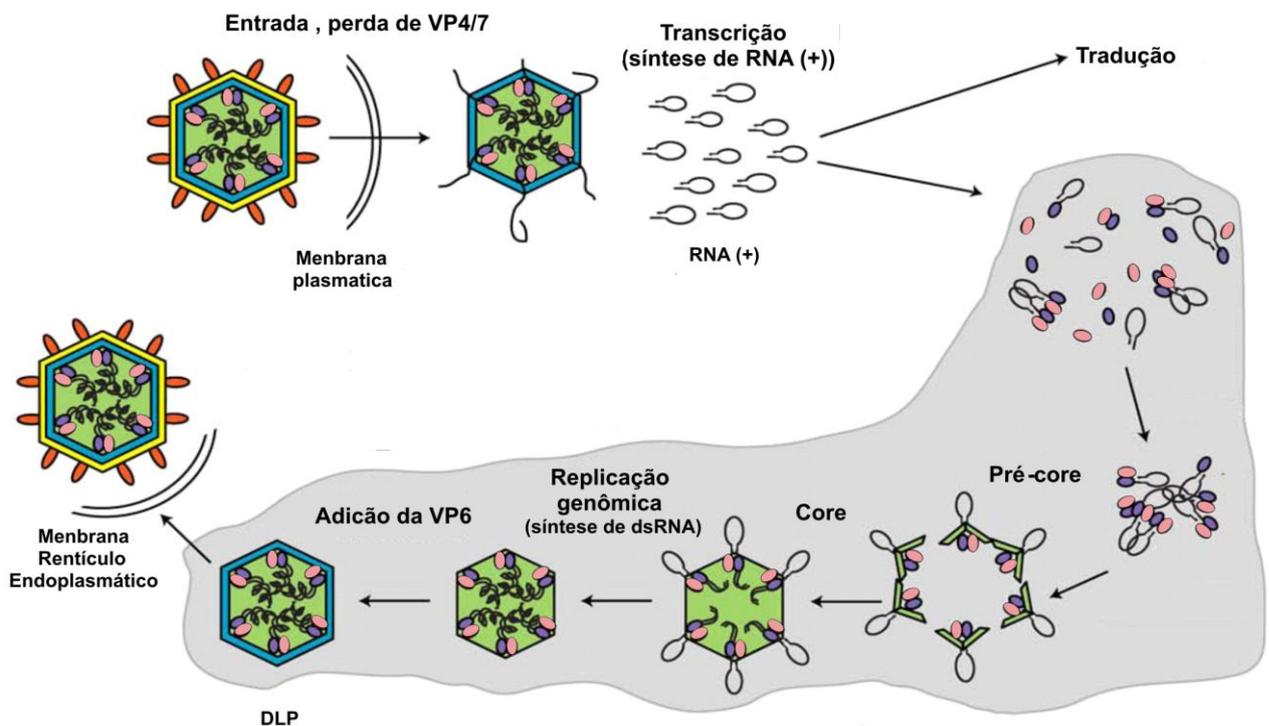


FIGURA 5: Modelo esquemático do ciclo de replicação dos rotavírus.
Fonte: Adaptado de Guglielmi et al. (2010).

3.4. FISIOPATOLOGIA

A fisiopatologia da diarreia por rotavírus é multifatorial e envolve diversos processos até o momento não totalmente esclarecidos. A má absorção de nutrientes devido à destruição dos enterócitos, o efeito enterotóxico da proteína não estrutural NSP4 e a ativação do sistema nervoso entérico, são alguns mecanismos da origem da diarreia causada por esse agente (ESTES E KAPIKIAN, 2007; GRAY et al., 2008).

As partículas virais infectam os enterócitos maduros do intestino delgado. Após replicação dos vírus, ocorre a lesão do epitélio devido à lise e substituição dos enterócitos por células imaturas as quais apresentam capacidade de absorção reduzida. Reduz-se a absorção dos dissacarídeos, gorduras e proteínas resultando em aumento da osmolaridade no lúmen intestinal e, conseqüentemente, incapacidade de absorção de água e nutrientes, levando à diarreia de natureza osmótica (BALL et al., 1996; GRAY et al., 2008; LORROT E VASSEUR, 2007a; RAMIG, 2004).

A proteína NSP4 atua como uma enterotoxina no mecanismo enteropatogênico. Esta proteína provoca a desestabilização da homeostasia dos íons Ca^{++} do RE. O aumento na concentração na Ca^{++} ocasiona o rompimento do citoesqueleto levando a lise celular e secreção do íon cloreto. Efeitos sob células não infectadas podem ser ocasionados por esta proteína liberada a partir de células infectadas, promovendo a liberação de Ca^{++} do RE e ruptura das junções celulares (BALL et al., 2005; ESTES E KAPIKIAN, 2007; HYSER et al., 2010; RAMIG, 2004).

A ativação do sistema nervoso entérico nas infecções por rotavírus pode desencadear a secreção de fluidos e eletrólitos e a proteína NSP4 pode estar envolvida neste processo através da liberação de peptídeos por meio de células infectadas das vilosidades intestinais (LORROT E VASSEUR, 2007b; LUNDGREN E SVENSSON, 2001) (Fig. 6).

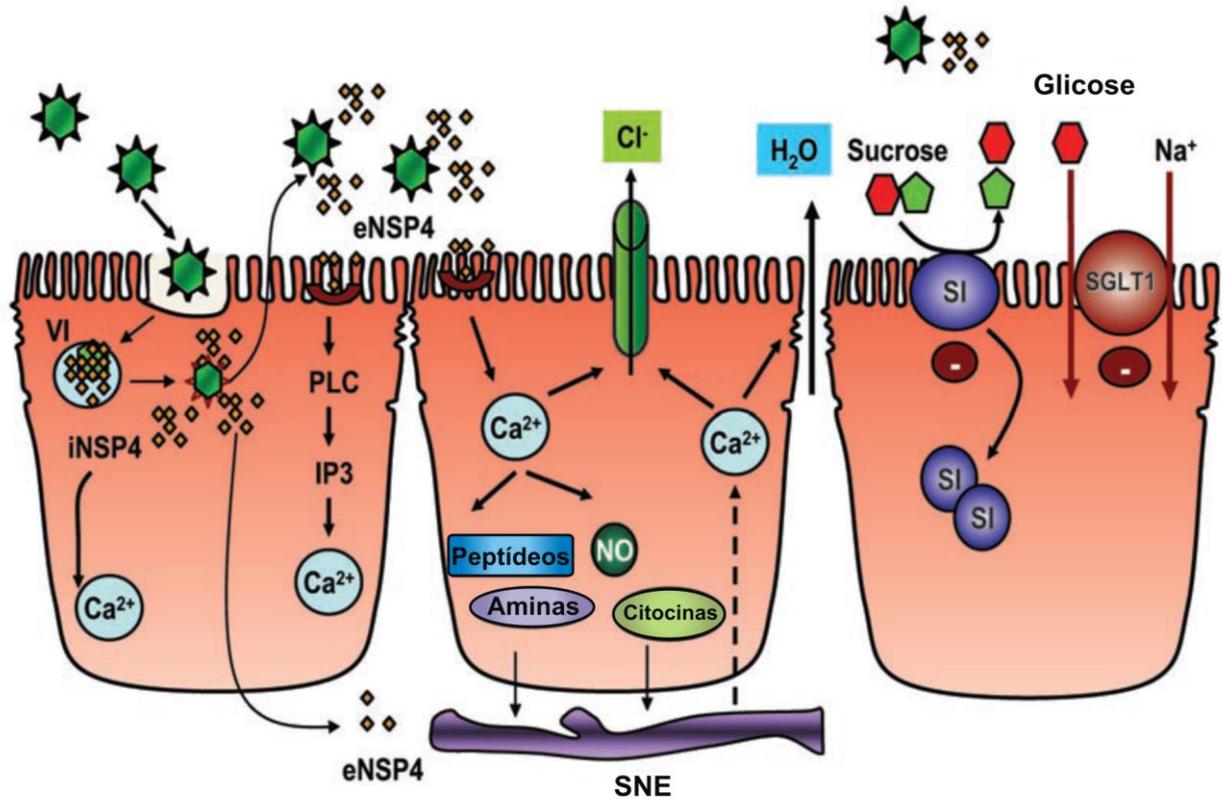


FIGURA 6: Principais mecanismos envolvidos na patogênese da diarreia por rotavírus. Após a formação de viroplasmata (VI) há liberação de novos vírus e da NSP4. Esta proteína induz um aumento da concentração de Ca^{++} em células infectadas proporcionando a desestabilização do citoesqueleto e efluxo de água e íons Cl^- , provocando diarreia de natureza secretora. Ocorre a liberação de aminas e peptídeos as quais estimulam o sistema nervoso entérico. A má digestão dos carboidratos deve-se a uma diminuição nos níveis de enzimas digestivas e diminuição da função da SGLT-1 (transportador de glicose dependente de sódio). Fonte: Adaptado de Hodges e Gill, 2010.

Recentemente foi proposto o mecanismo fisiopatológico do vômito durante a infecção pelos rotavírus. Acredita-se que a glicoproteína NSP4 esteja envolvida nesse processo por meio da liberação de serotonina a partir das *enterocromaffins*, células presentes no intestino, ativando os nervos vagos aferentes os quais estão conectados com as estruturas do tronco cerebral associados ao vômito (HAGBOM et al., 2011).

3.5. MECANISMOS DE EVOLUÇÃO GENÉTICA

Os rotavírus apresentam grande variabilidade genética, em parte por causa do seu genoma segmentado. Os mecanismos de diversidade genética, tais como mutações pontuais, rearranjos genômicos (recombinação intramolecular), reestruturação genética (*reassortment*) e a introdução genes de rotavírus animal em amostras de rotavírus humanos, levam à evolução desses vírus (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001).

As mutações pontuais compreendem trocas de bases nucleotídicas, as quais podem ser acumuladas e transmitidas para novas progênes virais. Tais alterações podem gerar novas linhagens ou sublinhagens dentro de um mesmo genótipo (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001; MAUNULLA E VON BONSDORFF, 1998).

Os rearranjos genômicos são modificações na sequência do segmento, ocasionadas por deleção ou duplicação (Fig. 7). A ocorrência deste mecanismo *in natura* é raro quando comparada com os outros tipos de mecanismo para a diversidade genética do rotavírus. Neste tipo de mutação, alguns segmentos de RNA perdem suas posições usuais e bandas adicionais são visualizadas pela EGPA (DESSELBERGER et al., 2001; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001, SOARES et al., 2010).

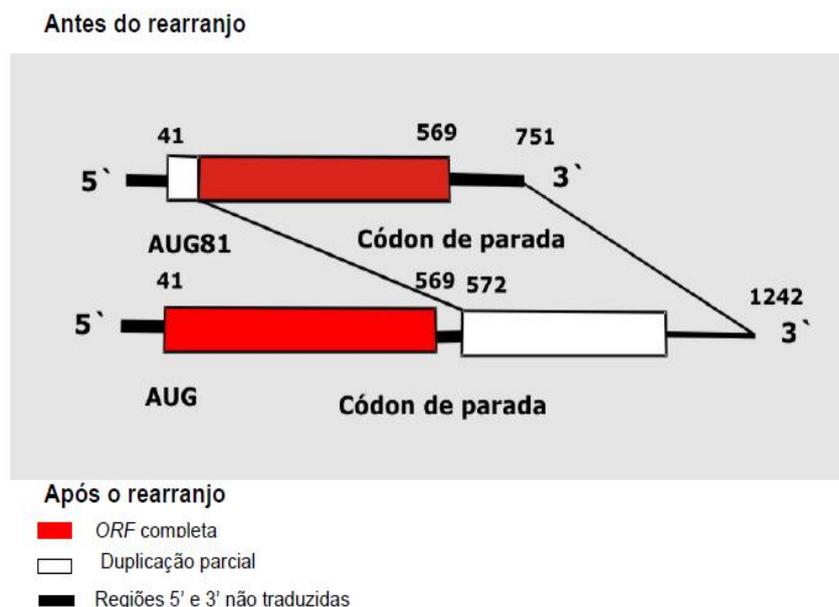


FIGURA 7: Rearranjo no genoma de rotavírus.
Fonte: Adaptado de Desselberger, 1996.

A reestruturação genética consiste na troca de material genético entre dois vírus pertencentes ao mesmo grupo, durante infecções mistas *in natura* ou por meio de coinfeção em cultivo celular. Em países em desenvolvimento é mais frequente a detecção de amostras com estas propriedades, uma vez que fatores como precárias condições de saneamento básico e higiene, defesas imunológicas limitadas e maior convívio do homem com animais favorecem a ocorrência de infecções mistas e provavelmente transmissão entre espécies (DE GRAZIA et al., 2010; MARTELLA et al., 2010; MASCARENHAS et al., 2007a; 2007b).

A ocorrência de rotavírus animal acometendo seres humanos se registra tanto em transmissão direta do vírus como por contribuição de genes na reestruturação genética, com segmentos genômicos de rotavírus de origem humana (BÁNYAI et al., 2009a; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001; MARTELLA et al., 2010; MATTHIJNSSENS et al., 2006).

3.6. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR ROTAVÍRUS

Diversos estudos realizados em escala global demonstram a importância que esses agentes assumem na etiologia das diarreias graves na infância demonstrando sua ampla circulação (ESTES E KAPIKIAN, 2007; KHOURY et al., 2011; KIRKWOOD et al., 2011; LINHARES et al., 2011; PERL et al., 2011; SANTOS E HOSHINO, 2005).

A mortalidade global associada aos rotavírus tem diminuído ao longo de duas décadas (PARASHAR et al., 2009). No entanto, eles são responsáveis por 125 milhões de episódios de diarreia, 2,4 milhões de hospitalizações e cerca de 500 mil mortes que ocorrem a cada ano em todo mundo (PARASHAR et al., 2009; TATE et al., 2011a). Na América Latina e Caribe, 24,3% dos casos de gastroenterite são ocasionados por tais agentes virais causando a morte de 47.000 crianças menores de cinco anos anualmente (LINHARES et al., 2011). No Brasil, estima-se que os rotavírus estão relacionados com 3.352.053 episódios de diarreia, 655.853 visitas para cuidados de saúde, 92.4535 hospitalizações e 850 mortes de crianças nesta mesma faixa etária (SOÁREZ et al., 2008).

A ocorrência universal dos rotavírus é amplamente reconhecida, sabendo-se que a rigor todas as crianças até os cinco anos de idade já se infectaram. Esses

vírus são referidos como “agentes democráticos”, visto que infectam crianças de todas as partes do mundo, compreendendo diferentes raças e classes sociais. Entretanto, a grande maioria dos relatos de morte por tais agentes ocorre nos países em desenvolvimento (ESTES E KAPIKIAN, 2007; MCCORMACK E KEAM, 2009; PARASHAR et al., 2006).

As infecções por rotavírus apresentam um caráter sazonal em países temperados, onde ocorrem expressivamente nos meses mais frios, que compreende o período do outono à primavera. Nos trópicos tal configuração sazonal se revela menos evidente e se registra a infecção por tais vírus ao longo de todo o ano, apesar de que os casos de gastroenterite por rotavírus tendem a ser mais elevados nos períodos mais frios e nas estações secas (COOK et al., 1990; LEVY et al., 2009).

Os genótipos de rotavírus frequentemente detectados, considerados usuais e que assumem importância epidemiológica universal, são representados pelos tipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8], sendo que as amostras G1P[8] prevalecem amplamente. Não obstante, registra-se a emergência de outros tipos como G5, G8, G10, G12, P[6] e P[9], principalmente nos países em desenvolvimento. As amostras não usuais são menos frequentes e representam 4,9% das infecções descritas em todo o mundo (CASTELLO et al., 2009; LE et al., 2008; LEITE et al., 2008; LI et al., 2008; LINHARES et al., 2011; SANTOS E HOSHINO, 2005).

As infecções mistas, isto é, coinfeção com mais de um genótipo, são ocasionadas pela ampla diversidade genética dos rotavírus, principalmente em países em desenvolvimento. A elevada prevalência de infecções mistas pode propiciar uma maior mutação genética *in vivo* do rotavírus, proporcionando a emergência de novas combinações não usuais. Este fenômeno pode causar um considerável impacto no processo de controle e prevenção contra o rotavírus, principalmente no que concerne à implantação de imunizantes seguros e eficazes (FREITAS et al., 2008; GENTSCH et al., 2005; KIRKWOOD, 2010; SANTOS e HOSHINO, 2005).

3.6.1. Epidemiologia do genótipo G1

O tipo G1 merece destaque, pois ele se apresenta geralmente com maior frequência nas investigações epidemiológicas, circulando em várias partes do mundo sob diferentes prevalências (LEITE et al., 2008; LINHARES et al., 2011; SANTOS E HOSHINO, 2005). Estima-se que em países desenvolvidos como América do Norte e Europa, 70% das infecções por rotavírus são pelo genótipo G1. Por outro lado, nos países em desenvolvimento, principalmente os localizados na África e Ásia, esse tipo se apresenta em menores frequências. Este panorama está possivelmente relacionado à circulação de amostras não usuais, assim como à emergência de novos tipos nos países mais pobres (KHOURY et al., 2011; LINHARES et al., 2011; RAMANI et al., 2007; SANCHEZ-PADILLA et al., 2009; SANTOS E HOSHINO, 2005; TODD et al., 2010).

Em uma revisão realizada por Linhares et al. (2011), abrangendo estudos realizados nos países da América Latina e Caribe, publicados entre 1990 a 2009, demonstrou-se que o tipo G1P[8] (17,9%) foi o mais prevalente, seguido por G2P[4] (9,1%) e G9P[8] (8,8%). No Brasil, Carvalho-Costa et al. (2011) observaram que em 2005, antes da introdução da vacina, o G9P[8] apresentava-se como o tipo mais prevalente. Nos anos seguintes (2006 a 2008) houve re-emergência de rotavírus G2P[4], e em 2009 ocorreu um declínio na frequência deste genótipo e o aumento dos casos de infecção pelo tipo G1P[8].

Leite et al., (2008), em uma revisão abrangendo 42 estudos realizados no Brasil, entre 1982 a 2007, demonstraram que o tipo G1 esteve associado a 43% dos casos de infecção por rotavírus no período pré-vacina. Em Belém, esse genótipo foi responsável por quase metade das diarreias associadas aos rotavírus (41%) ao longo de duas décadas, envolvendo estudos sobre gastroenterites de origem viral, sendo que a combinação G1P[8] concorreu com 64% das infecções (SOARES et al., 2010).

Em um estudo envolvendo crianças que receberam a vacina tetravalente contra rotavírus (RRV-TV) foram detectadas quatro linhagens relacionadas com o tipo G1 (JIN et al., 1996). Recentemente, com base na análise de amostras do tipo G1, detectadas em várias partes do mundo, foi proposta uma nova classificação em 11 linhagens e 17 sublinhagens. A divergência nucleotídica entre as amostras da

mesma sublinhagem é menor que 2%; 3% a 4% entre as sublinhagens; e 5% a 16% entre as linhagens (PHAN et al., 2007).

Recentes estudos têm demonstrado a ampla diversidade genética do gene VP7 de rotavírus G1. A introdução e emergência de variantes antigênicas deste gene podem ser responsáveis pela circulação contínua deste genótipo na população (ARISTA et al., 2006; ARORA et al., 2009; LE et al., 2010; PIETSCH et al., 2011).

Investigações envolvendo o sequenciamento completo do genoma de rotavírus G1 permanecem escassas e englobam principalmente protótipos isolados há pelo menos três décadas (MATTHIJNSSENS et al., 2008a). Com relação às amostras detectadas recentemente, Rahman et al., (2010) realizaram a análise do genoma completo de um rotavírus do tipo G1 (Dhaka16-03) isolado em 2003 em Bangladesh, o qual demonstrou grande similaridade com espécimes contemporâneos.

Rippinger et al., (2010) realizaram o sequenciamento do genoma viral de duas amostras candidatas a vacinas (RV3-G3P[6] e 116E-G9P[11]) e verificaram que certos resíduos de aminoácidos podem contribuir para atenuar ou influenciar a eficácia vacinal. Até o presente, a sequência nucleotídica da vacina Rotarix[®] (G1P[8]) não foi divulgada pelos fabricantes. Esta vacina faz parte do Programa Nacional de Imunização (PNI) e encontra-se disponível na rede pública. Estudos sobre a diversidade genética de amostras G1 são importantes a fim de detectar a ocorrência de novas linhagens virais circulantes que possam interferir em uma possível falha vacinal.

