

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PATOLOGIA DAS DOENÇAS TROPICAIS**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR
ROTAVÍRUS G2 AO LONGO DE 16 ANOS (1992 a 2008) NA
REGIÃO AMAZONICA, BRASIL.**

ALESSILVA DO SOCORRO LIMA DE OLIVEIRA

**Belém/Pará
2010**

ALESSILVA DO SOCORRO LIMA DE OLIVEIRA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR
ROTAVÍRUS G2 AO LONGO DE 16 ANOS (1992 a 2008) NA
REGIÃO AMAZONICA, BRASIL.**

Dissertação 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 Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Costa Linhares

Belém-Pará

2010

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)-
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical, Belém (PA)**

Oliveira, Alessilva do Socorro Lima de
Epidemiologia molecular das infecções por
rotavírus G2 ao longo de 16 anos (1992 a 2008)
na Região Amazônica, Brasil / Alessilva do Socorro
Lima de Oliveira; orientador, Alexandre da Costa
Linhares. - 2010.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal
do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de
Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2010

1. Rotavírus. 2. Infecções por rotavírus. I.
Linhares, Alexandre da Costa, orient. II. Título.

CDD. 22. ed. 616.0194

Ficha catalográfica elaborada por Valdenira de Jesus NMT/UFPA

ALESSILVA DO SOCORRO LIMA DE OLIVEIRA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR ROTAVÍRUS
G2 AO LONGO DE 16 ANOS (1992 a 2008) NA REGIÃO AMAZONICA,
BRASIL.**

Dissertação 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 Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Costa
Linhares

Data de aprovação: 05 de julho de 2010

Banca Examinadora:

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

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

Membro: Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite
Instituição: Fundação Osvaldo Cruz, MS, SVS

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

Suplente: Prof^a. Dr^a. Yvone Gabay Mendes
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

Belém-Pará

2010

Aos meus pais, Edeny Lima de Oliveira e Admilson Ramos de Oliveira pelo incentivo e apoio. Aos meus irmãos pela compreensão e amizade. E ao meu esposo Márcio Pimentel pelo incentivo, amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por ter me dado o dom da vida por estar sempre ao meu lado. Agradeço ainda a família maravilhosa que tenho e aos amigos que me ajudaram consideravelmente em toda essa caminhada.

Agradeço em especial a minha mãe, sem a qual nenhum sonho teria sido realizado.

Ao Dr. Alexandre da Costa Linhares, por me acolher em seu laboratório e me orientar neste trabalho, por toda sua dedicação e atenção.

Ao Instituto Evandro Chagas na pessoa de sua diretora Dr^a Elisabeth C. de Oliveira Santos.

A seção de Virologia do IEC, representada pelo seu chefe Dr. Alexandre da Costa Linhares.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte deste trabalho.

A Dr^a. Joana Mascarenhas, por todo apoio prestado.

À toda equipe do Laboratório de Rotavírus do Instituto Evandro Chagas, Sylvia Guerra, Luana Soares, Euzeni Menezes, Regis Maestri, Ian Carlos, Yvone Gabbay, Darivaldo Neri que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho;

À Sylvia Guerra, por toda sua amizade e companheirismo.

Aos meus amigos Ian Carlos, Mirleide dos Santos e Luana Soares pelo estímulo que sempre me deram para a concretização deste trabalho.

Ao meu esposo Marcio por todo apoio, amor e compreensão que me dedicou ao longo desse período.

Aos meus amigos que sempre entenderam meus estresses e ausência durante este tempo e me deram um enorme e importante apoio.

Aos meus familiares, que mesmo longe, sempre estiveram ao meu lado.

E a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

"Será como a árvore
plantada junto às correntes de
águas, a qual dá o seu fruto
na estação própria, e cuja
folha não cai; e tudo quanto
fizer prosperará".

(Salmo 01)

RESUMO

No Brasil, estima-se que os rotavírus causem 3.352.053 episódios de diarreia, 655.853 ambulatoriais, 92.453 hospitalizações e 850 mortes envolvendo crianças menores de 5 anos de idade. Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. A partícula viral é constituída por três camadas proteicas concêntricas e pelo genoma viral reunindo 11 segmentos de RNA com dupla fita. Reconhecem-se 23 genótipos G e 31 genótipos P. Dentre os genótipos G detectados até o momento, o G2 atua como um dos mais importantes, estando geralmente associado ao genótipo P[4]. Nos últimos três anos se tem observado em larga escala global a reemergência do genótipo G2, sendo um dos mais detectados nos anos que sucederam a implantação da vacina contra rotavírus, particularmente no Brasil. Este estudo teve como objetivo a caracterização molecular de amostras do tipo G2 obtidas de crianças participantes de estudos em gastroenterites virais na região amazônica, Brasil, no período de 1992 a 2008. Foram selecionadas 53 amostras positivas para rotavírus genótipo G2 que foram sequenciadas para VP7 e 38 para VP4. Inicialmente, as amostras foram genotipadas por RT-PCR e seus produtos purificados, quantificados e sequenciados. As amostras também foram testadas quanto ao perfil de migração dos segmentos de RNA. As sequências obtidas dos genes VP4 e VP7 foram alinhadas e editadas no programa Bioedit (v.6.05) e comparadas a outras sequências de RV registradas no banco de genes utilizando o programa BLAST. A árvore filogenética foi feita utilizando o programa Mega 2.1. Do total de 53 amostras sequenciadas para o gene VP7, a análise filogenética revelou a existência de duas linhagens (II e III) e três sublinhagens (IIa, IIc, IIId) que circularam em períodos diferentes na população. Amostras das sub-linhagem IIa e IIc apresentaram mutação na posição no aminoácido da posição 96 (Asp/ Asn). Essa modificação pode resultar em uma alteração conformacional dos epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes. As linhagens de G2 que circularam em Belém foram idênticas àquelas de outros Estados da região amazônica envolvidos no estudo. O gene VP[4] foi sequenciado na região da VP8*, sendo 36 pertencentes do genótipo P[4] e 3 ao P[6]. No genótipo P[4] foi identificada a circulação de duas linhagens, P[4]-4 ocorrendo nos anos de 1998-2000, e P[4]-5 que circulou nos períodos de 1993-1994 e 2006-2008. Nossos resultados reforçam dados de ocorrência continental que evidenciam a reemergência do genótipo G2 com a variante gênica IIc, a qual se estabeleceu na população em associação com o genótipo P[4]-5. A grande homologia entre as cepas de G2 que circularam entre os diferentes estados envolvidos no estudo sugere que as mutações registradas ultrapassaram barreiras geográficas e temporais.

Palavras chaves: Análise molecular, Rotavírus, Genótipo G2, Genótipo P[4].

ABSTRACT

In Brazil-it is estimated that rotavirus causes 3,352,053 episodes of diarrhea, 655 853 visits to emergency rooms, 92,453 hospitalizations and 850 deaths involving children under 5 years of age. Rotavirus belongs to the family *Reoviridae*, genus *Rotavirus*. The viral particle consists of three concentric layers of protein and the viral genome of 11 segments making up a double-stranded RNA. Currently, 23 G genotypes and 31 P genotypes. have been recognized. Among the G genotypes detected so far, G2 represents one of the most important and it is usually associated with the genotype P [4]. Over the past three years it has been observed on a continental scale the re-emergence of genotype G2, throughout the years following the introduction of universal rotavirus vaccination, particularly in Brazil. This study aimed at the molecular characterization of samples of G2 strains obtained from children participating in several studies on rotavirus gastroenteritis in the Amazon region, Brazil, from 1992 to 2008. We selected 53 rotavirus G2 samples which were sequenced for VP4 and 38 samples for VP7. These samples were genotyped by RT-PCR and its products being purified, quantified and sequenced. Samples were also subjected to electrophoresis of RNA segments. The obtained sequences of VP4 and VP7 genes were aligned and edited using the program Bioedit (v.6.05) and compared with other sequences registered in the RV gene bank using the BLAST program. The phylogenetic tree was made using the program Mega 2.1. Of the total 53 samples sequenced for the VP7 gene, phylogenetic analysis revealed two lineages (II and III) and three sublineages (IIa, IIc, IIId) that circulated in different periods in the population. Samples of sub-lineages IIa and IIc showed mutation at amino acid position 96(Asp/Asn). This modification may result in a conformational change of epitopes recognized by neutralizing antibodies. The G2 strains that circulated in Belém were identical to those circulating in other states in the Amazon region which were included in the study. The VP[4] gene was sequenced in the region of VP8*, yielding 36 which-belonged to genotype P[4] and tree to P[6] we could identify two strains: P[4]-4, occurring during 1998-2000 and the P[4]-5 during 1993-1994 and 2006-2008 periods. Our findings sustain recent findings indicating a worldwide reemergence of G2 genotypes of variant IIc, which were established in the population in combination with genotype P[4]-5. In our study, the high homology among G2 strains in various states suggests that detected mutations have even surpassed geographical and temporal barriers.

Key words: Molecular analysis, Rotavirus, G2 genotype, P[4] genotype

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 ROTAVÍRUS	18
2.1.1 Histórico	18
2.1.2 Taxonomia e classificação viral	19
2.1.3 Estrutura viral	21
2.1.4 Organização estrutural do genoma	24
2.1.5 Mecanismos de evolução dos rotavírus	25
2.1.6 Proteínas estruturais	27
2.1.7 Proteínas não estruturais	30
2.1.8 Epidemiologia	32
2.1.9 Genótipo g2 de rotavírus do grupo a	39
2.1.10 Replicação viral	43
2.1.11 Fisiopatologia	46
2.1.12 Imunidade	50
2.1.13 Transmissão	52
2.1.14 Tratamento	53
2.1.15 Diagnóstico laboratorial	55
2.1.16 Vacinas	57
3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	62
4 OBJETIVOS	63
4.1 OBJETIVO GERAL	63
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
5 MATERIAIS E MÉTODOS	64
5.1 MATERIAIS	64
5.2 MÉTODOS	68
5.2.1 Preparação fecal	68
5.2.2 Extração do genoma viral	68
5.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (egpa)	69
5.2.4 Determinação dos genótipos g e p	69
5.2.5 Eletroforese em gel de agarose	71

5.2.6	Purificação e quantificação do dna	72
5.2.7	Sequenciamento de nucleotídeos	73
5.2.8	Análise filogenética	74
6	RESULTADOS	75
6.1	ANÁLISE ELETROFORÉTICA	75
6.2	ANÁLISE DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS	76
6.2.1	Análise de nucleotídeos e aminoácidos do gene vp4	76
6.2.2	Análise de nucleotídeo e aminoácido do genótipo p[4] de rv-a	76
6.2.3	Análise de nucleotídeo e aminoácido do genótipo p[6] de rv-a	82
6.2.4	Análise de nucleotídeo e aminoácido do gene vp7 de rv-a	84
6.3	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E TEMPORAL DE AMOSTRAS DE RV-A GENÓTIPO G2, GENE VP7	92
6.4	DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DE AMOSTRAS DE VP4 DE RV-A	93
7	DISCUSSÃO	95
8	CONCLUSÃO	102
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
	ANEXOS	

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática da partícula viral do RV mostrando as principais estruturas e proteínas virais	22
Figura 2	Representação esquemática dos segmentos genômicos com suas proteínas codificadoras	23
Figura 3	Mortalidade por doença diarreica (%) em crianças menores de cinco anos de idade no período de 1990-2004 em distintas regiões do Brasil	35
Figura 4	Distribuição de tipos G ao longo de 25 anos no Brasil	37
Figura 5	Replicação dos Rotavírus	44
Figura 6	Mecanismos de patogênese do RV.	49
Figura 7	Fluxograma de projetos envolvidos no estudo	64
Figura 8	Eletroferotipos de RV-A genótipo G2 detectados ao longo de 16 anos na região amazônica	75
Figura 9	Análise das sequências de aa da proteína VP8* de amostras de rotavírus P[4] que circularam na região amazônica ao longo de 16 anos	78
Figura 10	Análise filogenética baseada na sequência parcial (816pb) nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras de RV-A genótipo P[4] provenientes estudos desenvolvidos ao longo de 16 anos na região	81
Figura 11	Análise filogenética baseada na sequência parcial (816pb) nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras de RV-A genótipo P[6] provenientes estudos desenvolvidos ao longo de 16 anos na região amazônica e amostras protótipos	83
Figura 12	Análise das sequências de aa da proteína VP7 de amostras de rotavírus G2 que circularam na região amazônica ao longo de 16 anos, representantes das diferentes linhagens.	86
Figura 13	Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica da região codificante do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras de RV-A genótipo G2 provenientes estudos desenvolvidos ao longo de 16 anos na região amazônica e amostras protótipos representantes de humanos e animais.	91
Figura 14	Análise temporal de amostras de rotavírus G2 que circularam no período de 1992 a 2008.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – Graus centígrados
μL – Microlitro
aa- Aminoácido
dsRNA – segmentos de ácido ribonucléico
EGPA – Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida
g – Grama
g/cm³- Gramas por centímetro cúbico
ID – Intestino delgado
IgA- Imunoglobulina A
IgG- Imunoglobulina G
kDa- Quilodáltons
mg – Miligrama
mL – Mililitro
NaOH – Hidróxido de sódio
nm – Nanômetro
NSP- Proteína não estrutural
NSPs – Proteína não estrutural
RNA – Ácido ribonucléico
rpm – Rotações por minuto
RV-A – Rotavírus do grupo A
RVs - Rotavírus
SGs- Sorogrupos
TA – Temperatura ambiente
TGI – Trato gastrointestinal
VP- Proteína estrutural
VR- Região de variação

1-INTRODUÇÃO:

O Brasil é um país em processo de desenvolvimento sócio econômico, onde desnutrição, morbidade e a mortalidade infantil ainda atingem números importantes, embora tenham diminuído significativamente nos últimos 30 anos (SOÁREZ *et al.*, 2008).

Uma das principais causas de morbimortalidade infantil são as doenças diarreicas agudas, que atingem tanto os países desenvolvidos quanto os subdesenvolvidos. Nestes, a doença pode atingir níveis alarmantes de desnutrição e morte. A morbidade associada à diarreia é muito importante, visto que crianças são acometidas por 1 a 10 episódios ao ano. Embora a mortalidade infantil associada ao rotavírus (RV) seja baixa nos países desenvolvidos, sua relevância está relacionada ao impacto da doença na população, afetando o desenvolvimento infantil bem como a sociedade pelos custos gerados pela demanda aos serviços médicos e via despesas indiretas causados pela doença. Os custos associados com diarreia por RV nos Estados Unidos foram estimados em 100-400 milhões de dólares para o sistema de saúde e de 1 bilhão para a sociedade (VRANJAC, 2004; PIET *et al.*, 2009).

A doença diarreica é uma síndrome que se caracteriza pelo aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou de pouca consistência, podendo estar acompanhada de vômito, febre e dor abdominal. As complicações se devem à desidratação e ao desequilíbrio hidroeletrolítico, sendo este relacionado com frequência a tratamentos instituídos de forma inadequada, podendo levar ao óbito quando associado à desnutrição (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

As doenças diarreicas agudas são de etiologia diversa, podendo ser causadas por bactérias, enteroparasitas e vírus. Os vírus são uma das principais causas dessas doenças, dentre eles os RV, que produzem um espectro clínico que os caracteriza como importante causa de diarreia em crianças menores de 5 anos de idade em todo o mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Este agente atinge não somente humanos, mas também outros mamíferos e aves (LINHARES e BRESEE, 2000).

Globalmente, os rotavírus do grupo A (RV-A) causam aproximadamente, 114 milhões de episódios diarreicos, 2,5 milhões de visitas ambulatoriais, 2,4 milhões de hospitalizações e 527.000 mortes entre crianças de até 5 anos de idade (PARASHAR *et al.*, 2009,, MADHI *et al.*, 2010, WULAN *et al.*, 2010). Do total de mortes estimadas, aproximadamente 230.000 ocorrem na África Sub-Saariana. Seis dos sete países com maior mortalidade por RV-A estão localizados na África (MADHI *et al.*, 2010).

Na América Latina e Caribe, os RV-A causam anualmente cerca de 10 milhões de casos diarreicos, 2 milhões de visitas hospitalares, 75.000 hospitalizações e 15.000 mortes (de OLIVEIRA *et al.*, 2008). No Brasil, estima-se que os RV-A causem 3.352.053 episódios de diarreia, 655.853 visitas para cuidados de saúde, 92.4535 hospitalizações e 850 mortes de crianças menores de 5 anos de idade. Infecções por RV-A atingem quase todas as crianças com até 5 anos de idade, independentemente da condição sócio-econômica e do país de origem (SOÁREZ *et al.*, 2008).

Os RV pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. A partícula viral não possui envelope, sendo constituída por três camadas proteicas concêntricas e pelo genoma viral reunindo 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA). Reconhecem-

se 23 genótipos G e 32 genótipos P (TROJNAR *et al.*, 2008; ABE *et al.*, 2009; URSU *et al.*, 2009).

A gastroenterite causada por RV-A tende a ser mais grave do que a por outros patógenos virais. A tríade de sintomas, caracterizada por febre, diarreia e vômito pode levar à desidratação de forma rápida. Na verdade, vômito grave tende a impedir o uso de reidratação oral nos casos mais graves (BAHL *et al.*, 2005). Este fato explica a elevada mortalidade por RV-A em áreas onde o acesso a assistência médica é deficiente (ROSE *et al.*, 2009).

As infecções são mais frequentes nos meses frios e secos (DENNEHY, 2008) e apresentam ciclos anuais, bianuais e quinquenais (BISHOP, *et al.*, 1983), nas regiões de clima tropical a sazonalidade dos RV-A é menos pronunciada com maior concentração nos meses mais quentes do ano (BERNSTEIN, 2009).

Os sorotipos G1-G4 e G9, em combinação com o genótipos P1A[8], P1B[4] e P1B[6], compreendem cerca de 95% das detecções de RV-A em todo o mundo; G1P1A[8] é a cepa predominante no mundo e na América do Norte (DENNEHY, 2008; O'RYAN, 2008; ESPARZA-AGUILAR *et al.*, 2009). Estudos recentes tem relatado o genótipo G12 (em combinação com P1B[6] ou P1A[8]) como cepa emergente em todo o mundo (WULAN *et al.*, 2010).

Com a introdução de vacinas contra RV-A é esperado um declínio significativo das mortes por diarreia entre crianças, fato este que já é observado no México e Estados Unidos (CORTESE *et al.*, 2010; RICHARDSON *et al.*, 2010). Estima-se que a vacinação contra RV-A evite 228.000 mortes anualmente em todo mundo (RHEINGANS *et al.*, 2009). Até o momento, quatorze países da América Latina (Brasil, Equador, El Salvador, Panamá, Nicarágua, México, Venezuela, Peru, Ilhas Cayman, Bolívia, Colômbia, Paraguai, Guatemala e Guiana), introduziram uma

vacina anti-RV-A em seu calendário nacional de vacinação (de OLIVEIRA *et al.*, 2008; PAHO, 2009).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1. ROTAVÍRUS:

2.1.1. Histórico:

Os RV foram descritos pela primeira vez em 1963, quando se observavam, à microscopia eletrônica, amostras fecais de macacos e camundongos. Somente dez anos depois um vírus similar, com característica estrutural esférica semelhante a uma roda, foi observado em amostra de crianças com diarreia (EBRAHIM, 2008). Receberam inicialmente a denominação de Duovírus. Devido ao seu aspecto radiado, esses agentes se designaram, posteriormente, rotavírus. No Brasil foram detectados pela primeira vez por Linhares *et al.* (1977), nas fezes de crianças atendidas em um hospital público de Belém, Pará.

Após a descoberta dos RV, devido a sua relevância na etiologia da diarreia aguda e associação com altos índices de mortalidade infantil, vários estudos foram conduzidos em nível mundial, buscando o conhecimento do vírus e da doença associada, para assim evitar a perda de milhares de vidas em todo o mundo (CUNLIFFE *et al.*, 1998; FRÜHWIRTH *et al.*, 2000; KOSHIMURA *et al.*, 2000; LINHARES e BRESER, 2000; CARNEIRO *et al.*, 2005; LUZ *et al.*, 2005; SANTOS e HOSHINO, 2005).

2.1.2. Taxonomia e classificação viral

Os RV apresentam três especificidades antigênicas, quais sejam, grupo, subgrupo e genótipo. O gênero *Rotavirus* inclui sete grupos (A-G) designados por relações antigênicas e perfis de migração dos segmentos de dsRNA, a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Os grupos A, B e C têm sido identificados somente em seres humanos sendo o A o mais importante em associação com gastroenterites (HOSHINO *et al.*, 1994; MARTINEZ-LAZO *et al.*, 2009; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008).

Historicamente, a VP6 foi a primeira proteína dos RV a ser usada para efeito de classificação. Tanto a VP6 como a VP4 constituem proteínas imunogênicas do vírus. Após a infecção, anticorpos para VP6 são facilmente detectados (SVENSSON *et al.*, 1999; CIARLET *et al.*, 2002; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008), e a grande maioria dos ensaios diagnósticos sorológicos são baseados na detecção dessa proteína. A VP6 possui diferentes epítomos que permitem distinguir subgrupos (SG) distintos do grupo A. Os RV apresentam quatro SGs (I, II, I+II e não I/não II), definidos de acordo com a reatividade frente a dois anticorpos monoclonais (MAbs) (DESSELBERGER, 1996; CIARLET *et al.*, 2002; LEITE *et al.*, 2008; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008). O SG II, mais comum entre seres humanos, e o SG I, encontrado principalmente entre amostras de origem animal. Entretanto, com base em caracterização molecular foram diferenciados dentro dos RV-A humanos dois grupos, os genogrupos, (genogrupo I: SG I, e genogrupo II: SG II, SG I+II e SG não I/não II) (ITURRIZA-GÓMARA *et al.*, 2002).

Em 1985, um esquema de classificação para o RV foi proposto, considerando a presença de múltiplos “grupos” e a existência dos sorotipos (GRAHAM e ESTES, 1985). Em 1989, um sistema de classificação binária foi estabelecido, derivado de reações sorológicas e da estrutura do gene de duas proteínas do capsídeo: VP4 e VP7 (CIARLET *et al.*, 2002; CUNLIFFE e NAKAGOMI, 2007). Variantes da glicoproteína VP7 definem o tipo G e as da VP4, proteína sensível à protease o tipo P. A classificação em VP7 e VP4 anteriormente era definida por neutralização e sorotipagem. Recentemente, esta determinação passou a ocorrer por genotipagem. Até o momento, 23 tipos G (14 sorotipos G) e 31 diferentes tipos P (14 sorotipos P, 1A,1B e 2-14) foram identificados (LEITE *et al.*., 2008; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008; SOLBERG *et al.*, 2009). Descreve-se o tipo P acompanhado do número de sorotipo/genótipo correspondente entre colchetes, e o G-tipo com o G acompanhado do número. Recentemente, um novo sistema de classificação para os RV foi proposto, para o qual se utilizariam os 11 segmentos genômicos dos RNA (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008).

A extensa variação genética e rearranjo dos 11 segmentos de RNA de dupla fita resultou na presença de um amplo espectro de diferentes genótipos de RV em seres humanos e animais (MAES *et al.*, 2009). O genoma segmentado do RV permite sua visualização em 11 bandas distintas e facilita a análise do seu perfil quando submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Há padrões variados de migração em diferentes linhagens do vírus dentro de um mesmo grupo, o que é conhecido como eletroferotipo. A classificação é estabelecida a partir das diferenças de mobilidade do 10º segmento, para as amostras de padrões “longo” e “supercurto”, e migração do 11º segmento classifica as amostras de padrão “curto” de migração. A característica do modelo eletroforético de RNA de RV-A consiste em

quatro classes contendo os segmentos 1-4, 5 e 6, 7-9, e 10 e 11 (WARD *et al.*, 2008). A classificação eletroforética do RV é amplamente utilizada em estudos epidemiológicos, por cada cepa possuir um perfil de RNA ou eletroforético característico (TANIGUCHI e URASAWA, 1995; WARD *et al.*, 2008).

2.1.3. Estrutura viral

Muitos estudos foram realizados para se obter o conhecimento sobre a estrutura do RV. Descobriu-se, então, através de uma imagem baseada em eletromicroscopia, tratar-se de um vírus com aproximadamente 100 nm de diâmetro, contendo capsídeo composto por 3 camadas de proteínas concêntricas que foram denominadas capsídeo externo, intermediário e interno (core); este, circundando o genoma viral. Uma camada é formada por 780 moléculas da proteína viral 7 (VP7) glicoproteína, e 60 dímeros ou trímeros da proteína VP4, que formam projeções de 11-12 nm a partir da camada de VP7. A proteína VP4 esta localizada no capsídeo externo da partícula, sendo composta por 780 moléculas da proteína VP6 (YODER e DORMITZER 2006).

A camada interna contem 120 moléculas de VP2 que interagem com 12 moléculas de transcriptase viral (VP1) e guanililtransferase (VP3) ao longo de 11 segmentos do genoma de RNA de dupla fita (dsRNA) de polaridade positiva. Esses segmentos variam de 660 a 3300 pares de base (pb), codificando seis proteínas estruturais (VP1 a VP6) e outras seis não-estruturais (NSP1 a NSP6) (Figura 1) (SHAW *et al.*, 1993; YEAGER *et al* 1994; PRASAD e CHIU 1994; WARD 2008;

WARD *et al.*, 2008). Cada segmento codifica uma proteína específica (Figura 2). Estudos com a estirpe símia SA11 de RV identificaram uma sexta proteína não-estrutural, codificada pelo segmento 11 do genoma viral, sendo este o único a codificar mais de uma proteína (MATTION *et al.*, 1991).

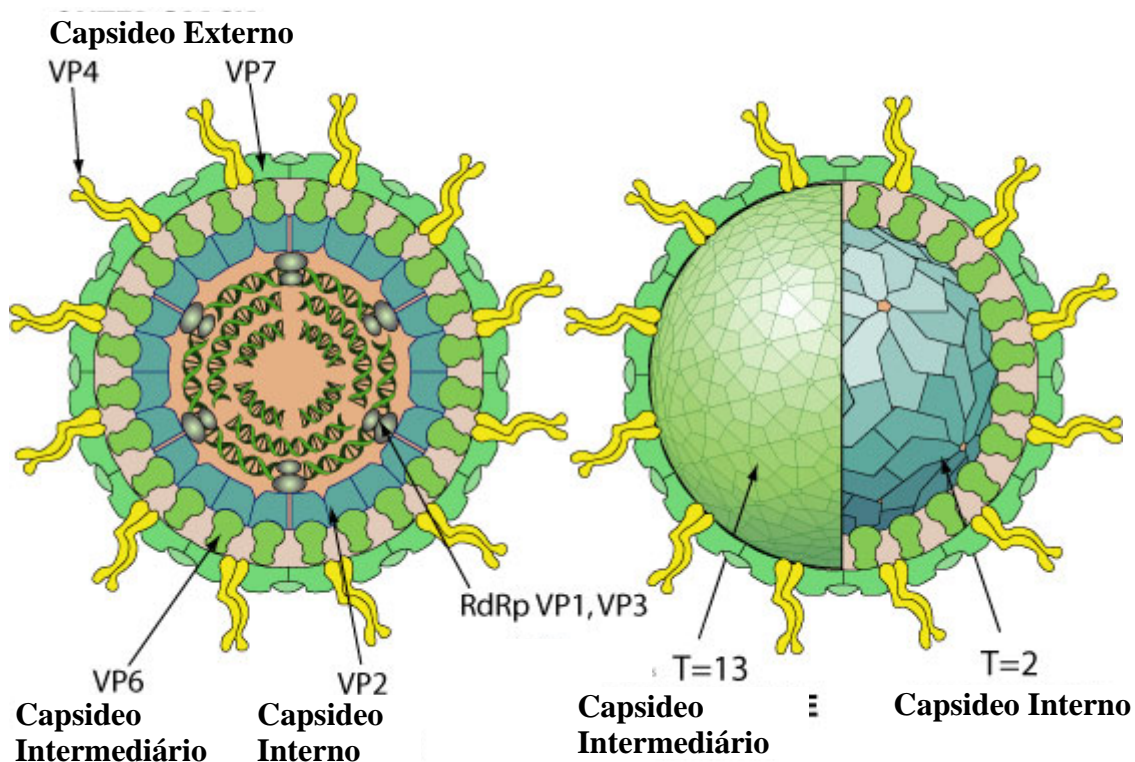


Figura 1: Representação esquemática da partícula viral do RV mostrando as principais estruturas e proteínas virais (Fonte: expasy.org/viralzone/complete_by_species/107.html).

