



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

**PATRÍCIA DOS SANTOS LOBO**

**ROTAVÍRUS DO GRUPO C ASSOCIADO À HOSPITALIZAÇÃO DE CRIANÇAS  
COM GASTREENTERITE AGUDA EM BELÉM, PARÁ**

**BELÉM- PA**

**2014**

**PATRÍCIA DOS SANTOS LOBO**

**ROTAVÍRUS DO GRUPO C ASSOCIADO À HOSPITALIZAÇÃO DE CRIANÇAS  
COM GASTRENERITE AGUDA EM BELÉM, PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais (área de concentração Patologia das doenças Tropicais), Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

BELÉM- PA


2014

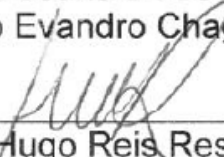
**PATRÍCIA DOS SANTOS LOBO**

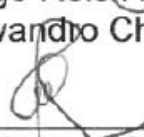
**ROTAVÍRUS DO GRUPO C ASSOCIADO À HOSPITALIZAÇÃO DE CRIANÇAS  
COM GASTREENTERITE AGUDA EM BELÉM, PARÁ.**


Dissertação apresentada à aprovação como requisito para obtenção do grau de Mestre ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais (área de concentração Patologia das doenças Tropicais), Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, pela comissão formada pelos professores/pesquisadores:


Banca Examinadora:

  
Membro: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas - Orientadora  
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

  
Membro: Prof<sup>a</sup>. Dr Hugo Reis Resque  
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

  
Membro: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliete da Cunha Araújo  
Instituição: Universidade Federal do Pará- UFPa

  
Membro: Prof<sup>a</sup>. Dr Anderson Nonato do Rosário Marinho  
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

  
Suplente: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luana da Silva Soares  
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

Data da defesa: 30/07/2014

Conceito: \_\_\_APROVADO\_\_\_

BELÉM- PA

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

---

Lobo, Patrícia dos Santos, 1989-  
Rotavírus do grupo C associado à  
hospitalização de crianças com gastroenterite  
aguda em Belém, Pará / Patrícia dos Santos  
Lobo. - 2014.

Orientadora: Joana D'Arc Pereira Mascarenhas.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal  
do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa  
de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém,  
2014.

1. Rotavírus - Belém (PA). 2. Diarreia em  
Crianças. I. Título.

CDD 22. ed. 618.923427

---

*Aos meus pais amados, Nazaré Santos e José Lôbo,  
que sem eles não existiria sucesso na minha caminhada.  
Eles merecem todas as vitórias alcançadas e o meu amor  
eterno.*

## AGRADECIMENTOS

Á Deus, por ser a minha força, minha fé e meu tudo.

Aos familiares, em especial aos meus pais, Nazaré e Lobo, que sempre me apoiaram e dedicaram sua vida em prol do meu sucesso, aos meus avôs Vicente (*in memorian*) e Benedito e avós Laudemira (*in memorian*) e Anerginda, que junto com minha mãe, me criaram e me deram todo o exemplo de vida, de ser humano, de respeito e de dedicação aos estudos, sempre com muito amor e carinho. Devo a eles todas as minhas vitórias e que hoje festejam minhas conquistas.

Á minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Joana D'Arc Pereira Mascarenhas, minha enorme gratidão pelos conhecimentos a mim repassados e pelas oportunidades e confiança, que apesar das dificuldades e momentos de conflitos, conseguimos resolver e prosseguir nesse projeto, contribuindo para o alcance do título de mestre.

Ao Alan Passos agradeço o companheirismo, a dedicação, a amizade, ao apoio às minhas decisões e o carinho dado em todos os momentos tristes e feliz que foram e serão vividos. Ao Meu Amor meu muito obrigado.

Ao Instituto Evandro Chagas na pessoa de sua diretora Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Santos que me ofereceu recursos humanos e estruturais para a realização deste trabalho.

Á seção de Virologia do IEC, representada pelo chefe Dr. Alexandre Linhares e todos do Projeto Efetividade que me permitiu acesso ao acervo de amostras e aos dados para uso neste projeto.

Ao Programa de pós-graduação do Núcleo de Medicina Tropical pela oportunidade e acesso ao título de mestre em Doenças Tropicais pela UFPa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq pelo incentivo a pesquisa e investimento financeiro de fundamental importância para o desenvolvimento dessa dissertação.

As amigas Larisse, Juliana, Paola, Flávia e Viviane que sempre estiveram ao meu lado, apesar da distância, oferecendo a amizade de anos, com boas risadas, choros, brigas e reconciliações, são irmãs do coração.