3.7. TRANSMISSÃO

A principal via de transmissão dos rotavírus é a fecal-oral, pelo contacto inter-humano, por meio da ingestão de água e alimentos contaminados com fezes ou contato com fômites (ESTES E KAPIKIAN, 2007). A elevada concentração de partículas excretadas durante a evacuação, cerca de um trilhão de partículas virais por milímetro cúbico de espécime fecal, propicia o processo de transmissão pelo contato direto. O período de incubação é de um a três dias, sendo que a excreção

máxima ocorre entre o 3º ou 4º dias após o início dos sintomas, e a dose infectante é de apenas dez partículas virais (WARD et al., 1986; ESTES E KAPIKIAN, 2007).

O trato respiratório parece ser uma via incomum de transmissão dos rotavírus, no entanto esta rota de transmissão não foi totalmente elucidada (ESTES E KAPIKIAN, 2007). Há relatos da detecção de partículas de rotavírus no trato respiratório superior e da presença de sintomas respiratórios em pacientes com gastroenterite; todavia, há estudos sustentando a inviabilidade deste modo de transmissão (AZEVEDO et al., 2005; COOK et al., 1990; VOLLET III et al., 1981; ZHAORI et al., 1991; ZHENG et al., 1991).

Os rotavírus denotam estabilidade físico-química, permitindo a sua permanência por longos períodos (até 10 dias) sobre superfícies e em ambientes com pouca umidade (GLEIZES et al., 2006). São resistentes aos desinfetantes comuns, mantendo seu potencial infeccioso por vários meses em temperaturas entre -40°C e -200°C (PARASHAR et al., 2003). Recentes estudos têm demonstrado a importância do monitoramento de amostras ambientais a fim de avaliar a epidemiologia dos rotavírus e possível risco de disseminação sobre a população (FUMIAN et al., 2011; GANIME et al., 2011; HE et al., 2011).

A ocorrência das infecções por rotavírus em ambientes fechados, como asilos, creches e hospitais, é geralmente comum devido a sua ampla disseminação (ESTES E KAPIKIAN, 2007; LI et al., 2011; TROP SKAZA et al., 2011). A infecção em adultos apresenta-se muitas vezes na forma assintomática, e geralmente ocorrem em pais de crianças infectadas, pacientes imunodeprimidos e idosos (ANDERSON E WEBER, 2004; ESTES E KAPIKIAN, 2007; PARASHAR et al., 2003). Surto de gastroenterite por rotavírus em populações isoladas como indígenas e quilombolas já foram descritos (KAIANO et al., 2009; LINHARES et al. 1981). Recentemente, Lunchs et al. (2011) relataram um surto por rotavírus e norovírus em casas de detenção no Brasil. Surtos de gastroenterite ocasionados por rotavírus por meio de veiculação hídrica também já foram registrados (KARMAKAR et al. 2008, KOROGLU et al. 2011).

A transmissão entre espécies tem sido cada vez mais confirmada, principalmente nos países em desenvolvimento, onde ocorre maior convívio entre os seres humanos e animais, principalmente bovinos, suínos e aves, e as condições insalubres de higiene (BÁNYAI et al., 2009a; JAIN et al., 2001; TEODOROFF et al.,

2005). Diversos estudos apontam a detecção de amostras de origem animal capazes de formar recombinantes gênicos com cepas de rotavírus humanos e vice-versa e que possivelmente estariam proporcionando a emergência de tipos não usuais (BÁNYAI et al., 2009a, 2009b; JAIN et al., 2001; MARTELLA et al., 2010; MASCARENHAS et al., 2007a; 2007b).

3.8. QUADRO CLÍNICO

As infecções por rotavírus podem ser assintomáticas ou se expressarem por gastroenterite de forma moderada ou grave. O período de incubação é curto (um a três dias), evoluindo para o aparecimento de vômitos, febre moderada/alta e diarreia aquosa que perduram por 5 a 8 dias, podendo levar à desidratação e, não havendo a intervenção hospitalar precoce, culmina com o óbito (ESTES E KAPIKIAN, 2007). A diarreia geralmente é autolimitada e a recuperação do paciente tende a ocorrer num período de sete a dez dias (BISHOP, 1996).

A forma assintomática da infecção por rotavírus é detectada principalmente em neonatos e crianças até os 4 meses de idade, provavelmente devido, entre outros fatores, à proteção conferida pelos anticorpos de origem materna (BISHOP et al., 1996; GLASS et al., 2006; LINHARES et al., 1989).

Os rotavírus possuem a capacidade de transpor o trato gastrointestinal e infectar outros órgãos, provocando manifestações clínicas atípicas. Nesse contexto, destaquem-se: atresia biliar, hepatite, nefrite, otite média, pneumonia, exantema, encefalite e convulsão (BLUTT et al., 2007; GILGER et al., 1992; RATH et al., 2011; YOSHIDA et al., 1995). Há relatos da detecção do RNA viral no soro e líquido cefalorraquidiano, sistema nervoso central, coração e células endoteliais. A viremia ocasionada por rotavírus é um processo relativamente frequente, no entanto, a doença sistêmica é rara e está associada à coinfeção envolvendo outros microorganismos como HIV (DESSELBERGER et al., 2009; RAMIG, 2007).

3.9. IMUNIDADE

A resposta imunológica contra diarreia causada por rotavírus não está totalmente elucidada e é considerada multifatorial, envolvendo a ação combinada de

anticorpos, imunidade humoral e celular (ESTES E KAPIKIAN, 2007; FRANCO et al., 2006).

As proteínas VP4 e VP7 desempenham importante papel na resistência à infecção por rotavírus, uma vez que induzem a produção de anticorpos neutralizantes e, conseqüentemente, parecem proteger os indivíduos suscetíveis. No entanto, a imunidade humoral é ampla e compreende a produção de anticorpos contra outras proteínas virais, incluindo VP2, VP6, NSP2 e NSP4. Contudo, nenhuma dessas proteínas, individualmente ou combinadas, proporcionam completa proteção clínica (ESTES E KAPIKIAN, 2007, GRAY et al., 2008; KIRKWOOD, 2010).

A primoinfecção por rotavírus não confere imunidade contra a reinfecção, mas protege contra o desenvolvimento da doença clinicamente grave durante os episódios subsequentes (VELÁZQUEZ et al., 1996). No entanto, em locais que apresentam ampla diversidade viral, como a Índia, há menor proteção conferida pela infecção precoce em casos de reinfecção (GLADSTONE et al., 2011). A infecção por rotavírus induz imunidade tanto homotípica quanto heterotípica. No caso da primoinfecção, há principalmente produção de anticorpos sorotipo-específicos, ao passo que a resposta imune nas reinfecção se apresenta mais ampla, traduzindo-se também em anticorpos heterólogos. Esta observação tornou-se a base estratégica para o desenvolvimento das vacinas contra rotavírus (FISCHER et al., 2002; GRAY et al., 2008; JIANG et al., 2002).

Com relação à imunidade celular, estudos demonstram que várias citocinas, tais como IFN- α , IFN- γ , IL-10 e TNF- α estão envolvidas no processo de proteção contra a infecção por rotavírus através de mecanismos como inibição da penetração desses vírus nas células hospedeiras, ativação dos linfócitos T citotóxicos; no entanto, a função que tais citocinas desempenham na patogênese e no controle da doença permanecem sob estudo (GRAFF et al., 2009; JIANG et al., 2002).

A imunidade local no intestino envolve principalmente anticorpos da classe IgA, os quais parecem ser os melhores marcadores de proteção. No entanto, os mecanismos de proteção ainda não estão completamente elucidados face à dificuldade na coleta dos fluidos intestinais, o caráter fugaz dos anticorpos no intestino e a variação na sensibilidade dos testes utilizados (ESTES E KAPIKIAN, 2007; FRANCO et al., 2006; GRAFF et al., 2009).

3.10. TRATAMENTO

O tratamento da gastroenterite causada por rotavírus é sintomático, a fim de prevenir e tratar a desidratação causada pela diarreia e vômito. A utilização da terapia de reidratação oral é indicada para corrigir o déficit hidroeletrólítico causado pelo vômito e a diarreia, sendo preconizada pela Organização Mundial de Saúde. No Brasil, o uso rotineiro da reidratação oral tem sido eficaz e de ampla aceitação, no entanto, em países da África e Sul da Ásia a sua utilização é inferior a 35% (LINHARES E BRESEE, 2000; SANTOSHAM, 2010).

A diarreia evolui para cura espontânea, devendo-se administrar apenas soro de reidratação e dieta equilibrada, não sendo recomendado o uso de antimicrobianos ou qualquer outro medicamento com a finalidade de interromper o curso da diarreia, salvo naqueles com comprometimento do estado geral, sugerindo associação bacteriana (BRASIL, 2006a; OLIVEIRA et al., 2007; OMS, 2005).

Uma alimentação adequada é importante com o intuito de manter a ingestão de nutrientes e evitar a perda de peso no decorrer da infecção, impedindo o agravamento da doença podendo levar a desnutrição (OLIVEIRA et al., 2007).

O uso de probióticos reduz a duração da diarreia causada por rotavírus e a gravidade da doença, particularmente o *Lactobacillus rhamnosus* GG (PANT et al., 2007; PHAM et al., 2008). A utilização de imunoglobulina oral de origem humana, drogas que atuam na síntese viral (nitazoxanida), medicamentos antissecretores (racecadotril) também estão sendo estudados como tratamento da diarreia por rotavírus (DE HOSTOS et al., 2011; LEHERT et al., 2011; PANT et al., 2007; TERAN et al., 2009).

3.11. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

As manifestações clínicas da doença causada pelos rotavírus não são suficientes para permitir o diagnóstico, já que outros enteropatógenos podem provocar quadros clínicos semelhantes, daí a necessidade da realização de exames laboratoriais específicos para sua confirmação.

A microscopia eletrônica (ME) foi a primeira técnica utilizada, resultando na detecção pioneira de partículas virais em seções do epitélio intestinal. Essa

técnica apresenta boa sensibilidade, sendo de rápida execução. Não obstante, envolve alto custo e necessita equipe técnica qualificada, o que limita seu uso em larga escala, sendo desta forma pouco utilizada (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

O cultivo celular para propagação de rotavírus é muito lento. Há necessidade do uso de tripsina no meio a serem cultivados os vírus, além da utilização de linhagens celulares de difícil manutenção, tais como células de rim de macaco (MA-104) e células de carcinoma de cólon humano (CaCo-2), e por isso é uma técnica de baixo valor diagnóstico. No entanto, esta técnica pode ser usada para estocagem de controles positivos e amostras incomuns (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

A técnica de aglutinação em partículas de látex baseia-se no agrupamento de antígenos, os quais se ligam com anticorpos específicos para a proteína VP6, é utilizada rotineiramente em laboratório. Trata-se de um método com fácil e rápida execução, baixo custo e sensibilidade satisfatória (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

O teste de imunocromatografia se baseia na detecção qualitativa de antígenos virais em amostras de fezes. Essa técnica é de rápida execução e possui sensibilidade comparável à do ensaio imunoenzimático (GABBAY et al., 2005).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) se constitui em uma técnica com alta sensibilidade e especificidade, sendo amplamente usada. Baseia-se na detecção de antígenos virais nos espécimes clínicos, compreendendo o uso de anticorpos dirigidos ao antígeno comum (VP6) dos rotavírus do grupo A. Embora já se encontrem reagentes para detecção de rotavírus dos grupos B e C, os mesmos ainda são pouco disponíveis no mercado. Esta técnica também é usada para detecção dos sorotipos G de rotavírus por meio do uso de anticorpos monoclonais específicos direcionados a proteína VP7 (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

A eletroforese em gel de poli(acrilamida) (EGPA) representa uma técnica sensível e específica que permite analisar o genoma viral revelando os padrões de migração dos segmentos genômicos. Esse método permite, ainda, detectar os rotavírus atípicos, isto é, não integrantes do grupo A, ensejando avaliar a diversidade dos rotavírus circulantes (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

Com o advento da biologia molecular nas últimas décadas, novas técnicas foram introduzidas como recurso de caracterização genética, tais como: hibridização

(*dot blot*), reação em cadeia mediada pela polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR), PCR-ELISA, PCR em tempo real, sequenciamento de nucleotídeos e *microarray* (microarranjo). No entanto, sua aplicação ainda se restringe à área científica, emergindo como importantes ferramentas nos estudos epidemiológicos (CORTESE, 2010; PANG et al., 2011).

3.12. VACINAS

A melhoria nas condições de saneamento e higiene tem pequeno impacto sobre a infecção por rotavírus. Desta maneira, estudos têm demonstrado que a melhor forma de controle desta enfermidade é por meio da vacinação, uma vez que a vacina mimetiza a infecção natural, fornecendo proteção contra a doença subsequente e trazendo um resultado significativo sobre o impacto da doença, principalmente nos países em desenvolvimento (O'RYAN E LINHARES, 2009; TATE et al., 2010). Visando a atingir esse propósito, várias candidatas a vacinas foram desenvolvidas ou estão sob estudo, com a finalidade de conferir proteção principalmente contra as gastroenterites de maior gravidade (DENNEHY, 2008; MASCARENHAS E LINHARES, 2005).

A primeira geração de vacinas contra rotavírus foi baseada na estratégia "Jenneriana", que utilizava vírus de origem animal na expectativa de conferir proteção heterotípica contra esses vírus. A seguir, uma segunda estratégia foi proposta, designada de "Jenneriana modificada", envolvendo o cocultivo de rotavírus de origens animal e humano, proporcionando o desenvolvimento de preparações polivalentes contendo amostras geneticamente reestruturadas. Uma terceira estratégia engloba as vacinas "não Jennerianas", empregando vírus de origem humana, atenuados ou isolados a partir de neonatos assintomáticos (BRESEE et al., 2005; MASCARENHAS E LINHARES, 2005).

Em 2009, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou a inclusão da vacinação contra o rotavírus em todos os programas nacionais de imunização (WHO, 2009). Atualmente, duas vacinas contra o rotavírus, Rotarix® (Glaxo SmithKline) e RotaTeq® (Merck e Co., Inc.) estão licenciadas em várias partes do mundo e foram incorporadas ao programa de imunização de vários países

e apresentaram significativo impacto na saúde pública (O'RYAN E LINHARES, 2009; RUIZ-PALACIOS, et al., 2006; VESIKARI et al., 2006b; 2007).

A vacina RotaTeq[®] é um imunizante pentavalente, atenuado, constituído por amostras de origem bovino-humano e confere imunidade contra os genótipos mais prevalentes de rotavírus (G1, G2, G3, G4 e P[8]) e proteção cruzada contra o tipo G9. Esse imunizante apresentou eficácia de até 100% contra os casos de diarreia grave e de 68,8% a 76,6% contra gastroenterites por rotavírus. Essa vacina foi licenciada para uso nos Estados Unidos em 2006 (HEATON et al., 2005; VESIKARI et al., 2006b; 2007). Recentes estudos demonstram um declínio dos casos de infecção por rotavírus após a introdução desta vacina nos Estados Unidos (CDC, 2009; TATE et al., 2011b; 2011c). No Brasil, um estudo projetou que a eficácia deste imunizante é de até 93% dos casos de hospitalizações causadas por rotavírus, resultando em uma redução de 42.991-77.383 casos de hospitalizações (EL KHOURY et al., 2011).

Outra vacina disponível no mercado é a Rotarix[®], representada por preparação monovalente, atenuada, de origem humana (G1P[8]), que evidenciou induzir proteção tanto homóloga quanto heteróloga, inclusive contra o tipo G9 (LINHARES et al., 2006; RUIZ-PALACIOS et al., 2006). Estudos mostraram a eficácia da Rotarix[®] contra gastroenterite grave por rotavírus de 83-100% para o tipo G1P[8], 82-100% para os outros tipos que não o G1, e de 44-86% para o tipo G2P[4] (KANG, 2006; MCCORMACK E KEAM, 2009).

O Brasil foi o primeiro país a implantar a vacina Rotarix[®] no Programa Nacional de Imunização (PNI) em março de 2006. Foi observada, nesta mesma época, a emergência do tipo G2P[4], que poderia estar relacionada com o processo de pressão seletiva provocada pela vacinação. No entanto, tal fenômeno aparentemente se deve à flutuação natural deste genótipo, uma vez que ele também foi detectado em alta frequência nos países onde esta vacina ainda não tinha sido introduzida em larga escala (CARVALHO-COSTA et al., 2011; HASING et al., 2009; LEITE et al., 2008; MATTHIJNSSENS et al., 2009; SOARES et al., 2011). Em Belém, um recente estudo demonstrou que a efetividade da Rotarix[®] frente aos casos de hospitalizações por gastroenterite ocasionada por rotavírus foi de 76% e com relação às infecções pelo genótipo G2P[4]; a vacina foi efetiva em 75,4% dos casos (JUSTINO et al., 2011).

Evidências sugerem que a eficácia das vacinas contra o rotavírus pode variar geograficamente devido à diversidade das amostras circulantes em cada região, assim como a alta prevalência de desnutrição e infecções gastrintestinais (KIRKWOOD, 2010; FISCHER WALKER E BLACK, 2011). No entanto, estimativas apontam que com o uso das vacinas comercializadas ocorreria uma redução de 47-57% nos casos de internações e prevenção de 74% das mortes por rotavírus em todo o mundo (MUNOS et al., 2010). A utilização dessas vacinas nos países em desenvolvimento, como África e Ásia, é essencial e desafiador, uma vez que nestes locais há maior frequência de casos graves da doença por rotavírus, além da grande diversidade de amostras circulantes nesta população. No Brasil houve uma redução das internações por gastroenterite em crianças menores de 5 anos de idade e o declínio da mortalidade infantil após a adoção universal da vacina contra rotavírus (DO CARMO et al., 2011, GURGEL et al., 2011; LANZIERI et al. 2010).

Outras preparações ainda estão sob estudo. Uma delas é a vacina tetravalente bovino-humana composta pelos genótipos G1, G2, G3 e G4, de origem humana, e pelo 10º segmento da amostra bovina UK (tipo P[7]G6). Esta preparação foi testada na Finlândia e apresentou eficácia de 60% contra os casos de diarreia e 90% contra gastroenterite grave causada por rotavírus (VESIKARI et al., 2006^a ; WARD et al., 2010).

Dois imunizantes contra rotavírus, obtidos a partir das amostras neonatais (116E - tipo G9P[11] e I321 - tipo G10P[11]) foram testados na Índia, no entanto apenas a amostra 116E induziu resposta imune satisfatória e encontra-se sob avaliação (BHANDARI et al., 2006).

Vacinas de vírus não vivos já foram avaliadas em modelos animais, porém nenhuma dessas preparações foi testada em seres humanos (CHOI et al., 1999; MCNEAL et al., 1999; O'NEAL et al., 1997). Uma das candidatas é a vacina composta pela proteína da camada intermediária VP6. Ela apresentou resultados satisfatórios quando testada em camundongos, no entanto há necessidade da realização de mais estudos a fim de comprovar seu potencial uso em seres humanos (WARD E MCNEAL, 2010).

4. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

O estudo não ocasionou qualquer risco ou prejuízo para as crianças ou seus responsáveis. Os projetos envolvidos no presente estudo foram previamente avaliados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, bem como pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), quando cabível, nas investigações que envolveram vacinas ou colaboração com instituições no exterior, em observância às normas nacionais e internacionais cabíveis. Esta pesquisa foi submetida ao CEP do IEC sob número CAAE - 0004.0.072.000-10 (Anexo 1).

Em relação aos aspectos de biossegurança, no decorrer dos procedimentos foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPIs) e todo material potencialmente contaminado foi manipulado em laboratório de segurança NB2 com o uso de cabine de fluxo laminar tipo 2.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a variabilidade genética dos genes VP4, VP7 e NSP4 dos rotavírus G1 circulantes nos municípios de Belém e Marituba, Pará, Brasil, no período de 1982 a 2008.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a diversidade nucleotídica e aminoacídica dos rotavírus G1 entre si e com as sequências obtidas na literatura, baseada no estudo dos genes VP4, VP7 e NSP4.
- b) Identificar os genótipos P de rotavírus G1.
- c) Descrever a distribuição temporal das variantes genéticas dos rotavírus G1.
- d) Descrever as mutações já caracterizadas e novas de interesse clínico.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. MATERIAL

6.1.1. Área de estudo

Os estudos a partir dos quais se obtiveram as amostras foram desenvolvidos nas cidades de Belém e Marituba, localizadas na região metropolitana de Belém, Pará. Estes municípios encontram-se localizados na Amazônia oriental, confluência dos rios Pará e Guamá. O clima é tropical e úmido, apresentando níveis pluviométricos elevados no período de janeiro a abril. A cidade de Belém é a capital do Estado, possui uma área de 1060 Km², sua população é estimada em 1.393.399 habitantes, incluindo 99.494 crianças menores de quatro anos de idade. O município de Marituba apresenta uma área de 103 Km² com uma população de aproximadamente 108.246 habitantes, dos quais 8.923 são crianças com idades inferiores a quatro anos (CENSO, 2010).