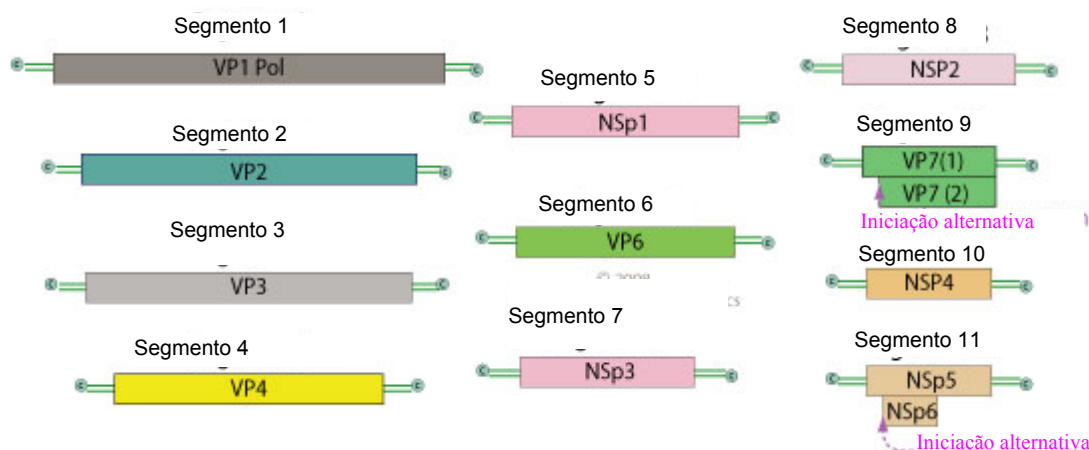


Figura 2: Representação esquemática dos segmentos genômicos com suas proteínas codificadoras (Fonte: [www.expasy.ch/viralzone/all by especies/107.html](http://www.expasy.ch/viralzone/all%20by%20species/107.html))

No core viral, as proteínas VP1 (*Pol*) e VP3 (*Cap*) estão diretamente associadas ao genoma. A proteína VP2 constitui a capa. A proteína VP1 possui atividade de RNA polimerase, RNA-dependente; enquanto que a proteína VP3 tem atividade de guanililtransferase, estando envolvida na adição da estrutura 5' -*cap* presente nos RNAs mensageiros. O capsídeo intermediário é formado por VP6. O capsídeo externo é composto por duas proteínas, VP4 e VP7, que são responsáveis pelas interações iniciais do vírus com a célula hospedeira. A VP4 contém um sítio de clivagem pela tripsina e, quando submetida ao tratamento com protease *in vitro*, desdobra-se dois produtos, as proteínas VP5* e VP8*, aumentando o potencial infeccioso viral (ESTES, KAPIKIAN, 2007).

As partículas de RV apresentam atividade de RNA-polimerase dependente (ESTES, KAPIKIAN, 2007). Essas partículas virais purificadas possuem gradientes de sedimentação distintos, com densidades de $1,44 \text{ g/cm}^3$ para partículas com capsídeo simples, $1,38 \text{ g/cm}^3$ para partículas com capsídeo duplo e $1,36 \text{ g/cm}^3$ para partículas com capsídeo triplo (BICAN *et al.*, 1982).

Na estrutura dos RV, três tipos de canais podem ser diferenciados com base em sua posição e tamanho, sendo 12 tipos I, 60 II e 60 III. Estes canais estão envolvidos na importação de metabólitos requeridos para a transcrição do RNA e exportação do transcrito nascente de RNA para subseqüente processo de replicação viral (ESTES, KAPIKIAN, 2007; PESAVENTO *et al.*, 2003).

2.1.4. Organização estrutural do genoma

O conhecimento da organização estrutural do genoma dos RV assume uma grande importância devido ao íntimo envolvimento do genoma com várias atividades enzimáticas dentro do capsídeo (JAYARAM *et al.*, 2004).

As partículas virais possuem a sua própria RNA-polimerase, dependente de RNA, a fim de transcrever cada segmento de RNA em RNAs mensageiros. Cada segmento de RNA, no sentido 5', inicia com uma guanidina, seguindo-se um conjunto de sequências conservadas que são parte da região “não-codificadora “ 5'. Segue uma “fase aberta de leitura” (ORF, *Open Reading Frame*), a qual codifica uma proteína que finaliza o códon de “terminação”, seguida por um conjunto de sequências “não-codificadoras” (ESTES, KAPIKIAN, 2007).

Quase todos os RNAs mensageiros terminam com uma sequência “consenso” 5'-UGUGACC-3', sendo que estas desencadeiam sinais importantes para a expressão gênica e replicação (WENTZ *et al.*, 1996). Os tamanhos das regiões “não-codificadoras”, nas extremidades 5' e 3', são variáveis para os diferentes genes e todos os genes sequenciados possuem pelo menos uma ORF longa depois do

primeiro códon de iniciação (ESTES, KAPIKIAN, 2007). A expressiva conservação das sequências terminais nos segmentos genômicos sugere que elas contêm importantes “sinais” para a transcrição, transporte de RNA, replicação, montagem ou empacotamento dos segmentos genômicos (PATTON e SPENCER, 2000).

Análises por crioeletromicrografia do RV detectaram uma notável habilidade do genoma dos RV de submeter-se à condensação e expansão reversível dentro do interior do capsídeo (PENSAVENTO *et al.*, 2001; JAYARAM *et al.*, 2004). Esses estudos forneceram informações adicionais na organização estrutural do genoma e natureza das interações entre este e as proteínas internas. Na presença de pH elevado com íons de amônio, o genoma, que possui um raio original de 220Å, sofre condensação a um raio de 180Å, e quando trazido ao pH fisiológico, o mesmo a expande alcançando seu raio original. O genoma permanece viável, com potencial de transcrição após o retorno ao seu estado original, indicando, dessa forma, que esta transformação é meramente estrutural e o dsRNA não está interrompido covalentemente pelo tratamento com pH elevado. Estes estudos ilustram a estabilidade notável do capsídeo e da superação do genoma, atributos que podem ser exigidos para a realização da transcrição contínua de segmentos múltiplos dentro do capsídeo (JAYARAM *et al.*, 2004).

2.1.5.Mecanismos de evolução dos Rotavírus

Os RV apresentam uma peculiar variação genética e propagação de cepas, a qual se deve a natureza segmentada do genoma. Os RV evoluem por mutações

pontuais, rearranjos do gene e recombinações (RAMIG e WARD, 1991; DESSELBERGER *et al.*, 2001).

Mutações pontuais podem acumular-se e serem repassadas para a progênie, acumulando-se e posteriormente podendo formar novas linhagens e sublinhagens em um mesmo genótipo (ITURRIZA-GOMARA *et al.*, 2001). Os rearranjos são alterações na sequência do segmento genômico, na forma de deleção ou duplicação, são resultados de erros de transcrição de um único segmento e possuem a sequência de um gene. Os rearranjos surgem como produtos de duplicação parcial da ORF do genoma. Uma hipótese para tal é que no momento da transcrição a RNA-polimerase RNA dependente apresente uma falha retornando a sua fita molde, reiniciando a transcrição de diferentes estágios (DESSELBERGER, 1996).

O rearranjo entre cepas é comumente detectado sendo considerado um importante mecanismo evolutivo entre cepas circulantes de RV. Acredita-se ocorrer também rearranjos intergenogrupos os quais já são bem documentados (WARD *et al.*, 1990; PALOMBO *et al.*, 1996).

Outra importante fonte de diversidade consiste na introdução de genes de RV animais, através de transmissão do vírus inteiro ou através de rearranjo. Embora haja poucas evidências epidemiológicas, estudos baseados em hibridização do genoma completo e em sequência e análise filogenética parecem apoiar a hipótese de que a transmissão entre espécies pode ocorrer (GRIFFIN *et al.*, 2002, RAHMAN *et al.*, 2003), entretanto, essas análises geralmente não possam demonstrar linhagem evolutiva direta entre animais recentes e cepas humanas. Na maioria dos casos, sequências de genes das cepas animais segregam, com exceção das amostras humanas, sugerindo uma forte diversificação, quer após o acolhimento de

comutação ou a distribuição desigual de diferentes linhagens filogenéticas em diferentes hospedeiros (BÁNYAI *et al.*, 2004). Nakagomi e Nakagomi (1991 e 2002) forneceram evidências moleculares expressivas para mostrar um próximo relacionamento interespecies entre cepas humanas e animais, ou confirmar a existência de recombinação de cepas de RV na natureza.

2.1.6. Proteínas estruturais

Os RV possuem seis proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7):

VP1: Está localizada no capsídeo interno, possui 125 quilodáltons (kDa) e integra o complexo de replicação. Este complexo atua como uma RNA-polimerase dependente de RNA; entretanto, esta proteína necessita da VP2 para atividade de replicação. A proteína VP1 é a única do *core* que possui uma sequência específica de reconhecimento ao RNA viral (MERTENS, 2004).

VP2: É a proteína mais abundante do *core*, também integra o complexo de replicação por sua capacidade de ligar-se aos dsRNA via seus resíduos N-terminais (JAYARAM *et al.*, 2004).

VP3: Localizada no capsídeo interno. Esta proteína atua como uma guanidil-transferase, metiltransferase e faz parte do complexo de transcrição do vírion, juntamente com VP1, ligando-se ao RNA de fita simples (MERTENS, 2004).

VP4: É uma proteína não glicosilada, possuindo 88 kDa massa molecular, 775 aminoácido (aa) e forma projeções diméricas a partir do capsídeo externo de vírions

maduros (BOTH *et al.*, 1994; ESTES, KAPIKIAN, 2007). A VP4 é codificada e tem sua síntese relacionada ao quarto segmento genômico. Estudos mostraram que a VP4 é a principal mediadora do processo de entrada na célula, estando implicada não somente na adsorção e penetração na célula, como também na hemaglutinação, neutralização e virulência (ESTES, KAPIKIAN, 2007; JAYARAM *et al.*, 2004). Essa proteína é susceptível a proteólise. Clivagens proteolíticas realçam a capacidade infectante viral (ESTES *et al.*, 1981; ARIAS *et al.*, 1996) e facilitam a entrada do vírus na célula. Na proteólise, a VP4 é clivada em VP8* (localizada no segmento N-terminal, a 28kDa) e VP5* (localizada no segmento C terminal, a 60 kDa), que permanecem ligados ao vírion. A VP5* está associada com atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4 e possui epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula. A subunidade VP8* tem sido encontrada exercendo um papel significativo no potencial infeccioso viral e no processo de neutralização. VP8* possui cinco epítomos de neutralização localizados nas posições M1-L10, I35-R44, I55-D66, V115-G123 e L223-P234 (Kovacs *et al.* 2003). O peptídeo VP4 contém grande parte dos epítomos relacionados às reações tipo-específicas (JAYARAM *et al.*, 2004).

VP6: Está localizada no capsídeo intermediário, formada por dois domínios que interagem, um com a proteína VP7 e outro com a VP2. É uma proteína muito presente no vírion, representando 51% do mesmo, com massa molecular de 41kDa, apresenta caráter hidrofóbico e é a principal portadora dos determinantes antigênicos, os quais permitem classificar os RV em diferentes grupos e subgrupos (ESTES, KAPIKIAN, 2007).

A VP6 é codificada pelo sexto segmento genômico, participa da entrada do vírus na célula e da transcrição dos dsRNA. O domínio de trimerização localiza-se

entre os aa 246 e 315, aquele necessário para a formação das partículas de dupla camada situa-se entre os aa 281 e 397. Os resíduos 296 a 259 e 305 são importantes no processo de reconhecimento pelos Mabs de subgrupo (ESTES, KAPIKIAN, 2007).

VP7: É uma glicoproteína localizada no capsídeo externo, com elevada imunogenicidade, induzindo a síntese de anticorpos neutralizantes. É codificada pelos 7°, 8° ou 9° segmentos genômicos. A ORF da VP7 codifica para 326 aminoácidos. A VP7 apresenta nove regiões variáveis (VR1-VR9) e dentro destas, 6 regiões são consideradas sítios antigênicos, região A (aa87-101), região B (aa142-152), região C (aa208-223), região D(aa291), região E(aa189-191) e região F(233-242) (KIRKWOOD *et al.* 1993).

Sob pressão seletiva do hospedeiro, essa proteína apresenta alterações em seus epítomos que expressam diferentes genótipos (ESTES, KAPIKIAN, 2007). Postula-se que a VP7 pode modular a função da VP4 durante os processos de adsorção e penetração na célula e pode interagir com moléculas de superfície após a interação iniciada com VP4 (MENDEZ *et al.*, 1999; JAYARAM *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado que concentrações adequadas de cálcio (Ca^{++}) são necessárias para manter a estabilidade da partícula. Pequenas concentrações de Ca^{++} , como as que ocorrem no citoplasma, provocam a formação de partículas incompletas ou *double-layered particles* (DPLs), que são ativadas para transcrição e necessárias no ciclo de replicação do vírus (ESTES, KAPIKIAN, 2007).

2.1.7. Proteínas não estruturais

Os RV possuem seis proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6), as quais são encontradas na célula infectada mas não no vírion. As proteínas não estruturais dos RV participam dos complexos de replicação pela capacidade de se ligarem ao RNA e atuarem como chaperonas de transporte. Além disso, participam dos sítios de replicação e montagem viral, bem como na condução dos segmentos para o processo de encapsidação (ESTES e COHEN, 1989). A NSP1 é codificada pelo 5° segmento genômico, estando associada com o citoesqueleto celular e facilita a ligação do vírus à célula. É uma glicoproteína pouco conservada, com relativa variabilidade de sequências. Não é uma proteína essencial para a replicação (MERTENS, 2004).

A proteína NSP2 é codificada pelo 8° segmento, é altamente conservada e expressa significativamente em células infectadas, localizando-se no viroplasma. A NSP2 teria três diferentes funções: NTPase (Nucleotídeo trifosfatase), RNA ligante e desestabilizadora da dupla hélice do RNA viral (JAYARAM *et al.*, 2004). Essa proteína pode associar-se com a NSP5 e envolver-se nos processos de replicação e encapsidação do RNA. A NSP2 pode desestabilizar hélices de ácidos nucleicos e atuar como NTPase (ESTES, KAPIKIAN, 2007; MERTENS, 2004).

A NSP3 encontra-se envolvida na tradução dos transcritos virais. Possui conformação de um homodímero, reconhecendo a sequência consenso 3' do RNA mensageiro (RNAm) e favorecendo a tradução dos transcritos de RNAm aos ribossomos, além de prevenir a degradação dos mesmos por nucleases celulares (DEO *et al.*, 2002; JAYARAM *et al.*, 2004).

A NSP4 é uma proteína de múltiplas funções na morfogênese do RV e na patogenia da doença por tal agente viral. É codificada pelo segmento 10 e possui três domínios hidrofóbicos, H1, H2 e H3 que se encontram na porção N-terminal. O gene de NSP4 tem sido classificado dentro dos grupos A, B e C. O grupo A compreende cinco genótipos: A (KUN), B (Wa), C (AU-1), D (EW) e E (avian-like) (CIARLET *et al.*, 2000; ITO *et al.*, 2001, MORI *et al.*, 2002; MASCARENHAS *et al.*, 2007). A NSP4 possui dois sítios de glicosilação, localizando-se em uma pequena alça no lúmen do retículo endoplasmático (RE), um domínio transmembrana, um domínio de oligomerização, um sítio de ligação com VP4 e uma região de aproximadamente 20 aa para ligação com o capsídeo imaturo (VP6) (HUANG *et al.*, 2004). O peptídeo da NSP4 correspondente aos resíduos 48-91 aa, é capaz de desestabilizar a membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER), com lise do mesmo e levando a um aumento de Ca^{++} , efeito potencializado na presença do peptídeo para as regiões 48-175. A somatória desses eventos gera uma diarreia de natureza secretora (ESTES, KAPIKIAN, 2007; HUANG *et al.*, 2004).

A NSP5 é codificada pelo 11° segmento e apresenta atividade compatível com uma autoquinase. A NSP5 em células não infectadas atua na NSP2, de forma a induzir a hiperfosforilação de NSP5. Durante a replicação, as proteínas NSP2, NSP5 e NSP6 estão associadas à formação de viroplasmas. A proteína NSP6 é codificada por uma ORF do 11° segmento e encontra-se principalmente no viroplasma e interage com NSP5, evidenciando sua participação na replicação e encapsidação do vírus (ESTES, KAPIKIAN, 2007).

2.1.8. Epidemiologia

As enfermidades infecciosas continuam sendo a primeira causa de morte na população infantil, representando 80% da morbidade dos casos pediátricos, sendo a diarreia uma das enfermidades mais frequentes em crianças menores de 5 anos, com mortalidade envolvendo 3 a 5 milhões de crianças ao ano, a maioria nos países em desenvolvimento (DEL AMO *et al.*, 2006).

Os RV-A são a principal causa de gastroenterite na população pediátrica, estando relacionados a elevada frequência de infecções, que podem produzir doença em espectro que abrange desde quadros brandos até a diarreia grave, com vômito, dor abdominal e febre, resultando em desidratação pronunciada, com subsequente desequilíbrio hidroeletrolítico, choque e morte (KAPIKIAN *et al.*, 2001; DOAN *et al.*, 2003; MOTA-HERNANDEZ *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2003; MCCORMACK e KEAM, 2009). Os RV-A também podem causar diarreia na população adulta, de maneira esporádica ou ocasionalmente em surtos (PAUL *et al.*, 2008).

Estima-se que esses vírus sejam responsáveis por 39% das hospitalizações devido a doenças gastrointestinais entre crianças em todo o mundo (WARD, 2008; MCCORMACK e KEAM, 2009). Os RV-A infectam crianças em proporções comparáveis nos países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento; virtualmente, todas as crianças se infectam por RV-A até os 5 anos de idade (PARASHAR *et al.*, 2003; MCCORMACK e KEAM, 2009). Entretanto, a grande maioria dos relatos de morte por RV-A ocorre nos países em desenvolvimento (Sul da Ásia e África Subsaariana) (PARASHAR *et al.*, 2006; MCCORMACK e KEAM,

2009). Cerca de 23% das 527.000 mortes anuais por RV-A ocorrem na Índia (OMS, 2009).

Os RV-A são responsáveis por cerca de 700.000 visitas médicas, pelo menos 87.000 hospitalizações e aproximadamente 231 mortes a cada ano na União Européia (SORRIANO-GABARRO *et al.*, 2006). De forma similar, os RV-A ocasionam cerca de 410.00 visitas médicas, de 55.000 a 70.000 hospitalizações e de 20-60 mortes anualmente nos Estados Unidos. Entre crianças menores de 5 anos de idade neste país, 17% das hospitalizações por gastroenterites associadas aos RV-A ocorrem durante os 6 primeiros meses de idade, com 40% ocorrendo no primeiro ano e 75% até os dois anos de vida (PARASHAR *et al.*, 2006; CURNS *et al.*, 2009; MCCORMACK e KEAM, 2009).

Infecções por RV-A têm sido relatadas em todo mundo. As combinações mais comumente detectadas em humanos são P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3, P[8]G4, P[6]G9, P[8]G9 (SANTOS *et al.*, 2007) e, mais recentemente, P[6]G12 ou P[8]G12 (MATTHIJNSSENS, *et al.*, 2010). Na Filadélfia, os tipos G1, G2 e G9 predominaram ao longo dos últimos 14 anos (CLARK *et al.*, 2009). Em 2006, um estudo realizado nos Estados Unidos mostrou que 84% dos genótipos de RV-A circulantes foram P[8]G1, seguida por P[4]G2 e P[6]G12 (PAYNE *et al.*, 2010).

No Quênia, o genótipo G1 foi o mais observado no ano de 2002. Posteriormente, o G9 emergiu como o predominante, seguindo-se de um genótipo menos frequente, o G8 (KIULIA *et al.*, 2008). Um estudo na Indonésia mostrou a ocorrência de uma grande variedade de tipos G (G1, G2, G3, G4, G8 e G9) e tipos P (P[4], P[6], P[8], P[9], P[10] e P[11]), sendo P[8]G1 a combinação mais frequente (WULAN *et al.*, 2010). No Japão, no período de julho de 2005 a junho de 2006 um

estudo mostrou que o genótipo P[8]G1 esteve presente em 70,1% dos casos, seguido por P[8]G3 (17,9%), P[8]G9 (6,8%) e P[4]G2 (2,6%) (PHAN *et al.*, 2007). Na Tunísia, um estudo realizado entre 2000 e 2007 revelou ser G2 o genótipo com maior ocorrência (32,7%), sendo ainda detectados G1, G3, G4, G8 e G9 (CHOUIKHA *et al.*, 2009). Na Índia um estudo desenvolvido no período de 2004 a 2008, detectou o genótipo G1 em 38% dos casos, seguidos por G3 (16,5%), G2 (15,2%), G9 (10,1%) e G4 (5,1%), sendo que as combinações G-P mais comuns foram P[8]G1, P[6]G3, P[6]G1 e P[4]G2 (MISHRA *et al.*, 2009).

Na América do Sul, os tipos G1, G2, G3 e G4 correspondem a 68% dos RV-A circulantes (SANTOS e HOSHINO, 2005). O genótipo P[8]G9 foi encontrado principalmente na América Latina (ARAÚJO *et al.*, 2001). No Paraguai, o G9 ocorreu em 5,7% dos casos de diarreia associada ao RV-A no período de 1999-2000 (COLUCHI *et al.*, 2002), sendo que no período de 2002 a 2005 o genótipo G9 foi o mais predominante (PARRA *et al.*, 2007).

Estudos desenvolvidos no Brasil entre 1986 a 2006 mostraram que mais de 51 genótipos foram detectados. Destes os mais prevalentes foram P[8]G1, P[8]G9 e P[4]G2 (GURGEL *et al.*, 2008). No período de 1997-1999 o genótipo G9 foi o terceiro mais frequente em duas cidades brasileiras. No período de 1999-2002 o G9 esteve presente em 78% dos casos de RV-A na Bahia, Brasil (SANTOS *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2005; LINHARES *et al.*, 2006, LEITE *et al.*, 2008). Um estudo realizado em São Paulo, Brasil, mostrou que em 2004 os genótipos P[8]G9 e P[8]G1 obtiveram maior frequência, sendo P[8]G1 foi o mais prevalente em 2005, e em 2007 o genótipo P[4]G2 obteve maior incidência (MORILLO *et al.*, 2010).

No Brasil, a mortalidade por diarreia aguda em crianças de até 5 anos de idade apresenta significativa variação por região geográfica, sendo maior nas

regiões Norte e Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). No período de 1980 a 2002, o Brasil obteve uma redução de 91,5% no índice de mortalidade infantil. Nesse mesmo período, a taxa de mortalidade infantil atribuída a diarreia reduziu de 41% para 4,7% (VICTORA e BARROS, 1993; BRASIL 2004; CONSTELA *et al.*, 2008). Entre 1999-2004 esses índices reduziram de 11% para 4% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Milli e Waldman (2009) demonstraram um expressivo declínio da mortalidade por diarreia entre menores de 5 anos (98%) no município de Osasco, SP, nas décadas de 1980 e 1990. Estudos desenvolvidos no País indicam redução semelhante da morbimortalidade no mesmo período, bem como da gravidade das diarreias na infância (figura 3) (LEITE *et al.*, 2008).

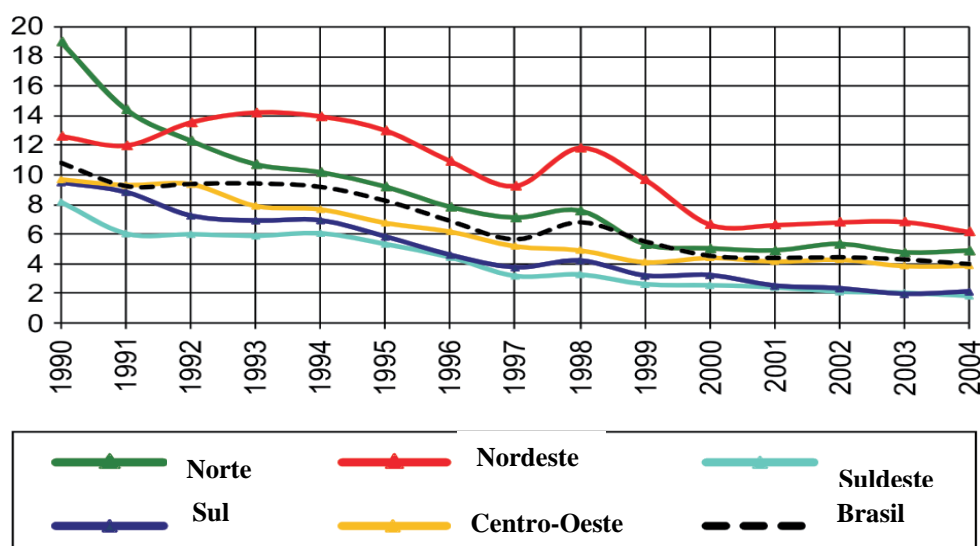


Figura 3: Mortalidade por doença diarréica (%) em crianças menores de cinco anos de idade no período de 1990-2004 em distintas regiões do Brasil (Adaptado de LEITE *et al.*, 2008).

Embora tenham ocorrido melhoras nas condições sanitárias no Brasil, as gastroenterites permanecem como um agravo significativo para a saúde na infância. Em 2002 elas foram responsáveis por cerca de 3.000 mortes no país, representando uma taxa de 19,6 mortes por 100.000 crianças menores de cinco anos de idade ao ano. Os bebês são os mais vulneráveis, representando 81,8% de todas as mortes devido a gastroenterite (BRASIL 2004; CONSTENLA *et al.*, 2008).

Dados do Ministério da Saúde, divulgados em 2009, informam que nos anos de 2006, 2007 e 2008 os índices de positividade para RV-A no Brasil foram de 16,8%, 21,7% e 36,6%, respectivamente, podendo-se observar que esses foram crescentes no decorrer dos anos, talvez por mais efetiva notificação. Para a região Norte, os valores de positividade foram de 26,6% (2006), 36,2% (2007) e 33,3% (2008). Dentre as regiões brasileiras, nos anos de 2006 e 2007, as que apresentaram valores mais expressivos foram nas regiões Norte com percentual de 30,8% e Nordeste com 30,1%, seguidos das regiões Sudeste (22,9%), Sul (10,4%) e Centro-Oeste (5,8%).