Aos meus colegas de Mestrado pelo companheirismo nesta jornada, pelos bons momentos em sala de aula e fora dela, pelas experiências compartilhadas, pelos excelentes momentos de convivência. Dedico em especial a Louise pela colaboração em minha dissertação e a sua amizade.

Aos meus amigos de curso e agregados, Laine, Ivy, Yasmin, Leila, Karla, Breno e Junior, pelo companheirismo, conselhos, trocas de experiências, por essa grande vivência, obrigada pela preciosa amizade.

Aos meus colegas da Seção de Virologia, Ian, Alessilva, Euzeni, Maryelle, James, Dielle, em especial ao Jones Siqueira pela grande ajuda na seleção das amostras e dos testes estatísticos realizados no trabalho, assim como a sua amizade, e os demais colegas, não menos importantes, agradeço também.

As amigas do rotavírus, Sylvia Guerra que me acompanhou em todos os procedimentos laboratoriais, dando força na minha vida pessoal, conselhos, experiências, incentivo, pelos momentos de risadas e pela grande amizade que só tende a crescer; e a amiga Luana Soares que me deu direcionamento nos testes laboratoriais e seu apoio em tudo que podia. Muito Obrigada meninas pelos grandes momentos de felicidade e amizade vividos.

Aos colegas do Centro Nacional de Primatas, a “macacada” que entendeu a realização das minhas atividades e que tornaram os momentos de indecisões em momentos de alegria.

Aos Dr(a) Hugo, Anderson e Eliete que com suas experiências colaboraram para melhoria do estudo em questão.

E o meu muito obrigado a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para o sucesso desse projeto.

“A pedra...

O distraído nela tropeçou...

O bruto a usou como projétil.

O empreendedor, usando-a, construiu.

O camponês, cansado da lida, dela fez o assento.

Para meninos, foi brinquedo.

Drummond a poetizou.

Já, David matou Golias, e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela escultura...

E em todos esses casos, a diferença não estava na pedra, mas no homem!

Não existe “pedra” em seu caminho que você não possa aproveitá-la para seu próprio crescimento [...].”

Antônio Pereira



## RESUMO

A gastroenterite aguda (GA) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, sendo o rotavírus um dos agentes causadores de GA, o qual é responsável por cerca de 38,3% dos casos de hospitalizações, resultando em 197.000 óbitos de crianças menores de cinco anos anualmente, principalmente nos países em desenvolvimento. O rotavírus pertence à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, possuem genoma dividido em 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA) e é classificado em oito grupos/espécies sorológicos distintos (A ao H). O mais comumente encontrado pertence ao grupo/espécie A (RVA), contudo o rotavírus do grupo/espécie C (RVC) vem assumindo importância nas gastroenterites e, geralmente, se relaciona a quadros de diarreia infantil de curso autolimitado, com possível transmissão de suínos. Este estudo visou detectar o RVC em crianças menores de três anos de idade hospitalizadas com gastroenterite aguda em Belém, Pará. Para tanto, de maio de 2008 a abril de 2011, uma vigilância intensiva para gastroenterite aguda (GA) foi realizada em um hospital pediátrico de Belém. Foram coletadas amostras de fezes de crianças com GA, das quais 279 amostras apresentavam resultados negativos para RVA e/ou norovírus (NoV). Nestas, o ácido nucléico foi extraído a partir da suspensão fecal pelo método de sílica sendo reversamente transcrito e amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os pares de iniciadores G8S/G8A para VP7; C1/C4 para VP6; T434/T435 para VP4; e NSP4(+)/(-) para NSP4. O Controle positivo (protótipo Cowden) e o negativo (água) foram utilizados em todos os testes. Foi realizado o sequenciamento automático e a análise filogenética subsequente. Os dados foram analisados através de testes estatísticos de qui-quadrado partição, exato de Fisher e regressão logística simples com valores de  $p \leq 0,05$ . A positividade para o RVC foi de 2,1% (6/279) pelo EGPAe RT-PCR. Posteriormente, foram submetidas ao sequenciamento automático e classificadas nos genótipos I2, G4, P[2] e E2 para os genes VP6, VP7, VP4 e NSP4, respectivamente. A frequência de RVC foi maior na faixa etária de 24 a 36 meses (5,7%) com  $p$  estatisticamente significativo ( $p = 0,0493$ ). O gênero mais acometido pelo RVC foi o masculino com frequência de 83,3%. Os sinais e/ou sintomas clínicos mais frequentes em crianças com RVC foi febre (80%), vômito (83,3%) e desidratação (100%). Portanto, neste estudo foi possível a caracterização e análise filogenética de VP6, VP7, VP4 e NSP4 desse vírus em crianças hospitalizadas com gastroenterite, fornecendo dados importantes quanto à circulação desses agentes em crianças hospitalizadas com gastroenterite na região metropolitana de Belém, Pará.