6.1.2. Pacientes e espécimes clínicos

Os espécimes clínicos sujeitos a análise no presente estudo foram provenientes de sete projetos de pesquisa em gastroenterites virais, conduzidos no Instituto Evandro Chagas entre os anos de 1982 e 2008 (Quadro 1).

Estudo	Característica do estudo	Período	Rotavírus positivo/ amostras coletadas	Frequência do tipo G1	N° amostras selecionadas
Longitudinal	Comunitário	1982-1986	36/441 (8%)	25% (9/36)	3 (33%)
RRV-TV	Duplo-cego controlado por placebo	1990-1992	90/1990 (4%)	49% (44/90)	18 (41%)
Nosocomial	Hospitalar	1992-1994	48/290 (16%)	29% (14/48)	8 (57%)
Hospital Sentinela	Hospitalar e ambulatorial	1998-2000	281/834 (34%)	11% (31/281)	20 (64%)
RIX 44-14	Duplo-cego controlado por placebo	2001-2003	136/745 (18%)	47% (64/136)	14 (22%)
Vigilância Epidemiológica	Hospitalar	2003	343/762 (45%)	68% (232/343)	17 (7%)
Rede de Vigilância	Hospitalar e ambulatorial	a partir de 2006	50/79 (63%)	10% (5/50)	3 (60%)
Total					83 (21%)

QUADRO 1. Descrição dos estudos sobre gastroenterite por rotavírus realizados no IEC no período de 1982 a 2008.

Todas as amostras selecionadas para o presente estudo (n=83) foram previamente caracterizadas como genótipo G1 por meio das técnicas de reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa e posteriormente por nested-PCR.

O critério de inclusão das amostras G1 no estudo foi a quantidade suficiente de espécimes fecais disponíveis para as análises dos três genes em questão (VP4, VP7 e NSP4) e a distribuição deste genótipo no período dos estudos descritos a seguir:

a) Estudo longitudinal das infecções por rotavírus entre crianças de Belém, Brasil (Estudo Longitudinal).

Essa investigação focalizou a epidemiologia e os aspectos clínicos da infecção por rotavírus. Foi realizada no período de dezembro de 1982 a março de 1986 e envolveu um grupo de 80 crianças que residiam em áreas periféricas de Belém, Pará, acompanhadas desde o nascimento até os 3 anos de idade. Foram

detectados 441 episódios diarreicos, dos quais 36 se revelaram positivos para rotavírus pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Nove amostras foram caracterizadas como tipo G1, sendo que três espécimes foram analisados no estudo em questão (LINHARES et al., 1989).

b) Estudo da imunogenicidade e inocuidade da vacina tetravalente contra rotavírus de origem símio-humana, geneticamente rearranjada, em Belém, Pará, Brasil (Estudo com a vacina RRV-TV).

Esse estudo objetivou avaliar a inocuidade, imunogenicidade e eficácia de três doses da vacina tetravalente geneticamente reestruturada, “RRV-TV”, em crianças saudáveis de Belém, Brasil. Foi conduzido no período de junho de 1990 a junho de 1992 e compreendeu um grupo de 540 crianças que receberam a “RRV-TV” ou placebo aos 1º, 3º e 5º meses de idade, sendo acompanhadas por dois anos após a tomada da primeira dose. Dos 1990 casos de diarreia testados pelo ELISA, 90 foram positivos para rotavírus. O tipo G1 foi detectado em 44 amostras, das quais 18 foram selecionadas para o presente estudo (LINHARES et al., 1996).

c) Subgrupos, sorotipos e eletroferotipos de rotavírus em crianças hospitalizadas em Belém, Pará (Estudo Nosocomial).

Essa investigação teve como objetivo determinar o papel dos rotavírus como causa de diarreia nosocomial. Foi realizada no período de novembro de 1992 a maio de 1994, quando foram examinadas amostras fecais de 290 crianças na faixa etária de 0 a 5 anos, internadas na Santa Casa de Misericórdia do Pará. Dos 290 episódios diarreicos registrados, 48 apresentaram-se positivos para rotavírus pelo ELISA. Quatorze espécimes foram caracterizados como tipo G1, sendo que 8 amostras participaram da análise (GUSMÃO et al, 1999).

d) Estudo de vigilância da doença por rotavírus em Belém, Pará (Estudo Hospital-Sentinela).

Esse estudo objetivou medir a diversidade antigênica das amostras circulantes de rotavírus e o impacto da doença causada por esses agentes em Belém, Pará. Foi conduzido no período de maio de 1998 a maio de 2000, envolvendo crianças com diarreia aguda na faixa etária de 0 a 3 anos, atendidas a

nível ambulatorial ou hospitalar em Belém, Pará. Das 834 amostras coletadas, 281 foram positivas para rotavírus pelo ELISA, 31 apresentaram tipo G1 e 20 foram selecionadas (Yvone Gabbay, comunicação pessoal).

e) Estudo da imunogenicidade, inocuidade e eficácia de uma vacina monovalente, atenuada, de origem humana contra rotavírus em Belém, Pará, Brasil (Estudo com a vacina RIX 4414).

Essa investigação avaliou a imunogenicidade, inocuidade e eficácia de duas doses da vacina monovalente da cepa RIX 4414 em crianças saudáveis em Belém, Brasil. Foi realizada no período de maio de 2001 a abril de 2003 e envolveu 745 crianças que receberam a vacina ou placebo aos 2º e 4º meses de idade. Cento e trinta e seis casos de diarreia foram associados com rotavírus, sendo que 64 espécimes caracterizados como G1, dos quais 14 amostras participaram do presente estudo (ARAÚJO et al., 2007).

f) Estudo prospectivo, multicêntrico, de vigilância hospitalar para estimar o impacto da gastroenterite por rotavírus em crianças com menos de três anos de idade na América Latina (Vigilância Epidemiológica).

Essa vigilância focalizou estimar o impacto da doença grave e a epidemiologia das infecções por rotavírus em uma população de crianças menores de três anos. Foi realizada no período de março a outubro de 2003. Participaram desse estudo 762 crianças internadas em hospitais públicos de Belém, Pará, por apresentarem quadro diarreico agudo. Também se incluíram aquelas atendidas no setor de emergência das unidades de saúde, requerendo reidratação. Dos 762 episódios diarreicos analisados, 343 foram positivos para rotavírus por ELISA e o genótipo G1 foi detectado em 232 amostras, sendo que 17 amostras foram incluídas nesta pesquisa (ABATE et al., 2004).

g) Estudo de vigilância epidemiológica das gastroenterites por rotavírus no Brasil: determinação do impacto da doença (Rede de Vigilância).

Este estudo, ainda em curso, tem como objetivo estabelecer uma rede nacional de vigilância epidemiológica das gastroenterites por rotavírus, a fim de definir-se o impacto da doença causada por esses patógenos no país. Foi iniciada

em fevereiro de 2006, mantendo-se até o presente momento e inclui cinco municípios, um de cada região do país, sendo que no Pará, o município de Marituba foi selecionado. Três amostras G1 foram objetos de estudo (SOARES et al., 2011).

6.2. MÉTODOS

6.2.1. Suspensão fecal

Foram preparadas suspensões fecais a 10% em tampão Tris- Ca^{++} 0,01M pH 7,2 visando à extração do RNA viral. Em seguida as suspensões foram homogeneizadas e centrifugadas a 2.000 Xg (gravidade) por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para a realização dos testes.

6.2.2. Extração do genoma viral

O genoma viral foi extraído a partir das suspensões fecais de acordo com o método descrito por Boom et al. (1990). A técnica consistiu em adicionar em tubos estéreis 300 μL de suspensão fecal, 20 μL de Proteinase K (20mg/mL) e 800 μL de Tampão L6 os quais foram homogeneizados e incubados a 56°C por 10 minutos. A seguir foram adicionados 200 μL de etanol absoluto e 20 μL de sílica, homogeneizados e incubados sob agitação lenta a TA (temperatura ambiente) por 30 minutos. Posteriormente, os tubos foram agitados em “vortex” durante 10 segundos, centrifugados a 10.000 Xg por 15 segundos e decantados os sobrenadantes subsequentemente. Aos sedimentos foram adicionados 500 μL de tampão L2, seguido por agitação em “vortex” e centrifugação (10.000 Xg / 15 segundos). Após essa etapa, lavagens com etanol a 70% (-20°C) e acetona (-20°C) foram realizadas seguidas por centrifugação a 10.000 Xg por 15 segundos. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos incubados em aria à temperatura de 56°C por 15 minutos para evaporação da acetona. Em seguida foram adicionados 60 μL de água ultrapura (livre de DNase e RNase), agitados por 15 segundos e incubados em banho-maria a 62°C por 15 minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados (10.000 Xg / 3 minutos) e os sobrenadantes, com o dsRNAs puros, coletados e armazenados a -70°C para realização dos testes posteriores.

Durante o processo de extração, todas as medidas de controle de contaminação foram realizadas, inclusive com a utilização de controle positivo (amostra positiva para rotavírus) e negativo (água ultra pura). O preparo das soluções utilizadas no estudo em questão está descrito no Anexo 2.

6.2.3. Reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)

Esta técnica foi desenvolvida de acordo com o preconizado por Gouvea et al., (1990), Gentsch et al., (1992) e Cunliffe et al. (1997).

Pelo fato de o material genético do rotavírus envolver RNA, é necessária a produção de um DNA complementar (cDNA) para posterior amplificação. Inicialmente, o dsRNA (2 µL) foi acrescido aos pares de iniciadores 4con3/4con2 ou Beg9/End9 ou Jrg30/Jrg31 concentrados a 20 mM. Posteriormente houve a desnaturação a 97°C em termociclador por 7 minutos, seguido de imersão em banho de gelo (0°C) por 5 minutos. Esses iniciadores amplificaram fragmentos dos genes VP4, VP7 e NSP4 conforme demonstrado no Quadro 2.

Iniciador	Sequência	Gene	Amplicon em pares de base
4con3 (+)	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	VP4	-
4con2 (-)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	VP4	875
Beg9 (+)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	VP7	-
End9 (-)	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	VP7	1062
Jrg30(+)	5'-GGC TTT TAA AAG TTC TGT T-3'	NSP4	-
Jrg31(-)	5'-ACC ATT CCT TCC ATT AAC-3	NSP4	738

QUADRO 2: Iniciadores utilizados na RT-PCR para amplificação dos genes VP4, VP7 e NSP4 de rotavírus.

Após a desnaturação foi adicionada mistura visando à obtenção do DNA complementar (cDNA) por meio de transcrição reversa, durante 1 hora a 42°C (Quadro 3).

RT	Quantidade em μL
H ₂ O	15,25
dNTP ^a 25mM	2
Tampão 10X	2,5
MgCl ₂ 50mM	2
RT ^b 20U	0,25
Total	22

QUADRO 3: Reagentes usados na RT-PCR para a obtenção do cDNA.

^aMistura dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP e dTTP.

^bII RNase Reverse Transcriptase 10.000U, 200 U/L

Após a obtenção do cDNA foi adicionada uma segunda mistura contendo os reagentes descritos no Quadro 4. Posteriormente, essa mistura foi submetida ao termociclador nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 2 minutos (desnaturação prévia), seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 42°C por 30 segundos (hibridização) e 72°C por 1 minuto (extensão), finalizando com 1 ciclo de 72°C por 10 minutos de extensão final. A seguir, os produtos da RT-PCR foram armazenados a -20°C.

PCR	Quantidade em μL
H ₂ O	19,25
dNTP 25Mm	2
Tampão 10X	2,5
MgCl ₂	1
Taq DNA Polimerase	0,25
Total	25

QUADRO 4: Reagentes usados na PCR para a amplificação dos genes VP4, VP7 e NSP4 de rotavírus.

6.2.4. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos obtidos na RT-PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% com Sybr Safe em tampão tris-borato-EDTA 1X (TBE). Os produtos da RT-PCR foram aplicados com azul de bromofenol juntamente com o marcador de peso molecular 123 pb diluído em TBE 1X e submetidos a condições de 120 V e 400 mA por 30 minutos. Os amplicons foram visualizados com o auxílio do sistema de fotodocumentação Gel Doc 1000 (Bio Rad).

6.2.5. Purificação do produto da RT-PCR

O produto da RT-PCR foi purificado visando ao sequenciamento de nucleotídeos. Utilizou-se o kit QIAQuick PCR purification (QIAGEN®) diretamente do produto da RT-PCR, segundo protocolo descrito pelo fabricante a seguir:

Em todos os tubos adicionou-se 5 vezes o volume do tampão PB para cada volume de PCR usado. Após homogeneização, a mistura foi transferida para a coluna acoplada ao tubo coletor de 2 mL, a qual foi centrifugada (10.000 Xg) por um minuto. O sobrenadante foi descartado e a coluna novamente acoplada ao tubo. Adicionou-se 750 µL do tampão PE diluído a coluna e centrifugado por um minuto para lavagem da coluna.

Novamente o sobrenadante foi descartado para remoção dos resíduos de reagentes e a coluna centrifugada por 60 segundos sem adição de qualquer reagente. Posteriormente, a coluna foi transferida a um tubo coletor e o DNA eluído em 50 µL do Tampão EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5). O material foi incubado a TA por um minuto e, logo após, centrifugado por um minuto para coleta e armazenamento do produto final a -20°C para ser quantificado e usado na reação de sequenciamento.

6.2.6. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada segundo o protocolo descrito pelo fabricante, com o uso do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). O DNA purificado foi aplicado, juntamente com azul de bromofenol, em

gel de agarose a 2% com Sybr Safe em TBE 1X, e aplicado também em outro orifício o peso molecular.

Posteriormente, as bandas de interesse no gel foram comparadas com o peso molecular, segundo a sua intensidade, e a concentração do DNA expressa em nanogramas (ng), a qual serviu de parâmetro para a reação de sequenciamento.

6.2.7. Sequenciamento de nucleotídeos

A reação de sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante do kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems), utilizando-se a mistura da reação conforme descrito no Quadro 5. A mistura foi adicionada a uma placa, juntamente com o DNA purificado e colocada no termociclador nas seguintes condições: 25 ciclos de 96°C por 30 segundos (desnaturação), 50°C por 15 segundos (hibridização) e 60°C por 3 minutos (extensão).

Reagentes	Quantidade em μL
Iniciador 2mM ^a	2
Tampão	2
Big Dye Terminator	2
DNA	Depende da concentração (máximo 4 μL)
H ₂ O	Depende da quantidade de DNA (máximo 3 μL)
Total	10

QUADRO 5: Reagentes usados na reação de sequenciamento dos genes VP4 e VP7

^aIniciadores descritos no Quadro 2

6.2.8. Purificação do produto da reação de sequenciamento

O produto da reação de sequenciamento foi purificado por precipitação com isopropanol e etanol, com a finalidade de retirar o excesso de “terminadores” não incorporados na reação. A precipitação consistiu em adicionar 40 μL de

isopropanol 70% ao produto de sequenciamento. Em seguida a placa foi agitada em “vortex”, incubada a TA por 15 minutos e centrifugada por 45 minutos a 4.000 Xg. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante por inversão da placa e 200 µL de etanol 70% foram adicionados em cada orifício, a qual foi centrifugada por 10 minutos a 4.000 Xg e o sobrenadante descartado novamente. Subsequentemente, centrifugou-se a placa de modo invertido sobre papel absorvente (~800 Xg). Secou-se a placa em termociclador por 5 minutos a 60°C e armazenada a -20°C para posterior eletroforese.

6.2.9. Eletroforese em sequenciador automático

As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida Hi-Di, desnaturadas a 96°C por 5 minutos em termociclador e colocadas em banho de gelo a 0°C por 3 minutos. Em seguida a placa foi submetida ao sequenciador automático ABI PRISM 3130 *xl* (Applied Biosystems), mediante a utilização do método de “terminação” de cadeia por didesoxirribonucleotídeos marcados com partículas fluorescentes que ao contato com raios laser, emitem sua fluorescência em distintos comprimentos de onda, correspondendo a cada nucleotídeo na extremidade 3’ permitindo a obtenção das sequências nucleotídicas (SANGER et al., 1977).

6.2.10. Alinhamento e edição das sequências para construção dos dendogramas

As sequências obtidas dos genes VP4, VP7 e NSP4 de rotavírus G1 foram alinhadas e editadas utilizando o programa Bioedit (v. 7.0.5.2). Em seguida, as sequências foram comparadas com outras amostras de rotavírus depositadas no banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando o programa BLAST. Para a análise filogenética foi adotado o método de Neighbour-joining, onde a matriz de distancia usando a fórmula de dois parâmetros de Kimura foi calculada a partir das sequencias alinhadas (KIMURA, 1980). Os dendogramas foram construídos no programa MEGA v.5.0.1. A análise de *bootstrap* foi realizada usando 2.000 réplicas, obtendo-se resultados reprodutíveis e proporcionando maior confiabilidade aos agrupamentos (FELSENSTEIN, 2009).

As sequências obtidas das amostras selecionadas foram avaliadas quanto à presença de substituições nucleotídicas e aminoacídicas, verificando a possível presença de polimorfismo nas amostras coletadas.

7. RESULTADOS

7.1. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Oitenta e quatro amostras foram selecionadas para participar da presente análise, correspondendo a 20,8% (83/399) de amostras G1 coletadas no IEC no período de 1982 a 2008. Esses espécimes foram testados por RT-PCR para a amplificação dos genes VP7, VP4 e NSP4, de acordo com o protocolo descrito por Gouvea et al., (1990), Gentsch et al., (1992) e Cunliffe et al. (1997) e posterior purificação e sequenciamento.

Vinte e uma amostras foram excluídas do estudo por não amplificarem todos os três genes sob análise. Desta forma, foi possível sequenciar e analisar os genes das 63 (75,9%) amostras pré-selecionadas.

7.1. ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO E AMINOÁCIDOS

7.1.1. Gene VP7

A análise das sequências parciais do gene que codifica a proteína VP7 demonstrou que as amostras de rotavírus G1 agruparam em 4 linhagens e 7 sublinhagens de acordo com a classificação proposta por Phan et al. (2007). As linhagens 1 (8/63, 12,7 %), 2 (29/63, 46,0%), 3 (18/63, 28,6%) e 9 (8/63, 12,7%) foram detectadas como demonstrado na Figura 8.

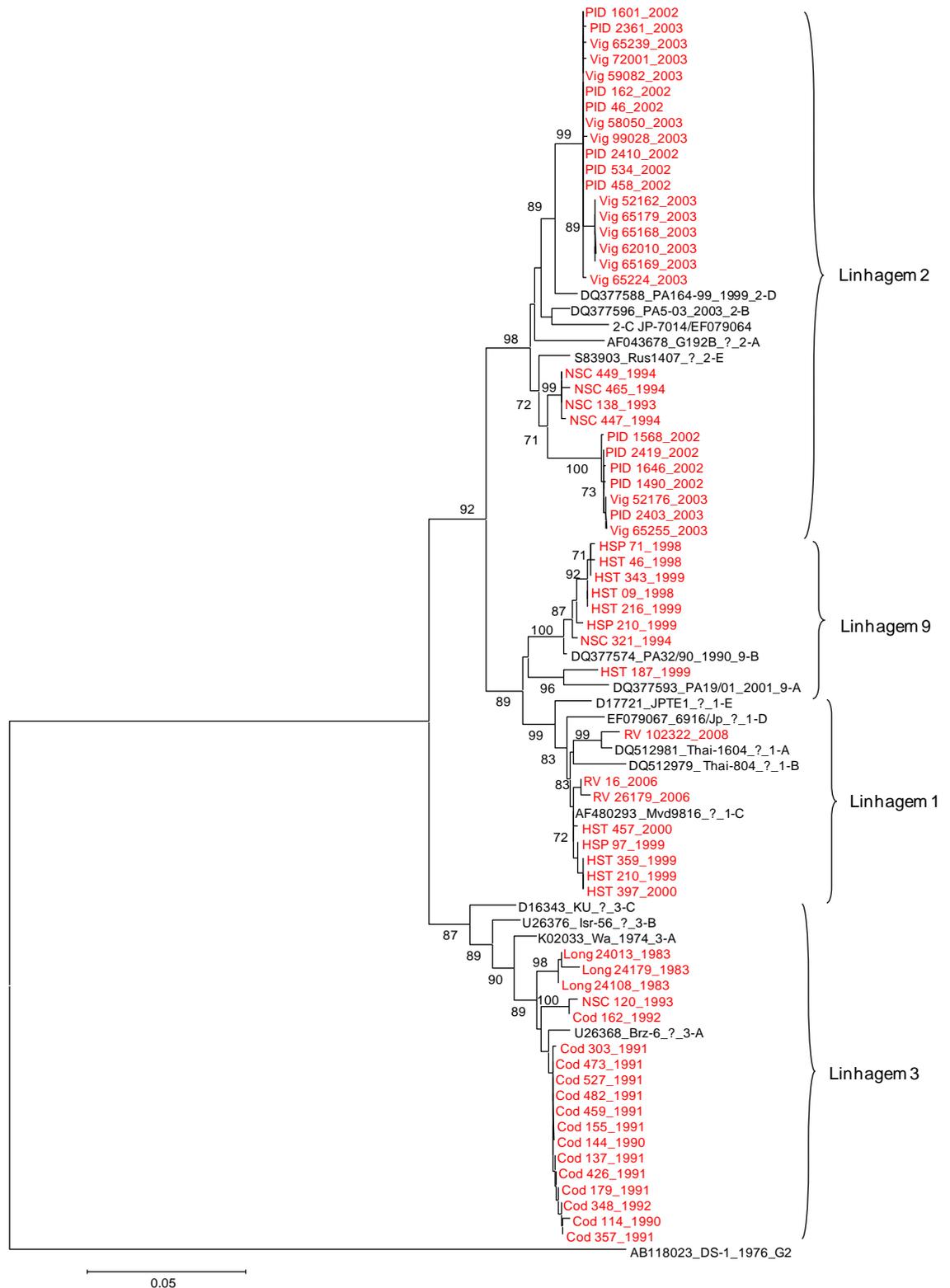


FIGURA 8: Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP7 envolvendo 63 amostras G1 dos municípios de Belém e Marituba. Os valores de *bootstrap* (2.000 pseudoréplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70 não estão representados.