Os RV-A de origem humana exibem uma ampla diversidade. Existem 42 diferentes sorotipos G-P combinados (GENTSCH *et al.*, 2005; DENNEHY, 2008). Entretanto, um pequeno número de sorotipos G (G1, G2, G3, G4 e G9) e genótipos P (P1B[4], P2A[6] e P1A[8]) predominam em todo mundo. As combinações mais comuns de G1P[8], G3P[8], G4P[8], G2P[4] e G9P[8] tem sido relatadas em mais de 90% das infecções por RV-A (SANTOS e HOSHINO, 2005; DENNEHY, 2008). Na Europa, a análise de amostras coletadas de 1973-2003 indicam que G1P[8] é o genótipo mais prevalente, ocorrendo em 69,4% das infecções por RV-A (GRAY *et al.*, 2008).

As taxas de detecção nacional de RV-A, ao longo de três períodos, sendo que o último corresponde a uma fase pós implantação da vacina contra RV-A no Programa Nacional de Imunizações, são mostrados na figura 4 (LEITE *et al.*, 2008).

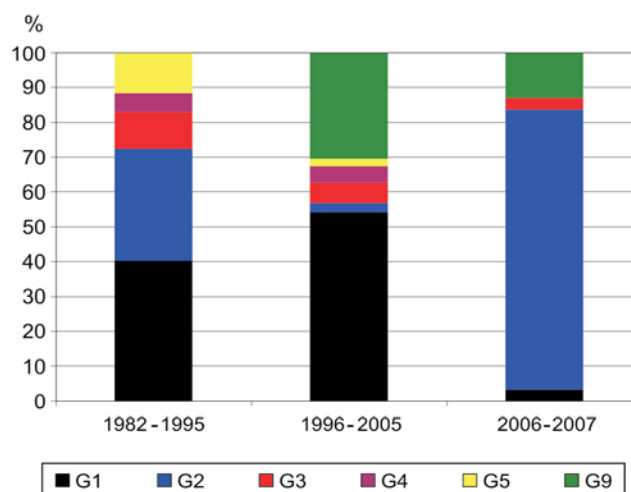


Figura 4: Distribuição de tipos G ao longo de 25 anos no Brasil (adaptado de LEITE *et al.*, 2008).

Os genótipos G e P são peculiarmente distribuídos entre seres humanos e animais, sugerindo barreiras de espécie e restrição no hospedeiro. As cepas G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] são globalmente predominantes nos seres humanos (ESTES, KAPIKIAN, 2007). Entretanto, têm surgido RV humanos com genótipos G incomuns (G5, G6, G8, G10 e G12) e P (P[3], P[6], P[9], P[11] e P[14]), fato estes envolvendo rearranjos genéticos naturais entre cepas humanas e animais; especialmente bovinos e suínos (SANTOS e HOSHINO, 2005; GHOSH *et al.*, 2007; NGUYEN *et al.*, 2007; RAHMAN *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008; PARRA *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2008; DHAMA *et al.*, 2009). Muitos genótipos G tipicamente de animais, como bovinos e suínos, têm sido encontrados em seres humanos, assim

como vários característicos das infecções humanas têm sido descritos em animais (GOUVEA *et al.*, 1994, ALFERI *et al.*, 1996, SANTOS *et al.*, 1998).

De acordo com estudos no Brasil, os genótipos G5, G8, e G10 representam uma significativa proporção de casos de diarreia aguda infantil (GOUVEA *et al.*, 1994; LEITE *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 1998). O sorotipo G3 tem sido encontrado em várias espécies animais, como conídeos, murinos, símios, caninos, equinos, bovinos e suínos, ocorrendo também em humanos (BROWNING *et al.*, 1992; KAPIKIAN e CHANOCK, 1996). O RV-A genótipo G9, dos quais o gene VP7 é presumivelmente derivado de um RV suíno, é reconhecido como patógeno emergente para os seres humanos em todo o mundo (HOSHINO *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2007; PHAN *et al.*, 2007). Desta forma os RV animais são considerados reservatórios potenciais que contribuem para a diversidade genética das amostras de origem humana.

O contínuo monitoramento de genótipos de RV-A no Brasil permitiu a identificação de quatro características epidemiológicas desses agentes: (I) a grande diversidade de genótipos G e P circulando simultaneamente em um determinado lugar e período de tempo; (II) o surgimento anormal de genótipos G e /ou P; (III) a detecção de combinações incomuns G+P; (IV) a ocorrência de elevado índice de infecções mistas dos genótipos G e/ou P (FREITAS *et al.*, 2008).

Muitos estudos relatam a ocorrência de infecções mistas entre genótipos de RV, provavelmente refletindo um rearranjo natural entre cepas (MAUNULA *et al.*, 2002; SANTOS e HOSHINO *et al.*, 2005; BARRIL *et al.*, 2006). Em Salento, na Itália, um expressivo percentual de infecções mistas foi detectado: 17,3% para o tipo G e 1,7% para o tipo P (De DONNO *et al.*, 2009). Um estudo conduzido entre adolescentes e adultos durante dois períodos (1993-1996 e 2004-2007) em Pune,

Índia, identificou um elevado índice de infecções mistas (39%-35%) nos dois períodos (TATTE *et al.*, 2010). Um estudo realizado na cidade de Goiânia, Goiás, Brasil, apresenta dados sobre a ocorrência de infecções mistas de RV-A, genótipo P (48%) (FREITAS *et al.*, 2008). Em uma recente revisão realizada no Brasil, as infecções mistas foram detectadas em 7% dos casos (LEITE *et al.*, 2008).

2.1.9. Genótipo G2 de rotavírus do grupo A

O RV-A genótipo G2 se constitui entre todos, o mais variável em suas características genéticas. Este tipo apresenta perfil eletroforético de migração curto, pertence ao genogrupo DS-1, geralmente está associado ao tipo P1B[4] de VP4 e possui especificidades com o SGI de VP6, e NSP4 tipo A (KAPIKIAN *et al.*, 2001). O genótipo G2, até o presente momento, está classificado de acordo com Arista *et al.*, (2005) e Paul *et al.*, (2008) em quatro linhagens, três de origem humana e uma de origem animal.

Estudos têm detectado a ocorrência de RV-A genótipo G2 com modelo longo de migração, fato que pode sugerir um rearranjo genético em condições naturais entre RV pertencentes aos dois maiores genogrupos, o Wa e o DS-1 (WARD *et al.*, 1990; NAKAGOMI e NAKAGOMI, 1991; KAGA e NAKAGOMI, 1994; KRISHNAN *et al.*, 1994; AIJAZ *et al.*, 1996; AHMED *et al.*, 2005). Ahmed *et al.*, (2005) apresentam evidências que sugerem ocorrer rearranjo interespecie entre rotavírus animal e cepas humanas, com posterior evolução para uma cepa capaz de causar infecção sintomática em seres humanos.

A conformação do dsRNA do gene VP7 de RV é desconhecida, no entanto, o dsRNA do gene VP7 de rotavírus G2 pode ter uma conformação única que poderia ser responsável por um flip-over, fenômeno observado em gel de poliacrilamida (ROSS *et al.*, 2008).

Esse genótipo foi constantemente associado a gastroenterite grave em crianças e adultos mais velhos, comparativamente a outros sorotipos comuns que circulam em seres humanos, devido a sua elevada diversidade genética/ antigênica (BERN *et al.*, 1992; CASCIO *et al.*, 2001; MIKAMI *et al.*, 2004; MARTELLA *et al.*, 2005). Entretanto, outros estudos têm demonstrado pouca correlação entre sorotipo/genótipo e gravidade clínica (BARNES *et al.*, 1992; POLANCO-MARIN *et al.*, 2003; ARISTA *et al.*, 2005).

O RV-A genótipo G2 está geralmente associado a surtos de diarreia em crianças e adultos e alguns autores defendem uma ocorrência natural cíclica deste (LINHARES e VELÁZQUEZ, 2008). A natureza deste genótipo ainda reserva aspectos intrigantes, por sua capacidade de ressurgir repentinamente e causar surtos em larga escala depois de ter passado anos sem circular (ZAO *et al.*, 1999).

Os RV-A genótipo G2 foram detectados em Taiwan nos anos de 1981 e 1987 e só foram reaparecer em 1992; sendo os mais prevalentes em um surto de gastroenterites em Taiwan no ano de 1993. Nesse estudo, o gene VP7 foi sequenciado e comparado, todas as amostras foram muito semelhantes entre si, exceção feita a uma amostra de 1981. A análise de VP1 e VP7 demonstrou ter ocorrido mutações comparáveis nos genes ao longo de dez anos e que grandes alterações no gene VP1 de cepas de 1993 sugerem que estes RV-A genótipo G2 evoluíram por recombinação genética (ZÃO *et al.*, 1999).

Em 1997, o genótipo G2 foi o predominante no Sul da África. Durante 1999, o G2 foi detectado em vários países africanos, incluindo Quênia, Nigéria, Gana, Burquino Faso e Tunísia (PAGE e STEELE, 2003). Amostras de rotavirus G2 coletadas em Palermo, na Itália, no período de 2002-2004, apresentaram-se refratárias a anticorpos monoclonais. Em Bangladesh no período de 2004 a 2006 o genótipo G2 foi o mais prevalente em crianças e adultos. Essa predominância foi também observada em vários países como China, Taiwan, Sul da África e Brasil (ARISTA *et al.*, 2005, Leite *et al.*, 2008). Este genótipo foi recentemente detectado em estudo conduzido por Rhamam *et al.* (2007) em Bangladesh, envolvendo crianças hospitalizadas de até 5 anos de idade.

Em Salento, na Itália, o tipo G2 foi o de maior ocorrência (44,9%) no período de 2006-2007, sendo que este associou-se em maioria ao genótipo P[8] (25,7%), esta combinação tem ocorrido nos últimos anos com frequência em várias partes do mundo (SANTOS e HOSHINO *et al.*, 2005). Neste estudo, G2P[4] ocorreu em 23% dos casos, também houve a detecção de uma combinação não usual (G2P[10]) (De DONNO *et al.*, 2009).

No período de dezembro de 2007 a novembro de 2008, os RV-A G2P[4] foram identificados como o genótipo de maior ocorrência na Índia (KANG *et al.*, 2009). Um recente estudo publicado em 2010 mostrou ser o G2 o genótipo de maior ocorrência (45,5%) em Bangladesh, no período de julho de 2005 a junho de 2006 (AHMED *et al.*, 2010). Um estudo conduzido entre adolescentes e adultos durante dois períodos (1993-1996 e 2004-2007) em Pune, Índia, identificou o genótipo G2P[4] como o mais prevalente no segundo período, essas amostras agruparam dentro das linhagens, I e IIb de G2 (TATTE *et al.*, 2010).

O genótipo G2 de RV-A foi detectado em 83,6% das amostras de crianças diarreicas de 0-5 anos que participaram de um estudo no período de 1992-1994 em Belém, Pará (GUSMÃO *et al.*, 1999). Em um estudo com neonatos em Belém, Brasil, Mascarenhas *et al.* (2007) identificaram a cepa G2P[6] em 98% dos casos investigado. No período de 1992-1998, um estudo desenvolvido em Belém, Brasil, Linhares *et al.* (2002) identificaram a presença do G2 em 62,7% dos casos estudados. Em Goiânia e Salvador, no período de 2005-2006, os RV-A genótipo P[4]G2 foram os mais predominantes (MUNFORD *et al.*, 2009).

Uma recente revisão de 12 estudos realizados em Belém, ao longo de 26 anos mostrou que o RV-A genótipo G2 esteve presente em 32,1% dos casos investigados. Nos períodos de 1981-1990, 1982-1986, e 1990-1992, a ocorrência de RV-A genótipo G2 variando entre 14,6% e 26,3%. De 1992- 1994 e 1996-1998 este tipo foi responsável por 76,7% e 60,7% dos casos ocorridos respectivamente. Seguiu-se a essa estação de RV-A genótipo G2, uma queda abrupta nos 5 anos seguintes, chegando a ser não detectado no ano de 2003 e ressurgindo como o genótipo mais prevalente no início de 2006, antes da introdução da vacina contra RV-A (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Em Sergipe, Brasil, um estudo com amostras de 2006-2008, identificou o genótipo G2 de RV-A em 95% dos casos positivos para este vírus (GURGEL *et al.*, 2009). Um recente estudo realizado no Sul do Pará nos anos de 2006 e 2008 identificou o genótipo G2P[4] em 90% das amostras testadas, sendo que estes foram classificados como pertencendo a linhagem II, sublinhagem IIa (2006) e IIc (2008) (MASCARENHAS *et al.*, 2010). O G2P[4] foi o predominante entre as cepas de RV-A que circularam no período de maio de 2008 a maio de 2009, em um estudo

realizado em Belém, Brasil, sobre a efetividade da vacina Rotarix[®] (LINHARES, 2010).

2.1.10.Replicação viral

No processo de replicação viral, somente partículas com triplo capsídeo conseguem aderir-se às células. A proteína VP4 atua no ciclo de replicação, promovendo o reconhecimento do receptor e subsequente penetração celular. A infectividade dos RV *in vitro* é aumentada e depende da presença de tripsina. Este tratamento proteolítico resulta na clivagem de VP4, originando os polipeptídeos VP5* e VP8* que são fundamentais no processo de internalização das partículas na célula (ZÁRATE *et al.*, 2000). *In vivo*, os RV possuem um tropismo celular natural pelos enterócitos maduros do intestino. A replicação ocorre no citoplasma das células absorptivas diferenciadas (figura 5), as partículas infecciosas são liberadas no lúmen intestinal e a replicação continua na área distal do intestino delgado (ESTES, KAPIKIAN, 2007; ZÁRATE *et al.*, 2004).

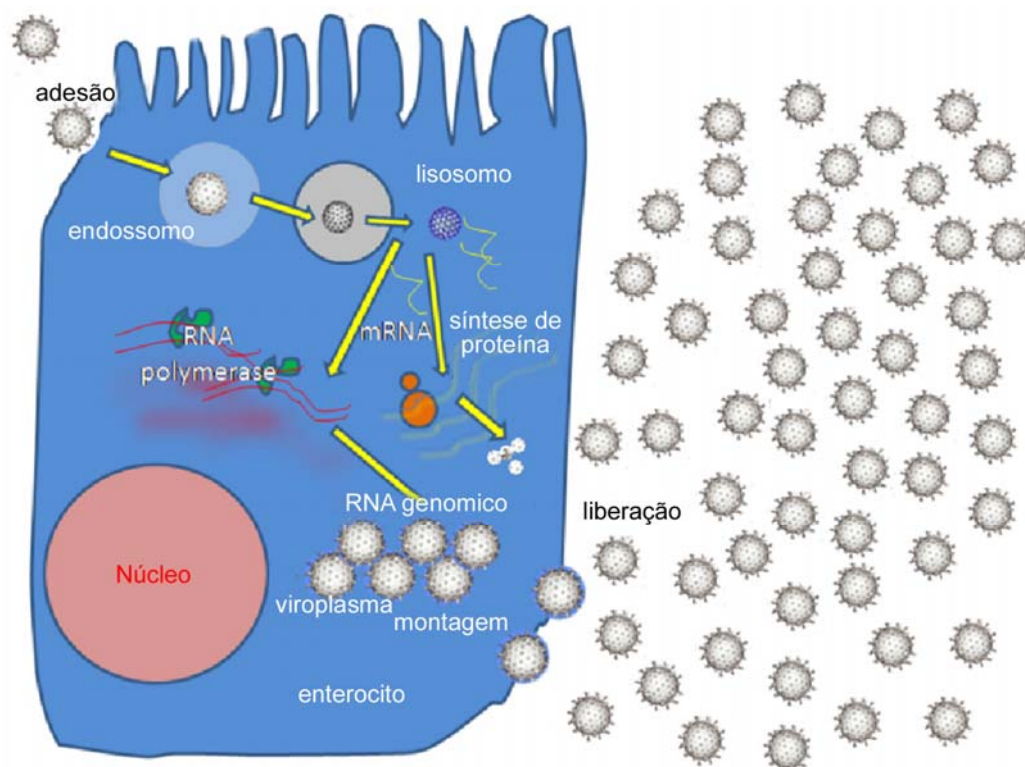


Figura 5: Replicação dos RV (Fonte: commons.wikimedia.org/wiki/File:Rotavirus_rep)

Os receptores para RV incluem gangliosídeos GM1 e GM3, integrinas 21, x2 e v3 e a “proteína de choque térmico” hsc 70 (ARIAS *et al.*, 2001). O ácido siálico pode participar direta ou indiretamente do processo de interação do RV com a célula (KELJO e SMITH, 1988). O ciclo de replicação e a estrutura dos RV são extremamente dependentes da concentração de Ca^{++} no meio (RUIZ *et al.*, 2000). Após a ligação, o vírus é internalizado, sendo que esta não ocorre entre 0°C e 4°C, indicando que esse passo requer processo celular ativo (KELJO e SMITH, 1988).

O mecanismo de entrada do RV na célula ainda é obscuro, mas pode ocorrer por entrada direta com a clivagem de VP4 pela tripsina pancreática ou por endocitose sem acidificação do endossoma (RUIZ *et al.*, 1997). O processo

endocítico é Ca^{++} dependente, a ligação do RV ao receptor celular induz a formação de uma vesícula endocítica, isolando a partícula com capsídeo triplo em um compartimento intracelular. Ocorre redução na concentração do Ca^{++} no interior de vesículas e, equilibrada a concentração de Ca^{++} com o citoplasma, o vírus perde o capsídeo externo e ocorre a lise vesicular, permitindo que partículas com duplo capsídeo passem para o citoplasma, sendo ativas para a transcrição (RUIZ *et al.*, 2000).

A transcrição dos RV e todas as demais atividades inerentes à replicação do genoma e montagem dos vírions são feitas por enzimas virais (IMAI *et al.*, 1983). Os RNAs transcritos pela RNA polimerase RNA-dependente atuam na síntese das proteínas estruturais e não-estruturais, e também servem de molde do RNA para a síntese da fita negativa do material genético (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A maioria das proteínas virais é sintetizada no viroplasma e a formação de novos vírions envolve a participação das proteínas virais do citoplasma e dos viroplasmas. A formação do core com uma cópia de cada um dos 11 segmentos do genoma dos RV é bastante coordenada (PATTON e SPENCER, 2000). Após a formação das partículas de duplo capsídeo elas saem do viroplasma para o interior do RE adjacente. Estas partículas adquirem temporariamente uma camada lipídica dupla e são provisoriamente envelopadas, contêm as proteínas de superfície, VP7 e VP4 e pequenas quantidades das NSPs (PORUCHYNSKY e ATKINSON, 1991). O envelope lipídico é removido levando a formação dos vírions maduros (ESTES; KAPIKIAN, 2007; JAYARAM *et al.*, 2004).

Extensas citólises ocorrem no término da infecção e drásticas alterações na permeabilidade da membrana plasmática em células infectadas resultam na liberação das proteínas celulares e virais. Apesar da lise celular, muitas partículas

com duplo ou triplo capsídeo permanecem associadas com restos celulares, sugerindo interações com estruturas no interior da célula (MUSALEM e ESPEJO, 1985).

2.1.11.Fisiopatologia

Após a ingestão, as partículas de RV são levadas para os enterócitos maduros das porções média e alta do intestino delgado e isso se dá por entrada direta ou por endocitose Ca^{++} dependente (Figura 6) (ANDERSON, WEBER, 2004). Durante a replicação dos vírus nos enterócitos ocorre morte e descamação dessas células, que são substituídas por outras imaturas das criptas intestinais (os enteroblastos), as quais têm capacidade de absorção reduzida. A infecção dos enterócitos é responsável por anomalias estruturais e funcionais do epitélio, originando a diarreia (BLUTT *et al.*, 2007). Observa-se redução da Na/K ATPase, responsável pelo processo de absorção intestinal do Na acoplado à glicose, havendo redução da absorção deste, assim como de água. Há também redução da atividade inerente às dissacaridases, principalmente da lactase, comprometendo o desdobramento dos dissacarídeos e sua absorção, promovendo um aumento da osmolaridade do lúmen intestinal e consequente aumento do afluxo de líquidos. O açúcar não absorvido pode sofrer ação de bactérias que colonizam as porções mais distais do intestino, resultando na eliminação de fezes com pH ácido, resultando na diarreia de natureza osmótica (PEREZ-SCHAEL *et al.*, 2003).

O processo de replicação viral leva à expressão de genes do vírus e à indução de várias citocinas inflamatórias, redução na expressão de genes do enterócito e vacuolização (CASOLA *et al.*, 1998; ROLLO *et al.*, 1999; BOSHUIZEN *et al.*, 2003). Durante a diarreia ocorre diminuição da digestão de açúcares e da absorção de sais minerais e água, aumentando a gravidade da doença (KAPIKIAN, CHANOCK, 1996).

Lesões como a infiltração mononuclear da lâmina própria, distensão da cisterna do RE, aumento mitocondrial e presença de microvilosidades esparsas e irregulares também têm sido relacionadas aos RV (MOON, 1997). Estudos demonstraram a participação da NSP4 dos RV, como uma enterotoxina, induzindo a diarreia (BALL *et al.*, 1996; ESTES e MORRIS, 1999). A proteína NSP4 interage com receptores celulares do epitélio intestinal, ativando uma via de sinalização transducional que aumenta os níveis de Ca^{++} , levando ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática ao Cl^- e da secreção do íon cloreto, induzindo a diarreia (ESTES, KAPIKIAN *et al.*, 2007). A NSP4 pode estar envolvida na estimulação do sistema nervoso entérico através da liberação de aminas/peptídeos por meio de células endócrinas das vilosidades intestinais, pelo efeito da NSP4 no Ca^{++} intracelular (LUNDGREN e SVENSSON, 2001).

Lundgren *et al.* (2000) sugerem que a infecção por RV impede o desenvolvimento dos enterócitos e, posteriormente, afeta a função não apenas do epitélio intestinal, mas também do sistema nervoso. Distúrbio neurológico observado em crianças com infecção por RV onde este infectou o sistema nervoso central causando convulsões (KEIDAN *et al.* 1992; LYNCH *et al.*, 2001).

Infecções graves por RV diminuem os níveis de pp70S6K, pMAPK , prostaglandina E2 e óxido nítrico e aumentam a toxicidade para impedir o desenvolvimento normal dos enterócitos das vilosidades do intestino delgado e com consequente alteração na estrutura e função do epitélio. Essas mudanças são susceptíveis de provocar má-absorção e motilidade gastrointestinal anormal durante infecção por RV (SUREDRAN, 2008).

O quadro clínico geralmente envolve vômitos, febre, diarreia aquosa e desidratação variando de leve a grave, além de dor abdominal. Vômitos e febre geralmente perduram por dois ou três dias, enquanto a diarreia geralmente persiste por cinco a oito dias (LINHARES e BRESEE, 2000). Entretanto, o quadro pode agravar-se ou até mesmo levar à morte, quando associado à desnutrição ou à quadros de desidratação grave. A diarreia geralmente é autolimitada e a recuperação do paciente tende a ocorrer num período de sete a dez dias (BISHOP, 1996).

Alguns pesquisadores têm associado a infecção por RV a outros sinais clínicos como infecção do sistema nervoso central (ITURRIZA-GÓMARA *et al.*, 2001), com edema agudo hemorrágico infantil (DI LERNIA *et al.*, 2004) e diabetes autoimune (BLOMQVIST *et al.*, 2002).

Os RV, por um mecanismo desconhecido escapam do trato gastrointestinal e causam viremia. Casos tem sido relatados, sugerindo que o RV podem causar infecções em células fora do intestino causando hepatites, nefrites, pneumonia, exantemas, coagulação intravascular disseminada, linfocitose hemofagocítica e complicações neurológicas (YOSHIDA *et al.*, 1995; BLUTT *et al.*, 2007). Antígenos de RV foram detectados em amostras de crianças com diarreia, indicando antigenemia e possível viremia ocorrendo durante infecção por RV (BLUTT *et al.*,

2003; CRAWFORD *et al.*, 2006). As possíveis consequências clínicas da viremia em seres humanos são desconhecidas.

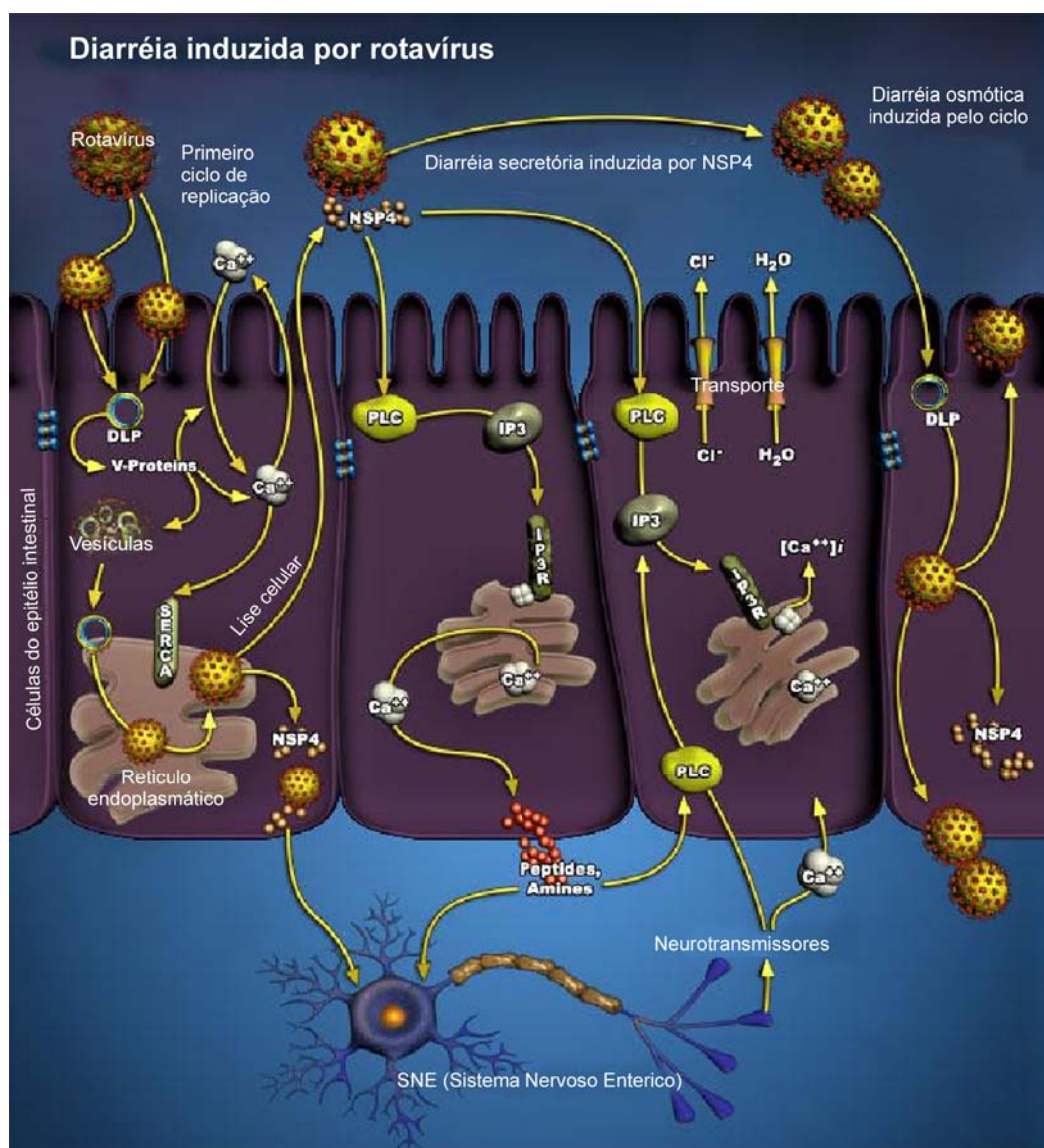


Figura 6: mecanismos de patogênese do RV. No primeiro ciclo de replicação visualizamos os dois mecanismos de entrada do RV na célula (adsorção e penetração), a formação de DPLs, liberação da NSP4 e ativação do SNE. Em seguida temos o mecanismo da diarréia secretória induzida pela NSP4 com ativação do SNE. Posteriormente, temos a diarréia osmótica induzida pelo Ca^{++} . Fonte: www4.appliedbiosystems.com tools pathway.