A linhagem 1 é dividida em 5 sublinhagens (1A a 1E) sendo que uma amostra pertenceu a sublinhagem 1A (RV 102322) e 7 espécimes a 1C. A sublinhagem 1C englobou os espécimes que circularam nos anos de 1999, 2000 e 2006. Os espécimes desta sublinhagem apresentaram similaridade nucleotídica entre si, variando de 99,4% a 99,7%. Quando comparadas com o protótipo da sublinhagem 1C (Mvd 9816) as amostras HST 210, HST 359 e HST 397 apresentaram mudanças aminoacídicas nos resíduos 59 (I→V) (região variável) e 91 (T→A) (região antigênica). A alteração do aa 91 (T→A) também ocorreu no espécime HSP 97. As amostras RV 16 e RV 126179 demonstraram mudanças nos sítios 46 (A→V) e 74 (G→E), ambos localizados na região variável. As três amostras que foram coletadas após a implantação da vacina contra rotavírus pertenceram a esta linhagem.

A linhagem 3 englobou 28,6% (18/63) das amostras e elas circularam entre os anos de 1983 a 1993. Esses espécimes apresentaram divergências nucleotídicas e aminoacídicas de 2,1% e 5,1%, respectivamente. Esta linhagem encontra-se dividida em 3 sublinhagens (3A, 3B e 3C) sendo que as amostras do presente estudo agruparam na sublinhagem 3A. O ramo da árvore em que estas amostras se encontram é sustentado por um *bootstrap* de 89.

Todas as amostras da linhagem 3 apresentaram 12 alterações nucleotídicas quando comparadas com o protótipo Wa. Destas modificações nucleotídicas, houve mudanças aminoacídicas nos resíduos: 49 (R→K), 68 (A→T), 74 (G→E), 123 (A→T) e 147 (N→S). Todas essas alterações ocorreram nas regiões variáveis.

Os espécimes que circularam entre 1990 a 1992 pertencentes ao estudo com a vacina RRV-TV da linhagem 3, com exceção da COD 162, apresentaram além das alterações descritas acima, duas substituições nucleotídicas: 334 (C→T) e 373 (G→A) havendo mudança correspondendo aos resíduos 112 (P→S) (região conservada) e 125 (V→I) (região variável). As amostras do estudo Longitudinal demonstraram uma mudança aminoacídica no resíduo 227 (V→M) (região conservada).

A linhagem 9 envolveu 12,7% (8/63) dos espécimes estudados. Ela encontra-se dividida em 2 sublinhagens, 9A e 9B. Sete espécimes formaram um grupo coeso, sustentado por um *bootstrap* de 100, e agruparam na sublinhagem 9B.

A similaridade nucleotídica entre elas variou de 99,2% a 99,9%. Estas amostras circularam no final da década de 90, com exceção da NSC 321 que foi detectada em 1994. Um espécime pertenceu à sublinhagem 9A (HST 187) e demonstrou similaridade de 97,5% com a amostra PA19-01 isolada na Itália em 2001.

As amostras dos estudos Hospital-Sentinela e Nosocomial que agruparam na sublinhagem 9B demonstraram duas substituições nucleotídicas nas posições 133 (T→C) e 169 (A→C) havendo mudanças aminoacídicas nos resíduos 45 (F→L) e 57 (I→L), localizados na região conservada, quando comparadas com a amostra PA3c representante desta sublinhagem .

A linhagem mais frequentemente detectada foi a 2, compreendendo 46% (29/63) dos espécimes analisados. Ela se apresenta subdividida em 5 sublinhagens (2A a 2E), sendo que na atual pesquisa foi detectada a circulação das sublinhagens 2E e 2D. A sublinhagem 2D agrupou 18 amostras que circularam período de 2002 a 2003, enquanto que a sublinhagem 2E envolveu 11 espécimes detectados nos anos de 1993, 1994, 2002 e 2003. As amostras da sublinhagem 2D apresentaram similaridade nucleotídica variando de 99,6% a 100%. A similaridade entre os espécimes que agruparam na sublinhagem 2E variou de 97,8% a 100%.

Ocorreram 10 alterações de nucleotídeos nas amostras que agruparam na sublinhagem 2D. Destas alterações houve mudanças nos resíduos 49 (K→R); 66 (V→A) e 179 (E→G). Todas as amostras pertencentes à sublinhagem 2E apresentaram alterações em três sítios: 28 (R→Q), 75 (M→I) e 126 (E→D). Essas alterações ocorreram nas regiões variáveis.

Dois espécimes da Vigilância Epidemiológica (Vig 52176 e Vig 65255) e cinco do estudo com a vacina RIX 4414 (PID 1568, PID 2419, PID 1646, PID 1490 e PID 2403) formaram um grupo coeso sustentado por um *bootstrap* de 100. Esses espécimes agruparam na sublinhagem 2E e apresentaram alterações aminoacídicas específicas nos resíduos 68 (A→T) e 217 (M→I).

As amostras analisadas foram comparadas com o protótipo Wa para verificar a ocorrência de modificações aminoacídicas nas regiões antigênicas A, B, C e F como representado na Figura 9. Observou-se que ocorreram alterações nos resíduos 97 (D→E), 147 (S→N), 218 (I→V) em todas as amostras G1, com exceção as da linhagem 3. Os espécimes da linhagem 1 apresentaram uma modificação específica a este grupo no sítio 94 (N→S) e compartilharam com a linhagem 9 a mutação 217 (M→T). Houve uma mudança singular à sublinhagem 2D na posição 235 (H→Y).

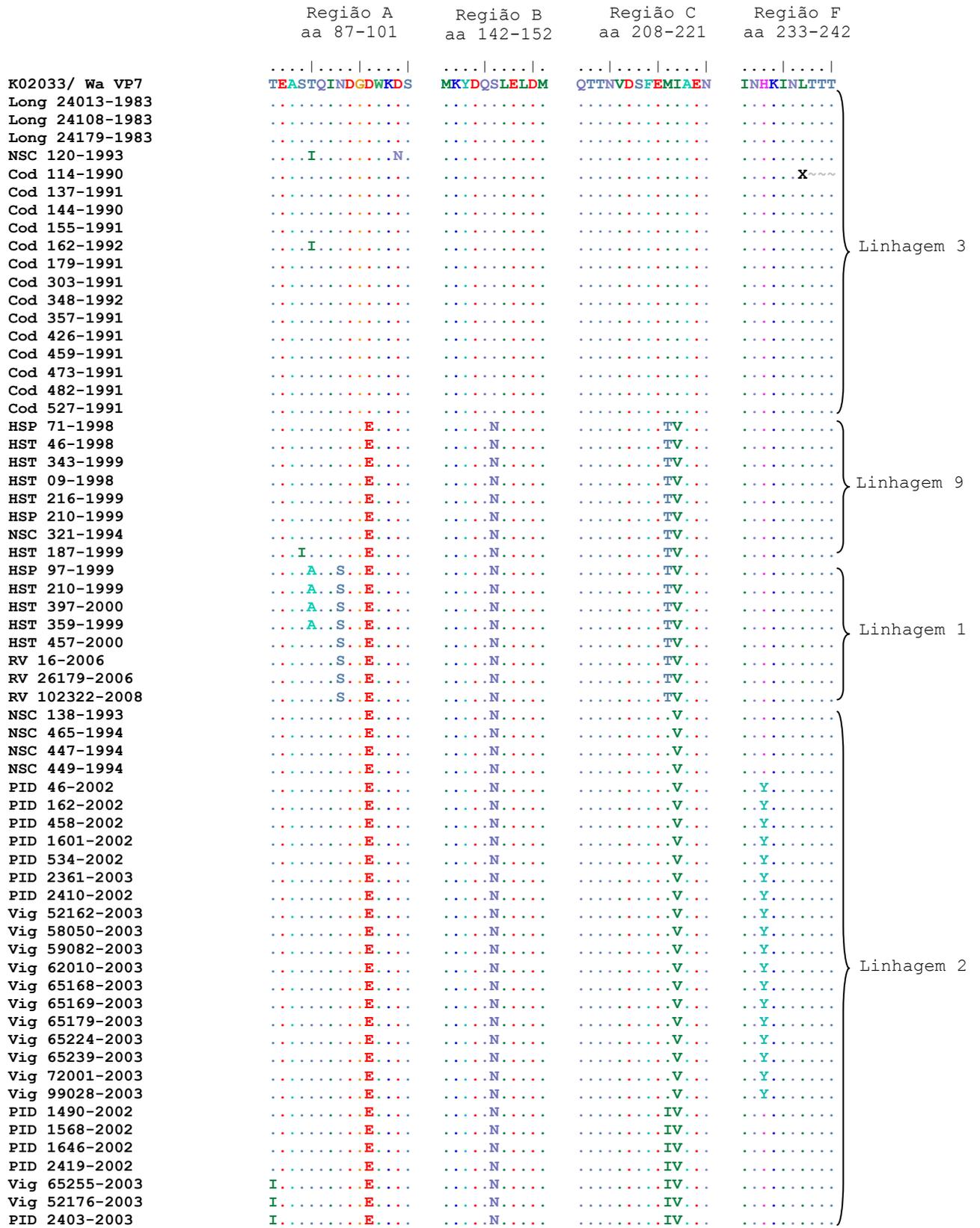


FIGURA 9: Alinhamento das seqüências de aminoácidos do gene VP7 das amostras do presente estudo e protótipo Wa nas regiões antigênicas A, B, C e F. Siglas dos aa estão no anexo 3.

7.1.2. Gene VP4

O sequenciamento do gene VP4 se deu na região do peptídeo VP8. A análise deste gene configurou que todas as amostras de rotavírus G1 pertenceram ao tipo P[8]. A análise realizada das sequências nucleotídicas está representada na Figura 10 e demonstrou que os espécimes agruparam nas linhagens 2 (21/63, 33,3%) e 3 (42/63, 66,7%).

A linhagem 2 englobou todas as amostras do estudo com a vacina RRV-TV, dois espécimes do estudo Nosocomial e cinco do Hospital Sentinela. Essas amostras circularam no período de 1990 a 1999 e o ramo da árvore em que elas se encontram é sustentado por um *bootstrap* de 99. Tais espécimes apresentaram similaridade nucleotídica, entre si, variando de 97,1% a 99,6%.

A análise de nucleotídeos das amostras pertencentes à linhagem 2, quando comparadas com o protótipo F45 demonstrou que ocorreram 19 alterações que resultaram em 5 mudanças de aminoácidos nas posições 63 (L→P), 114 (P→Q), 135 (N→Q), 195 (N→D) e 199 (T→I). A amostra NSC 321 demonstrou alteração (T→V) no resíduo 199. As amostras do Hospital Sentinela apresentaram mudanças singulares nas posições 114 (A→V) e 191 (A→T).

A linhagem 3 foi a mais frequente e englobou 66,7% dos espécimes analisados. Todas as amostras do presente estudo que agruparam na linhagem 3 foram comparadas com o protótipo OP351 e, com exceção do espécime HSP 210, apresentaram uma modificação nucleotídica na posição 293 (G→A) alterando o resíduo 98 (S→N).

Os espécimes da Rede de Vigilância, Vigilância Epidemiológica, com exceção da Vig 52176, e sete amostras do estudo com a vacina RIX 4414, formaram um grupo coeso na linhagem 3 e apresentaram similaridade nucleotídica variando de 99,1% a 99,5%, entre si. Estes espécimes circularam no período de 2002 a 2006 e apresentaram duas mudanças aminoacídicas nos resíduos 108 (V→I) e 245 (K→T).

Em outro ramo da linhagem 3 encontram-se onze amostras que foram detectadas durante os anos de 1999 a 2003. Elas exibiram similaridade entre si variando de 99% a 100%, e quando comparadas com a amostra rj7363/03 a similaridade variou de 98,8% a 99,6%.

Todos os espécimes do estudo Longitudinal e quatro amostras do estudo Nosocomial formaram um ramo isolado sustentado por *bootstrap* de 97. A

similaridade nucleotídica entre esses espécimes variou de 96,3 a 99,6%. Nos resíduos 106 (I→V), 115 (V→I) e 120 (N→T) ocorreram alterações aminoacídicas singulares a este grupo. As amostras do estudo Longitudinal também apresentaram modificações nas posições 32 (N→D), 121 (V→I) e 195 (G→D). Essas alterações foram verificadas quando esses espécimes foram comparados com o protótipo representantes desta linhagem (OP351).

Com relação à análise na região antigênica da proteína VP4, todas as amostras apresentaram substituições nas posições 35 (I→V) e 38 (S→G) como visualizado na Figura 11. Com exceção das amostras do estudo Longitudinal, as demais demonstraram alteração no resíduo 121 (I→V). O sítio 120 foi modificado (T→N) nos espécimes da linhagem 3, excetuando-se 8 amostras. Houve alteração no resíduo 115 (V→I) em um grupo de amostras de ambas as linhagens. As regiões 3 e 5 mantiveram-se conservadas.

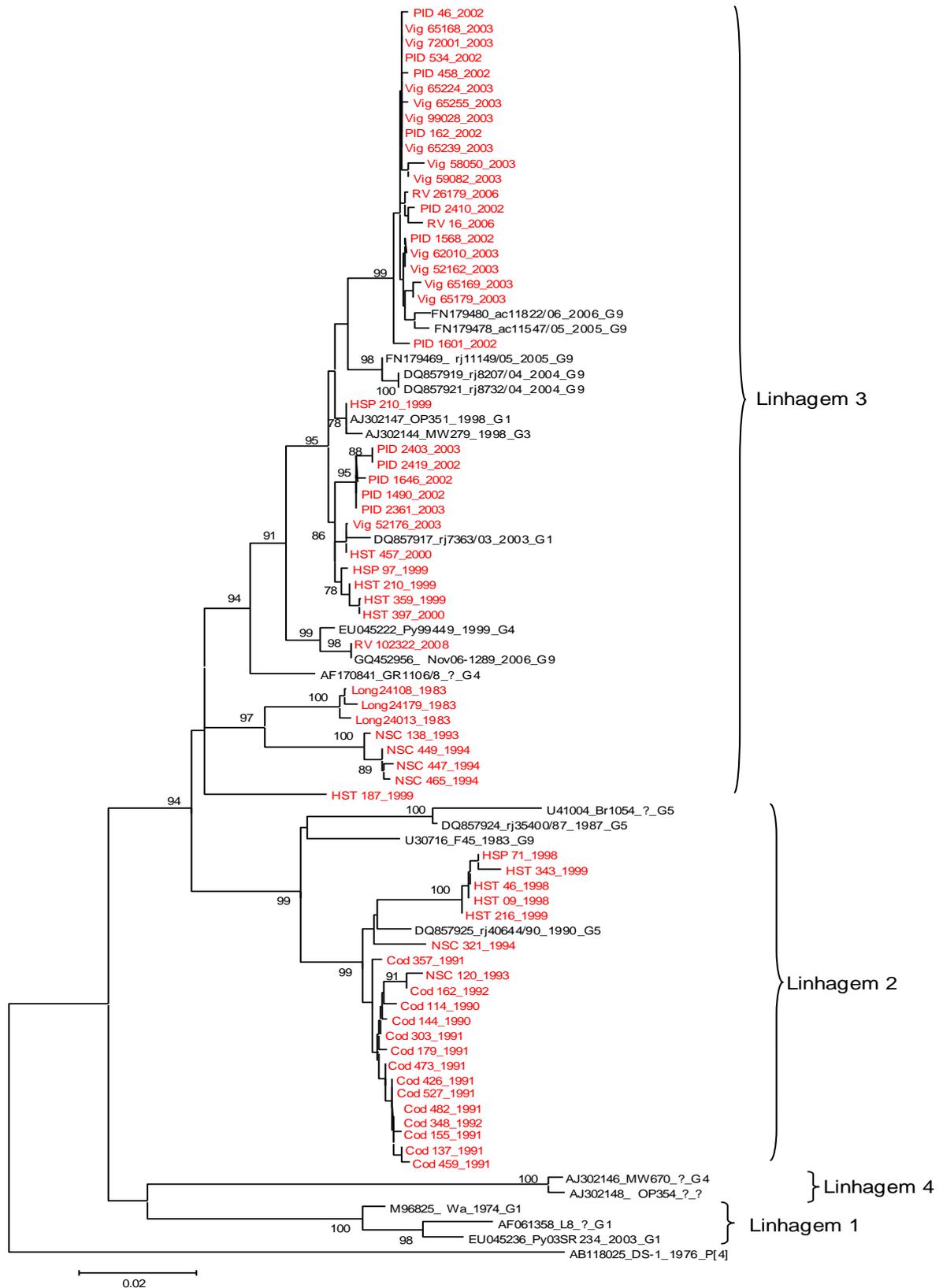


FIGURA 10: Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP4 envolvendo 63 amostras G1 dos municípios de Belém e Marituba. Os valores de *bootstrap* (2.000 pseudoréplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70 não estão representados.

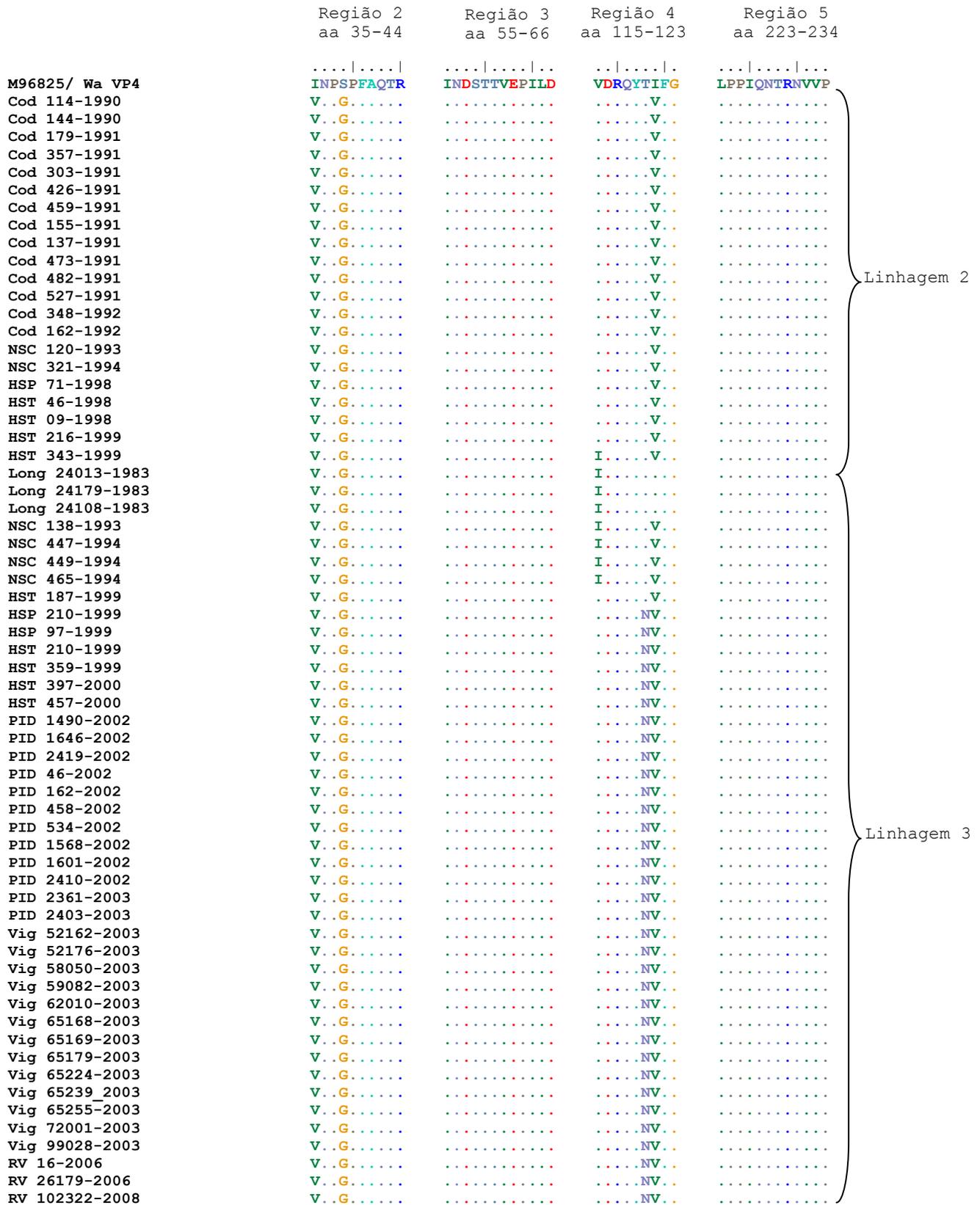


FIGURA 11: Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene VP4 das amostras do presente estudo e protótipo Wa nas regiões antigênicas 2 a 5. Siglas dos aa estão no anexo 3.

7.1.3. Gene NSP4

A análise das sequências parciais do gene que codifica a proteína NSP4 demonstrou que todas as amostras de rotavírus G1 agruparam no genótipo E1. A similaridade nucleotídica e aminoacídica entre essas amostras variou de 91,7% a 100% e 79,4% a 100%, respectivamente (Fig. 12).

Em todas as amostras analisadas para o gene NSP4 houve mudanças de nucleotídeos nas posições 47 (C→T) e 101 (T→C), resultando em alteração aminoacídica dos resíduos 16 (S→P) e 34 (L→P), quando comparadas com o protótipo do genótipo E1 (Wa).

Todas as amostras do estudo Longitudinal e do estudo com a vacina RRV-TV juntamente com três espécimes do estudo Nosocomial e três do Hospital Sentinela formaram um grupo coeso sustentado por bootstrap de 94. Elas foram detectadas no período de 1983, 1990 a 1994, 1998 e 1999. Neste grupo ocorreram três alterações de nucleotídeos nos sítios: 209 (A→G), 410 (G→A) e 506 (C→T), resultando em mudança de aminoácido nos resíduos 70 (Y→C), 137 (R→K) e 169 (S→L), respectivamente.

Os espécimes da Rede de Vigilância, Vigilância Epidemiológica, do estudo com a vacina RIX 44-14 e sete amostras do Hospital Sentinela apresentaram alterações aminoacídicas nas posições 141 (V→I), 142 (I→V), 145 (S→T) e 169 (S→I). Essas amostras circularam entre os anos de 1999 a 2000, 2002 a 2003, 2006 e 2008 e o ramo da árvore em que elas se encontram é sustentado por um *bootstrap* de 99.

Duas amostras do estudo com a vacina RRV-TV (COD 179 e COD 357) e seis do estudo com a RIX 44-14 (PID 1490, PID 1568, PID 1646, PID 2361, PID 2403 e PID 2419) e uma da Vigilância Epidemiológica (Vig 52176) apresentaram alteração no aa 131 (H→Y).

Duas amostras do Hospital Sentinela (HSP 71 e HST 216) e três do estudo Nosocomial (NSC 138, NSC 447, NSC 449) demonstraram mudanças nos aminoácidos 111 (E→D) e 134 (L→M).



FIGURA 12: Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene que codifica para a proteína NSP4 envolvendo 63 amostras G1 dos municípios de Belém e Marituba. Os valores de *bootstrap* (2.000 pseudoréplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70 não estão representados.

7.2. DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DAS VARIANTES GENÉTICAS PARA O GENE VP7 DE AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS G1

O tipo G1 de rotavírus circulou constantemente na população, como demonstrado na Figura 13. No ano de 1983 e início da década de 90, a sublinhagem 3A foi detectada predominantemente. A partir de 1993, observou-se a co-circulação de diferentes sublinhagens. Amostras pertencentes à linhagem 9 foram encontradas apenas na década de 90, sendo que em 1999 houve a co-circulação das sublinhagens 9A, 9B e 1C. A linhagem 2 circulou nos anos de 1993, 1994, 2003 e 2006. No período de 2002 a 2003 foi constatada a presença de duas sublinhagens (2D e 2E). A partir de 2006, observou-se a circulação das sublinhagens 1A e 1C.

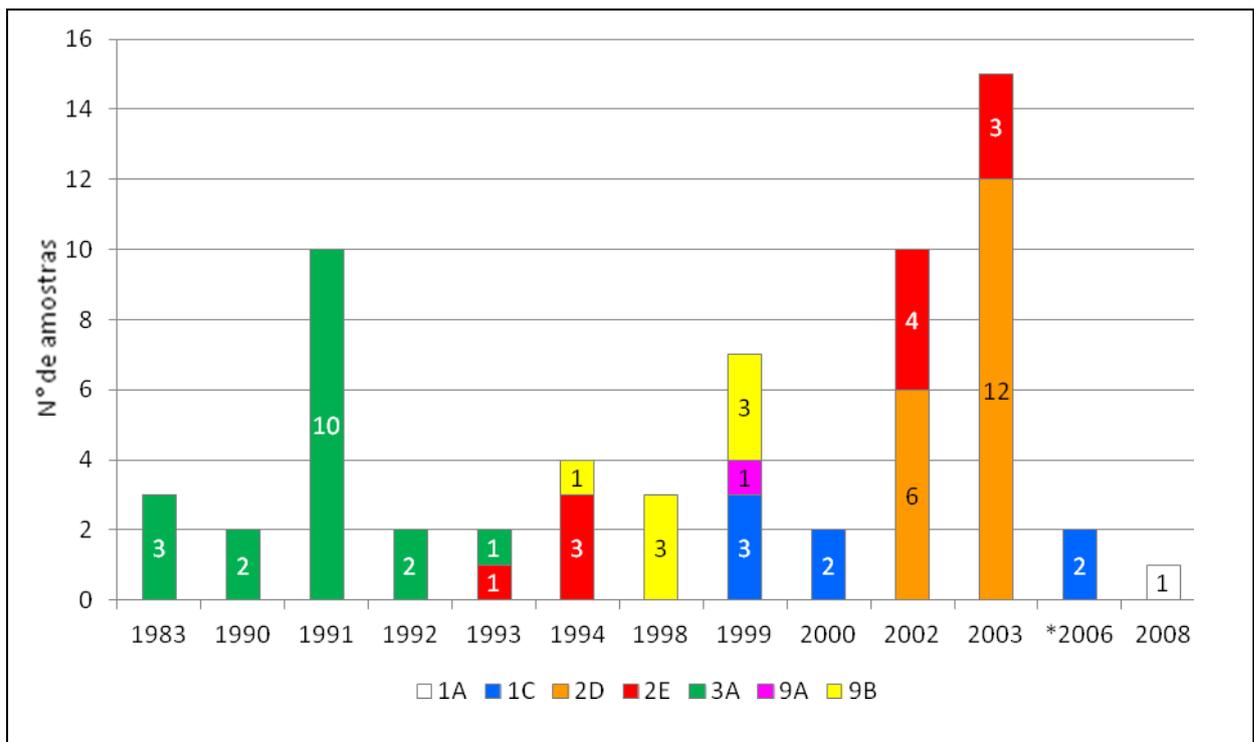


Figura 13: Distribuição temporal das linhagens e sublinhagens do gene VP7 de rotavírus G1 que circularam no período de 1983 a 2008 em Belém e Marituba.

*2006: ano de introdução da vacina anti-rotavírus

7.3. DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DAS VARIANTES GENÉTICAS PARA O GENE VP4 DE AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS G1

A Figura 14 configura a distribuição das linhagens do tipo P[8] das amostras G1. Observa-se que a linhagem 2 circulou predominantemente nos anos 90, enquanto que a partir de 2000 houve a predominância da linhagem 3. Nos anos de 1993, 1994 e 1999 ocorreu a co-circulação destas linhagens.

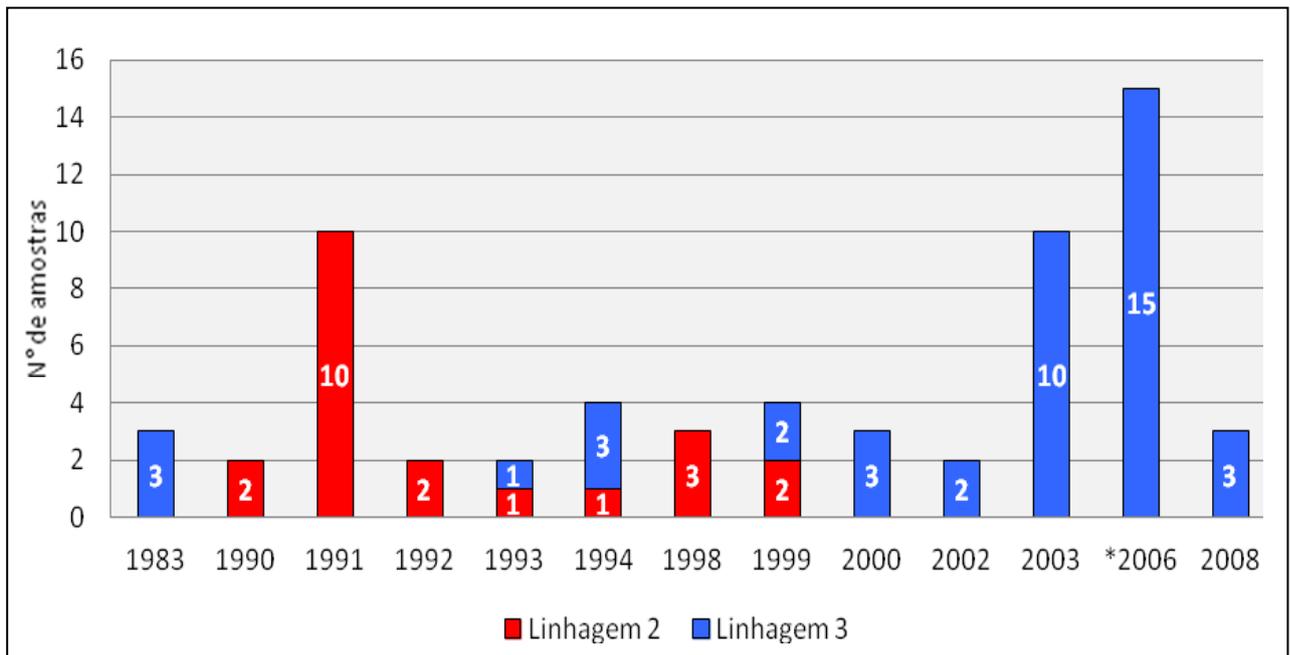


FIGURA 14: Distribuição temporal das linhagens do gene VP4 de rotavírus G1 que circularam no período de 1983 a 2008 em Belém e Marituba.

*2006: ano de introdução da vacina anti-rotavírus

8. DISCUSSÃO

Estudos sobre diversidade genética e antigênica dos rotavírus são extremamente necessários a fim de monitorar e caracterizar os diferentes tipos circulantes devido aos diversos mecanismos de evolução que estes vírus apresentam. Tais mecanismos podem gerar variantes dentro de um genótipo, ocasionando eventualmente o escape frente à imunidade conferida pelas vacinas em uso.

Diversos estudos descrevem a ampla circulação do tipo G1 de rotavírus em todo o mundo (LEITE et al., 2008; LINHARES et al., 2011; SANTOS E HOSHINO, 2005). A variabilidade antigênica e genética que os rotavírus G1 apresentam no gene VP7 permite a sua contínua circulação (ARISTA et al., 2006; ARORA et al., 2009; LE et al., 2010; PHAN et al., 2007). São descritas 11 linhagens e 17 sublinhagens deste genótipo até o presente momento, sendo que as linhagens 10 e 11 envolvem rotavírus de origem animal (suíno e bovino) e as demais de origem humana (PHAN et al., 2007).

As amostras do presente estudo agruparam em 4 linhagens e 7 sublinhagens, apresentando divergência de nucleotídeos e aminoácidos, entre as mesmas, de 10,2% e 29,3%, respectivamente. Não foi encontrada inserção ou deleção no gene da VP7 nas amostras analisadas. A maioria das alterações de aminoácidos ocorreu nas regiões variáveis. No entanto, foram observadas quatro modificações na região conservada entre amostras das linhagens 3 (aa 112 e 227) e 9 (aa 45 e 57).

Bányai et al. (2009c), ao analisarem o gene VP7 de rotavírus G1 detectados na Hungria ao longo de 16 anos, verificaram a detecção das mesmas linhagens (1, 2, 3 e 9) que circularam no nosso estudo. Não obstante, a sublinhagem 2D foi mais frequente na Hungria, enquanto que na presente pesquisa predominaram concomitantemente as sublinhagens 2E e 3A, perfazendo um total de 57,1% (36/63) das amostras.

No presente estudo verificou-se que as amostras da linhagem 3 do gene VP7 circularam até o início dos anos de 1990. Elas agruparam com os protótipos Wa isolado nos Estados Unidos e Brz-6 detectado no Brasil. A partir deste período observou-se a co-circulação de linhagens e sublinhagens na população. A linhagem 2E circulou entre os anos de 1993 e 1994, desapareceu e ressurgiu em meados dos

anos 2000. Aliás, perfil semelhante ao da sublinhagem 1C, a qual foi detectada em 1999 e 2000, reaparecendo em 2006.

Em 2003 houve a co-circulação das sublinhagens 2D e 2E. As amostras da sublinhagem 2D apresentaram similaridade nucleotídica variando de 97,9% a 98,5% quando comparadas com o protótipo PA 164 detectada em 1999. Neste mesmo período, no Paraguai, verificou-se que a sublinhagem 2B foi a mais frequente. A partir de 2006 observou-se a detecção da linhagem 1, assim como na Coréia do Sul e na Índia onde esta linhagem foi dominante neste mesmo período (ARORA et al., 2009; LE et al., 2010; PARRA et al., 2007).

Nosso estudo também reforça a hipótese de extinção da linhagem 3, visto que muitos estudos não a detectaram entre as amostras recentes. Verificou-se a ocorrência das linhagens 1 e 2 circulando entre os espécimes das análises realizadas a partir de meados dos anos 2000 (ARORA et al., 2009; LE et al., 2010; PARRA et al., 2007; PIETSCH et al., 2011).

Estudos usando anticorpos monoclonais demonstraram que epítomos da VP7 estão envolvidos na neutralização do rotavírus G1. Estes epítomos estão localizados nas regiões antigênicas A (aa 94, 96-99), B (aa145-148), C (208, 211-213, 217, 221) D (aa 291) e ocasionalmente na região conservada nas posições 104 e 201 (COULSON E KIRKWOOD, 1991; GORZIGLIA et al., 1990; GREEN E KAPIKIAN, 1992; HOSHINO et al., 1994; KANG et al., 1993; KOBAYASHI et al., 1991a; LAZDINS et al., 1995; TANIGUCHI et al., 1988). No presente estudo foram observadas alterações nos resíduos 97 (D→E), 147 (S→N) e 218 (I→V) em todas as amostras, com exceção dos espécimes da linhagem 3; a substituição 217 (M→T) nas linhagens 1 e 9; e na posição 94 (N→S) nas amostras da linhagem 1. Os demais resíduos anteriormente descritos demonstraram-se constantes. Substituições aminoacídicas nessas posições estão relacionadas com perda do reconhecimento de epítomos específicos por anticorpos monoclonais tipo G1. Desta maneira, essas mutações podem alterar a antigenicidade das amostras e permitir o escape destas cepas ao sistema imune, além de potencialmente determinar a falha da vacina devido a mudanças antigênicas.

As alterações nos sítios 97, 147 e 218 em todas as amostras das linhagens 1, 2 e 9 também ocorreram com espécimes coletados no período de 1986

a 2004 na Itália (ARISTA et al., 2006). Phan et al. (2007) também descreveram essas alterações aminoácidas nas regiões antigênicas.

Mudanças nas posições 69 e 238 levam à eliminação do sítio de glicosilação (BLACKHALL et al., 1992). Estes sítios mantiveram-se conservados entre as amostras pesquisadas e corroboram os achados de Arora et al. (2009).

Na presente pesquisa não foi possível realizar a comparação representativa das amostras coletadas antes e após a implantação da vacina contra rotavírus devido ao número pequeno de amostras coletadas no período pós-vacina (3 espécimes). Dois espécimes agruparam na sublinhagem 1C e a amostra RV 102322, que foi coletada em 2008, pertenceu a sublinhagem 1A. Ela demonstrou similaridade de 99% com o protótipo Thai-1604. A baixa frequência do tipo G1 neste período deve-se a reemergência de rotavírus G2P[4], cuja taxa de detecção variou de 60.6% a 91.0% entre os anos de 2006 a 2008. Cabe ressaltar que este fenômeno não se restringiu ao Brasil, mas também a países da América Latina, mesmo naqueles onde a vacina ainda não tinha sido introduzida no setor público (CARVALHO-COSTA et al., 2011; LINHARES et al., 2011; OLIVEIRA, submetido; O'RYAN, et al., 2011). No entanto, há relatos do aumento da frequência do genótipo G1 a partir de 2009 (RAHMAN et al., 2011; SOARES et al., 2011).

Com relação ao gene VP4, verificou-se que todas as amostras analisadas pertenceram ao genótipo P[8]. Este dado corrobora os da literatura, visto que a combinação G1P[8] é a mais frequentemente detectada entre as amostras de rotavírus circulantes em todo mundo (LINHARES et al., 2011; SANTOS E HOSHINO, 2005).

A análise filogenética de amostras P[8] detectadas globalmente permitiu sua classificação em quatro linhagens distintas, quais sejam: Wa-like (linhagem P[8]-1), F45-like (linhagem P[8]-2), OP351-like (linhagem P[8]-3) e MW670-Like (linhagem P[8]-4) (ANSALDI et al., 2007; ARISTA et al., 2005; ESPÍNOLA et al., 2008; GOUVEA et al., 1999; MAUNULLA et al., 1998).

Estudos desenvolvidos em diversos países como Alemanha, Itália e Coréia do Sul associaram o rotavírus G1 com as quatro linhagens do tipo P[8] (ARISTA et al., 2006; LE et al., 2010; PIETCSH et al., 2011). Na presente análise foi observada a detecção de amostras das linhagens 2 e 3 do tipo P[8]. A linhagem 3 foi a mais frequente, sendo responsável por 66,7% (42/63) dos casos, enquanto que a

2 colaborou com 33,3% (21/63). A divergência nucleotídica e aminoacídica, entre essas amostras foi de 8,3% e 5,1%, respectivamente.

Para o gene VP4 são descritas 5 regiões antigênicas, assim definidas: região 1 (aa 1-10), 2 (aa 35-44), 3 (aa 55-66), 4 (aa 115-123) e 5 (aa 223-234) (KOVACS-NOLAN et al., 2003). Assim como no gene VP7, diversas alterações ocorreram nas regiões variáveis. Duas regiões antigênicas apresentaram mutações (2 e 4). Tais mutações podem vir a afetar a infectividade viral, uma vez que essas regiões são domínios de neutralização. Assim como em outro relato da literatura, o sítio de clivagem da VP4 por ação da tripsina (Arg 247) manteve-se conservado entre as amostras analisadas (PIETCSH et al., 2011).

Neste estudo verificou-se que as amostras coletadas em 1983 pertenceram à linhagem 3 do tipo P[8]. A linhagem 2 circulou no início da década de 1990, seguida pela co-circulação de ambas linhagens nos anos de 1993, 1994 e 1999. Após o ano 2000 a linhagem 3 foi predominante. Configuração semelhante ao do estudo realizado na Itália com rotavírus G1, no entanto a linhagem 1 foi mais frequente até o final dos anos 90 e a linhagem 3, a partir de 2001 (ARISTA et al., 2006). Nosso estudo corrobora com a literatura acerca da atual circulação da linhagem 3 do tipo P[8] (ARISTA et al., 2006; ANSALDI et al., 2007; ARAÚJO et al., 2007; ESPINOLA et al., 2008).

Na literatura há poucos relatos sobre diversidade genética da proteína não-estrutural NSP4 associada ao tipo G1. A análise desta proteína pode ser útil para explicar padrões evolutivos e rearranjo genético de rotavírus em circulação.