2.1.12.Imunidade

A resolução de uma gastroenterite depende em grande parte da resposta imunológica. Em um hospedeiro normal, antígenos de RV são transportados em placas de Peyer, processadas por células B, macrófagos ou células dendríticas e apresentadas às células T auxiliares. Isto culmina com a estimulação de células B RV-específicas e proliferação dos linfócitos T citotóxicos precursores (OFFIT, 1996; ANDERSON e WEBER, 2004). Estudos mostraram que após uma infecção por RV as concentrações de IgA atingem seu pico nos dias 14 a 17 e persistem ao longo de um ano, com posterior declínio na sua concentração. Esses resultados sugerem que a IgA é o mais consistente marcador de proteção contra RV (BERNSTEIN *et al.*, 1989; ANDERSON, WEBER, 2004). Entretanto, a IgA para RV é frequentemente não detectável em fluidos duodenais ou fezes após a primeira semana de infecção (OFFIT, 1996; ANDERSON e WEBER, 2004).

Muitas das infecções sintomáticas por RV ocorrem entre o terceiro mês e o segundo ano de vida, com um pico de incidência entre o 7º e o 15º meses. Infecções por RV são mais frequentemente graves em crianças com 3 a 24 meses de idade, do que nos mais velhas ou adultos (CHRYSTIE *et al.*, 1978; PEREZ-SCHAEL *et al.*, 1987; DENNEHY, 2008). Estudos longitudinais demonstraram que as infecções por RV naturalmente adquiridas induzem uma proteção frente à reinfecção pelo vírus, fato muito importante para prevenir eventos mais graves da doença (VELAZQUEZ *et al.*, 1996; FISCHER *et al.*, 2002). Embora as crianças possam ser infectadas por RV várias vezes durante sua vida, a infecção inicial após os 3 meses de idade mais provavelmente pode causar diarreia grave e desidratação.

Estudos têm demonstrado que a resposta imune frente à primeira infecção por RV é predominantemente homotípica quanto à indução de anticorpos neutralizantes específicos (VELAZQUEZ *et al.*, 1996). Os RV podem escapar à ação do sistema imune e induzir uma nova infecção através de vários mecanismos. São múltiplos os grupos, subgrupos e sorotipos, em subseqüentes infecções, e a resposta passa a assumir caráter heterotípico, daí podendo advir proteção cruzada (CLARK *et al.*, 1985; CHRISTY *et al.*, 1988; MATSON *et al.*, 1992; O'RYAN *et al.*, 1994; JIANG *et al.*, 2002; ANDERSON, WEBER, 2004; DENNEHY, 2008).

A maioria das mães possui anticorpos contra RV que são repassados aos filhos via transplacentária, protegendo o neonato. Conseqüentemente, a maioria dos recém-nascidos infectados mostra-se assintomática ou desenvolverá doença branda (BISHOP *et al.*, 1983; DENNEHY, 2008), exceção feita aos bebês prematuros que apresentam um maior risco de doença grave devido à ausência de anticorpos maternos compartilhados via transplacentária (NEWMAN *et al.*, 1999).

A VP6 é o antígeno dominante quanto à propriedade de induzir resposta imune à infecção por RV humano (SVENSSON *et al.*, 1987). Imunoglobulinas do tipo A do soro ou anticorpos IgG atuam reagindo contra o antígeno VP6 em ensaios imunoenzimáticos (FRANCO *et al.*, 1996).

A imunidade local no intestino parece ser importante para proteção contra infecções subseqüentes. Os níveis de IgA anti-RV no soro, medido imediatamente após a infecção, geralmente refletem níveis de IgA da mucosa e parece ser os melhores marcadores de proteção (FRANCO *et al.*, 2006).

A resolução da infecção por RV envolve CD8, linfócito T citotóxico e resposta de anticorpos (FRANCO *et al.*, 1997; MCNEAL *et al.*, 1997). Demonstraram-se elevados níveis de citocinas, interferon α , interleucina 10 (IL10) e fator de necrose

tumoral (TNF α) em soro e plasma de crianças com RV (JIANG *et al.*, 2003). Sugere-se que a imunidade humoral e a mediada por células exercem importante papel na resolução de uma infecção em curso pelo RV e na proteção frente a infecções subsequentes.

2.1.13. Transmissão

A transmissão do RV ocorre principalmente via fecal-oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados com fezes ou contato com fômites (ESTES, KAPIKIAN *et al.*, 2007). Apenas uma gotícula infectada com esse vírus em uma superfície onde uma criança possa encostar a boca é o suficiente para contaminá-la (GLASS, 2006). Creches, asilos e hospitais são focos de disseminação do vírus. A excreção assintomática de RV em adultos é um potencial importante na transmissão e perpetuação deste vírus de forma endêmica (ESTES, KAPIKIAN *et al.*, 2007). As partículas infecciosas de RV podem permanecer por longos períodos (1 a 10 dias) sobre superfícies e em ambientes com pouca umidade (GLEIZES *et al.*, 2006). São relativamente resistentes aos desinfetantes comuns mantendo seu potencial infeccioso por vários meses, em temperaturas entre -40°C e -200°C (PARASHAR *et al.*, 2003).

Autores relatam a possível transmissão dos RV pela via respiratória (GORDON, 1982; COOK *et al.*, 1990; ZHENG *et al.*, 1991). A veiculação hídrica de partículas infecciosas de RV também é relatada na literatura como um importante e

expressivo meio de propagação viral em lugares com saneamento básico deficiente ou inexistente (ESTES e KAPIKIAN *et al.*, 2007).

Em modelos experimentais há relatos de que apenas um vírion pode levar à infecção (GRAHAN *et al.*, 1987) e Glass *et al.*, (2006) postula que apenas dez partículas virais seriam suficientes para acometer uma criança. A elevada proporção de portadores assintomáticos contribui para a rápida disseminação do vírus (PARASHAR *et al.*, 2003; GLEIZES *et al.*, 2006).

Algumas pesquisas sustentam o caráter zoonótico das infecções por RV, haja vista as observações da ocorrência de estirpes de RV de animais que compartilham o mesmo antígeno neutralizante com outros provenientes de seres humanos. Além disso, há registro da ocorrência de amostras de origem animal que naturalmente infectam seres humanos ou que são capazes de formar recombinantes gênicos com cepas de RV humanos (NAKAGOMI e NAKAGOMI, 1991; JAIN *et al.*, 2001; RAHMAN *et al.*, 2003; MARTELLA *et al.*, 2005).

2.1.14. Tratamento

O tratamento das gastroenterites por RV é sintomático, voltado para prevenir e tratar a desidratação, secundária ao processo. Para isto é indicada a ingestão de líquidos e da terapia de reidratação oral (TRO), que também corrigem o déficit hidroeletrolítico existente assegurando um aporte adequado de eletrólitos frente às perdas causadas pelo vômito e a diarreia. No Brasil, o uso rotineiro da reidratação

oral, preconizada pela Organização Mundial de Saúde, tem sido prática e eficaz no combate à diarreia aguda e de ampla aceitação (LINHARES, 2000). Em casos de incapacidade quanto à ingestão de líquidos pela via oral ou desidratação grave, será necessária internação hospitalar para hidratação intravenosa e aporte médico (SANTOSHAM, *et al.*, 1997). Infelizmente, a cobertura conhecida para intervenções eficazes como a TRO é inferior a 35% em partes da África e Sul da Ásia (SANTOSHAM, 2010).

A alimentação rotineira da criança deve ser continuada com o intuito de manter a ingestão de nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e evitar a perda de peso no decorrer da infecção. A suplementação de Zn^{++} no decorrer da doença diarreica é indicada por alguns autores que têm demonstrado que essa atitude ajuda na redução do episódio diarreico, gravidade e incidência de episódios subsequentes nos 2-3 meses seguintes à terapia (OMS, 2006).

Estudos recentes têm postulado ação terapêutica na diarreia por RV, usando uma combinação de *Lactobacillus rhamnosus* GG, reconhecido como probióticos (PANT *et al.*, 2007).

A utilização de constipantes (Caolin, pectina, colestiramina) e de antiespasmódicos não é recomendada pela OMS, pois não atuam na eliminação da doença, nem na melhora do quadro clínico (OMS, 2005). A nitazoxanida[®] vem sendo recentemente avaliada quanto a possibilidade de ser utilizada no tratamento de doença diarreica por RV. Entretanto, os resultados obtidos com esse medicamento ainda são mínimos, necessitando de maiores investigações. O reccadotril[®] é uma droga antissecretora que atuaria na redução do número de episódios diarreicos, entretanto este só foi avaliado em adultos (CEZSARD e SALAZAR-LINDO, 2005).

2.1.15. Diagnóstico laboratorial

Os elevados índices de morbi-mortalidade gerados pelos RV levaram ao desenvolvimento de pesquisas que culminaram com técnicas rápidas e seguras para o diagnóstico de RV, hoje amplamente difundidas na elucidação de quadros suspeitos, no monitoramento de cepas circulantes, na identificação e classificação de novos genótipos.

A microscopia eletrônica (ME), usada como método pioneiro no diagnóstico de RV, permite a visualização das partículas virais nas fezes, apresenta elevada especificidade e rapidez de diagnóstico. Entretanto é uma técnica com custos de execução elevados, exige equipe qualificada e não permite diagnóstico em larga escala, sendo desta forma pouco utilizada (VERONESI, 2010).

A propagação do vírus em cultura celular é possível, utilizando linhagens celulares como MA-104 (células de rim de macaco) e CaCo-2 (célula de carcinoma de cólon humano). Entretanto, a propagação do vírus em cultura é muito lenta e não tem valor diagnóstico (SANTOS e SOARES, 2008).

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA ou EIA) são técnicas voltadas para detecção de antígenos virais nos espécimes clínicos que passaram a ser utilizadas por viabilizar a detecção do vírus em um maior número de amostras em um curto intervalo de tempo, além de apresentar uma boa sensibilidade, muito embora necessite de 10^4 - 10^7 partículas virais para detectar a infecção (ESTES, KAPIKIAN *et al.*, 2007; ANDERSON, WEBER, 2004). Geralmente, os kits diagnósticos incluem anticorpos policlonais ou monoclonais dirigidos ao antígeno comum VP6 dos RV-A.

Embora hajam testes imunoenzimáticos para a detecção de RV-B e RV-C, estes somente são utilizados em alguns centros diagnósticos (VERONESI, 2010).

O teste de aglutinação em látex, o qual se baseia no agrupamento de antígenos livres os quais se ligam a anticorpos específicos, esses kits destinam-se à determinação qualitativa direta de antígenos virais de RV em fezes (Santos, 2008). Os testes de imunocromatografia também se baseiam na detecção qualitativa de antígenos virais em amostras de fezes. Esses métodos diagnóstico possuem sensibilidade comparável à da técnica imunoenzimática (VERONESI, 2010), além de ser um método rápido, e que não exigem grandes aparatos laboratoriais.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) é um método muito utilizado por sua sensibilidade e especificidade na detecção do genoma viral de acordo com os padrões de migração de seus segmentos genômicos. É uma técnica que permite detectar todos os grupos de RV (ESTS, KAPIKIAN, 2007), além de identificar perfis genômicos e padrões de migração de todos os grupos de RV, o que permite avaliar a diversidade do RV circulantes.

Técnicas moleculares foram desenvolvidas e muito difundidas nos últimos anos, sendo introduzidas na rotina dos laboratórios de pesquisa, porém não naqueles que visam estritamente ao diagnóstico. A reação em cadeia pela polimerase precedida da transcrição reversa (RT-PCR) é uma técnica de amplificação do RNA viral que é inicialmente convertido em cDNA por transcrição reversa, antes de iniciar o processo de amplificação. A RT-PCR é sem dúvida uma das mais utilizadas na atualidade por apresentar elevada sensibilidade, custo razoável e possibilita a genotipagem dos RV. Uma variação dessa técnica é a RT-PCR em tempo real, a qual apresenta maior sensibilidade e permite a quantificação da carga viral em uma infecção.

Outras técnicas, ainda restritas ao campo científico, também têm sido muito utilizadas, tais como: hibridização, *dot blot*, nesta técnica a sequencia alvo é separada por eletroforese, transferida para uma membrana e hibridizada com uma sonda marcada com radioisótopos ou enzima. A hibridização em microarranjos consiste na hibridização de amostras de DNA com sequencias gênicas específicas imobilizadas em superfícies sólidas. O sequenciamento de nucleotídeos é utilizado para a análise genética do RV (CORTESE, 2010).

2.1.16.Vacinas

O desenvolvimento de novas vacinas eficazes e seguras contra o RV, foi reconhecida como a estratégia de intervenção mais eficaz, podendo trazer um resultado significativo sobre o impacto da doença (O'RYAN e LINHARES, 2009). Numerosos estudos têm documentado que a imunidade induzida por uma infecção natural pelos RV protege as crianças de subsequentes episódios de diarreia grave por esse patógeno, embora este apresente tipos distintos. Baseados nesses conhecimentos foram desenvolvidas várias estratégias para a produção de vacinas contra RV e algumas avaliadas em seres humanos.

A primeira vacina oral contra RV-A testada em humanos foi a monovalente e continha a cepa Nebraska (RIT4237), de origem bovina. Embora essa vacina tenha conferido razoáveis taxas de proteção para crianças da Finlândia, a proteção foi baixa naquelas que viviam em países em desenvolvimento (LINHARES *et al.*, 2002; GLASS *et al.*, 2005). Posteriormente, foi licenciada a primeira vacina contra RV-A

para uso em humanos, tratava-se de uma composição tetravalente geneticamente reestruturada rhesus-humanos (RRV-TV, RotaShieldTM). Nos EUA essa vacina apresentou níveis protetores de até 80% (BERNSTEIN *et al.*, 1995). Em países como Peru e Brasil, a eficácia foi apenas parcial, com uma proteção variando entre 24% a 35% (LINHARES *et al.*, 1999). Essa vacina foi licenciada em 1998, entretanto, em julho de 1999 sua administração foi suspensa por estar associada primariamente a 15 casos de intussuscepção (um tipo de obstrução intestinal) entre crianças que haviam tomado à vacina (CDC/MMWR, 1999; HOSHINO *et al.*, 2003).

Hoje existem duas vacinas licenciadas em várias partes do mundo, Rotarix[®] (GSK) e Rotateq[®] (MERCH). Ambas as vacinas demonstraram excelente segurança e eficácia de proteção em grandes estudos clínicos pré-licenciamento realizados na Europa, Estados Unidos e América Latina (VESIKARI *et al.*, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2007; VESIKARI *et al.*, 2007). Vários países da América Central e Latina já incluíram a vacina contra o RV-A e seu programa nacional de imunizações. Países africanos e asiáticos têm adiado sua decisão na pendência do resultado de novos estudos (DELACOUR, 2009). Estimativas apontam que com as vacinas comercializadas, haja uma redução de 47-57% nos casos de internações e uma prevenção de 74% das mortes por RV-A em todo o mundo (MUNOS *et al.*, 2010).

A Rotarix[®] é monovalente, derivada de uma amostra de RV-A humana, G1[P8] (amostra 89-12), após passagem em cultivo celular e clonagem (De Vos, 2004). O seu desenvolvimento fundamentou-se nas evidências de que uma infecção por RV-A com uma amostra selvagem protege as crianças de episódios subsequentes de diarreia grave pelo mesmo tipo ou por tipos G diferentes. A cepa vacinal, denominada RIX4414 (Rotarix[®]), foi inicialmente avaliada na Finlândia, onde mostrou segurança, imunogenicidade e eficácia. A eficácia da vacina tem sido

confirmada em uma série de estudos que já envolveram mais de 63.000 crianças (RUIZ-PALACIOS *et al.*, 2006). Esses estudos mostraram eficácia da RIX4414 contra agentes de gastroenterites grave por RV-A a 83-100% para o tipo P[8]G1, 82-100% para os tipos não G1 e de 44-86% para o tipo P[4]G2 (KANG, 2006; MCCORMACK e KEAM, 2009).

A Rotarix[®] foi introduzida no calendário nacional de vacinação do Brasil em março de 2006. Linhares *et al.* (2008), indicam que duas doses orais de RIX 4414 quando administrada no período indicado conferem proteção que se estende ao segundo ano de vida, mesmo na vigência de cenários que indicam sorotipos virais distintos se comparados primeiro e segundo anos de acompanhamento. Lanzieri *et al.* (2010), demonstraram que no Brasil houve uma redução nas internações por gastroenterite em crianças menores de 5 anos de idade após a implantação da vacina contra RV-A. Em 2006 e 2007 houve uma redução nas internações por gastroenterite de 26% e 48%, respectivamente em crianças menores de 1 ano, em comparação com o período pré-vacina (1998-2005). As maiores taxas de redução entre crianças menores de um ano se deu nas regiões Sul e Sudeste, onde a cobertura vacinal foi maior. Uma pesquisa realizada no Nordeste do Brasil concluiu que desde a introdução da vacina em 2006, houve uma redução no número de consultas e hospitalizações por diarreia nessa região (GURGEL *et al.*, 2009).

Uma recente pesquisa desenvolvida no México relata que a recente inclusão da Rotarix[®] no calendário nacional de imunizações pode ter contribuído para a redução do número de mortes relacionadas à diarreia de qualquer etiologia entre crianças mexicanas, sugerindo um potencial benefício da vacinação contra RV-A (RICHARDSON *et al.*, 2010).

Um estudo conduzido na África, utilizando a Rotarix[®], concluiu que a vacina reduziu significativamente a incidência de gastroenterite grave por estes agentes em crianças africanas durante o primeiro ano de vida. Neste estudo a eficácia da vacina contra tipos G1 e não G1 foi similar (MADHI *et al.*, 2010). A capacidade de uma vacina contra o RV-A ser capaz de proteger contra uma grande diversidade de grupos é muito importante na África, onde a diversidade genotípica é substancial (STEELE *et al.*, 2003; GENTSCH *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2005). Na Ásia, a eficácia da RIX4414 em crianças foi avaliada, e os resultados mostraram uma proteção de 96% nos casos de gastroenterites grave e uma proteção de 94% para os casos de hospitalizações por gastroenterites grave (O'RYAN e LINHARES, 2009).

Estudos de eficácia da Rotarix[®] em crianças europeias revelou uma proteção de 78,9% contra agentes de gastroenterites e de 90,4% em casos de gastroenterites por RV-A (O'RYAN e LINHARES, 2009).

A RotaTeq[®], é um imunizante pentavalente reunindo amostras de origem bovino-humana e seu princípio é basicamente conferir imunidade específica frente aos sorotipos G1, G2, G3, G4 e P[8]. A RotaTeq[®] resultou em proteção de 100% nos casos de diarreia por RV-A com maior gravidade. Avaliações com mais de 70.000 crianças revelaram que este imunizante não aumenta o risco de intussuscepção em crianças (HEATON *et al.*, 2005). Uma eficácia de 96% contra internações por RV-A tem sido demonstrada (VESIKARI *et al.*, 2006). A vacina pentavalente contra RV-A foi licenciada nos Estados Unidos em fevereiro de 2006 e em 2007 as taxas de vacinação foram estimadas em aproximadamente 50% (CLARK *et al.*, 2009). Recentemente, nos Estados Unidos têm-se publicado dados que denotam alta efetividade da vacinação (RotaTeq[®]) aplicada de maneira universal, pois no período

de 2006-2007 foi observada uma diminuição superior a 50% comparando com períodos anteriores, provavelmente devido a influencia da vacinação (CDC, 2008). Um estudo realizado nos Estados Unidos em 18 Estados, com o objetivo de comparar as hospitalizações por gastroenterite aguda após a introdução da RotaTeq[®], mostrou uma redução drástica das internações em 2008, fato este associado a utilização dessa vacina (CURNS *et al.*, 2010).

Com base em dados de eficacia e efetividade, uma recente revisão conclui que ambas as vacinas contra RV-A são altamente eficazes e efetivas em impedir episódios graves de RV-A e a morte de crianças menores de 5 anos em países desenvolvidos e na América Latina (MUNOS *et al.*, 2010).

Um recente estudo caso-controle com RIX4414 desenvolvido em Belém, Brasil, demonstrou a efetividade da vacina, expressa em 82% dos casos graves de hospitalizações por gastroenterites associadas ao RV-A. No caso da efetividade frente a infecções pelo genótipo G2P[4] de RV-A, esta se traduziu em 75,4% dos casos (LINHARES *et al.*, 2010).

3. Justificativa do estudo:

O impacto mundial da infecção por RV-A tem conduzido ao desenvolvimento de estratégias vacinais no intuito de reduzir a sua morbi-mortalidade (HOSHINO e KAPIKIAN 2000; LINHARES e BRESSE 2000; COSTA *et al.*, 2004; LINHARES e VILLA 2006, LINHARES *et al.*, 2006).

Nos últimos três anos, têm-se observado em escala global e principalmente no Brasil, a re-emergência do genótipo G2. Este genótipo é geralmente detectado em surtos envolvendo crianças e adultos e segundo alguns autores, pode ocorrer de forma cíclica a intervalos de dez anos (LINHARES e VELÁZQUEZ, 2008). Este genótipo ressurgiu em um momento de introdução e pós-introdução da vacina contra RV-A no calendário nacional de vacinação, o que levou alguns autores a suspeitar de uma possível ineficácia da vacina frente a tal sorotipo.

Ainda persistem não suficientemente elucidados múltiplos aspectos sobre a infecção por sorotipo G2. Esse estudo é o primeiro na região a investigar as possíveis mudanças no gene que possam estar levando a predominância deste genótipo após a implantação da vacina no país. Este proporcionará um melhor entendimento sobre a diversidade genética dos RV-A genótipo G2 e o comportamento no decorrer dos últimos 16 anos na região amazônica. A par disso, servirá de apoio a estudos posteriores, principalmente os relacionados a estratégias de vacinação contra RV-A.

4. OBJETIVOS:

4.1. Objetivo Geral

Estudar a diversidade molecular de amostras de RV-A genótipo G2, obtidas de crianças participantes de estudos em gastroenterites virais na região amazônica, Brasil, no período de 1993 a setembro de 2008, antes e após a introdução da Rotarix®.no calendário nacional de imunizações do Brasil.

4.2. Objetivos Específicos

- 1-** Determinação e análise dos eletroferotipos de RV-A genótipo em gel de poliacrilamida (EGPA);
- 2-** Análise comparativa das sequencias de nucleotídeos e aminoácidos dos genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7 dos RV-A genótipo G2;
- 3-** Verificar a diversidade dos genes VP4 e VP7 dos RV-A genótipo G2;
- 5-** Observar a distribuição temporal das variantes genéticas de RV-A genótipo G2;
- 6-** Identificar a evolução genética de amostras de RV-A genótipo G2 detectadas antes e após o advento da vacina na região Amazônica, Brasil;

5. MATERIAIS E MÉTODOS:

5.1. Materiais:

As 54 amostras do estudo foram oriundas de diferentes pesquisas conduzidas na região amazônica (Pará, Amazonas, Roraima) e processadas no Instituto Evandro Chagas (IEC) em Belém, Pará. O presente estudo obteve aprovação do comitê de ética e pesquisa do IEC. A seguir se apresentam sucintamente as características dos estudos envolvidos:

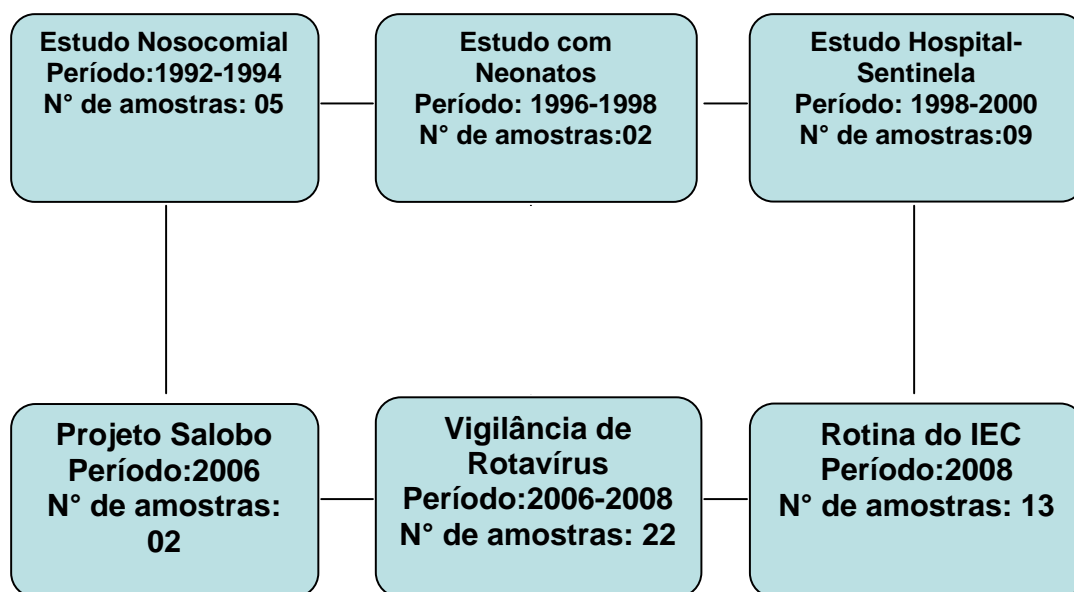


Figura 7: Fluxograma de projetos envolvidos no estudo

a) Subgrupos, sorotipos e eletroferotipos de rotavírus em crianças hospitalizadas em Belém, Pará (Estudo Nosocomial, Gusmão *et al.*, 1999).

Este estudo teve como objetivo determinar o papel dos RV-A como causa de diarreia nosocomial, sendo realizado no período de novembro de 1992 a maio de 1994. Foram coletadas amostras fecais de 290 crianças de 0 a 5 anos, internadas na Santa Casa de Misericórdia do Pará. Três grupos foram constituídos: nosocomial (crianças que desenvolveram diarreia até três dias depois da internação – 54 pacientes); comunitário (crianças já admitidas com diarreia ou que a apresentavam nas primeiras 72 horas após a internação – 182 pacientes); e não diarreico (crianças que não apresentaram diarreia três dias antes e depois da coleta dos espécimes – 54 pacientes). Para este estudo foram selecionadas cinco amostras conhecidas como RV-A genótipo G2.

b) Estudo com neonatos em Belém, Pará.

Realizado no período maio de 1996 a 1998, este estudo realizou a detecção de RV-A em amostras de neonatos do Hospital Santa Casa de Misericórdia do Pará. O estudo investigou 437 amostras de pacientes recém-nascidos de 0-28 dias. Deste estudo foram selecionadas 03 amostras RV-A genótipo G2.