A análise do gene que codifica a proteína NSP4 demonstrou que todos os espécimes deste estudo pertenceram ao genótipo E1. A similaridade nucleotídica e aminoacídica entre essas amostras variou de 91,7% a 100% e 79,4% a 100%, respectivamente. Com relação ao protótipo Wa representante deste genótipo a divergência nucleotídica e aminoacídica foi de 7,9% e 16,8%, respectivamente.

São descritos cinco sítios funcionais da proteína NSP4, localizados nos seguintes resíduos: 19D (glicosilação); 68I e 76I (domínio H3); 131H e 135I (toxicidade); 138P (ligação a VP4) e 174S (ligação a VP7) (HYSER et al., 2008). Nove amostras da presente análise demonstraram alteração no sítio 131 (H→Y). Os demais resíduos funcionais mantiveram-se conservados. A substituição neste

resíduo já foi relatada em amostras de neonatos em Belém que circularam no período de 1996 a 1998 (MASCARENHAS et al., 2007b).

Nossos resultados corroboram os da literatura em relação à classificação desses três genes, uma vez que as amostras apresentaram os seguintes genótipos: G1-P[8]-E1 (MATTHIJNSSENS et al, 2008 a, b; 2011). Com o advento da nova classificação dos rotavírus baseada nos 11 genes virais, é de grande importância o desenvolvimento de estudos sobre esses genes em amostras circulantes na região amazônica, a fim de observar a variabilidade genética, possível transmissão entre espécies envolvendo rotavírus de origens humana e animal, bem como o impacto que tais alterações podem ocasionar sobre o processo de imunização.

Estudo realizado por Jin et al. (1996) usando soros de crianças vacinadas com a RRV-TV, afirmaram que a proteína VP7 da vacina, pertencente à linhagem 3 do tipo G1, foi antigenicamente distinta das amostras dos Estados Unidos e de outros espécimes circulantes em todo o mundo, pertencentes a outras linhagens. Hoshino et al. (2005) verificaram que anticorpos induzidos por amostras G9 da linhagem 1 são capazes de neutralizar antígenos da linhagem 2 e 3, enquanto que anticorpos da linhagem 3 não possuem a mesma capacidade em relação a linhagem 1. Estes resultados denotam que é possível que as diferentes linhagens de rotavírus possam ter diferentes propriedades antigênicas.

Uma vez que atualmente duas vacinas estão licenciadas e em uso no Brasil (Rotarix[®] e Rotateq[®]), e ambas apresentam em sua formulação a especificidade G1, é extremamente necessário investigar a circulação dessas amostras e suas variantes, já que elas que podem apresentar possíveis modificações antigênicas e interferir a efetividade vacinal, possivelmente devido a alterações antigênicas.

A alta heterogeneidade intragenotípica e antigênica é um motivo provável para a predominância persistente do rotavírus G1 em todo o mundo ao longo dos anos. A caracterização antigênica, juntamente com a análise genética, é necessária para confirmar se tais amostras e daí resulta a diversidade antigênica.

Tal análise permitiu ampliar o conhecimento da diversidade genética e da circulação de variantes de rotavírus G1, representando o primeiro estudo da epidemiologia molecular deste genótipo no Brasil e a necessidade de seu contínuo monitoramento frente as suas peculiaridades genéticas de adaptação e propagação,

a fim de detectar possíveis variantes emergentes que possam representar um desafio às estratégias atuais de imunização.

9. CONCLUSÃO

- Todas as amostras do presente estudo apresentaram genótipo G1-P[8]-E1.
- A análise de VP7 demonstrou a circulação de quatro linhagens (1, 2, 3 e 9) e sete sublinhagens (1A, 1C, 2D, 2E, 3A, 9A e 9B) de rotavírus G1.
- Co-predominaram as sublinhagens 2E e 3A, concorrendo com um total de 57,1% (36/63) das amostras.
- Foram observadas três substituições de aminoácidos [97 (D→E), 147 (S→N) e 218 (I→V)] no gene VP7 nas regiões antigênicas (A, B e C) nas amostras das linhagens 1, 2 e 9.
- Foram detectadas as linhagens 2 e 3 do tipo P[8], sendo que a 3 foi mais frequente (66,7%)
- No gene da VP4 ocorreram duas alterações [35 (I→V) e 38 (S→G)] na região antigênica (2) em todas as amostras analisadas.
- Nove amostras da presente análise demonstraram alteração no sítio de toxicidade da NSP4 (aa 131).
- Os genes VP4, VP7 e NSP4 de rotavírus G1 sofreram alterações no decorrer dos anos de estudo.
- Há ampla diversidade antigênica e genética de rotavírus G1 circulantes na região.

10. PERSPECTIVAS

Há necessidade de investigações mais profundas acerca das mutações em regiões pouco conhecidas e suas possíveis alterações na estrutura das proteínas, bem como sua atividade biológica associada a implicações clínicas. Estudos sobre os demais genes e suas influências na virulência e infectividade viral também são necessários a fim de avaliar a diversidade genética, evolução molecular, transmissão entre-espécies e o impacto que tais alterações podem representar no atual cenário pós-vacina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE H, LINHARES AC, VENEGAS G, VERGARA R, LOPEZ P, JIMENEZ E, et al. Results of a hospital-based study on rotavirus gastroenteritis in Latin American children. In: 24th International Congress of Pediatrics (ICP); 2004, Cancun, Mexico; 2004. p. 656 (resumo).

ANDERSON EJ, WEBER SG. Rotavirus infection in adults. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 2, p. 91-99, 2004.

ANGEL J, FRANCO MA, GREENBERG HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 7, p. 529-539, 2007.

ANSALDI F, PASTORINO B, VALLE L, DURANDO P, STICCHI L, TUCCI P, BIASCI P, LAI P, GASPARINI R, ICARDI G; PAEDIATRIC LEGHORN GROUP. Molecular characterization of a new variant of rotavirus P[8]G9 predominant in a sentinel-based survey in central Italy. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 1011-1015, 2007.

AOKI ST, SETTEMBRE EC, TRASK SD, GREENBERG HB, HARRISON SC, DORMITZER PR. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. **Science**, v. 324, n. 5933, p. 1444-1447, 2009.

ARAÚJO EC, CLEMENS SA, OLIVEIRA CS, JUSTINO MC, RUBIO P, GABBAY YB, DA SILVA VB, MASCARENHAS JD, NORONHA VL, CLEMENS R, GUSMÃO RH, SANCHEZ N, MONTEIRO TA, LINHARES AC. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of two doses of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in healthy infants. **J Pediatr (Rio J)**, v. 83, n. 3, p. 217-224, 2007.

ARAÚJO IT, ASSIS RM, FIALHO AM, MASCARENHAS JD, HEINEMANN MB, LEITE JP. Brazilian P[8],G1, P[8],G5, P[8],G9, and P[4],G2 rotavirus strains: nucleotide sequence and phylogenetic analysis. **J Med Virol**, v. 79, n. 7, p. 995-1001, 2007.

ARISTA S, GIAMMANCO GM, DE GRAZIA S, COLOMBA C, MARTELLA V. Genetic variability among serotype G4 Italian human rotaviruses. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 3, p.1420-1425, 2005.

ARISTA S, GIAMMANCO GM, DE GRAZIA S, RAMIREZ S, LO BIUNDO C, COLOMBA C, CASCIO A, MARTELLA V. Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population. **J Virol**, v. 80, n. 21, p. 10724-10733, 2006.

ARORA R, CHABRA P, CHITAMBAR SD Genetic diversity of genotype G1 rotaviruses co-circulating in western India. **Virus Res**, v. 146, n. 1-2, p. 36-40, 2009.

AZEVEDO MS, YUAN L, JEONG KI, GONZALEZ A, NGUYEN TV, POULY S, GOCHNAUER M, ZHANG W, AZEVEDO A, SAIF LJ. Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. **J Virol**, v.79, n. 9, p. 5428-5436, 2005.

BAGCHI P, DUTTA D, CHATTOPADHYAY S, MUKHERJEE A, HALDER UC, SARKAR S, KOBAYASHI N, KOMOTO S, TANIGUCHI K, CHAWLA-SARKAR M. Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection. **J Virol**, v. 84, n. 13, p. 6834-6845, 2010.

BAKER M, PRASAD BV. Rotavirus cell entry. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 343, p. 121-148, 2010.

BALL JM, MITCHELL DM, GIBBONS TF, PARR RD. Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin. **Viral Immunol**, v.18, n.1, p. 27-40, 2005.

BALL JM, TIAN P, ZENG CQY, MORRIS AP, ESTES MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 101-104, 1996.

BÁNYAI K, BOGDÁN A, DOMONKOS G, KISFALI P, MOLNÁR P, TÓTH A, MELEGH B, MARTELLA V, GENTSCH JR, SZUCS G. Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. **J Med Virol**, v. 81, n. 2, p. 362-370, 2009a.

BÁNYAI K, ESONA MD, MIJATOVIC S, KERIN TK, PEDREIRA C, MERCADO J, BALMASEDA A, PEREZ MC, PATEL MM, GENTSCH JR. Zoonotic bovine rotavirus strain in a diarrheic child, Nicaragua. **J Clin Virol**, v. 46, n. 4, p. 391-393, 2009b.

BÁNYAI K, GENTSCH JR, MARTELLA V, BOGDÁN A, HAVASI V, KISFALI P, SZABÓ A, MIHÁLY I, MOLNÁR P, MELEGH B, SZÜCS G. Trends in the epidemiology of human G1P[8] rotaviruses: a hungarian study. **J Infect Dis**, v. 200, suppl. 1, p. S222-S227, 2009c.

BHANDARI N, SHARMA P, GLASS RI, RAY P, GREENBERG H, TANEJA S, SAKSENA M, RAO CD, GENTSCH JR, PARASHAR U, MALDONADO Y, WARD RL, BHAN MK. Safety and immunogenicity of two live attenuated human rotavirus vaccine candidates, 116E and I321, in infants: Results of a randomized controlled trial. **Vaccine**, v.24, p. 5817-5823, 2006.

BISHOP RF. Natural history of human rotavirus infection. **Arch Virol**, v. 12, p. 119-128, 1996.

BISHOP RF, BUGG HC, MASENDYCZ PJ, LUND JS, GORRELL RJ, BARNES GL. Serum, fecal, and breast milk rotavirus antibodies as indices of infection in mother-infant pairs. *J Infect Dis*, v. 174, supl 1, p. S22-S29, 1996.

BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH, RUCK BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*, v. 2, n. 7841, p. 1281-1283, 1973.

BLACK RE, COUSENS S, JOHNSON HL, LAWN JE, RUDAN I, BASSANI DG, JHA P, CAMPBELL H, WALKER CF, CIBULSKIS R, EISELE T, LIU L, MATHERS C, CHILD HEALTH EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP OF WHO, UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*, v. 375, n. 9730, p. 1969-1987, 2010.

BLACKHALL J, BELLINZONI R, MATTION N, ESTES MK, LA TORRE JL, MAGNUSSON G. A bovine rotavirus serotype 1: serologic characterization of the virus and nucleotide sequence determination of the structural glycoprotein VP7 gene. *Virology*, v. 189, n. 2, p. 833-837, 1992.

BLUTT SE, MATSON DO, CRAWFORD SE, STAAT MA, AZIMI P, BENNETT BL, PIEDRA PA, CONNER ME. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med*, v. 4, n. 4, p.e121, 2007.

BOOM R, SOL CJA, SALIMANS MMM, JANSEN CL, WERTHEIM-VAN DILLEN PME, VAN DER NOORDAA J. Rapid and simple method for purifications of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, n. 28, p. 495-503, 1990.

BRASIL. Instituto Adolfo Lutz; Centro de Vigilância Epidemiológica Professor Alexandre Vranjac. Diarréia e rotavírus. *Rev Saúde Pública*, São Paulo: n. 38, p. 844-845, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Informe Técnico – Doença Diarréica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano - VORH**, Brasília: MS, 2006a. p.1-36.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2006b. DATASUS. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2008/c06.def>>. Acesso em: 10/09/2010.

BRESEE JS, PARASHAR UD, WIDDOWSON MA, GENTSCH JR, STEELE AD, GLASS RI. Update on rotavirus vaccines. *Pediatr Infect Dis J*, v. 24, n. 11, p. 947-952, 2005.

CARDOSO DD, SOARES CM, DIAS E SOUZA MB, DE AZEVEDO MDA S, MARTINS RM, QUEIRÓZ DA, DE BRITO WM, MUNFORD V, RÁCZ ML. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 1, p.25-29, 2003.

CARNEIRO NB, DINIZ-SANTOS DR, FAGUNDES SQ, NEVES LL, REGES RM, LIMA EK, QUADROS VH, SOARES LE, SILVA FS, SCHNEITER HDE G, FIGUEIREDO I, SILVA LR. Clinical and epidemiological aspects of children hospitalized with severe rotavirus-associated gastroenteritis in Salvador, BA, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 9; n. 6, p.525-528, 2005.

CARVALHO-COSTA FA, VOLOTÃO EDE M, DE ASSIS RM, FIALHO AM, DE ANDRADE JDA S, ROCHA LN, TORT LF, DA SILVA MF, GÓMEZ MM, DE SOUZA PM, LEITE JP. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. **Pediatr Infect Dis J**, v. 30, supl.1, p.S35-S41, 2011.

CASTELLO AA, NAKAGOMI T, NAKAGOMI O, JIANG B, KANG JO, GLASS RI, GLIKMANN G, GENTSCH JR. Characterization of genotype P[9]G12 rotavirus strains from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains. **J Med Virol**, v. 81, n.2, p. 371-381, 2009.

CDC. Reduction in rotavirus after vaccine introduction - United States, 2000-2009. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 58, n. 41, p. 1146-1149, 2009.

CDC. Rotavirus surveillance worldwide – 2009. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 86, n. 18, p. 174-176, 2011.

CENSO 2010. Disponível em <http://www.censo2010.ibge.gov.br>. Acesso em: 20/11/2011.

CHOI AH, BASU M, MCNEAL MM, CLEMENTS JD, WARD RL. Antibody-independent protection against rotavirus infection of mice stimulated by intranasal immunization with chimeric VP4 or VP6 protein. **J Virol**, v. 73, n. 9, p. 7574-7581, 1999.

CIARLET M, LIPRANDI F. Serological and genomic characterization of two porcine rotaviruses with serotype G1 specificity. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 1, p. 269-272, 1994.

CORTESE MM, TATE JE, SIMONSEN L, EDELMAN L, PARASHAR UD. Reduction in gastroenteritis in United States children and correlation with early rotavirus vaccine uptake from national medical claims databases. **Pediatr Infect Dis J**, v. 29, n. 6, p. 489-494, 2010.

COOK SM, GLASS RI, LEBARON CW, HO MS. Global seasonality of rotavirus infections. **Bull World Health Organ**, v. 68, n. 2, p. 171-177, 1990.

COULSON BS, KIRKWOOD C. Relation of VP7 amino acid sequence to monoclonal antibody neutralization of rotavirus and rotavirus monotype. **J Virol**, v. 65, n. 11, 5968-5974, 1991.

CUNLIFFE NA, WOODS PA, LEITE JP, DAS BK, RAMACHANDRAN M, BHAN MK, HART CA, GLASS RI, GENTSCH JR. Sequence analysis of NSP4 gene of human rotavirus allows classification into two main genetic groups. **J Med Virol**, v. 53, n. 1, p. 41-50, 1997.

DA SILVA MF, TORT LF, GÓMEZ MM, ASSIS RM, DE MENDONÇA MC, VOLOTÃO EDE M, LEITE JP. Phylogenetic analysis of VP1, VP2, and VP3 gene segments of genotype G5 group A rotavirus strains circulating in Brazil between 1986 and 2005. **Virus Res**, v.160, n. 1-2, p. 381-388, 2011.

DE GRAZIA S, GIAMMANCO GM, POTGIETER CA, MATTHIJNSSENS J, BANYAI K, PLATIA MA, COLOMBA C, MARTELLA V. Unusual assortment of segments in 2 rare human rotavirus genomes. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 5, p. 859-862, 2010.

DE HOSTOS EL, CHOY RK, NGUYEN T. Developing novel antisecretory drugs to treat infectious diarrhea. **Future Med Chem**, v. 3, n. 10, p. 1317-1325, 2011.

DENNEHY PH. Rotavirus vaccines: an overview. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, n. 1, p. 198-208, 2008.

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

DESSELBERGER U, ITURRIZA-GOMARA M, GRAY JJ. Rotavirus epidemiology and surveillance. **Novartis Found Symp**, v. 238, p. 125-147, 2001.

DESSELBERGER U, MANKTELOW E, LI W, CHEUNG W, ITURRIZA-GÓMARA M, GRAY J. Rotaviruses and rotavirus vaccines. **Br Med Bull**, v. 90, p. 37-51, 2009.

DO CARMO GM, YEN C, CORTES J, SIQUEIRA AA, DE OLIVEIRA WK, CORTEZ-ESCALANTE JJ, LOPMAN B, FLANNERY B, DE OLIVEIRA LH, CARMO EH, PATEL M. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **PLoS Med**, v. 8, n. 4, p. e1001024, 2011.

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**, v. 197, n. 1, p.397-404, 1993.

DYALL-SMITH ML, LAZDINS I, TREGEAR GW, HOLMES IH. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 10, p. 3465-3468, 1986.

EL KHOURY AC, MAST TC, CIARLET M, MARKSON L, GOVEIA MG, MUNFORD V, RÁCZ ML. Projecting the effectiveness of RotaTeq[®] against rotavirus-related hospitalisations in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 541-545, 2011.

ESPÍNOLA EE, AMARILLA A, ARBIZA J, PARRA GI. Sequence and phylogenetic analysis of the VP4 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. **Arch Virol**, v. 153, n. 6, p. 1067-1073, 2008.

ESTES MK, KAPIKIAN AZ. **Rotaviruses**. In: KNIPE DM, HOWLEY PM. *Fields Virology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1917-1974.

FELSENSTEIN J. PHYLIP (Phylogenetic Inference Package), version 3.69. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 2009.

FISCHER WALKER CL, BLACK RE. Rotavirus vaccine and diarrhea mortality: quantifying regional variation in effect size. **BMC Public Health**, v. 13, supl. S16, p. 1-7, 2011.

FISCHER TK, VALENTINER-BRANTH P, STEINSLAND H, PERCH M, SANTOS G, AABY P, MOLBAK K, SOMMERFELT H. Protective immunity after natural rotavirus infection: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, West Africa. **J Infect Dis**, v. 186, n. 5; p. 593-597, 2002.

FLEWETT TH, WOODE GN. The rotaviruses. **Arch. Virol**, v. 57, n. 1, p.1-23, 1978.

FRANCO MA, ANGEL J, GREENBERG HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 2718-2731, 2006.

FREITAS ER, SOARES CM, FIACCADORI FS, SOUZA M, PARENTE JA, COSTA PS, CARDOSO DD. Occurrence of group A rotavirus mixed P genotypes infections in children living in Goiânia-Goiás, Brazil. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 27, n.11, p. 1065-1069, 2008.

FUJITA, Y. Rotavirus genome segment 7 (NSP3) is a determinant of extraintestinal spread in the neonatal mouse. **J Infect Dis**, v. 63, p.: 83-86, 2010.

FUMIAN TM, GAGLIARDI LEITE JP, ROSE TL, PRADO T, MIAGOSTOVICH MP. One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix[®] vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. **Water Res**, v. 45, n. 17, p. 5755-5763, 2011.

GABBAY YB, BORGES AA, OLIVEIRA DS, LINHARES AC, MASCARENHAS JD, BARARDI CR, SIMÕES CM, WANG Y, GLASS RI, JIANG B. Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belém, Brazil. **J Med Virol**, v. 80, n. 9, p.1666-1674, 2008.

GABBAY YB, JIANG B, OLIVEIRA CS, MASCARENHAS JD, LEITE JP, GLASS RI, LINHARES AC. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children

attending a day-care centre in Belém, Brazil. **J Diarrhoeal Dis Res**, v. 17, n. 2, p.69-74, 1999.

GABBAY YB, MORAIS MAA, ALVES AS, OLIVEIRA KK, MASCARENHAS, JDP, LINHARES AC. Detecção de rotavírus por imunocromatografia: ensaio simples e de rápida execução. **Rev Par Méd**, v. 19, n. 1, p. 13-18, 2005.

GANIME AC, CARVALHO-COSTA FA, MENDONÇA MC, VIEIRA CB, SANTOS M, FILHO RC, MIAGOSTOVICH MP, LEITE JP. Group A rotavirus detection on **environmental** surfaces in a hospital intensive care unit. **Am J Infect Control**, 2011. doi:10.1016/j.ajic.2011.07.017.

GENTSCH JR, GLASS RI, WOODS P, GOUVEA V, GORZIGLIA M, FLORES J, DAS BK, BHAN MK. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 6, p. 1365-1373, 1992.

GENTSCH JR, LAIRD AR, BIELFELT B, GRIFFIN DD, 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**, v. 192, supl 1, p. S146-S159, 2005.

GILGER MA, MATSON DO, CONNER ME, ROSENBLATT HM, FINEGOLD MJ, ESTES MK. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. **J Pediatr**, v. 120, n. 6, p. 912-917, 1992.

GLADSTONE BP, RAMANI S, MUKHOPADHYA I, MULIYIL J, SARKAR R, REHMAN AM, JAFFAR S, GOMARA MI, GRAY JJ, BROWN DW, DESSELBERGER U, CRAWFORD SE, JOHN J, BABJI S, ESTES MK, KANG G. Protective effect of natural rotavirus infection in an Indian birth cohort. **N Engl J Med**, v. 365, n. 4, p. 337-346, 2011.

GLASS RI, PARASHAR UD, BRESEE JS, TURCIOS R, FISCHER TK, WIDDOWSON MA, JIANG B, GENTSCH JR. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. **Lancet**, v. 368, n. 9532, p. 323-332, 2006.

GLEIZES O, DESSELBERGER U, TATOCHENKO V, RODRIGO C, SALMAN N, MEZNER Z, GIAQUINTO C, GRIMPREL E. Nosocomial rotavirus infection in European countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. **Pediatr Infect Dis J**, v. 25, p. S12-S21, 2006.

GOUVEA V, GLASS RI, WOODS P, TANIGUCHI K, CLARK HF, FORRESTER B, FANG ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J Clin Microbiol**, v. 28, n.2, p. 276-282, 1990.

GOUVEA V, LIMA RC, LINHARES RE, CLARK HF, NOSAWA CM, SANTOS N. Identification of two lineages (WA-like and F45-like) within the major rotavirus genotype P[8]. **Virus Res**, v. 59, n. 2, p. 141-147, 1999.

GORZIGLIA M, LARRALDE G, WARD RL. Neutralization epitopes on rotavirus SA11 4fM outer capsid proteins. **J Virol**, v. 64, n. 9, p. 4534-4539, 1990.

GRAFF JW, ETTAYEBI K, HARDY ME. Rotavirus NSP1 Inhibits NFkB Activation by Inducing Proteasome-Dependent Degradation of b-TrCP: A Novel Mechanism of IFN Antagonism. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2009.

GRAY J, VESIKARI T, VAN DAMME P, GIAQUINTO C, MRUKOWICZ J, GUARINO A, DAGAN R, SZAJEWSKA H, USONIS V. Rotavirus. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, supl. 2, p. S24-31, 2008.

GREEN KY, KAPIKIAN AZ. Identification of VP7 epitopes associated with protection against human rotavirus illness or shedding in volunteers. **J Virol**, v. 66, n. 1, p. 548-453, 1992.

GREENBERG HB, FLORES J, KALICA AR, WYATT RG, JONES R. Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the Wa and DS-1 strains of human rotavirus. **J Gen Virol**, v. 64, p.313-320, 1983a.

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**, v. 39, n. 1, p. 91-99, 1983b.

GUERRERO CA, MÉNDEZ E, ZÁRATE S, ISA P, LÓPEZ S, ARIAS CF. Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 26, p.14644-14649, 2000.

GUGLIELMI KM, MCDONALD SM, PATTON JT. Mechanism of intraparticle synthesis of the rotavirus double-stranded RNA genome. **J Biol Chem**, v. 285, n. 24, p. 18123-18128, 2010.

GURGEL RQ, ILOZUE C, CORREIA JB, CENTENARI C, OLIVEIRA SM, CUEVAS LE. Impact of rotavirus vaccination on diarrhoea mortality and hospital admissions in Brazil. **Trop Med Int Health**, v. 6, n. 9, p. 1180-1184, 2011.

GUSMÃO RH, MASCARENHAS JD, GABBAY YB, LINS-LAINSON Z, RAMOS FL, MONTEIRO TA, VALENTE SA, FAGUNDES-NETO U, LINHARES AC. Rotavirus subgroups, G serotypes, and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belém, Brazil. **J Trop Pediatr**, v. 45, n. 2, p. 81-86, 1999.

HAGBOM M, ISTRATE C, ENGBLOM D, KARLSSON T, RODRIGUEZ-DIAZ J, BUESA J, TAYLOR JA, LOITTO VM, MAGNUSSON KE, AHLMAN H, LUNDGREN O, SVENSSON L. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. **PLoS Pathog**, v.7, n. 7, e1002115, 2011.

HASING ME, TRUEBA G, BAQUERO MI, PONCE K, CEVALLOS W, SOLBERG OD, EISENBERG JN. Rapid changes in rotaviral genotypes in Ecuador. **J Med Virol**, v. 81, n.12, p. 2109-2113, 2009.

HE X, WEI Y, CHENG L, ZHANG D, WANG Z. Molecular detection of three gastroenteritis viruses in urban surface waters in Beijing and correlation with levels of fecal indicator bacteria. **Environ Monit Assess**, 2011. doi: 10.1007/s10661-011-2362-6.

HEATON PM, GOVEIA MG, MILLER JM, OFFIT P, CLARK HF. Development of a pentavalent rotavirus vaccine against prevalent serotypes of rotavirus gastroenteritis. **J Infect Dis**, v. 192, suppl. 1, p. S17-S21, 2005.

HODGES K, GILL R. Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. **Gut Microbes**, v. 1, n. 1, p. 4-21, 2010.

HOSHINO Y, HONMA S, JONES RW, ROSS J, SANTOS N, GENTSCH JR, KAPIKIAN AZ, HESSE RA. A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains. **Virology**, v. 332, n. 1, p. 177-188, 2005.

HOSHINO Y, NISHIKAWA K, BENFIELD DA, GORZIGLIA M. Mapping of antigenic sites involved in serotype-cross-reactive neutralization on group A rotavirus outer capsid glycoprotein VP7. **Virology**, v. 199, n. 1, p. 233-237, 1994.

HUANG H, SCHROEDER F, ESTES MK, MCPHERSON T, BALL JM. Interaction(s) of rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) C-terminal peptides with model membranes. **Biochem J**, v. 380, n. 3, p. 723-733, 2004.

HYSER JM, COLLINSON-PAUTZ MR, UTAMA B, ESTES MK. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. **M Bio**. v. 1, n. 5, pii: e00265-10, 2010.

HYSER JM, ZENG CQ, BEHARRY Z, PALZKILL T, ESTES MK. Epitope mapping and use of epitope-specific antisera to characterize the VP5* binding site in rotavirus SA11 NSP4. **Virology**, v. 373, n. 1, p. 211-228, 2008.

ICTV. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Virus. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Virus In: FAUQUET, C.M.; MAYO. M.A., MANILOFF, J.; DESSEBERGER, U.; BALL, L.A. (eds), San Diego: Elsevier Academic press, p. 981-998, 2005.

ITURRIZA-GÓMARA M, ISHERWOOD B, DESSELBERGER U, GRAY J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. **J Virol**, v. 75, n. 8, p. 3696-3705, 2001.

ITURRIZA GÓMARA M, WONG C, BLOME S, DESSELBERGER U, GRAY J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J Virol**, v. 76, n. 13, p:6596-6601, 2002.

JAIN V, DAS BK, BHAN MK, GLASS RI, GENTSCH JR; INDIAN STRAIN SURVEILLANCE COLLABORATING LABORATORIES. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 10, p. 3524-3529, 2001.

JAGANNATH MR, KESAVULU MM, DEEPA R, SASTRI PN, KUMAR SS, SUGUNA K, RAO CD. N- and C-terminal cooperation in rotavirus enterotoxin: novel mechanism of modulation of the properties of a multifunctional protein by a structurally and functionally overlapping conformational domain. **J Virol**, v. 80, n.1, p. 412-425, 2006.

JAYARAM H, ESTES MK, PRASAD BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. **Virus Res**, v. 101, p. 67-81, 2004.

JIANG B, GENTSCH JR, GLASS RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. **Clin Infect Dis**, v. 34, n. 10, p. 1351-1361, 2002.

JIN Q, WARD RL, KNOWLTON DR, GABBAY YB, LINHARES AC, RAPPAPORT R, WOODS PA, GLASS RI, GENTSCH JR. Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses. **Arch Virol**, v. 141, p. 2057-2076, 1996.

JUSTINO MC, LINHARES AC, LANZIERI TM, MIRANDA Y, MASCARENHAS JD, ABREU E, GUERRA SF, OLIVEIRA AS, DA SILVA VB, SANCHEZ N, MEYER N, SHAFI F, ORTEGA-BARRIA E, SORIANO-GABARRÓ M, COLINDRES RE. Effectiveness of the monovalent G1P[8] human rotavirus vaccine against hospitalization for severe G2P[4] rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil. **Pediatr Infect Dis J**, v. 30, n. 5, p. 396-401, 2011.

KAIANO JHL, MENDONÇA AFO, OLIVEIRA CS, ARAÚJO EC, LINHARES AC, MASCARENHAS JDP. Detecção de rotavirus em crianças da comunidade quilombola do Abacatal, Ananindeua-PA. In: XVI Congresso Brasileiro de Infectologia, 2009, Maceió. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2009. v. 13. p. 55-55 (Resumo).

KANG G. Rotavirus vaccines. **Indian J Med Microbiol**, v. 24, n. 4, p. 252-257, 2006.

KANG SY, BENFIELD DA, GORZIGLIA M, SAIF LJ. Characterization of the neutralizing epitopes of VP7 of the Gottfried strain of porcine rotavirus. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 9, p. 2291-2297, 1993.

KARMAKAR S, RATHORE AS, KADRI SM, DUTT S, KHARE S, LAL S. Post-earthquake outbreak of rotavirus gastroenteritis in Kashmir (India): an epidemiological analysis. **Public Health**, v. 122, n. 10, p. 981-989, 2008.

KERYER-BIBENS C, LEGAGNEUX V, NAMANDA-VANDERBEKEN A, COSSON B, PAILLARD L, PONCET D, OSBORNE HB. The rotaviral NSP3 protein stimulates translation of polyadenylated target mRNAs independently of its RNA-binding domain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 390, n. 2, p. 302-306, 2009.

KHOURY H, OGILVIE I, EL KHOURY AC, DUAN Y, GOETGHEBEUR MM. Burden of rotavirus gastroenteritis in the Middle Eastern and North African pediatric population. **BMC Infect Dis**, n. 11, p. 1-11, 2011.

KIMURA MA. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KIRKWOOD CD. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. **J Infect Dis**, v. 202, p. S43-S48, 2010.

KIRKWOOD CD, BONIFACE K, BARNES GL, BISHOP RF. Distribution of rotavirus genotypes after introduction of rotavirus vaccines, Rotarix[®] and RotaTeq[®], into the National Immunization Program of Australia. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 30, suppl. 1, p.S48-S53, 2011.

KIRKWOOD C, MASENDYCZ PJ, COULSON BS. Characteristics and location of cross-reactive and serotype-specific neutralization sites on VP7 of human G type 9 rotaviruses. **Virology**, v. 196, n. 1, p.79-88, 1993.

KOBAYASHI N, TANIGUCHI K, URASAWA S. Analysis of the newly identified neutralization epitopes on VP7 of human rotavirus serotype 1. **J Gen Virol**, v. 72, Pt. 1, p. 117-124, 1991a.(depois

KOBAYASHI N, TANIGUCHI K, URASAWA T, URASAWA S. Analysis of the neutralization epitopes on human rotavirus VP7 recognized by monotype-specific monoclonal antibodies. **J Gen Virol**, v. 72, p.1855-1861, 1991b.

KOROGLU M, YAKUPOGULLARI Y, OTLU B, OZTURK S, OZDEN M, OZER A, SENER K, DURMAZ R. A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. **New Microbiol**, v. 34, n. 1, p. 17-24, 2011.

KOVACS-NOLAN J, YOO D, MINE Y. Fine mapping of sequential neutralization epitopes on the subunit protein VP8 of human rotavirus. **Biochem J**, v. 376, pt. 1, p.269-275, 2003.

LANZIERI TM, COSTA I, SHAFI FA, CUNHA MH, ORTEGA-BARRIA E, LINHARES AC, COLINDRES RE. Trends in hospitalizations from all-cause gastroenteritis in children younger than 5 years of age in Brazil before and after human rotavirus vaccine introduction, 1998-2007. **Pediatr Infect Dis J**, v. 29, n.7, p.673-675, 2010.

LAZDINS I, COULSON BS, KIRKWOOD C, DYALL-SMITH M, MASENDYCZ PJ, SONZA S, HOLMES IH. Rotavirus antigenicity is affected by the genetic context and glycosylation of VP7. **Virology**, v. 209, n. 1, p. 80-89, 1995.

LE VP, CHUNG YC, KIM K, CHUNG SI, LIM I, KIM W. Genetic variation of prevalent G1P[8] human rotaviruses in South Korea. **J Med Virol**, v. 82, n. 5, p. 886-896, 2010.

LE VP, KIM JY, CHO SL, NAM SW, LIM I, LEE HJ, KIM K, CHUNG SI, SONG W, LEE KM, RHEE MS, LEE JS, KIM W. Detection of unusual rotavirus genotypes G8P[8] and G12P[6] in South Korea. **J Med Virol**, v. 80, n. 1, p. 175-182, 2008.

LEHERT P, CHÉRON G, CALATAYUD GA, CÉZARD JP, CASTRELLÓN PG, GARCIA JM, SANTOS M, SAVITHA MR. Racecadotril for childhood gastroenteritis: an individual patient data meta-analysis. **Dig Liver Dis**, v. 43, n. 9, p. 707-713, 2011.

LEITE JP, CARVALHO-COSTA FA, LINHARES AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 745-753, 2008.

LEVY K, HUBBARD AE, EISENBERG JN. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. **Int J Epidemiol**, v. 38, n. 6, p.1487-1496, 2009.

LI DD, DUAN ZJ, ZHANG Q, LIU N, XIE ZP, JIANG B, STEELE D, JIANG X, WANG ZS, FANG ZY. Molecular characterization of unusual human G5P[6] rotaviruses identified in China. **J Clin Virol**, v. 42, n.2, p. 141-148, 2008.

LI Z, BAKER ML, JIANG W, ESTES MK, PRASAD BV. Rotavirus architecture at subnanometer resolution. **J Virol**, v. 83, n. 4, p.1754-1766, 2009.

LI Y, GUO H, XU W, WU T, MA H, FONTAINE RE. A community outbreak of rotavirus diarrhea associated with exposures in a hospital outpatient department in South China. **Pediatr Infect Dis J**, v. 30, n. 9, p. 745-748, 2011.

LINHARES AC, BRESEE JS. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. **Rev Panam Salud Publica**, v. 8, n. 5, p 305-331, 2000.

LINHARES AC, GABBAY YB, FREITAS RB, DA ROSA ES, MASCARENHAS JD, LOUREIRO EC. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. **Epidemiol Infect**, v. 102, n. 1, p. 129-145, 1989.

LINHARES AC, GABBAY YB, MASCARENHAS JD, DE FREITAS RB, OLIVEIRA CS, BELLESI N, MONTEIRO TA, LINS-LAINSON Z, RAMOS FL, VALENTE SA. Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil. **Bull World Health Organ**, v. 74, n. 5, p. 491-450, 1996.

LINHARES AC, PINHEIRO FP, FREITAS RB, GABBAY YB, SHIRLEY JA, BEARDS GM. An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune, isolated South American Indian community. **Am J Epidemiol**, v. 113, n. 6, p. 703-170, 1981.

LINHARES AC, PINHEIRO FP, SCHMETZ C, MÜLLER G, PETERS D. Duovirus (Rotavírus) em Belém do Pará, Brasil. **Rev Inst Med Trop**, v. 19, n.4, p. 278-279, 1977.

LINHARES AC, STUPKA JA, CIAPPONI A, BARDACH AE, GLUJOVSKY D, ARUJ PK, MAZZONI A, RODRIGUEZ JA, REARTE A, LANZIERI TM, ORTEGA-BARRIA E, COLINDRES R. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. **Rev Med Virol**, 2011. doi: 10.1002/rmv.682

LINHARES AC, VERSTRAETEN T, WOLLESWINKEL-VAN DEN BOSCH J, CLEMENS R, BREUER T. Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 3, p. 312-314, 2006.

LÓPEZ S, ARIAS CF. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. **Trends Microbiol**, v.12, n. 6, p. 271-278, 2004.

LORROT M, VASSEUR M. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? **Virol J**, v. 4, p.31, 2007a.

LORROT M, VASSEUR M. Physiopathology of Rotavirus diarrhea. **Arch Pediatr**, supl 3, p. S145-S151, 2007b.

LUCHS A, MORILLO SG, RIBEIRO CD, VILANOVA BC, CALUX SJ, CARMONA RDE C, TIMENETSKY MC. Gastroenteritis outbreak due to G2P[4] rotavirus and GII norovirus at two correctional facilities in Brazil, 2010. **J Clin Virol**, v. 51, n. 3, p. 213-214, 2011.

LUNDGREN O, SVENSSON L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes Infect**; v. 3, n. 13, p.1145-1156, 2001.

LUZ CR, MASCARENHAS JD, GABBAY YB, MOTTA AR, LIMA TV, SOARES LS, LINHARES AC. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among

hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 47, n. 5, p. 287-293, 2005.

MARTELLA V, BÁNYAI K, MATTHIJNSSENS J, BUONAVOGLIA C, CIARLET M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol*, v. 140, n. 3-4, p. 246-255, 2010.

MASCARENHAS JDP, LEITE JPG, LIMA JC, HEINEMANN MB, OLIVEIRA DS, ARAÚJO IT, SOARES LS, GUSMÃO RHP, GABBAY YB, LINHARES AC. Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin. *J Med Microbiol*, v. 56, pt. 4, p. 524-532, 2007a.

MASCARENHAS JDP, LINHARES AC, GABBAY YB, LIMA CS, GUERRA SDE F, SOARES LS, OLIVEIRA DS, LIMA JC, MACÊDO O, LEITE JP. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. *Virus Res*, v. 126, n. 1-2, p. 149-158, 2007b.

MASCARENHAS JDP, LINHARES AC. Rotavirus gastroenteritis and the urgent need for a vaccine in developing countries. *Postgraduate Doctor Caribbean*, v.21, n.5, p.152-161, 2005.

MATTHIJNSSENS J, BILCKE J, CIARLET M, MARTELLA V, BÁNYAI K, RAHMAN M, ZELLER M, BEUTELS P, VAN DAMME P, VAN RANST M. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol*, v. 4, n. 10, p. 1303-1316, 2009.

MATTHIJNSSENS J, CIARLET M, HEIMAN E, ARIJS I, DELBEKE T, MCDONALD SM, PALOMBO EA, ITURRIZA-GÓMARA M, MAES P, PATTON JT, 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*, v. 82, n. 7, p. 3204-3219, 2008a.

MATTHIJNSSENS J, CIARLET M, MCDONALD SM, ATTOUI H, BÁNYAI K, BRISTER JR, BUESA J, ESONA MD, ESTES MK, GENTSCH JR, ITURRIZA-GÓMARA M, JOHNE R, KIRKWOOD CD, MARTELLA V, MERTENS PP, NAKAGOMI O, PARREÑO V, RAHMAN M, RUGGERI FM, SAIF LJ, SANTOS N, STEYER A, TANIGUCHI K, PATTON JT, DESSELBERGER U, VAN RANST M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* v. 156, n. 8, p.1397-1413, 2011.

MATTHIJNSSENS J, CIARLET M, RAHMAN M, ATTOUI H, BÁNYAI K, ESTES M, GENTSCH J, ITURRIZA-GÓMARA M, KIRKWOOD C, MARTELLA V, MERTENS PP, NAKAGOMI O, PATTON JT, RUGGERI FM, SAIF L, 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*, v. 153, p. 1621-1629, 2008b.

MATTHIJNSSENS J, RAHMAN M, MARTELLA V, XUELEI Y, DE VOS S, DE LEENER K, CIARLET M, BUONAVOGLIA C, VAN RANST M. Full genomic analysis

of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. **J Virol**, v. 80, n. 8, p. 3801-3810, 2006.

MATTION N, COHEN J, ESTES M. **The rotavirus proteins**. In: KAPIKIAN AZ. *Viral Infectious of Gastrointestinal Tract* New York: Marcel Dekker, 1994. p.169-249.

MAUNULA L, VON BONSDORFF CH. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. **J Gen Virol**, v. 79, p. 321-332, 1998.

MCCORMACK PL, KEAM SJ. Rotavirus vaccine RIX4414 (Rotarix): a review of its use in the prevention of rotavirus gastroenteritis. **Paediatr Drugs**, v. 11, n. 1, p. 75-88, 2009.

MCNEAL MM, RAE MN, BEAN JA, WARD RL. Antibody-dependent and -independent protection following intranasal immunization of mice with rotavirus particles. **J Virol**, v. 73, n. 9, p. 7565-7573, 1999.