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

Este estudo objetivou medir a diversidade antigênica das amostras circulantes de RV e o impacto da doença causada por esses agentes em Belém, Pará, sendo realizado no período de maio de 1998 a maio de 2000 e tendo como população-alvo, crianças na faixa etária de 0 a 3 anos, atendidas a nível ambulatorial ou internadas em um hospital público de Belém, Pará. Deste estudo foram selecionadas nove amostras RV-A genótipo G2.

d) Avaliação da situação de saúde-doença face às mudanças ambientais e sociais na área de influência do projeto Salobo, Marabá, Pará, Brasil (Projeto Salobo, Mascarenhas *et al.*, 2010).

Realizado nos períodos 2006, 2008-2010, este estudo objetivou caracterizar o quadro nosológico atual com a avaliação da influência de eco-sistema da região e a influência dos movimentos migratórios na região. A população alvo foi constituída por crianças de 0-5 anos. Deste estudo foram selecionadas duas amostras do ano de 2006, positivas para RV-A genótipo G2.

e) Estudo de vigilância epidemiológica das gastroenterites por rotavírus no Brasil: determinação do impacto da doença.

Foi iniciado em fevereiro de 2006, este estudo se desenvolve no âmbito de uma rede nacional de vigilância epidemiológica das gastroenterites por RV incluindo cinco municípios, um de cada região do Brasil, sendo que no Pará, o município de Marituba foi selecionado. Além de amostras do Pará o IEC por ser laboratório de referencia nacional para RV, também recebe amostras dos estados do Amazonas, Acre, Roraima, Rondônia, Piauí. Tendo como objetivo definir-se o impacto da doença causada por esses patógenos no país. Deste estudo foram selecionadas 22 amostras positivas para RV-A genótipo G2 nos anos de 2006 a 2008 dos estados da região amazônica os quais enviaram amostras para análise.

f) Demanda espontânea de amostras no laboratório de rotavírus de IEC.

Foram incluídas nessa investigação 13 amostras oriundas da rotina do Laboratório de Rotavírus do Instituto Evandro Chagas, coletadas de maio a outubro de 2008.

5.2.MÉTODOS:

5.2.1.Preparação fecal:

As suspensões fecais foram preparadas a 10% em tampão Tris-Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2. Em seguida as suspensões foram homogeneizadas, centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante coletado e estocado a -20° C.

5.2.2-Extração do genoma viral:

O genoma viral foi extraído a partir das suspensões fecais, de acordo com protocolo descrito por Boom *et al.* (1990). A técnica foi processada pela adição de 300µl de suspensão fecal, 20µl de proteinase K e 200µl de etanol, o produto foi homogeneizado e incubado a 56°C por 10 min. Posteriormente, adicionou-se 800 µl de tampão L6 e 20µl de sílica, homogenizou-se e seguiu incubação sob agitação lenta a temperatura ambiente por 20 minutos. Subsequentemente os tubos foram agitados em “vortex” e centrifugados a 14.000 rpm por 45 segundos, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, adicionou-se 500µl de tampão L2, agitando-se em “vortex” para posterior centrifugação (14.000 rpm por 45 segundos). Subsequentemente, foram realizadas lavagens com etanol a 70% (4°C) e acetona (4°C). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento incubado em banho-maria a temperatura de 56°C por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se 60µl de água mili-Q estéril, agitando-se por 15 segundos, com subsequente incubação em banho-maria a 56°C por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 4

minutos a 14.000 rpm e os sobrenadantes contendo os dsRNA puros coletados e armazenados a -20°C.

5.2.3-Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)

Os perfis eletroforéticos de RV foram determinados pela EGPA, segundo o método descrito por Pereira et al (1983). A técnica se processou com a adição de 10µl da amostra de dsRNA extraído, com posterior adição de 2µl de azul de bromofenol para posterior aplicação em gel de poliacrilamida à 5%. Esse gel foi submetido a eletroforese vertical por 90 minutos. Após corrida o gel foi retirado da cuba e os fragmentos do genoma viral fixado com etanol, ácido acético e corados com nitrato de prata, e posterior revelação com hidróxido de sódio e formaldeído 37%. O perfil eletroforético foi visualizado em negatoscópio de luz branca, documentado em foto documentador e classificado de acordo com Herring et al.(1982).

5.2.4-Determinação dos genótipos G e P

Após a extração do RNA viral procedeu-se a RT-PCR, a qual foi desenvolvida em duas etapas. A primeira etapa consistiu na obtenção do DNA complementar (cDNA) por meio de transcrição reversa, seguida da amplificação pela PCR, empregando-se os pares de iniciadores (Quadro 1) 4con3/4con2 para o gene da

VP4 e Beg9/End9 ou 9con1/9con2 para o gene da VP7, de acordo com o protocolo descrito por Gentsch et al. (1992); Das et al., (1994), Gouvea et al., (1993).

RT	Iniciadores	Gene	Produto Amplicon Pares de base (pb)	Referência
9con (+)	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	VP7	-	Das <i>et al.</i> , 1994
9con2 (-)	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	VP7	904	Das <i>et al.</i> , 1994
Beg9(+)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	VP7	-	Gouvêa et al.,
End9(-)	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	VP	1062	Gouvêa et al.
4con3 (+)	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	VP4	-	Gentsch <i>et al.</i> , 1993
4con2 (-)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	VP4	875	Gentsch <i>et al.</i> , 1993

Quadro 1: Sequência dos iniciadores utilizados na RT-PCR para os genes VP7 e VP4 de RV

Inicialmente o dsRNA foi desnaturado a 97°C em termociclador por 5 minutos, e posteriormente imersos em banho de gelo (0°C) por 5 minutos, para hibridização dos iniciadores, sendo então adicionado a primeira mistura (Quadro 2), homogeneizados e incubados em termociclador por 1 hora a 42°C, finalizando a primeira etapa (obtenção do cDNA).

REAGENTES	TRANSCRIÇÃO REVERSA 1X/ μ L	PCR 1X/ μ L
H ₂ O	16,25	21,25
dNTP 25mM	1	1
Tampão 10X	2,5	2,5
MgCl ₂ 50mM	1	1
RT 10U	0,25	-
Taq DNA Polimerase 2,5U	-	0,25
Total	21	25

Quadro 2: Reagentes utilizados na reação de RT-PCR

A segunda fase consistiu na amplificação pela PCR, adicionando-se ao produto da primeira etapa uma segunda mistura (Quadro 2), com as seguintes condições: um ciclo de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de 72°C por 10 minutos e posterior armazenamento a -20°C.

5.2.5. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose para a separação e visualização dos amplicons de DNA de diferentes tamanhos. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR[®] Safe DNA gel stain, juntamente com o marcador de peso molecular e submetidas a um campo elétrico (120V, 400MA, 30 minutos) o que permitiu com que

os fragmentos de DNA fossem separados de acordo com seu tamanho. Os fragmentos de DNA foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em aparelho de foto documentação de gel (Vilber Loumart).

5.2.6. Purificação e quantificação do DNA

O DNA viral foi purificado diretamente do produto da PCR, com o kit QUIAQuick PCR purification[®] (QIAGEN). Em um tubo coletor de 2ml, adicionou-se 5 vezes o volume do Buffer PB para cada volume de PCR usado. Agitou-se em vórtex. A mistura obtida foi transferida para a coluna acoplada com o tubo coletor de 2 ml, posteriormente, centrifugou-se por 30 a 60 segundos. O líquido do tubo coletor foi descartado e o mesmo recolocado na coluna. Adicionou-se 0,75 ml do Buffer PE na coluna. Centrifugou-se por 30 a 60 segundos. Descartou-se o líquido do tubo coletor. Centrifugou-se novamente por 30 a 60 segundos sem adicionar nenhum reagente. Transferiu-se a coluna do tubo coletor para um ependorf limpo de 1,5 ml. Adicionou-se 50 µL do Buffer EB no centro da membrana. Incubou-se em temperatura ambiente por 1 minuto. Posteriormente a reação foi centrifugada por 1 minuto e em seguida recolhida e armazenada a -20°C.

A quantificação do DNA, expressa em nanogramas (ng), foi realizada com marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder[®] (Invitrogen), servindo de parâmetro para a reação de sequenciamento.

5.2.7. Sequenciamento de nucleotídeos

A reação de sequenciamento foi conduzida segundo o protocolo descrito pelo fabricante do kit Big Dye Terminator[®] (Applied Biosystems). Em uma sala estéril, distribuiu-se 2 μ L do iniciador positivo ou do iniciador negativo (Quadro 1) em cada microtubo. Adicionou-se em cada microtubo 2 μ L de Big Dye Terminator[®] (Applied Biosystems) e 2 μ L de tampão para reações de 10 μ L ou 4 μ L de Big Dye Terminator[®] e 4 μ L de tampão para reações de 20 μ L, completando-se com água ultrapura. Posteriormente, foi adicionado o produto da purificação. A quantificação serviu de parâmetro para a reação de sequenciamento, pois cada reação deveria conter de 40-70 ng de DNA da amostra que foi adicionada em cada poço correspondente. A reação foi levada ao termociclador a 96°C por 30 segundos para desnaturação, 50°C por 15 segundos para hibridização e 60 °C por 3 minutos para extensão, por 25 ciclos.

Inicialmente, foi preparado o isopropanol a 65%, sendo então adicionado 40 μ l ao produto de sequenciamento. A placa foi agitada em vórtex por 3-5 segundos, incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, e em seguida foi centrifugada por 45 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente. Subsequentemente o sobrenadante foi retirado por inversão da placa e uma preparação de etanol 70% foi adicionada no volume de 200 μ l em cada orifício da placa que foi em seguida centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente e no final o sobrenadante foi retirado por inversão da placa e a esta foi realizado um spin com a placa invertida sobre papel absorvente (~300 rpm). Posteriormente, procedeu-se a secagem da placa em

termobloco 50°C por 5-10 minutos. Ao final o pellet foi ressuspensão em 10-20µl de formamida. A reação foi levada ao termociclador a 97°C por 5 minutos e posterior banho de gelo por 3 minutos, a fim de proceder o choque térmico. Subsequentemente, a placa foi submetida ao sequenciador automático (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems).

5.2.8. Análise filogenética

As sequências nucleotídicas obtidas dos genes VP7 e VP4 foram alinhadas e editadas no programa Bioedit (v. 6.05) e comparadas a outras sequências de RV registradas no banco de genes, utilizando o programa BLAST. Para a análise filogenética foi adotado o método de Neighbour-joining (SAITTOU *et al.*, 1987), onde a matriz de distância usando a fórmula de dois parâmetros de Kimura foi calculada a partir das sequências alinhadas (Kimura, 1980). As árvores filogenéticas foram construídas no programa MEGA 2.1 (KUMAR *et al.*, 2000). A análise de bootstrap foi realizado usando 2000 réplicas, obtendo resultados reprodutíveis e proporcionando maior confiabilidade aos agrupamentos (FELSENSTEIN, 1985).

6.RESULTADOS:

6.1.ANÁLISE ELETROFORÉTICA:

As 54 amostras foram testadas quanto ao seu padrão de migração através de eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo detectado perfil eletroforético característico de RV-A em 90,6% delas. O restante (9,4%) revelaram-se negativos nessa técnica. Todas as amostras positivas por essa técnica apresentaram perfil eletroforético de migração curto (figura 8).

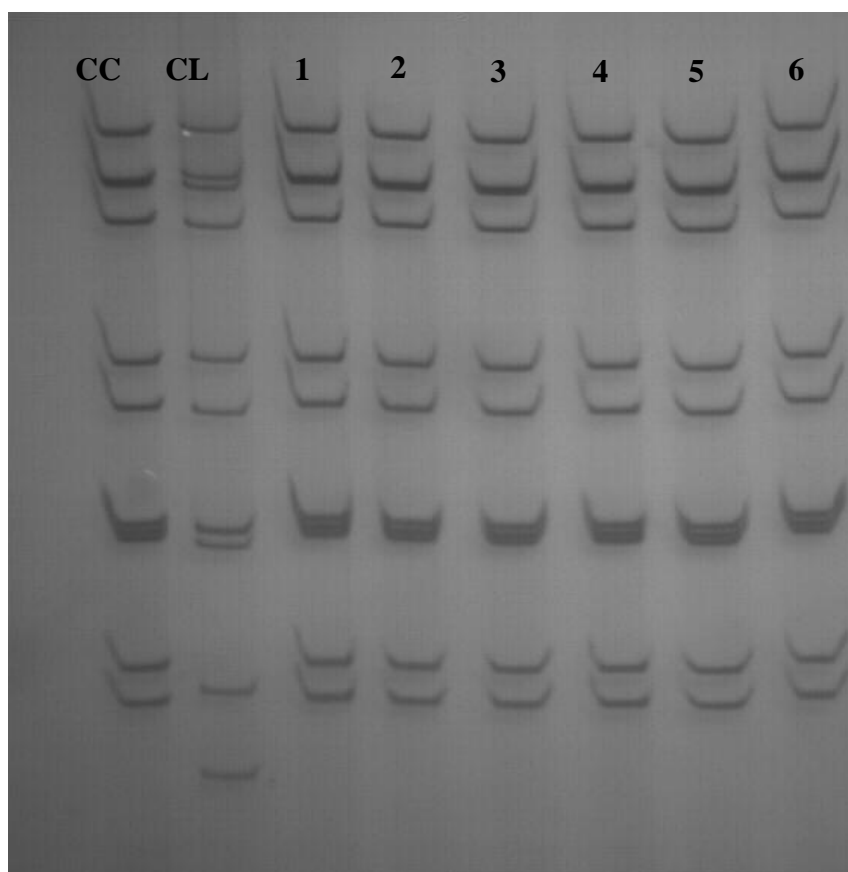


Figura 8: Eletroferotipos de RV-A genótipo G2 detectados ao longo de 16 anos na região amazônica. CC-controle curto, CL- controle longo, 1-6: amostras.

6.2-ANÁLISE DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS:

6.2.1-Análise de nucleotídeos e aminoácidos do gene VP4:

O sequenciamento de VP[4] se deu na região VP8* do gene. Das 54 amostras analisadas, em 39 amostras foi possível o sequenciamento de VP4, quatro tiveram seu volume esgotado e onze não resultaram em amplificação na reação de RT-PCR, o que impossibilitou o sequenciamento. Das amostras sequenciadas, 36 foram identificadas como P[4] e 3 como P[6].

6.2.2- Análise de nucleotídeo e aminoácido do Genótipo P[4] de RV-A:

Nossas amostras agruparam dentro de duas linhagens, a P[4]-4 e a P[4]-5. Quando analisamos os aminoácidos de nossas amostras podemos notar substituições em diferentes regiões, incluindo três sítios antigênicos (figura 9).

A linhagem P[4]-4 abrange somente as amostras do estudo hospital sentinela realizado nos anos de 1998 a 2000 em Belém do Pará. A linhagem P[4]-4 divergem de 5,8% a 6,9% da P[4]-5.

A linhagem P[4]-5 engloba as demais amostras estudadas, podendo-se notar que agruparam amostras de diferentes períodos (1993, 1994, 2006, 2007 e 2008) e também de vários Estados (PA, AM e RR). As amostras de 2006, 2007 e 2008 distribuíram-se em três ramos diferentes. No 1º ramo encontram-se as destes 3 anos, apresentando um grau de divergência de 0,1% a 0,9% entre si. No 2º ramo, o

qual abriga amostras predominantemente de 2008, e apenas uma do ano de 2007, denotaram-se divergência de 0% a 0,1%. Essas amostras agruparam com o protótipo H676/2004 da Rússia e com amostras de Bangladesh de 2005. No 3º ramo encontramos amostras de 1993 e 1994, agrupando com amostras da Índia, Itália que circularam nesse mesmo período (figura 10)

	90	100	110	120	130	140	150	160	30	40	50	60	70	80
Hu/DS-1/1976/USA_AB118025	WLLISSNTNGVVYESTNNND	FWTAVIAVEPHV	SNRQYILFGENKQFN	VENN	SDKWKFFEMFKGSSQGNF	SNRRTLTSS			TQSV	TVNPGPFAQTR	YAPVNWGHGE	INDSTTVEP	VLD	GPYQPTTFKPPNDY
Hu/rj5619/2002/Brazil_DQ857927	D	S	N	V	I	S	SD	N	N	I	V			
HSP154-PA99	D	S	N	V	I	S	SD	N	N	I				
HSP036-PA98	D	S	N	V	I	S	SD	N	N	I				
HSP088-PA98	D	S	N	V	I	S	SD	N	N	I			S	
HST030-PA98	D	S	N	V	I	S	SD	N	N	I				
HST181-PA99	D	S	N	V	I	S	SD	N	N	I				
97707-RR07	D	S		V	I	S	SD	N	N					
96883-AM07	D	S		V	I	S	SD	N	N					
Hu/P4/KMR029/South Korea EF077	D	S		V	I	S	SD	N	N					
SAL-977-D	D	S		V	I	S	SD	N	N					
100104-RR08	D	S		V	I	S	SD	N	N					
24751-PA06	D	S		V	I	S	SD	N	N					
97064-PA07	D	S		V	I	S	SD	N	N					
RSM-PA08	D	S		V	I	S	SD	N	N					
AYM-PA08	D	S		V	I	S	SD	N	N					
SALL957C-PA06	D	S		V	I	S	SD	N	N					
97713-AM07	D	S		V	I	S	SD	N	N					
97695-PA07	D	S		V	I	S	SD	N	N	G				
WPS-PA08	D	S		V	I	S	SD	N	N	G				
Hu/MMC6/G2P4/2005/Bangladesh	D	S		V	I	S	SD	N	N					
IVPM-PA08	D	S		V	I	S	SD	N	N					
LSQ-PA08	D	S		V	I	S	SD	N	N					
98321-AM07	D	S	P	V	I	S	SD	N	N					D
MHCP-PA08	D	S	P	V	I	S	SD	N	N					D
TCS-PA08	D	S	P	V	I	S	SD	N	N					D
SC-PA08	D	S	P	V	I	S	SD	N	N					D
98642-AM08	D	L	P	V	I	S	SD	N	N					D
AFSO-PA08	D	S	P	V	I	S	SD	N	N					D
CSO-PA08	D	S	P	V	I	S	SD	N	N					D
Hu/H41/G2P4/1993/Italy DQ17283	D	S		V	I	S	SD	N	N					
NSC-314	D	S		V	I	T	R	SD	N					
NSC-223	D	S		V	I		R	SD	N					
NSC-105	X	S		V	I		R	SD	N					

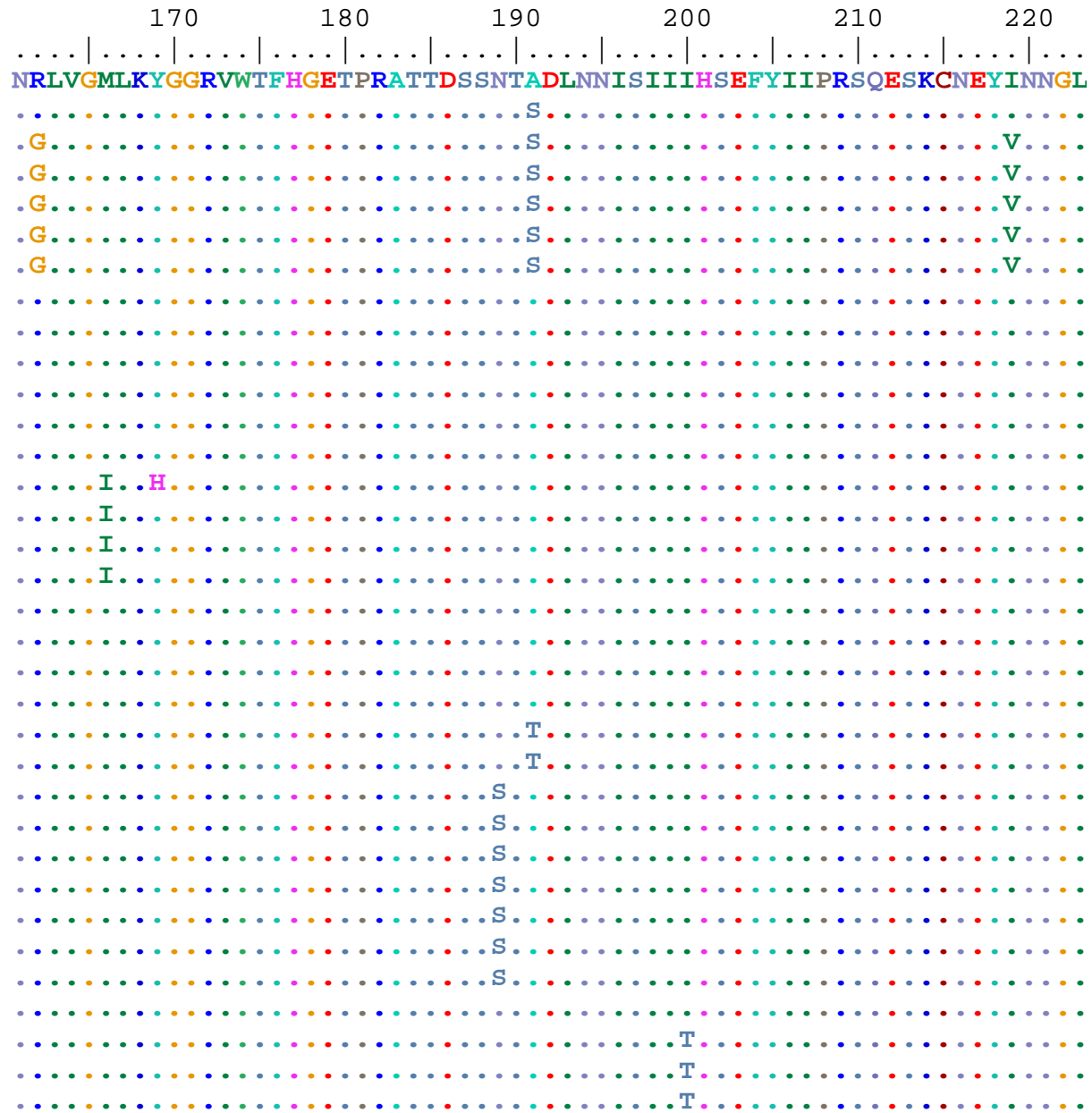


Figura 09– Análise das sequências de aa da proteína VP8* de amostras de rotavírus P[4] que circularam na região amazônica ao longo de 16 anos, representantes das diferentes linhagens. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com a amostra protótipo DS-1. Os retângulos indicam as regiões antigênicas (2/2).

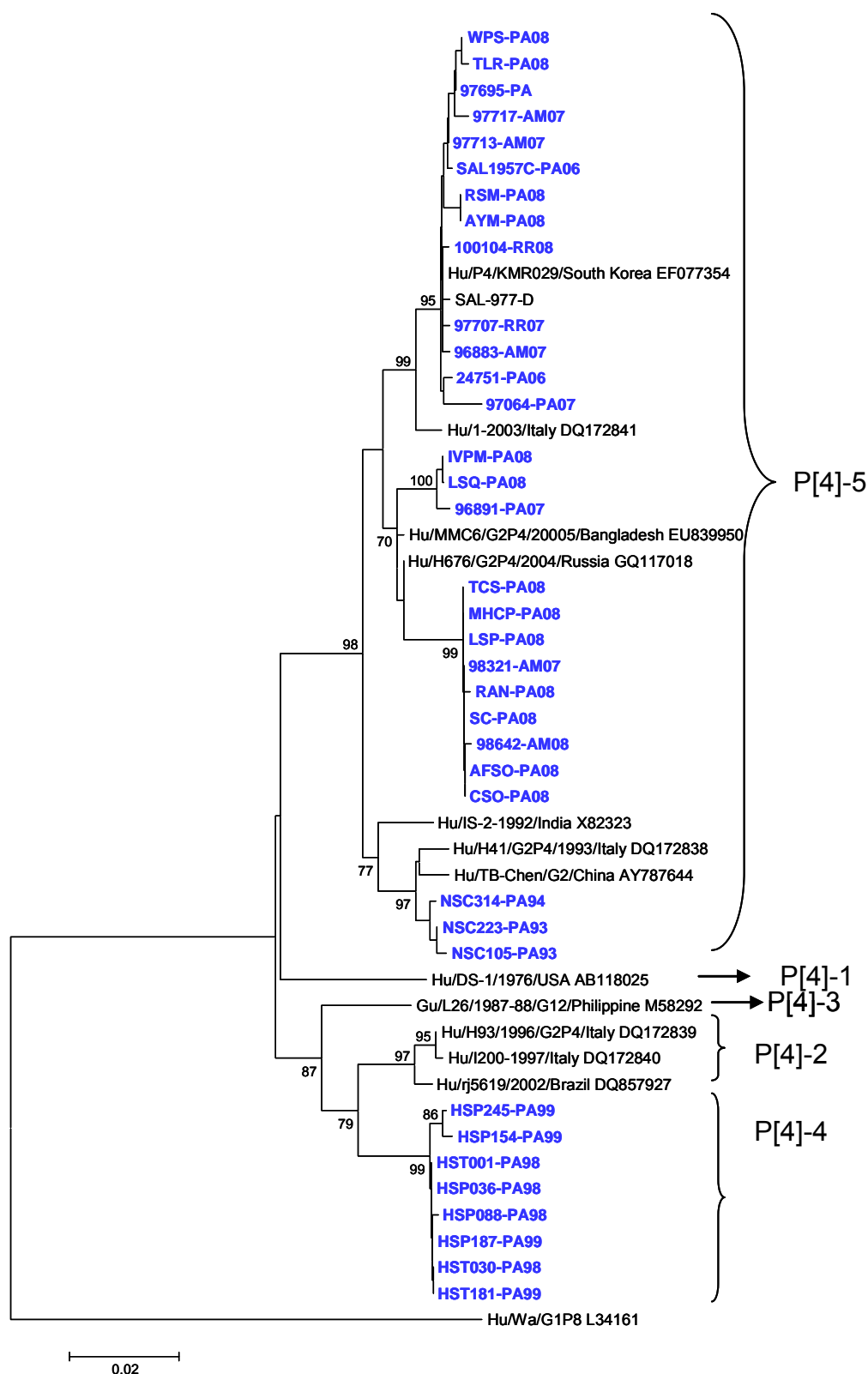


Figura 10: Análise filogenética baseada na sequência parcial (816pb) nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras de RV-A genótipo P[4] provenientes estudos desenvolvidos ao longo de 16 anos na região amazônica e amostras protótipos. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

6.2.3. Análise de nucleotídeo e aminoácido do Genótipo P[6] de RV-A

O sequenciamento da região VP8* do gene VP4 de RV-A revelou a ocorrência de três amostras de RV-A genótipo P[6], que circularam nos anos de 1993, e 1997, sendo provenientes de dois estudos diferentes. O primeiro compreendendo infecções nosocomiais e o segundo relacionando-se a infecções em neonatos, ambos realizados em Belém, Pará. De acordo com Martela et al. (2006), este genótipo está classificado em cinco linhagens (I-V) e quatro sub-linhagens (Ia-IId).

A análise filogenética dessas amostras identificou a circulação de apenas uma linhagem, I, sublinhagem Ia (figura 11). Nossas amostras apresentaram uma similaridade de 99,6% a 99,9% entre si. Essas cepas apresentaram várias alterações de aminoácidos, entretanto, nenhuma localizada em regiões antigênicas e apresentado alteração na posição 146(N→S).