MERTENS P. The dsRNA viruses. **Virus Res**, v. 101, n. 1, p. 3-13, 2004.

MOSSEL EC, RAMIG RF. A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse. **J Virol**, v. 77, n. 22, p. 12352-12356, 2003.

MOSSEL EC, RAMIG RF. Rotavirus genome segment 7 (NSP3) is a determinant of extraintestinal spread in the neonatal mouse. **J Virol**, v. 76, n. 13, p. 6502-6509, 2002.

MÜLLER H, JOHNE R. Rotaviruses: diversity and zoonotic potential- a brief review. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 120, n. 3-4, p. 108-112, 2007.

MUNOS MK, WALKER CL, BLACK RE. The effect of rotavirus vaccine on diarrhoea mortality. **Int J Epidemiol**, v. 39, suppl. 1, p. i56-i62, 2010.

OLIVEIRA CS, MASCARENHAS JDP, GABBAY YB, LINHARES AC. Infecções por rotavírus. **Infectologia Pediátrica**. Ed. Atheneu, Cap. 48, 2007.

OLIVEIRA ASL, MASCARENHAS JDP, SOARES LS, GUERRA SFS, GABBAY YB, SANCHÉZ N, COLINDRES RE, JUSTINO MCA, LINHARES AC. Rotavirus serotype distribution in Northern Brazil trends over a 27 year period pre and post national vaccine introduction. **Trials in Vaccinology** (submetido).

OMS. **The treatment of diarrhoea: a manual for physicians and other senior health workers**. 4th rev 2005.

O'NEAL CM, CRAWFORD SE, ESTES MK, CONNER ME. Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. **J Virol**, v. 71, n. 11, p. 8707-8717, 1997.

O'RYAN M, LINHARES AC. Update on Rotarix: an oral human rotavirus vaccine. **Expert Rev Vaccines**, v. 8, n. 12, p. 1627-1641, 2009.

O'RYAN M, LUCERO Y, LINHARES AC. Rotarix(?): vaccine performance 6 years postlicensure. **Expert Rev Vaccines**, v. 10, n. 12, p. 1645-1659, 2011.

PALUMBO E, MALORGIO C, SIANI A, BONORA G. Diarrhoea in children: aetiology and clinical aspects. **Infez Med**, v. 17, n. 2, p.95-99, 2009.

PANG X, CAO M, ZHANG M, LEE B. Increased sensitivity for various rotavirus genotypes in stool specimens by amending three mismatched nucleotides in the forward primer of a real-time RT-PCR assay. **J Virol Methods**, v. 172, n. 1-2, p. 85-87, 2011.

PANT N, MARCOTTE H, BRÜSSOW H, SVENSSON L, HAMMARSTRÖM L. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. **BMC Microbiol**, v. 7, n. 86, p.1-9, 2007.

PARASHAR UD, BURTON A, LANATA C, BOSCHI-PINTO C, SHIBUYA K, STEELE D, BIRMINGHAM M, GLASS RI. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. **J Infect Dis**. v. 200, suppl.1, p.S9-S15, 2009.

PARASHAR UD, HUMMELMAN EG, BRESEE JS, MILLER MA, GLASS RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 5, p. 565-572, 2003.

PARASHAR UD, GIBSON CJ, BRESSE JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerg Infect Dis**. v. 12, n^o 2, p. 304-306, 2006.

PARRA GI, ESPÍNOLA EE, AMARILLA AA, STUPKA J, MARTINEZ M, ZUNINI M, GALEANO ME, GOMES K, RUSSOMANDO G, ARBIZA J. Diversity of group A rotavirus strains circulating in Paraguay from 2002 to 2005: detection of an atypical G1 in South America. **J Clin Virol**, v. 40, n. 2, p. 135-141, 2007.

PERL S, GOLDMAN M, BERKOVITCH M, KOZER E. Characteristics of **rotavirus** gastroenteritis in hospitalized children in Israel. **Isr Med Assoc J**, v. 13, n. 5, p. 274-277, 2011.

PHAM M, LEMBERG DA, DAY AS. Probiotics: sorting the evidence from the myths. **Med J Aust**, v. 188, n. 5, p. 304-308, 2008.

PHAN TG, KHAMRIN P, QUANG TD, DEY SK, TAKANASHI S, OKITSU S, MANEEKARN N, USHIJIMA H. Detection and genetic characterization of group A

rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. **J Virol**, v. 81, n. 9, p. 4645-4653, 2007.

PIETSCH C, SCHUSTER V, LIEBERT UG. A hospital based study on inter- and intragenotypic diversity of human rotavirus A VP4 and VP7 gene segments, Germany. **J Clin Virol**, v. 50, n. 2, p. 136-141, 2011.

PRASAD BV, ROTHNAGEL R, ZENG CQ, JAKANA J, LAWTON JA, CHIU W, ESTES MK. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. **Nature**, v. 382, n. 6590, p.471-473, 1996.

RAHMAN M, ALAMGIR AS, SAIADA F, HASSAN Z, FARUQUE AS, CRAVIOTO A, AZIM T, RAHMAN M. Co-circulation of G1, G2 and G9 rotaviruses in hospitalized patients in Bangladesh during 2006-2009. **Hum Vaccin**, v. 7, n.9, p. 929-933, 2011.

RAHMAN M, MATTHIJNSSENS J, SAIADA F, HASSAN Z, HEYLEN E, AZIM T, VAN RANST M. Complete genomic analysis of a Bangladeshi G1P[8] rotavirus strain detected in 2003 reveals a close evolutionary relationship with contemporary human Wa-like strains. **Infect Genet Evol**, v. 10, n. 6, p. 746-754, 2010.

RAMANI S, KANG G. Burden of disease & molecular epidemiology of group A rotavirus infections in India. **Indian J Med Res**, v. 125, n. 5, p. 619-632, 2007.

RAMIG RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **J Virol**, v. 78, n. 19, p. 10213-10220, 2004.

RAMIG RF. Systemic rotavirus infection. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 5, n. 4, p. 591-612, 2007.

RATH BA, GENTSCH J, SECKINGER J, WARD K, DEPUTY S. Rotavirus encephalitis with basal ganglia involvement in an 8-month-old infant. **Clin Pediatr (Phila)**, 2011. doi: 10.1177/0009922811417301.

RIPPINGER CM, PATTON JT, MCDONALD SM. Complete genome sequence analysis of candidate human rotavirus vaccine strains RV3 and 116E. **Virology**, v. 405, n. 1, p. 201-213, 2010.

RUIZ MC, COHEN J, MICHELANGELI F. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. **Cell Calcium**, v. 28, n. 3, p. 137-149, 2000.

RUIZ MC, LEON T, DIAZ Y, MICHELANGELI F. Molecular biology of rotavirus entry and replication. **The Scient World J**, v. 9, p. 1476–1497, 2009.

RUIZ-PALACIOS GM, PÉREZ-SCHAEI I, VELÁZQUEZ FR, ABATE H, BREUER T, CLEMENS SC, CHEUVART B, ESPINOZA F, GILLARD P, INNIS BL, CERVANTES Y, LINHARES AC, LÓPEZ P, MACÍAS-PARRA M, ORTEGA-BARRÍA E, RICHARDSON V, RIVERA-MEDINA DM, RIVERA L, SALINAS B, PAVÍA-RUZ N, SALMERÓN J, RÜTTIMANN R, TINOCO JC, RUBIO P, NUÑEZ E, GUERRERO ML,

YARZÁBAL JP, DAMASO S, TORNIEPORTH N, SÁEZ-LLORENS X, VERGARA RF, VESIKARI T, BOUCKENOOGHE A, CLEMENS R, DE VOS B, O'RYAN M; HUMAN ROTAVIRUS VACCINE STUDY GROUP. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **N Engl J Med**, v. 354, n. 1, p. 11-22, 2006.

SANCHEZ-PADILLA E, GRAIS RF, GUERIN PJ, STEELE AD, BURNY ME, LUQUERO FJ. Burden of disease and circulating serotypes of rotavirus infection in sub-Saharan Africa: systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v.9, n.9, p. 567-576, 2009.

SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

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**, v.15, n.1, p.29-56, 2005.

SANTOSHAM M. Rotavirus vaccine a powerful tool to combat deaths from diarrhea. **N Engl J Med**, v. 362, p. 358-360, 2010.

SHAW AL, ROTHNAGEL R, ZENG CQ, LAWTON JA, RAMIG RF, ESTES MK, PRASAD BV. Rotavirus structure: interactions between the structural proteins. **Arch Virol**, v. 12, p. 21-27, 1996.

SIQUEIRA AA, SANTELLI AC, ALENCAR LR JR, DANTAS MP, DIMECH CP, CARMO GM, SANTOS DA, ALVES RM, LUCENA MB, MORAIS M, ASSIS RM, FIALHO A, MASCARENHAS JD, COSTA M, LINHARES AC, LEITE JP, ARAUJO WN, HATCH DL. Outbreak of acute gastroenteritis in young children with death due to rotavirus genotype G9 in Rio Branco, Brazilian Amazon region, 2005. **Int J Infect Dis**, v. 14, n. 10, p. e898-903, 2010.

SOARES LS, LOBO PD, MASCARENHAS JD, NERI DL, GUERRA SD, OLIVEIRA AD, MAESTRI RP, OLIVEIRA DD, MENEZES EM, LINHARES AC. Identification of lineage III of G12 rotavirus strains in diarrheic children in the Northern Region of Brazil between 2008 and 2010. **Arch Virol**, v. 157, n.1, p.135-139, 2012.

SOARES LS, MASCARENHAS JDP, GABBAY YB, GUSMÃO RHP, LINHARES AC. Molecular characterization of G1 human rotaviruses detected in children from Belém, Pará, Brazil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 1, n. 1, p. 125-130, 2010.

SOÁREZ PC, VALENTIM J, SARTORI AM, NOVAES HM. Cost-effectiveness analysis of routine rotavirus vaccination in Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 23, p. 221-230, 2008.

TANIGUCHI K, HOSHINO Y, NISHIKAWA K, GREEN KY, MALOY WL, MORITA Y, URASAWA S, KAPIKIAN AZ, CHANOCK RM, GORZIGLIA M. Cross-reactive and serotype-specific neutralization epitopes on VP7 of human rotavirus: nucleotide

sequence analysis of antigenic mutants selected with monoclonal antibodies. **J Virol**, v. 62, n. 6, p.1870-1874, 1988.

TANIGUCHI K, URASAWA S. **Diversity in rotavirus genomes**. In: *Seminars in Virology*, v.6, p.123-131,1995.

TARAPOREWALA ZF, CHEN D, PATTON JT. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. **J Virol**, v. 73, n.12, p. 9934-9943, 1999.

TARAPOREWALA ZF, PATTON JT. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. **J Virol**, v. 75, n. 10, p. 4519-4527, 2001.

TARAPOREWALA ZF, PATTON JT. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. **Virus Res**, v.101, n. 1, p. 57-66, 2004.

TATE JE, BURTON AH, BOSCHI-PINTO C, STEELE AD, DUQUE J, PARASHAR UD, THE WHO-COORDINATED GLOBAL ROTAVIRUS SURVEILLANCE NETWORK. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, 2011a. doi:10.1016/S1473-3099(11)70253-5.

TATE JE, CORTESE MM, PAYNE DC, CURNS AT, YEN C, ESPOSITO DH, CORTES JE, LOPMAN BA, PATEL MM, GENTSCH JR, PARASHAR UD. Uptake, impact, and effectiveness of rotavirus vaccination in the United States: review of the first 3 years of postlicensure data. **Pediatr Infect Dis J**, v. 30, p. S56-S60, 2011b.

TATE JE, MUTUC JD, PANOZZO CA, PAYNE DC, CORTESE MM, CORTES JE, YEN C, ESPOSITO DH, LOPMAN BA, PATEL MM, PARASHAR UD. Sustained decline in rotavirus detections in the United States following the introduction of rotavirus vaccine in 2006. **Pediatr Infect Dis J**, v. 30, p. S30-S34, 2011c.

TATE JE, PATEL MM, STEELE AD, GENTSCH JR, PAYNE DC, CORTESE MM, NAKAGOMI O, CUNLIFFE NA, JIANG B, NEUZIL KM, DE OLIVEIRA LH, GLASS RI, PARASHAR UD. Global impact of rotavirus vaccines. **Expert Rev Vaccines**, v. 9, n. 4, p. 395-407, 2010.

TEODOROFF TA, TSUNEMITSU H, OKAMOTO K, KATSUDA K, KOHMOTO M, KAWASHIMA K, NAKAGOMI T, NAKAGOMI O. Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strains. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 1377-1384, 2005.

TERAN CG, TERAN-ESCALERA CN, VILLARROEL P. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. **Int J Infect Dis**, v. 13, n. 4, p. 518-523, 2009.

TODD S, PAGE NA, DUNCAN STEELE A, PEENZE I, CUNLIFFE NA. Rotavirus strain types circulating in Africa: Review of studies published during 1997-2006. **J Infect Dis**, v. 202, p. S34-S42, 2010.

TROP SKAZA A, BESKOVNIK L, ZOHAR CRETNIK T. Outbreak of rotavirus gastroenteritis in a nursing home, Slovenia, December 2010. **Euro Surveill**, v. 16, n. 14, p. 1-4, 2011.

VELÁZQUEZ FR, MATSON DO, CALVA JJ, GUERRERO L, MORROW AL, CARTER-CAMPBELL S, GLASS RI, ESTES MK, PICKERING LK, RUIZ-PALACIOS GM. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. **N Engl J Med**, v. 335, n. 14, p. 1022-1028, 1996.

VESIKARI T, KARVONEN A, PRYMULA R, SCHUSTER V, TEJEDOR JC, COHEN R, MEURICE F, HAN HH, DAMASO S, BOUCKENOOOGHE A. Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. **Lancet**, v. 370, n. 9601, p.1757-1763, 2007.

VESIKARI T, KARVONEN AV, MAJURI J, ZENG SQ, PANG XL, KOHBERGER R, FORREST BD, HOSHINO Y, CHANOCK RM, KAPIKIAN AZ. Safety, efficacy, and immunogenicity of 2 doses of bovine-human (UK) and rhesus-human rotavirus reassortant tetravalent vaccines in Finnish children. **J Infect Dis**, v. 194, n. 3, p. 370-376, 2006a.

VESIKARI T, MATSON DO, DENNEHY P, VAN DAMME P, SANTOSHAM M, RODRIGUEZ Z, DALLAS MJ, HEYSE JF, GOVEIA MG, BLACK SB, SHINEFIELD HR, CHRISTIE CD, YLITALO S, ITZLER RF, COIA ML, ONORATO MT, ADEYI BA, MARSHALL GS, GOTHEFORS L, CAMPENS D, KARVONEN A, WATT JP, O'BRIEN KL, DINUBILE MJ, CLARK HF, BOSLEGO JW, OFFIT PA, HEATON PM; ROTAVIRUS EFFICACY AND SAFETY TRIAL (REST) STUDY TEAM. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. **N Engl J Med**, v. 354, n. 1, p. 23-33, 2006b.

VOLLET III, JJ, DUPON HL, PICKERING LK. Nonenteric sources of rotavirus in acute diarrhea. **J Infect Dis**, v. 144, p. 495, 1981.

WARD RL, BERNSTEIN DI, YOUNG EC, SHERWOOD JR, KNOWLTON DR, SCHIFF GM. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. **J Infect Dis**, v. 154, n. 5, p. 871-880, 1986.

WARD RL, CLARK HF, OFFIT PA. Influence of potential protective mechanisms on the development of live rotavirus vaccines. **J Infect Dis**, v. 202, p. S72-S79, 2010.

WARD RL, MCNEAL MM. VP6: A candidate rotavirus vaccine. **J Infect Dis**, v. 202, p. S101-S107, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rotavirus vaccines: an update. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 84, n. 50, p. 533-540, 2009.

YEAGER M, BERRIMAN JA, BAKER TS, BELLAMY AR. Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. **EMBO J**, v.13, n. 5, p. 1011-1018, 1994.

YOSHIDA A, KAWAMITU T, TANAKA R, OKUMURA M, YAMAKURA S, TAKASAKI Y, HIRAMATSU H, MOMOI T, IIZUKA M, NAKAGOMI O. Rotavirus encephalitis: detection of the virus genomic RNA in the cerebrospinal fluid of a child. **Pediatr Infect Dis J**, v. 14, n. 10, p. 914-916, 1995.

ZÁRATE S, ESPINOSA R, ROMERO P, GUERRERO CA, ARIAS CF, LÓPEZ S. Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. **Virology**, v. 278, n. 1, p. 50-54, 2000.

ZHAORI GT, FU LT, XU YH, GUO YR, PENG ZJ, SHAN WS. Detection of rotavirus antigen in tracheal aspirates of infants and children with pneumonia. **Chin Med J**, v. 104, n. 10, p. 830-833, 1991.

ZHENG BJ, CHANG RX, MA GZ, XIE JM, LIU Q, LIANG XR, NG MH. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. **J Med Virol**, v. 34, n. 1, p. 29-37, 1991.

ANEXO 1



Parecer de Aprovação nº 0023/2008
Protocolo CEP/IEC - Nº 0017/08
CAAE: 0017.0.072.000-08

Ananindeua/PA, 10 de dezembro de 2008.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS

Projeto: “Análise molecular dos genes VP4, VP7 e NSP4 de rotavirus do tipo G1 circulantes em Belém. Pará. Brasil. de 1982 a 2008”

Pesquisador Responsável: **Luana da Silva Soares**

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epigrafe foi considerado **aprovado**.

Recomendamos a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preenchidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório semestral e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.


 MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
 Coordenador do CEP/IEC

ANEXO 2 – Preparo das soluçõesa) Tampão Tris-Ca⁺⁺ 0.01M, pH 7,2

Tris Base (Sigma)	1,21 g
Cloreto de cálcio (Vetec)	0,22 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Adicionar cloreto de cálcio e tris base em 200 mL de água destilada. Homogeneizar e completar com água até o volume final. Armazenar em recipientes transparentes e estocar a temperatura ambiente (TA).

b) Sílica

Dióxido de sílica (Sigma)	60 g
Água destilada q.s.p	500 mL

Homogeneizar a sílica e deixar sedimentar por 24 h. Aspirar por sucção 430 mL e desprezar o sobrenadante. Completar o volume para 500 mL com água destilada, homogeneizar, sedimentando-se naturalmente por 5 h. Aspirar, por sucção, 440 mL do sobrenadante e desprezá-lo. Ajustar o sedimento para pH 2,0 pela adição de 600 µL de ácido clorídrico 37% (Merck). Aliquotar 10 mL da solução em frascos de cor âmbar, autoclavar e estocar a TA.

c) Tampão L2

Isotiocianato de guanidina (Sigma)	120 g
Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4 (Invitrogen)	100 mL

Homogeneizar o isotiocianato de guanidina juntamente com tris-HCl 0,1M, pH 6,4, até dissolver totalmente o soluto. Armazenar em frascos de cor âmbar e estocar a TA.

d) Tampão L6

Isotiocianato de guanidina (Sigma)	120 g
Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4 (Invitrogen)	100 mL
Triton X-100 (Pharmacia Biotech)	1,3 g
EDTA 0,2 M, pH 8,0 (Pharmacia Biotech)	22 mL

Em um recipiente de vidro colocar EDTA 0,2 M, pH 8,0, juntamente com Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4. Adicionar o isotiocianato de guanidina e homogeneizar o até total dissolução. Por último, acrescentar triton X-100 lentamente. Armazenar em frascos de cor âmbar e estocar a TA

e) Tampão TBE 10X

Tris-base (Invitrogen)	108 g
Ácido bórico (Vetec)	55 g
EDTA 0,5 M, pH 8,0 (Pharmacia Biotech)	40 mL

Diluir para uso essa solução 1X antes do uso.

ANEXO 3- Siglas e símbolos dos aminoácidos

Letra	Sigla	Nome do aminoácido	Caráter
A	Ala	Alanina	Não polar
C	Cis	Cisteína	Não polar
D	Asp	Ácido Aspártico	Ácido
E	Glu	Ácido Glutâmico	Ácido
F	Fen	Fenilalanina	Não polar
G	Gli	Glicina	Não polar
H	His	Histidina	Básico
I	Ile	Isoleucina	Não polar
K	Lis	Lisina	Básico
L	Leu	Leucina	Não polar
M	Met	Metionina	Não polar
N	Asn	Asparagina	Polar
P	Pro	Prolina	Não polar
Q	Gln	Glutamina	Polar
R	Arg	Arginina	Básico
S	Ser	Serina	Polar
T	Ter	Treonina	Polar
V	Val	Valina	Não polar
W	Trp	Triptofano	Não polar
Y	Tir	Tirosina	Polar