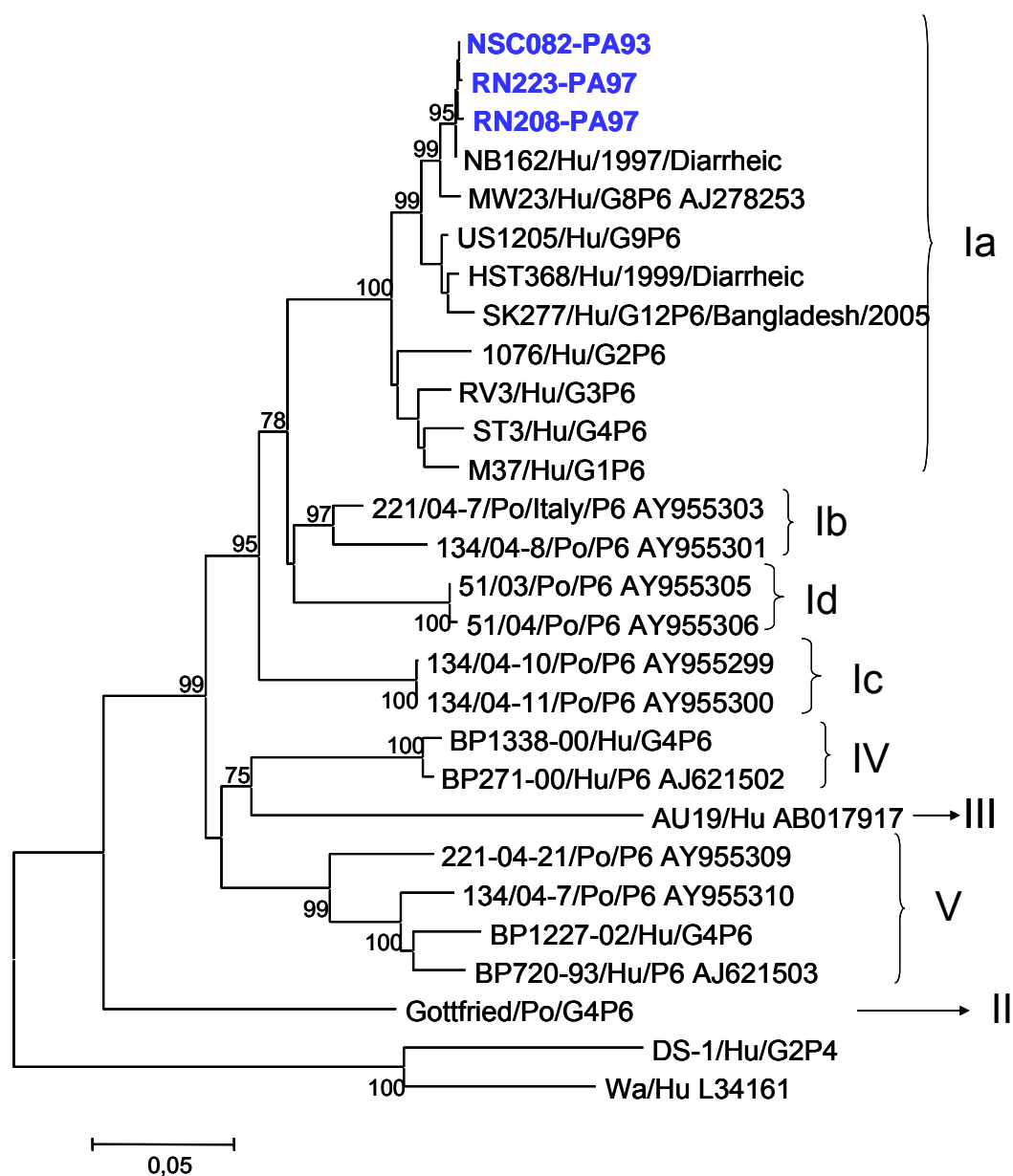


Figura 11: Análise filogenética baseada na sequência parcial (816pb) nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras de RV-A genótipo P[6] provenientes estudos desenvolvidos ao longo de 16 anos na região amazônica e amostras protótipos. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

6.2.4. Análise de nucleotídeo e aminoácido do gene VP7 de RV-A

Foi realizado o sequenciamento de nucleotídeos do gene VP7 de 54 amostras de RV-A genótipo G2 selecionadas ao longo de 16 anos de ocorrência na região amazônica. A análise filogenética (figura 13) revelou a existência de duas linhagens (II e III) e três sublinhagens (IIa, IIc, IId).

A linhagens III englobou amostras que circularam nos anos de 1997 a 1999 de Belém do Pará, sendo provenientes de estudos e de populações diferentes. Nesta linhagem, amostras de hospital e de posto de saúde (ambulatório) agruparam com uma amostra oriunda de estudo com neonatos. Essas amostras foram muito similares entre si, de 100% a 99,94%. O ramo da árvore em que estas amostras se encontram é sustentado por um bootstrap de 99%.

A linhagem II subdivide-se em quatro sub-linhagens, IIa, IIb, IIc e IId, sendo que as amostras agruparam com as IIa, IIc e IId. A sub-linhagem IIa esteve circulando nos anos de 2006 e 2007 nos estados do Pará, Amazonas e Roraima. Essas amostras foram muito similares entre si, de 100% a 99,94%. Neste grupo de amostras, a mais divergente é a SAL-1940-D.

A sub-linhagem IIc foi detectada em amostras que circularam entre os anos de 2006 a 2008 no Pará, Amazonas e Roraima, sendo que desta sub-linhagem também faz parte uma amostra de Belém do Pará, que circulou em 1993; esta amostra apresentou mutações particulares que a enquadraram nesta sub-linhagem. Podemos notar, dentro da IIc uma sutil separação em dois grandes ramos. Neste grupo, as amostras apresentam similaridade de 100% a 99,92% entre si. Esse grupamento é sustentado por um bootstrap de 99%. Nesta sublinhagem a amostra

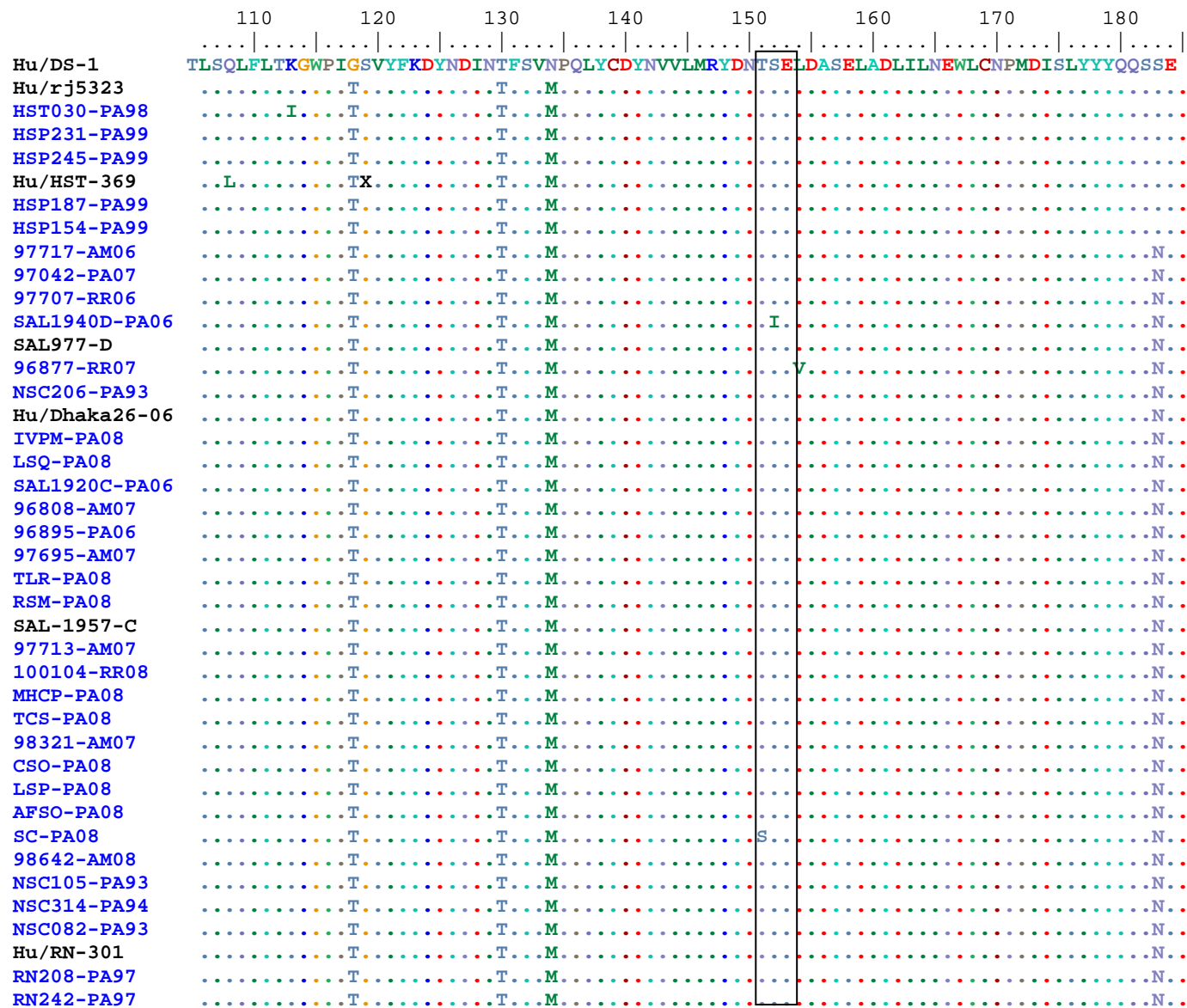
96877 é a mais divergente entre todas (1.2% a 2.8%), esta amostra é também a mais divergente do protótipo DS-1, cerca de 8,4%.

A sub-linhagem IId engloba amostras de 1993, 1994 e 1997 que circularam em Belém, Pará. Nesta percebemos que amostras de neonatos que circularam em 1997 e amostras de infecções nosocomiais agruparam em um mesmo ramo na árvore. Essas amostras são muito similares entre si, de 100% a 99,4%, e divergem de 7 a 7,9% da linhagem III.

Todas as amostras analisadas apresentaram alterações nucleotídicas importantes.

Quando comparadas e analisadas às alterações de aminoácidos (figura 12) comuns ao grupo de amostras, podemos notar uma substituição na posição 213, que pertence a região antigênica C (N→S(anexo 02), linhagem III e N→D, linhagem II). Algumas amostras apresentaram alteração em um local de prolina (posição 75). Com relação aos locais de cisteína e aos demais sítios de prolina permaneceram conservados.

Região B



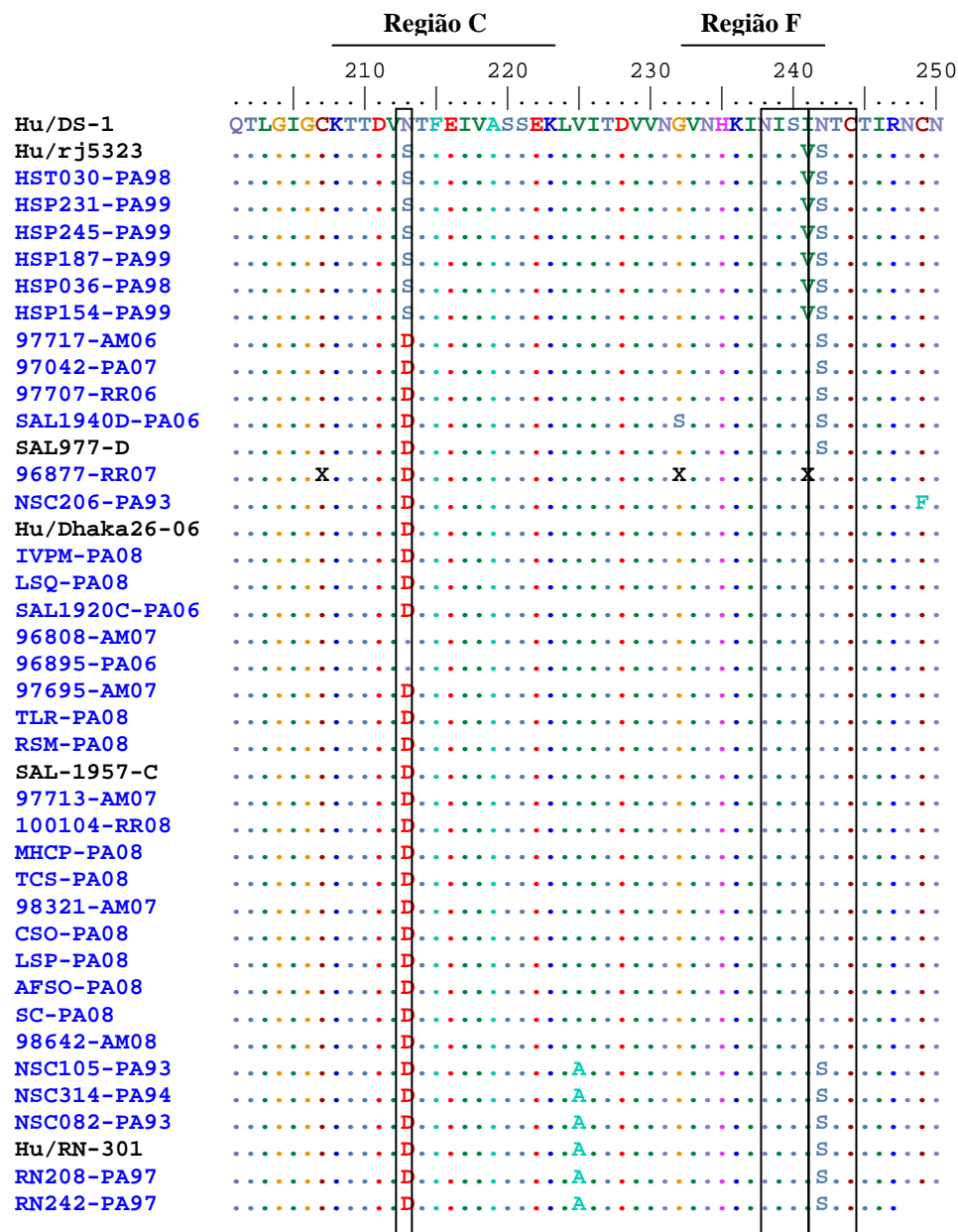


Figura 12– Análise das sequências de aa da proteína VP7 de amostras de rotavírus G2 que circularam na região amazônica ao longo de 16 anos, representantes das diferentes linhagens. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com a amostra protótipo DS-1. Os retângulos indicam as regiões antigênicas(3/3).

Para a linhagem III, à qual pertencem amostras de 1998 a 2000 (Estudo Hospital sentinela) e uma amostra de 1997 (Estudo Nosocomial), todas são do Pará, podendo-se observar várias alterações de aminoácidos, inclusive em regiões antigênicas, as alterações mais relevantes são: 87, região antigênica A, (A→T), 213, região antigênica C, (N→S), 241, região antigênica F, (I→V), 242, região antigênica F, (N→S). As amostras da linhagem III não sofreram alterações nos sítios de glicosilação 69 (NST), 146 (NTS) e 238 (NIS).

A linhagem II engloba a maior parte das amostras deste estudo sendo que nossas amostras agruparam em Ila, Ilc e Ild. Na linhagem Ila a qual engloba amostras dos anos de 2006 e 2007, pertencentes aos Estados do Pará, Amazonas e Roraima, as mudanças ocorreram nas posições : 44(I→M), 87 (A→T) e 96 (D→N) região antigênica A, 213 região antigênica C (N→D), 242 região antigênica F, (N→S). A amostra SAL-1940D sofreu alterações na posição 147 (Y→I) região antigênica B e sítio de glicosilação. Nas demais amostras desta sub-linhagem os sítios de glicosilação permaneceram conservados. A alteração na posição 44 ocorre na VR3, dentro da sequência de sinal de peptídeo. Essas amostras possuem similaridade entre si de 99,4% a 100%.

A sub-linhagem IIc, reúne amostras provenientes de todos os estados participantes nos anos de 2006, 2007 e 2008 e uma amostra de 1993 do Pará. Nesta sub-linhagem, várias alterações ocorreram em nível de grupo e individual, sendo que as mais importantes foram: 44(I→M), 87(A→T) região antigênica A, 96(D→N) região antigênica A, 213(N→D) região antigênica C (N→D). Existem ainda, dentro deste grupo, duas amostras, 96877 e SC-Pa08, que sofreram modificações importantes na posição 146(N→S), região antigênica B e sítio de glicosilação. Essa sub-linhagem é suportada por um bootstrap de 99%

Na sub-linhagem IIId, encontram-se amostras de 1993-1994 e 1997, abrangendo estudos com infecções nosocomiais e neonatos, respectivamente. Nestas amostras, foram observadas alterações nas posições 44 (I→T) VR3, 242(M→S) região antigênica F e as amostras nosocomiais desta sub-linhagem, todas apresentaram modificações na posição 50 (T→A) a qual pertence a VR3. Essas cepas não sofreram alterações em seus sítios de glicosilação. Esse grupamento é sustentado por um bootstrap de 100%.

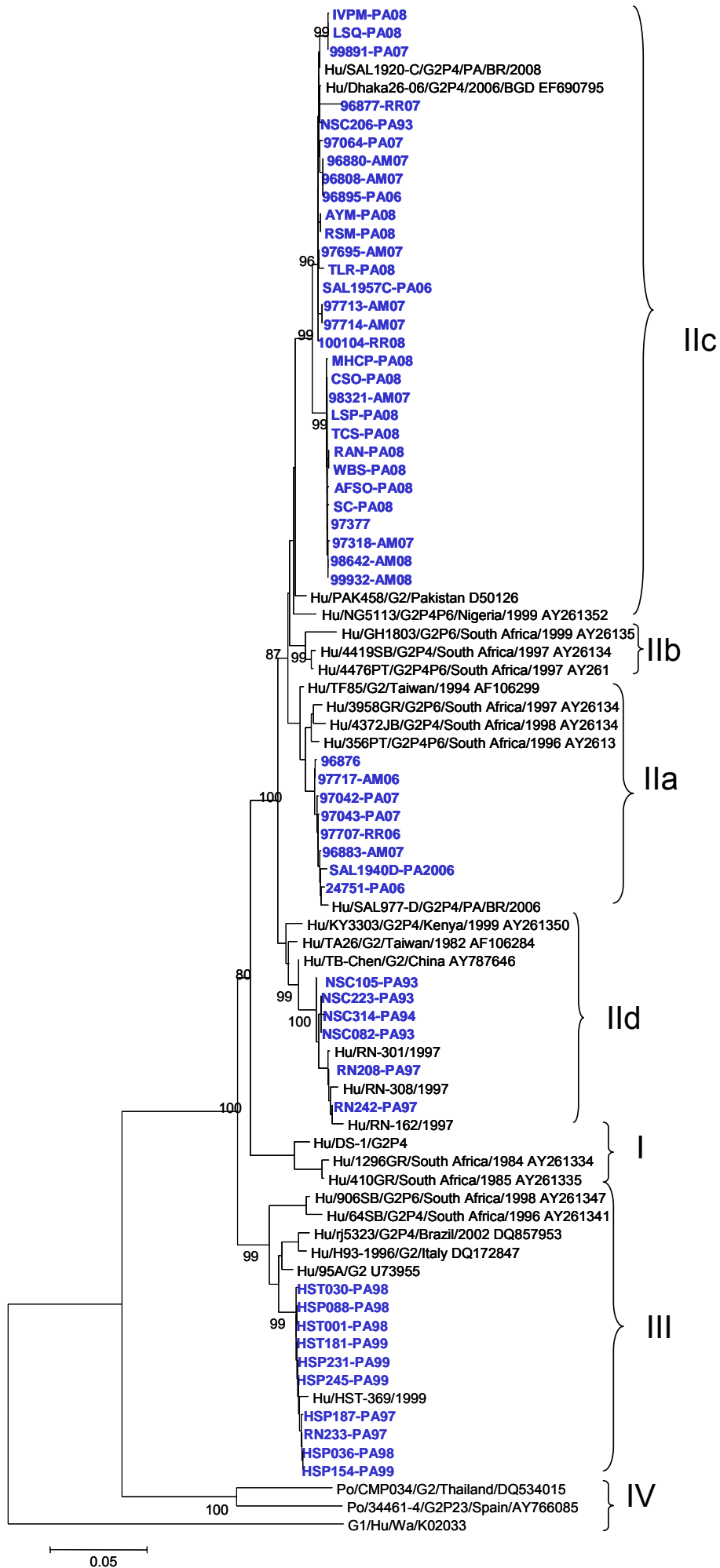


Figura 13: Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica da região codificante do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras de RV-A genótipo G2 provenientes estudos desenvolvidos ao longo de 16 anos na região amazônica e amostras protótipos representantes de humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

6.3.DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E TEMPORAL DE AMOSTRAS DE RV-A GENÓTIPO G2, GENE VP7:

As amostras de RV-A genótipo G2 apresentaram certas peculiaridades com relação à sua distribuição ao longo do tempo, surgindo de forma explosiva e dominante em um momento e desaparecendo em outros. De acordo com dados locais, os tipos G2 tiveram uma forte circulação nos anos de 1992-1994 (Estudo Nosocomial), 1996-1998 (Estudos Neonatos) e 1998-2000 (Hospital Sentinela), 2006-2008 (Salobo, Rede Rotavirus e Rotina do IEC). No período de 1993-1994 foi detectada a circulação de uma única linhagem (II) e duas sub-linhagens (IIc e IIId). A IIc foi detectada em apenas uma amostra do ano de 1993, e a sub-linhagem IIId foi a predominante neste período. Nos anos de 1996-2000 foi constatada a presença de duas linhagens II (IIId) e III. No período de 2006-2007 foi identificada a presença de somente uma linhagem (II) e duas sublinhagens (IIa e IIc), em 2008 a sublinhagem IIc foi a predominante.

Quanto à distribuição geográfica, esta só pôde ser analisada no período de 2006-2008, e com relação a este intervalo de tempo podemos afirmar que as cepas que circularam foram as mesmas em todas as regiões participantes deste estudo, o que revela não existir barreiras geográficas para a disseminação do genótipo G2.

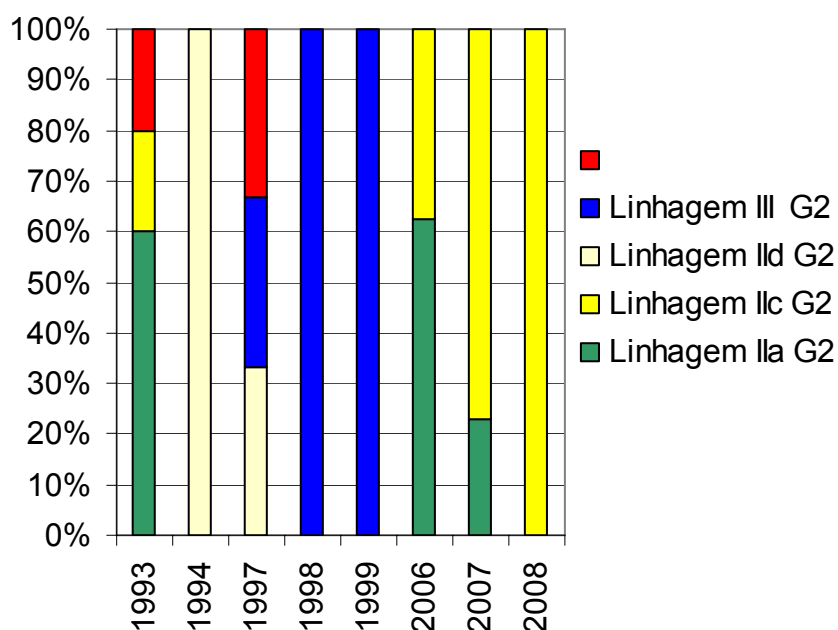


Figura 14: Análise temporal de amostras de rotavírus G2 que circularam no período de 1992 a 2008.

6.4.DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DE AMOSTRAS DE VP4 DE RV-A

No decorrer dos 16 anos de estudo com cepas G2, podemos notar que este esteve predominantemente associado ao genótipo P[4]. Dentre as amostras P[4] observamos a circulação de duas linhagens. A primeira foi a P[4]-5, em amostras de 1993 e 1994 as quais foram muito similares, havendo assim a formação de um grupo dentro desta linhagem. Depois, os anos de 1998 a 2000 tivemos a ocorrência da linhagem P[4]-4, com amostras muito similares e sem variações dentro da linhagem. Nos anos de 2006 a 2008 tivemos a ocorrência exclusiva da linhagem

P[4]-5, na qual percebemos uma maior diversidade havendo a formação de três grupos dentro desta linhagem. Com esses dados podemos notar que o genótipo P[4] sofreu várias modificações ao longo dos anos de sua ocorrência.

O genótipo P[6] foi somente identificado em 3 amostras de 1993 e 1997 no Estado do Pará. Nos anos subsequentes do estudo o genótipo P[6] não foi identificado em associação com o genótipo G2.

7.DISCUSSÃO:

Estudos sobre diversidade de grupos de RV-A que circulam em diferentes regiões e em diferentes períodos de tempo e os mecanismos de evolução são de extrema importância para a projeção e implementação de vacinas para o combate aos RV. Diante do atual cenário de pós-implantação da vacina contra RV-A, a aquisição de dados epidemiológicos por caracterização molecular, das cepas de RV-A genótipo G2, o qual se apresenta como o mais predominante pós vacina, é fundamental para a compreensão dos mecanismos de evolução desse vírus.

A análise e comparação de nucleotídeos e aminoácidos do gene que codifica a VP7 de RV-A genótipo G2 permitiu classificar as amostras em duas linhagens (II e III). A dedução de aminoácidos deste gene mostrou que nas posições 75, 113, 125, 129 178 e 213 há frequentes mutações. A alteração na posição 75, a qual pertence a VR5 é uma região de prolina e pode acarretar modificações das características estruturais básicas (ZAO *et al.*, 1999). A alterações no aminoácido 213 que pertence a região antigênica C, estão relacionadas com perda do reconhecimento de epítomos específicos por anticorpos monoclonais tipo G2 (COULSON *et al.*, 1996). Mutações nessa região têm sido frequentemente relacionadas com um aumento da resistência a anticorpos de neutralização (ITURRIZA-GOMARA *et al.*, 2001; ZADE *et al.*, 2009;).

As amostras pertencentes à linhagem III não sofreram alterações em sítios de glicosilação. Essas cepas apresentaram modificações em três regiões antigênicas, A (87), C (213) e F (241 e 242), possuindo 98% de similaridade com amostras detectadas por Piec e Palombo (1998). Nossos resultados são similares aos encontrados por Arista *et al.*, (2005), em amostras provenientes da Itália no período

de 1993, 1996-1997. Além dessas alterações, foram detectadas outras regiões de mutações pontuais e que, até o momento, não foram relacionadas com alterações importantes para este genótipo. Esta linhagem também foi detectada em 1999 e 2002 em amostras de Belém, Pará (MASCARENHAS *et al.*, 2007) e do Rio de Janeiro (ARAÚJO *et al.*, 2007). No grupo de amostras pertencentes a esta linhagem, podemos notar a estreita similaridade e identidade de 100% no tocante a composição de aminoácido entre amostras de infecções com neonatos e amostras de hospital e posto de saúde, o que nos leva a sugerir que a mesma cepa que acometeu crianças na comunidade também infectou crianças recém nascidas.

Na linhagem II detectamos a presença de uma substituição na posição 44, dentro da região de variação 3 (VR3), em uma sequência de sinal de peptídeo. Essa alteração também esteve presente em amostras de 1993 e 1994 em um estudo realizado em Taiwan (ZAO *et al.*, 1999) e em outras sequências humanas analisadas (Matlab6-04, MMC6,SC-4, DR0017, NG5113, Rus-Nov-06-885, PAK458).

A substituição de aminoácido na posição 96 (Asp→Asn), localizada nas regiões antigênicas A e VR5, esteve presente em amostras da linhagem II, sub-linhagem IIa e IIc. Estudos têm relatado que essa alteração induz a uma mudança na carga elétrica, podendo resultar em uma alteração conformacional dos epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes (LAZDINS *et al.*, 1995; ZAO *et al.*, 1999; ITURRIZA-GÓMARA *et al.*, 2001). Foi proposto que as regiões antigênicas A e C, que estão distantes na molécula linear interagem estreitamente dobrando na forma da molécula VP7 (ITURRIZA-GÓMARA *et al.*, 2001). Assim, a substituição de aminoácido na posição 96 (Asp/Asn) é a provável responsável por um escape destas cepas a anticorpos de neutralização. Todas as amostras com alteração na

posição 96, também tiveram alteração na posição 87, resultado semelhante ao encontrado por Iturriza-Gómara et al (2001).

A alteração na posição 96 foi detectada predominantemente em amostras de 2006 a 2008. Entretanto, foi identificada essa alteração em uma amostra (NSC206) proveniente do ano de 1993. Esse fato sugere que esta mutação provavelmente surgiu no início da década de 90, conferindo a sublinhagem IIc uma ferramenta de escape às defesas do hospedeiro e que talvez não tenha conseguido nesse período causar surto pelo fato da população exposta já ter entrado em contato recente com amostras G2 da linhagem III ou devido a características cíclicas de ocorrência de G2. Entretanto, a partir de 2006, em um cenário de implantação e pós implantação da vacina, onde possivelmente passou a ocorrer uma pressão seletiva entre as cepas de RV-A, com mudança na ecologia do vírus, o que propiciou o ressurgimento desta linhagem que em 2008 fez da sublinhagem IIc única a ser detectada nesse estudo.

Nossos resultados são semelhantes aos encontrados em Taiwan em 1993 (ZAO *et al.*, 1999), aos achados no Reino Unido por Iturriza-Gómara et al (2001), Arista et al (2005) em amostras da Itália e Mascarenhas et al (2010), em amostras provenientes do Sul do Pará. Essa alteração pode, portanto, ser considerada como uma mutação de escape a anticorpos que encontra-se dispersa geograficamente.

Dentro das sublinhagens IIc e IIa, duas amostras, a SC-PA08 e a SAL-1940D, sofreram alterações de aa nas posições 146 e 147, respectivamente, região antigênica B e sítio de glicosilação da proteína. Mudanças na posição 146 levam a eliminação do sítio de glicosilação, enquanto que modificações na posição 147 estão relacionadas com perda de reconhecimento de epítomos específicos por monotipos específicos Mabs (COULSON et al., 1996).

Na sub-linhagem IIa, que ocorreu nos anos de 2006 e 2007 em todos os Estados participantes deste estudo, podemos detectar alterações importantes nas posições 87 e 96, 213 e 242, pertencentes as regiões antigênicas A, C e F, respectivamente. Esta sub-linhagem foi detectada na Itália em amostras de 2003 e 2004 (ARISTA *et al.*, 2005) e no Brasil em amostras de 2006 (Mascarenhas *et al.*, 2010).

A sub-linhagem II d esteve presente em amostras de 1993-1994 (estudo com infecção nosocomial) e 1997 (estudo com recém-nascidos). Neste grupamento, as amostras foram muito similares entre si (99,3%). Essas amostras foram conservadas em seus sítios de glicosilação, apresentando alterações em regiões hipervariantes do gene. Nas amostras nosocomiais percebemos uma alteração típica das mesmas na posição 50 (T→A), não havendo relatos na literatura de que esta alteração possa acarretar alguma modificação para este genótipo. Essa alteração não foi observada em nenhuma das amostras que foram utilizadas como protótipo. O fato de infecções de origens diferentes ocorrem pela mesma linhagem pode estar relacionado ao fato de ambas as infecções serem de origem hospitalar, o que pode indicar que o vírus circula livremente entre ambientes, causando infecções sintomáticas e assintomáticas. Vale ressaltar, também, que essas amostras quanto ao gene VP4, foram P[6] para neonatos, o que está de acordo com dados de ocorrência mundial em que infecções em neonatos pelo genótipo G2 este está sempre associado ao tipo P[6]. Nas infecções nosocomiais o G2 esteve associado ao genótipo P[4], exceção a amostra nsc082 que é G2P[6].

Quando comparamos amostras dos diferentes estados participantes, podemos notar que, dentro das suas sub-linhagens, essas são idênticas entre si em nível de aa. Este fato nos leva a concluir que a cepa de rotavírus G2 que circulou foi

a mesma para todas as regiões geográficas investigadas e que sua ocorrência foi simultânea, não existindo barreiras para a propagação destas cepas.

Para o gene VP4, notamos a circulação ao longo desse estudo de dois genótipos P[4] e P[6], os quais comumente estão associados ao genótipo G2 da proteína VP7. Para o genótipo P[4], notamos a circulação de duas linhagens P[4]-4 e P[4]-5. Na P[4]-4 encontramos exclusivamente amostras dos anos de 1998 a 2000 de Belém do Pará. Essas amostras apresentaram alterações de aminoácidos que são particulares, além modificações em epítomos de neutralização. A Alteração de aa na posição 217 esta relacionada com resistência a MAbS (DORMITZER et al., 2002). Nossas amostras foram similares a outras do Brasil de 2002 e da Itália de 1996-1997, sendo que a maior parte agrupou na linhagem P[4]-5, com amostras que circularam nos anos de 1993-1994 e de 2006 a 2008. As amostras deste estudo agruparam com outras de várias partes do mundo, inclusive Brasil. Nossos resultados são similares aos encontrados no Paraguai por Espínola et al, (2008); entretanto, estes detectaram somente a ocorrência da linhagem P[4] nos anos de 1998-2000 e 2002-2005. De acordo com nossos dados, podemos perceber que esta linhagem tem se mantido como prevalente ao longo dos anos, embora sofrendo pequenas variações.

As amostras de genótipo P[6] agruparam dentro da linhagem Ia, sendo muito similares a amostras do Brasil que circularam em 1997, ano em que nossas amostras circularam, sendo que ambas apresentam as mesmas alterações a nível de aminoácidos, o que nos leva a concluir tratar-se da mesma cepa circulante. Todas as nossas amostras P[6] apresentaram alteração na posição 146, a qual esta associada ao escape a anticorpos de neutralização (DORMITZER et al., 2002). Este genótipo pode aparecer associado com a maioria das especificidades de VP7, sendo

detectado em infecções neonatais assintomáticas e sintomáticas (BÁNYAI et al., 2004).

O genótipo G2 foi detectado em Belém do Pará ao longo de 16 anos, entre 1992 a 2008, assim como em outros Estados da região amazônica ao longo de 3 anos (2006-2008). Durante este período podemos observar que este genótipo ocorreu de forma descontínua, em três intervalos de tempo (1992-1994, 1996-2000, 2006-2008), e predominando quase absoluto em suas ocorrências, seguindo-se de intervalos de completo desaparecimento, o que sugere uma ocorrência cíclica ao longo do tempo. Embora não possamos afirmar o intervalo exato de recorrência deste genótipo, podemos afirmar que ocorrem após períodos de aparente extinção deste genótipo.

Quanto à diversidade de cepas de rotavírus genótipo G2 do período anterior e posterior a implantação da vacina Rotarix[®] no calendário nacional de imunizações, podemos perceber que são amostras muito diferentes, com a ocorrência de duas linhagens e três sub-linhagens, em intervalos distintos de tempo, exceção feita ao período de 2006-2007, em que as sub-linhagens IIa e IIc coexistiram, sendo que a IIa foi completamente extinta no ano de 2008, onde a IIc predominou amplamente.

O fato do genótipo G2 ter prevalecido no período de pós implantação da vacina, possivelmente não está associado a uma seleção vacinal e sim a própria biologia deste genótipo que parece possuir ocorrência cíclica, com períodos de não ocorrência e posterior explosão em surtos, os quais se dão com linhagens ou sub-linhagens diferentes da ocorrência anterior.

Um estudo desenvolvido no Brasil mostrou que a vacina Rotarix[®] foi eficaz na proteção contra a cepa G2P[4] em crianças de 6-11 meses. Entretanto, a eficácia acima de 12 meses declinou, o que sugere que a imunidade diminuiu nessas

crianças (CORREIA *et al.*, 2010). Um estudo desenvolvido em Aracaju e Sergipe mostrou eficácia da vacina contra RV-A frente ao genótipo P[4]G2 de 89% e 95%, respectivamente (GURGEL *et al.*, 2009). Em recente estudo sobre efetividade da vacina no Brasil, constatou-se que a efetividade da Rotarix[®] foi maior em crianças de 3-11 meses (LINHARES *et al.*, 2010).

Quando analisamos comparativamente amostras circulantes entres os Estados participantes, podemos notar que essas amostras são absolutamente idênticas entre si, não havendo, portanto, variação de cepas entre estados, o que circulou no Pará de 2006-2008 foi o mesmo que circulou nos demais Estados envolvidos.

Nosso estudo possibilitou o conhecimento da diversidade genética e da circulação de cepas de rotavírus genótipo G2, o qual figura hoje no cenário mundial como o mais frequente. Mesmo em países como o Brasil, em que a vacina contra rotavírus foi incorporada no calendário nacional de imunizações desde 2006, este genótipo foi o mais predominante. Fatos como o relatado acima, dimensionam a grande importância de estudos com o genótipo G2 de RV-A o qual já demonstrou apresentar características particulares e que devem ter seu estudo aprofundado.

8-CONCLUSÃO:

- Os RV-A genótipo G2 de VP4 estão associados na grande maioria dos casos, ao genótipo P[4] de VP4.
- Os genótipos G2 do gene VP7 de RV-A que circularam em outros estados da região amazônica, são idênticos aos que circulam em Belém, Pará o que sugere que as mutações que ocorreram não são geográfica, nem temporalmente localizadas.
- A alteração no aminoácido 96 do genótipo G2 de VP7 surgiu em amostras de 1993, não se estabelecendo neste período, ressurgindo em outro momento como mecanismo de escape ao sistema imune.
- A mutação na posição 96, associada à posição 87 do genótipo G2 de VP7, foi filogeneticamente importante para explosão e persistência desta sublinhagem na população a partir de 2006.
- Alterações conjuntas nas posições 44, 75, 87 e 96 do genótipo G2 de VP7 podem estar relacionada com a explosão e persistência da linhagem no cenário atual.
- As linhagens de RV-A genótipo G2 de VP7 detectadas na era pré-vacinal são filogeneticamente diferentes daquelas do período pós-vacinação, evidenciando-se pela alternância na circulação das linhagens e sub-linhagens.
- A mutação que ocasionou o ressurgimento e a persistência da linhagem II do genótipo G2 na população foi provavelmente originada em uma amostra em 1993.

- Amostras de neonatos e nosocomiais foram 100% similares quanto ao gene VP7.
- Os genes VP4 e VP7 sofreram polimorfismo no decorrer dos anos de estudo.
- Nossos resultados reforçam dados de ocorrência mundial que evidenciam que o ressurgimento do genótipo G2 de VP7 se deu em associação ao genótipo P[4]-5 de VP4.
- Os RV-A genótipo G2 analisados no presente estudo apresentaram um padrão cíclico similar àqueles sugerido ser característico desse genótipo.
- Muitas alterações a nível de aminoácidos não foram até o momento relatados pela literatura, não possuindo estudos que possam estimar o valor dessas mudanças.
- Há necessidade de investigações mais apuradas sobre alterações em regiões de mutação pouco conhecidas, suas alterações a nível biológico associados a possíveis implicações clínicas.

9- REFERÊNCIAS:

ABE M, et al. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. **Virus Res.** Vol. 144; p 250–7; 2009.

AHMED K et al. Molecular characterization of VP7 gene of human rotaviruses from Bangladesh. **Virus Genes.** V 40; p347-56; 2010.

AHMED K, NAKAGOMI T, NAKAGOMI O. Isolation and molecular characterization of a naturally occurring non-structural protein 5 (NSP5) gene reassortant of group A rotavirus of serotype G2P[4] with a long RNA pattern. **Journal of Medical Virology** ; v. 77; p 323-30; 2005.

ALFIERI A.A et al. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. **Arch Virol.** V. 141; p 2353-64; 1996.

ANDERSON E.J. AND WEBER S.G. Rotavirus infection in adults. **Lancet Infect Dis**; p 91-9, 2004.

ARAÚJO I.T et al. Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol.** V 139, p1999-2001, 2001.

ARAÚJO IT. et al. 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, p 995-1001, 2007.

ARIAS C.F. et al. Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). **Novartis Found Symp.** Vol 238, p 47-60, 2001.

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

ARISTA S. et al. G2 rotavirus infections in an infantile population of the South of Italy: variability of viral strains over time. **J Med Virol.** V. 77, p. 587-94, 2005.

BAHL R. et al. Incidence of Severe Rotavirus Diarrhea in New Delhi, India, and G and P Types of the Infecting Rotavirus Strains.S114 **.JID** v.192, 2005.

BALL JM, TIAN P, ZENG CQ, MORRIS AP, ESTES MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science** .vol 272, p 101-4, 1996.

BÁNYAI K. et al. Sequencing and phylogenetic analysis of human genotype P[6] rotavirus strains detected in Hungary provides evidence for genetic heterogeneity within the P[6] VP4 gene. **J Clin Microbiol**. Vol 42, p 4338-43, 2004.

BARNES GL, UNICOMB L, BISHOP RF. Severity of rotavirus infection in relation to serotype, monotype and electropherotype. **J Paediatr Child Health**. Vol 28, p 54-7, 1992.

BARRIL PA, et al. Detection of group a human rotavirus G9 genotype circulating in Córdoba, Argentina, as early as 1980. **J Med Virol**. Vol 78, p 1113-8, 2006.

BERN C, et al. Rotavirus diarrhea in Bangladeshi children: correlation of disease severity with serotypes. **J Clin Microbiol**. Vol 30,p 3234-8, 1992.

BERNSTEIN DI. Rotavirus overview. **Pediatr Infect Dis J**. Vol 28, p. S50-3, 2009.
BICAN, P. et al. Purification and characterization of bovine rotavirus cores; **J Virol**, vol 43, p1113-7, 1982.

BISHOP R. et al. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. **N. Engl. J. Med**. Vol 309, p72–76, 1983.

BISHOP RF, et al. Serum, fecal, and breast milk rotavirus antibodies as indices of infection in mother-infant pairs. **J Infect Dis**. Vol 174, p:S22-9, 1996.

BLOMQVIST M, et al. Rotavirus infections and development of diabetes-associated autoantibodies during the first 2 years of life. **Clin Exp Immunol**. Vol. 128, p511-5, 2002.

BLUTT SE, et al. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event?. **Lancet**. Vol. 362, p1445-9, 2003.

BLUTT SE, et al. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. **PLoS Med**. vol 4, p121, 2007.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol 28, p495-503, 1990.

BOSHUIZEN, J. A. et al. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. **J. Virol**. Vol 77, p13005–13016, 2003.

BOTH, G.W., BELLAMY, A.R., MITCHELL, D.B. Rotavirus protein structure and function. **Curr Top Microbiol Immunol**. Vol 185, p 67-105, 1994.

BRASIL. Indicadores de dados básicos para a saúde. Ministério da Saúde. departamento de análise de situação de saúde/SVS. Brasília, D.F.: **Ministério da Saúde**, p280, 2004.

BROWNING GF, et al. Evidence for two serotype G3 subtypes among equine rotaviruses. **J Clin Microbiol**. Vol 30, p485-91, 1992.

CARNEIRO NB. et al. Clinical and epidemiological aspects of children hospitalized with severe rotavirus-associated gastroenteritis in Salvador, BA, Brazil. **Braz J Infect Dis**. Vol 9; p525-8, 2005.

CASCIO A, et al. Rotavirus gastroenteritis in Italian children: can severity of symptoms be related to the infecting virus? **Clin Infect Dis**. Vol 32, p1126-32, 2001.

CASOLA, A. et al. Rotavirus infection of cultured intestinal epithelial cells induces secretion of CXC and CC chemokines. **Gastroenterology**. vol 114, p947–955, 1998. CDC. Rotavirus surveillance - worldwide, 2001-2008. **MMWR**. vol 57, p1255-1257, 2008.

CHOUIKHA A, et al. Relationship between electropherotypes and VP7/VP4 genotypes of group A rotaviruses detected between 2000 and 2007 in Tunisian children. **Pathol Biol**. Vol 28, 2009.

CHRISTY, C. et al. Field trial of rhesus rotavirus vaccine in infants. **Pediatr. Infect. Dis. J**. vol 7, 645–650, 1988.

CHRYSTIE IL, TOTTERDELL BM, BANATVALA JE. Asymptomatic endemic rotavirus infections in the newborn. **Lancet**. Vol 1, p1176-8, 1978.

CIARLET, M.; ESTES, M. Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies. **Encyclopedia of Environmental Microbiology**. p.2573-2773, 2002.

CLARK HF. et al Decline in cases of rotavirus gastroenteritis presenting to The Children's Hospital of Philadelphia after introduction of a pentavalent rotavirus vaccine. **Clin Vaccine Immunol**. Vol 16, p382-6, 2009.

CLARK, H. F. et al. Diverse serologic response to rotavirus infection of infants in a single epidemic. **Pediatr Infect. Dis**. vol 4, p626-631, 1985 .

CONSTENLA D.O. Economic Impact of a Rotavirus Vaccine in Brazil. **J health popul nutr**. vol 26, p388-396, 2008.

COOK, S. M. et al. Global seasonality of rotavirus infections. **OMS**. v.68, 1990, p.171-177.

CORREIA JB, et al. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. **J Infect Dis**. Vol 201, p363-9, 2010.

CORTESE MM, et al. Reduction in Gastroenteritis in United States Children and Correlation With Early Rotavirus Vaccine Uptake From National Medical Claims Databases. **Pediatr Infect Dis J**. 2010.

CORTESE MM, PARASHAR UD; Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recomm Rep**. Vol 58, p1-25, 2009.

COSTA PS et al. Rotavirus A infections and reinfections: genotyping and vaccine implications. **J Pediatr**. Vol 80, p119-22, 2004.

COULSON BS et al. Amino acids involved in distinguishing between monotypes of rotavirus G serotypes 2 and 4. **J Gen Virol**. Vol 77, p239-45, 1996.

CRAWFORD SE et al. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. **J Virol**. Vol 80, p4820-32, 2006.

CUNLIFFE N. AND NAKAGOMI O. Introduction of rotavirus vaccines in developing countries: remaining challenges. **Ann Trop Paediatr**, v 27 (3), p 157-67, 2007.

CUNLIFFE NA. et al. Epidemiology of rotavirus diarrhoea in Africa: a review to assess the need for rotavirus immunization. **Bull World Health Organ**. Vol 76, p525-37, 1998.

CURNS AT .et al. Projected Impact of the new rotavirus vaccination program on hospitalizations for gastroenteritis and rotavirus disease among US children <5 years of age during 2006-2015. **J Infect Dis**. Vol 200, pS49-56, 2009.

CURNS AT, et al. Reduction in Acute Gastroenteritis Hospitalizations among US Children After Introduction of Rotavirus Vaccine: Analysis of Hospital Discharge Data from 18 US States. **J Infect Dis**. Vol 22, 2010.

DAS BK, et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **J Clin Microbiol**. Vol 32, p1820-2, 1994.

DE DONNO A et al. Emergence of unusual human rotavirus strains in Salento, Italy, during 2006-2007. **BMC Infect Dis**. Vol 15, p9:43, 2009.

DE OLIVEIRA LH et al. Rotavirus vaccine introduction in the Americas: progress and lessons learned. **Expert Rev Vaccines**, vol 7; p345-53, 2008.

De Vos B, et al. A rotavirus vaccine for prophylaxis of infants against rotavirus gastroenteritis. **Pediatr Infect Dis J**. v 23 p 179-82, 2004.

DEL AMO IP. et al. Situación epidemiológica de las gastroenteritis producidas por rotavirus, recomendaciones de la vacunación frente a rotavirus. 2006.

DELACOUR H. Impact of rotavirus vaccines in developing countries. **Med Trop**. vol 69 p327-32, 2009.

DENNEHY PENELOPE H. Rotavirus Vaccines: an Overview. **Clinical microbiology reviews**. p198-208, 2008.

DEO R.C. et al. Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. **Cell**. Vol108, p71-81, 2002.

DESSELBERGER U, ITURRIZA-GÓMARA M, GRAY JJ. Rotavirus epidemiology and surveillance. **Novartis Found Symp.** Vol 238; p125-47, 2001.

DESSELBERGER U. Genome rearrangements of rotaviruses. **Arch Virol Suppl.** Vol 12, p37-51, 1996.

DHAMA K, et al. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Vet Res Commun.** Vol 33, p 1-23, 2009.

DI LERNIA V, LOMBARDI M, LO SCOCCO G. Infantile acute hemorrhagic edema and rotavirus infection. **Pediatr Dermatol.** V 21(5):548-50, 2004.

DOAN, LT. et al. Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. **J. Med. Virol.** Vol 69, p.588-594, 2003.

DORMITZER PR, et al. Molecular characterization of the VP1, VP2, VP4, VP6, NSP1 and NSP2 genes of bovine group B rotaviruses: identification of a novel VP4 genotype. **Arch Virol.** Vol 155, p159-67, 2010.

EBRAHIM G. J. Rotaviruses and Rotavirus Vaccines. **Journal of Tropical Pediatrics.** V 54, p 79-82, 2008.

ESPÍNOLA EE, et al. Sequence and phylogenetic analysis of the VP4 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. **Arch Virol.** Vol 153; p1067-73, 2008.

ESTES, M. K. e MORRIS, A. P. A viral enterotoxin. A new mechanism of virus induced pathogenesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol 473, p73-82, 1999.

ESTES, M. K., KAPIKIAN, A. Z. **Rotaviruses.** In: Knipe, D. M.; Howley, P. M.; Griffin, D. E., editors. *Virology*. 5th ed Philadelphia, PA: Lippincott. Williams and Wilkins, p. 1917-1957, 2007.

FISCHER, T. K. et al. Protective immunity after natural rotavirus infection: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, west Africa. **J Infect. Dis.** Vol 186, p593–597, 2002.

FRANCO, M. A., C. TIN, e H. B. GREENBERG. CD8 T cells can mediate almost complete short-term and partial long-term immunity to rotavirus in mice. **J Virol.** Vol 71, p4165–4170, 1997.

FRANCO, M. A., N. FENG e H. B. GREENBERG. Molecular determinants of immunity and pathogenicity of rotavirus infection in the mouse model. **J Infect. Dis.** Vol 174, pS47–S50, 1996.

FRANCO, M. A.; ANGEL, J.; GREENBERG, H. B. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. **Vaccine**, v. 24, p.2718 –2731, 2006.

FREITAS ER, et al. Occurrence of group A rotavirus mixed P genotypes infections in children living in Goiânia-Goiás, Brazil. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** Vol 27, p1065-9, 2008.

FRÜHWIRTH M. Distribution of rotavirus VP4 and VP7 serotypes among nonhospitalized and hospitalized patients with nosocomially acquired gastroenteritis in Austria. **J Clin Microbiol.** Vol 38, p1804-6, 2000.

GENTSCH JR. et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol.** Vol 30, p1365-73, 1992.

GENTSCH, JR. et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. **J Infect. Dis.** Vol 192, pS146–S159, 2005.

GHOSH S, et al. Evidence for bovine origin of VP4 and VP7 genes of human group A rotavirus G6P[14] and G10P[14] strains. **J Clin Microbiol.** Vol 45, p2751-3, 2007.

GLASS RI. et al. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. **Lancet.** V 368, p.323-368, 2006.

GLASS RI. et al. Rotavirus vaccines: targeting the developing world. **J Infect Dis.** Vol 192; pS160-6, 2005.

GLEIZES O. et al. Nosocomial rotavirus infection in European countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. **Pediatr Infect Dis J.** vol 25; pS12-S21, 2006.

GORDON A.G. Rotavirus infections and the sompe syndrome. **J Infect Dis.** Vol 146, 1982, p117-8.

GOUVEA V, et al. Restriction endonuclease analysis of the vp7 genes of human and animal rotaviruses. **J Clin Microbiol.** Vol 3, p917-23, 1993.

GOUVEA V, et al. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. **J Clin Microbiol.** Vol 32, p1408-9, 1994.

GRAHAM D.Y., ESTES M.K. Proposed working serologic classification system for rotaviruses. **Annales de l'Institut Pasteur de Virologie.** Vol 136, p5–12, 1985.

GRAY J, et al. Rotavirus. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** Vol 46, pS24-31, 2008.

GRIFFIN DD, et al. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6] G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. **Virology.** Vol 294, 256-69, 2002.

GURGEL RG, et al. Incidence of rotavirus and all-cause diarrhea in northeast Brazil following the introduction of a national vaccination program. **Gastroenterology.** Vol 137; p1970-5, 2009.

GURGEL RQ, et al. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review. **J Clin Virol.** Vol 43, p1-8, 2008.

GUSMÃO RH. et al. Rotaviruses as a cause of nosocomial, infantile diarrhoea in northern Brazil: pilot study. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Vol 90, p743-9, 1995.

GUSMÃO RH. et al. Rotavirus subgroups, G serotypes, and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belém, Brazil. **J Trop Pediatr.** Vol 45, p81-6, 1999.

HEATON PM et al. Development of a pentavalent rotavirus vaccine against prevalent serotypes of rotavirus gastroenteritis. **J Infect Dis.** Vol 192, p17-21, 2005.

HERRING A.J. et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology.** Vol 16, p473-477, 1982.

HOSHINO Y AND KAPIKIAN AZ. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. **J Health Popul Nutr.** Vol 18, p5-14, 2000.

HOSHINO Y, et al. A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains. **Virology.** Vol 332, p177-88, 2005.

HOSHINO Y, et al. Horizontal transmission of rhesus monkey rotavirus-based quadrivalent vaccine during a phase 3 clinical trial in Caracas, Venezuela. **J Infect Dis.** Vol 187, p791-800, 2003.

HOSHINO, Y. AND A. Z. KAPIKIAN. Rotavirus vaccine development for the prevention of severe diarrhea in infants and young children. **Trends Microbiol.** Vol 2, p242-249, 1994.

HUANG H. et al. Interaction (s) of rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) C-terminal peptides with model membranes. **Biochem J.** vol. 308; p723-33, 2004.

ITO H. et al. Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses. **Virus Res.** Vol 75; p123-38, 2001.

ITURRIZA GÓMARA M, et al. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J Virol.** Vol 76, p6596-601, 2002.

ITURRIZA GÓMARA M. et al. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J Virol.** Vol 76, p6596-601, 2002.

ITURRIZA-GÓMARA M, et al. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. **J Virol.** Vol 75, p3696-705, 2001.

JAIN V. et al. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed infections in India. **J Clin Microbiol.** Vol 39; p3524-9, 2001.

JAYARAM H, ESTES MK, PRASAD BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. **Virus Res.** V101, p 67-81, 2004.

JIANG B., GENTSCH J.R., GLASS, R.I. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. **Clin Infect Dis.** V 34, p 1351-61, 2002.

JIANG B., L. SNIPES-MAGALDI, P. DENNEHY, H. KEYSERLING, R. C. HOLMAN, J. BRESEE, GENTSCH, AND R. I. GLASS. Cytokines as Mediators for or Effectors against Rotavirus Disease in Children. **Clinical and diagnostic laboratory immunology.** Vol. 10, p. 995–1001, 2003.

KAGA E, NAKAGOMI O. Recurrent circulation of single nonstructural gene substitution reassortants among human rotaviruses with a short RNA pattern. **Arch Virol.** V136, p 63-71, 1994.

KANG G, ARORA R, CHITAMBAR SD, DESHPANDE J, GUPTA MD, KULKARNI M, NAIK TN, MUKHERJI D, VENKATASUBRAMANIAM S, GENTSCH JR, GLASS RI, PARASHAR UD. Indian Rotavirus Strain Surveillance Network. Multicenter, hospital-based surveillance of rotavirus disease and strains among Indian children aged <5 years. **J Infect Dis.** V 200, p147-53, 2009.

KANG G. **Rotavirus vaccines.** Indian J Med Microbiol. V 24, p 252–257, 2006.

KAPIKIAN A.Z., CHANOCK R.M. **Rotaviruses.** In: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Hirsh MS, Melnick JL, Monath TP (ed) *Virology*, 3rd edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p.1657-1708, 1996.

KEIDAN I, SHIF I, KEREN G, PASSWELL JH. Rotavirus encephalopathy: evidence of central nervous system involvement during rotavirus infection. **Pediatr Infect Dis J**. V11, p773-5,1992.

KELJO, D. J. AND SMITH, A. K. Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. **Journal Pediatric Gastroenterology Nutritional**. V 7, p.249- 256, 1988.

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**. V16, p111-20, 1980.

KIULIA NM, KAMENWA R, IRIMU G, NYANGAO JO, GATHERU Z, NYACHIEO A, STEELE AD, MWENDA JM. The epidemiology of human rotavirus associated with diarrhoea in Kenyan children: a review. **J Trop Pediatr**. V 54, p 401-5, 2008.

KOSHIMURA Y, NAKAGOMI T, NAKAGOMI O. The relative frequencies of G serotypes of rotaviruses recovered from hospitalized children with diarrhea: A 10-year survey (1987–1996) in Japan with a review of globally collected data. **Microbiol Immunol**. V 44, p 499– 510, 2000.

KUMAR M, RATHORE DP, SINGH AK. Amberlite XAD-2 functionalized with o-aminophenol: synthesis and applications as extractant for copper(II), cobalt(II), cadmium(II), nickel(II), zinc(II) and lead(II). **Talanta**. V 51, p 1187-96, 2000.

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**. 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, p 80-9, 1995.

LEITE JP, ALFIERI AA, WOODS PA, GLASS RI, GENTSCH JR. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. **Arch Virol**. V141, p 2365-74, 1996.

LEITE JPG, FILIPE ANIBAL CARVALHO-COSTA, ALEXANDRE C LINHARES. **Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience -A Review**. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Vol. 103, p 745-753, 2008.

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, p141-8, 2008.

LINHARES A.C., BRESEE J.S. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. **Rev Panam Salud Publica**, V8, p 305-3, 2000.

LINHARES AC, CARMO KB, OLIVEIRA KK, OLIVEIRA CS, FREITAS RB, BELLESI N et al. Nutritional status in relation to the efficacy of the rhesus-human reassortant, tetravalent rotavirus vaccine (RRV-TV) in infants from Belém, Pará state, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, 44:13-6, 2002.

LINHARES AC, et al. Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. **Lancet.**V 371, p1181-9, 2008.

LINHARES AC, LANATA CF, HAUSDORFF WP, GABBAY YB, BLACK RE. Reappraisal of the Peruvian and Brazilian lower titer tetravalent rhesus-human reassortant rotavirus vaccine efficacy trials: analysis by severity of diarrhea. **Pediatr Infect Dis J.**18, p 1001-6, 1999.

LINHARES AC, MASCARENHAS JD, GUSMÃO RH, GABBAY YB, FIALHO AM, LEITE JP. Neonatal rotavirus infection in Belém, northern Brazil: nosocomial transmission of a P[6] G2 strain. **J Med Virol.** V 67, p 418-26, 2002.

LINHARES AC, PINHEIRO FP, SCHMETZ C, MULLER G, PETERS D. Duovírus (rotavírus) em Belém, Pará. **Rev Inst Med Trop.** V19, p278-9, 1977.

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, V 312-4, 2006.

LINHARES AC, VILLA LL. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). **J Pediatr.** V 82, p 25-34, 2006.

LINHARES e VELÁZQUEZ. Emerging Infectious Diseases ,Vol. 14, No. 5, May 2008.

LUNDGREN O, PEREGRIN AT, PERSSON K, KORDASTI S, UHNOO I, SVENSSON L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. **Science**. V 287, p491-5, 2000.

LUNDGREN O, SVENSSON L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes Infect**. V 3, p1145-56, 2001.

LUZ C.R., MASCARENHAS J.D., GABBAY Y.B., MOTTA A.R., LIMA T.V., SOARES L.S., et al. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil. **Rev Inst Med Trop**. V 47, p 287-93, 2005.

LYNCH M, LEE B, AZIMI P, GENTSCH J, GLASER C, GILLIAM S, CHANG HG, WARD R, GLASS RI. Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. **Clin Infect Dis**. V33, p 932-8, 2001.

MADHI SA, CUNLIFFE NA, STEELE D, et al. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. **N Engl J Méd**, V 362, p 289-98, 2010.

MAES P, MATTHIJNSSENS J, RAHMAN M, VAN RANST M. **RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses**. **BMC Microbiol**. V9, p 238, 2009.

MARTELLA V, BANYAI K, CIARLET M, ITURRIZA-GOMARA M, LORUSSO E, DE GRAZIA S, ET AL. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: Evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. **Virology**. V 344, p 509-19, 2006.

MARTELLA V, CIARLET M, BASELGA R, ARISTA S, ELIA G, LORUSSO E, BANYAI K, TERIO V, MADIO A, RUGGERI FM, FALCONE E, CAMERO M, DECARO N, BUONAVOGLIA C. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. **Virology**. V 337, p 111-23, 2005.

MARTINEZ-LAZO J, ROMÁN A, HEAD J, CERVERA I, RODRÍGUEZ M, RODRÍGUEZ-AVIAL I, PICAZO J.J. Phylogeny of G9 rotavirus genotype: a possible explanation of its origin and evolution. **J Clin Virol**. V44, p 52-57, 2009.

MASCARENHAS JD, LIMA CS, DE OLIVEIRA DS, GUERRA SDE F, MAESTRI RP, GABBAY YB, DE LIMA IC, DE MENEZES EM, LINHARES ADA C, BENSABATH G. Identification of two sublineages of genotype G2 rotavirus among diarrheic children in Parauapebas, Southern Pará State, Brazil. **J Med Virol**. V 82, p 712-9, 2010.

MASCARENHAS JD, 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.** V126, p149-58, 2007.

MATSON, D. O., M. L. O'RYAN, L. K. PICKERING, S. CHIBA, S. NAKATA, P. RAJ, AND M. K. ESTES. Characterization of serum antibody responses to natural rotavirus infections in children by VP7-specific epitope-blocking assays. **J. Clin. Microbiol.** V 30, p1056–1061, 1992.

MATTHIJNSSENS J, et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Arch Virol.** V153, p1621-9, 2008.

MATTHIJNSSENS J, RAHMAN M, CIARLET M, ZELLER M, HEYLEN E, NAKAGOMI T, UCHIDA R, HASSAN Z, AZIM T, NAKAGOMI O, VAN RANST M. Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. **Emerg Infect Dis.** V16, p625-30, 2010.

MATTION NM, MITCHELL DB, BOTH GW, ESTES MK. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. **Virology.** V181, p295-304, 1991.

MCCORMACK e KEAM. Rotavirus vaccine RIX 4414 (Rotarix™). **Pediatr Drugs.** V11, p 75-88, 2009.

MCNEAL, M. M., M. N. RAE, AND R. L. WARD. Evidence that resolution of rotavirus infection in mice is due to both CD4 and CD8 cell-dependent activities. **J. Virol.** V71, p8735–8742, 1997.

MERTENS P. The dsRNA viruses. **Virus Res.** V 101, p3-13, 2004

MIKAMI T, NAKAGOMI T, TSUTSUI R, ISHIKAWA K, ONODERA Y, ARISAWA K, NAKAGOMI O. An outbreak of gastroenteritis during school trip caused by serotype G2 group A rotavirus. **J Med Virol.** V73, p460-4, 2004.

MILLI, L.C.F.L. e WALDMAN E.A. Tendência temporal e desigualdades na mortalidade por diarreias em menores de 5 anos. **J. Pediatria.** Vol 85, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2006/c07.def>. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença Diarréica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano – VORH.** 2005.

MISHRA V, AWASTHI S, NAG VL, TANDON R. Genomic diversity of group A rotavirus strains in patients aged 1-36 months admitted for acute watery diarrhoea in northern India: a hospital-based study. **Clin Microbiol Infect.** V 16, p45-50, 2010.

MOON HW. Comparative histopathology of intestinal infections. **Adv Exp Med Biol.** V412, p1-19, 1997.

MORI Y, BORGAN MA, ITO N, SUGIYAMA M, MINAMOTO N. Diarrhea-inducing activity of avian rotavirus NSP4 glycoproteins, which differ greatly from mammalian rotavirus NSP4 glycoproteins in deduced amino acid sequence in suckling mice. **J Virol,** V76, p 5829-5834, 2002.

MORILLO SG, LUCHS A, CILLI A, COSTA FF, CARMONA RC, TIMENETSKY MC. Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era. **J Pediatr.** V86, p155-8, 2010.

MOTA-HERNANDEZ, F. et al. Rotavirus diarrhea severity is related to the VP4 type in Mexican children. **J Clin. Microbiol.** v.41, p.3158-3162, 2003.

MUNFORD V, GILIO AE, DE SOUZA EC, CARDOSO DM, CARDOSO DD, BORGES AM, COSTA PS, MELGAÇO IA, ROSA H, CARVALHO PR, GOLDANI MZ, MOREIRA ED JR, SANTANA C, EL KHOURY A, IKEDO F, RÁCZ ML. Rotavirus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: a hospital-based surveillance study. **J Infect Dis.** V200, p106-13, 2009 .

MUNOS MK, WALKER CL, BLACK RE. The effect of rotavirus vaccine on diarrhoea mortality. **Int J Epidemiol.** V39, p 56-62, 2010.

MUSALEM, C.; ESPEJO, R. T. Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. **Journal of General Virology.** V.66, p.2715-2724, 1985.

NAKAGOMI O, NAKAGOMI T. Genomic relationships among rotaviruses recovered from various animal species as revealed by RNA-RNA hybridization assays. **Res Vet Sci.** V73(3), p207-14, 2002.

NAKAGOMI O, NAKAGOMI T. Molecular evidence for naturally occurring single VP7 gene substitution reassortant between human rotaviruses belonging to two different genogroups. **Arch Virol.** V119, p67-81, 1991.

NEWMAN, R. D., J. GRUPP-PHELAN, D. K. SHAY, AND R. L. DAVIS. Perinatal riskfactors for infant hospitalization with viral gastroenteritis. **Pediatrics.** V103, p E3, 1999.

NGUYEN TA, KHAMRIN P, TRINH QD, PHAN TG, PHAM LE D, HOANG LE P, HOANG KT, YAGYU F, OKITSU S, USHIJIMA H. Sequence analysis of Vietnamese P[6] rotavirus strains suggests evidence of interspecies transmission. **J Med Virol.** V79, p1959-65, 2007.

O'RYAN, M. L., D. O. MATSON, M. K. ESTES, AND L. K. PICKERING. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. **J. Infect. Dis.** V169, p504–511, 1994.

OFFIT PA. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies are clearing. **J. Infect Dis.** V 174, p S59-64, 1996.

OLIVEIRA, A. S. L.; MASCARENHAS, J. D. P.; SOARES, L. S.; GUERRA, S. F. S.; GABBAY, Y. B.; SANCHEZ, N. O.; COLINDRES, R. E.; JUSTINO, M. C. A.; LANZIERI, T. M.; LINHARES, A. C. Rotavirus serotype distribution in Northern Brazil: trends over a 27-year period pre and post national vaccine introduction. Submetido.

OMS. Estimated rotavirus deaths for children under 5 years of age: 2004. **Geneva:WHO,2009.**www.who.int/immunization_monitoring/burden/rotavirus_estimates/en/index.html. 2009.

O'RYAN M, LINHARES AC. Update on Rotarix: an oral human rotavirus vaccine. **Expert Rev Vaccines.** V8, p1627-41, 2009.

O'RYAN M. The ever-changing landscape of rotavirus serotypes. **Pediatr Infect Dis J.** V28, pS60-2, 2009.

PAGE NA, STEELE AD. Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains from the African continent. **J Clin Microbiol.** V42, p595-600, 2004.

PALOMBO EA, BUGG HC, MASENDYCZ PJ, COULSON BS, BARNES GL, BISHOP RF. Multiple-gene rotavirus reassortants responsible for an outbreak of gastroenteritis in central and northern Australia. **J Gen Virol.** V77, p1223-7, 1996.

PAN 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.** V27, p86, 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.** V200, p S9-S15, 2009.

PARASHAR UD, GIBSON CJ, BRESSE JS, GLASS RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerg Infect Dis.** V12, p304-306, 2006.

PARASHAR, U.D., HUMMELMAN, E.G., BRESEE, J.S., MILLER, M.A., GLASS, R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg Infect Dis.** V9, p565-72, 2003.

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.** V40, p135-41, 2007.

PATTON, J.T., SPENCER, E. Genome replication and packaging of segmented doublestranded RNA viruses. **Virology.** V277, p217-25, 2000.

PAUL S K; KOBAYASHI N; NAGASHIMA S; ISHINO; WATANABE S; ALAM M. M. ; AHMED M. U.; HOSSAIN M. A. ; NAIK T. N. Phylogenetic analysis of rotaviruses with genotypes G1, G2, G9, G12 in Bangladesh: evidence for a close relationship between rotaviruses from children and adults. **Arch. Virol.** V153, p1999-2012, 2008.

PAYNE DC, SZILAGYI PG, STAAT MA, EDWARDS KM, GENTSCH JR, WEINBERG GA, HALL CB, CURNS AT, CLAYTON H, GRIFFIN MR, FAIRBROTHER G, PARASHAR UD. Secular variation in United States rotavirus disease rates and serotypes: implications for assessing the rotavirus vaccination program. **Pediatr Infect Dis J.** V28, p948-53, 2009.

PEREIRA, H. G.; AZEVEDO, R. S.; LEITE, J. P.; BARTH, O. M.; SUTMOLLER, F.; DE FARIAS, V.; VIDAL, M. N. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the

rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** V 78, p. 483-490, 1983.

PÉREZ-SCHAEEL I, ESCALONA M, SALINAS B, MATERÁN M, PÉREZ ME, GONZÁLEZ G. Intussusception-associated hospitalization among Venezuelan infants during 1998 through 2001: anticipating rotavirus vaccines. **Pediatr Infect Dis J.** V22, p234-9, 2003.

PEREZ-SCHAEEL I, GONZALEZ M, DAOUD N, PEREZ M, SOTO I, GARCIA D, DAOUD G, KAPIKIAN AZ, FLORES J. Reactogenicity and antigenicity of the rhesus rotavirus vaccine in Venezuelan children. **J Infect Dis.** V155, p334-8, 1987.

PESAVENTO, J. B., J. A. LAWTON, M. E. ESTES, AND B. V. PRASAD. The reversible condensation and expansion of the rotavirus genome. **Proc. Natl. Acad. Sci.** V98, p1381-1386, 2001.

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.** V81, p4645-53, 2007.

PIEC TL, PALOMBO EA. Sequence comparison of the VP7 of serotype G2 rotaviruses from diverse geographical locations. **DNA Seq.** V9, p369-73, 1998.

PIET MAES, JELLE MATTHIJNSSENS, MUSTAFIZUR RAHMAN AND MARC VAN RANST. RotaC: A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. **BMC Microbiology.** V 9, p238, 2009.

POLANCO-MARÍN G, GONZÁLEZ-LOSA MDEL R, RODRÍGUEZ-ANGULO E, MANZANO-CABRERA L, CÁMARA-MEJÍA J, PUERTO-SOLIS M. Clinical manifestations of the rotavirus infection and his relation with the electropherotypes and serotypes detected during 1998 and 1999 in Merida, Yucatan, Mexico. **J Clin Virol.** V27, p242-6, 2003.

PORUCHYNSKY MS, ATKINSON PH. Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. **J Virol.** V65, p4720-7, 1991.

PRASAD, B. V. V.; CHIU, W. **Structure of rotavirus.** In: RAMIG, R. F. (Ed.). Current Topics in Microbiology and Immunology. 1994. v.185, p.1-27.

RAHMAN M, DE LEENER K, GOEGBUER T, WOLLANTS E, VAN DER DONCK I, VAN HOOVELS L, VAN RANST M. Genetic characterization of a novel, naturally occurring recombinant human G6P[6] rotavirus. **J Clin Microbiol.** V41, p2088-95, 2003.

RAHMAN M, HASSAN ZM, ZAFRUL H, SAIADA F, BANIK S, FARUQUE AS, DELBEKE T, MATTHIJNSSENS J, VAN RANST M, AZIM T. Sequence analysis and evolution of group B rotaviruses. **Virus Res.** V125, p219-25, 2007.

RAMIG RF AND WARD RL. Genomic segment reassortment in rotaviruses and other reoviridae. **Adv Virus Res.** V39, n163-207, 1991.

RHEINGANS RD, ANTIL L, DREIBELBIS R, PODEWILS LJ, BRESEE JS, PARASHAR UD. Economic costs of rotavirus gastroenteritis and cost-effectiveness of vaccination in developing countries. **J Infect Dis.** V200, Suppl 1, pS16-27, 2009.

RICHARDSON V, HERNANDEZ-PICHARDO J, QUINTANAR-SOLARES M, et al. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. **N Engl J Méd.** V 362, p299-305, 2010.

ROLLO, E. E., K. P. KUMAR, N. C. REICH, J. COHEN, J. ANGEL, H. B. GREENBERG, R. SHETH, J. ANDERSON, B. OH, S. J. HEMPSON, E. R. MACKOW, AND R. D. SHAW. The epithelial cell response to rotavirus infection. **J Immunol.** V 163, p 4442–4452, 1999.

ROSE J, HAWTHORN RL, WATTS B, SINGER ME. Public health impact and cost effectiveness of mass vaccination with live attenuated human rotavirus vaccine (RIX4414) in India: model based analysis. **BMJ.** V25, p 1-13, 2009.

ROSS J, OSTLUND EN, CAO D, TATSUMI M, HOSHINO Y. Acrylamide concentration affects the relative position of VP7 gene of serotype G2 strains as determined by polyacrylamide gel electrophoresis. **J Clin Virol.** V 42, p374-80, 2008.

RUIZ MC, ABAD MJ, CHARPILLENNE A, COHEN J, MICHELANGELI F. Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. **J Gen Virol.** V78, p2883-93, 1997.

RUIZ, M. C; COHEN, J.; MICHELANGELI, F. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infectious. **Cell calcium.** V.3, p.137-149, 2000.

RUIZ-PALACIOS, G. M., I. et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **N. Engl. J. Med.** V354, p11–22, 2006.

SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol.** V4, p406-25, 1987.

SANTOS N, HONMA S, TIMENETSKY MDO C, LINHARES AC, USHIJIMA H, ARMAH GE, GENTSCH JR, HOSHINO Y. Development of a microtiter plate hybridization-based PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P genotypes. **J Clin Microbiol.** V46, p462-9, 2008.

SANTOS N, LIMA RC, PEREIRA CF, GOUVEA V. Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. **J Clin Microbiol.** V36, p2727-9, 1998.

SANTOS N, SOARES CC, VOLOTÃO EM, ALBUQUERQUE MC, HOSHINO Y. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. **J Clin Microbiol.** V41, p399-402, 2003.

SANTOS, N., AND Y. HOSHINO. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Rev. Med. Virol.** V15, p29–56, 2005.

SANTOSHAM M, MOULTON LH, REID R, CROLL J, WEATHERHOLT R, WARD R, FORRO J, ZITO E, MACK M, BRENNEMAN G, DAVIDSON BL. Efficacy and safety of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccine in Native American populations. **J Pediatr.** V131, p632-8, 1997.

SANTOSHAM M. Rotavirus vaccine a powerful tool to combat deaths from diarrhea. **N Engl J Med.** V362, p358-60, 2010.

SHARMA S, RAY P, GENTSCH JR, GLASS RI, KALRA V, BHAN MK. Emergence of G12 rotavirus strains in Delhi, India, in 2000 to 2007. **J Clin Microbiol.** V46, p1343-8, 2008.

SHAW AL, ROTHNAGEL R, CHEN D, RAMIG RF, CHIU W, PRASAD BV. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. **Cell.** V74, p693-701, 1993.

SOÁREZ PC, VALENTIM J, SARTORI AM, NOVAES HM. Cost-effectiveness analysis of routine rotavirus vaccination in Brazil. **Rev Panam Salud Publica**. V23, p221-30, 2008.

SOLBERG OD, HASING ME, TRUEBA G, EISENBERG JN. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. **Virology**. V385, p58-67, 2009.

SORRIANO-GABARRO M; MRUKOWIEZ J; VESIKARI T; ET AL. Burden of rotavirus disease in european union countries. **Pediatr Infect Dis J**. V25, p S7 -11, 2006.

STEELE AD, PEENZE I, DE BEER MC, PAGER CT, YEATS J, POTGIETER N, RAMSAROOP U, PAGE NA, MITCHELL JO, GEYER A, BOS P, ALEXANDER JJ. Anticipating rotavirus vaccines: epidemiology and surveillance of rotavirus in South Africa. **Vaccine**. V21, p354-60, 2003.

SVENSSON L, SHESBERADARAN H, VESIKARI T, NORRBY E, WADELL G. Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT 4237, RRV-1). **J Gen Virol**. V68, p1993–1999, 1987.

TANIGUCHI K, URASAWA S. Diversity in rotavirus genomes. **Seminars in Virology**. V 6, p123-31, 1995.

TATTE VS, GENTSCH JR, CHITAMBAR SD. Characterization of group A rotavirus infections in adolescents and adults from Pune, India: 1993-1996 and 2004-2007. **J Med Virol**. V 82, p519-27, 2010.

TROJNAR E, OTTO P, JOHNE R. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. **Virol**. V386, p 325–333, 2009.

URSU K, KISFALI P, RIGO D, IVANICS E, ERDELYI K, DAN A, et al. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. **Arch Virol**. V154, p1365–9. DOI:10.1007/s00705-009-0439-0, 2009.

VELÁZQUEZ FR, MATSON DO, GUERRERO L, et al. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. **J Infect Dis**. V182, p 1602–09, 2000.

VELAZQUEZ, F. R., D. O. MATSON, J. J. CALVA, L. GUERRERO, A. L. MORROW, S. CARTER-CAMPBELL, R. I. GLASS, M. K. ESTES, L. K. PICKERING, AND G. M. RUIZ-PALACIOS. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. **N. Engl. J. Med.** V 335, p1022–1028, 1996.

VESIKARI T, ITZLER R, MATSON DO, SANTOSHAM M, CHRISTIE CD, COIA M, COOK JR, KOCH G, HEATON P. Efficacy of a pentavalent rotavirus vaccine in reducing rotavirus-associated health care utilization across three regions (11 countries). **Int J Infect Dis.** V11 Suppl 2, pS29-35, 2007.

VESIKARI T, KARVONEN A, PUUSTINEN L, SZAKAL ED, ZENG SQ, DELEM A, DE VOS B. A short report on highlights of world-wide development of RIX4414: an European experience. **Vaccine.** V24, p3779, 2006.

VICTORA C AND BARROS F. Diarrheal disease among children under five years in the Americas, 1980-1992. **New York, NY: United Nations Children's Fund.** 230 p, 1993.

VRANJAC, ALEXANDRE. Diarreia e rotavírus; Instituto Adolfo Lutz e Centro de Vigilância Epidemiológica. **Rev de saúde pública.** V338, p844-5, 2004.

WARD RICHARD L. Rotavirus vaccines: how they work or don't work, expert reviews, molecular medicine. **Expert Rev Mol Med.**V10;p 5; 2008.

WARD RL, NAKAGOMI O, KNOWLTON DR, MCNEAL MM, NAKAGOMI T, HUDAN, CLEMENS JD, SACK DA. Formation and selection of intergenogroup reassortants during cell culture adaptation of rotaviruses from dually infected subjects. **J Virol.** V65, p2699-701, 1991.

WARD, RICHARD L., MONICA M MCNEAL, A DUNCAN STEELE. Why does the world need another rotavirus vaccine?. **Therapeutics and Clinical Risk Management.** V4, p49–63, 2008.

WENTZ MJ, PATTON JT, RAMIG RF. The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. **J Virol.** V70, p7833-41, 1996.

WULAN W N, LISTIYANINGSIH E, SAMSI KMK, AGTINI MD, KASPER MATTHEW RK, AND PUTNAM SD. Identification of a Rotavirus G12 Strain, Indonesia. **Emerging Infectious Diseases**. V16, p159-161, 2010.

YANG J, WANG T, WANG Y, LU B, BAI X, ZHANG L, WANG M, WANG H. Emergence of human rotavirus group A genotype G9 strains, Wuhan, China. **Emerg Infect Dis**. V13, p1587-9, 2007.

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**. V13, p1011-8, 1994.

YODER JD, DORMITZER PR. Alternative intermolecular contacts underlie the rotavirus VP5* two- to three-fold rearrangement. **EMBO J**. V25, p1559-68, 2006.

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**. V14, p914-6, 1995.

ZADE JK, CHHABRA P, CHITAMBAR SD. Characterization of VP7 and VP4 genes of rotavirus strains: 1990-1994 and 2000-2002. **Epidemiol Infect**. V137, p936-42, 2009.

ZAO CL, YU WN, KAO CL, TANIGUCHI K, LEE CY, LEE CN. Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. **J Gen Virol**. V80, p1407-15, 1999.

ZARATE S, ESPINOSA R, ROMERO P, MENDEZ E, ARIAS CF, LOPEZ S. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. **J Virol**. V74, p593-599, 2000.

ZÁRATE S, ROMERO P, ESPINOSA R, ARIAS CF, LÓPEZ S. VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin α v β 3 through a novel integrin-binding site. **J Virol**. V78, p10839-47, 2004.

ZHENG, B.J. et al. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. **J. Med. Virol**. V34, p.29-37, 1991.

ANEXOS

ANEXO 01-Parecer de aprovação do comitê de ética



Parecer de Aprovação nº 001/2010
Protocolo CEP/IEC - Nº 033/09
CAAE: 0037.0.072.000-09

Ananindeua/PA, 12 de janeiro de 2010.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS

Projeto: **“Epidemiologia molecular dos rotavírus G2 ao longo de 16 anos (1992-2008) na região amazônica, Brasil”**

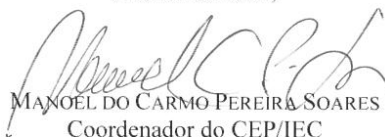
Pesquisador Responsável: ALEXANDRE DA COSTA LINHARES

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epígrafe foi considerado **aprovado**.
Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

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 anual 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.

Atenciosamente,



MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC

ANEXO 02 - Siglas e símbolos dos aminoácidos

Letra	Sigla	Nomes dos aminoácidos	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	Glutamine	Polar
R	Arg	Arginina	Básico
S	Ser	Serina	Polar
T	Tre	Treonina	Polar
V	Val	Valina	Não Polar
W	Trp	Triptofano	Não Polar
Y	Tir	Tirosina	Polar