**Palavras-chave:** Rotavírus do grupo C; gastroenterite aguda e crianças hospitalizadas.

## ABSTRACT

Acute gastroenteritis (AG) is a major cause of morbidity and mortality of children worldwide, being rotavirus one of the causative agents of AG, responsible for about 38.3% of the cases of hospitalization, resulting in 197,000 deaths of children under five years annually, mostly in developing countries. Rotavirus belongs to the family *Reoviridae*, genera *Rotavirus*, have genome composed by 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA) and are classified into eight groups/different species (A to H). The most commonly found belongs to the group/species A (RVA), however rotavirus group/species C (RVC) has assumed importance in gastroenteritis and usually relate to self-limiting course of childhood diarrhea, with possible transmission from pigs. This study aims to detect the RVC in children less than three years of age hospitalized with acute gastroenteritis in Belém city, Pará state, Amazon region, Brazil. From May 2008 to April 2011, an intensive surveillance for AG was performed in a pediatric hospital of Belém in children with AG, of which 279 samples had negative results for RVA and norovirus. Accordingly, the nucleic acid was extracted from the fecal suspension with silica by the method of reverse transcribed and amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primer pairs specific for the VP7 gene G8S/G8A; C1/C4 for VP6; T434/T435 for VP4; and NSP4 (+)/(-) specific for NSP4 gene. The positive control (prototype Cowden) and negative control (water RNase free) were used in all tests. Automatic sequencing and subsequent phylogenetic analysis were performed. Data were analyzed using statistical chi-square partition, Fisher's exact test and simple logistic regression with p values  $\leq 0.05$ . The positive rate for RVC was 2.1% (6/279) by PAGE and RT-PCR and posteriorly, submitted to automated sequencing and classified in genotypes I2, G4, P[2] and E2 for VP6, VP7, VP4 and NSP4 genes, respectively. The frequency of RVC was higher in the age group between 24 to 36 months (5.7%) ( $p= 0.0493$ ). Gender more affected by RVC was the male with a frequency of 83.3%. Signs and/or symptoms most frequent in children with RVC were fever (80%), vomiting (83.3%) and dehydration (100%). In summary, in this study it was possible the characterization and phylogenetic analysis of VP6, VP7, VP4 and NSP4 genes, providing important data regarding the presence of these agents in hospitalized children with gastroenteritis in the metropolitan region of Belém, Pará.

**keywords:** Group C Rotavirus; acute gastroenteritis and hospitalized children

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1- Micrografia eletrônica do extrato fecal contendo partículas completas de RV (75-100 <sup>o</sup> nm de diâmetro).....  | 21 |
| FIGURA 2- Árvore filogenética comparando a sequência de nt e aa do gene VP1 para vários isolados de RVA-RVH .....  | 24 |
| FIGURA 3-Representação esquemática da estrutura da partícula de RV demonstrando as proteínas dos capsídeos externo, intermediário e interno do virion.....   | 25 |
| FIGURA 4- Estrutura e localização das proteínas estruturais (VP1-4, VP6 e VP7) do RV .....   | 26 |
| FIGURA 5-Perfis eletroforéticos dos grupos de rotavírus de A-G, associados à infecção no homem e outros animais .....  | 29 |
| FIGURA 6- Mecanismos de mutação genética .....   | 31 |
| FIGURA 7- Reestruturação no genoma de RV .....   | 32 |
| FIGURA 8- Árvore filogenética baseada na sequência completa de aminoácidos do gene VP7 do RVC suíno .....  | 35 |
| FIGURA 9- Esquema da replicação do RV .....  | 39 |
| FIGURA 10- Principais mecanismos envolvidos na patogênese da diarreia por RV .   | 42 |
| FIGURA 11- Mapa da região metropolitana de Belém, Pará.....  | 54 |
| FIGURA 12- Desenho esquemático da amplificação por RT-PCR. PCR realizada a partir de cDNA sintetizado pela transcriptase reversa, em que o molde inicial é uma molécula de RNA, utilizando iniciadores específicos.....  | 58 |
| FIGURA 13- Esquema de purificação do produto da RT-PCR seguindo o protocolo do kit EasGen - EasyPrep PCR clean-up Mini .....   | 63 |
| FIGURA 14- Esquema da reação de sequenciamento automático de DNA.....  | 64 |
| FIGURA 15- Dendrograma demonstrando a classificação genética do gene VP6 das amostras positivas para RVC em fezes de crianças hospitalizadas com gastroenterite entre maio/2008 a abril/2011 em Belém-PA. As representações das amostras desse estudo estão organizadas da |    |

- seguinte forma: Vírus (RVC)/origem do hospedeiro (Hu)/país de coleta (Brasil)/código da amostra/anos de coleta/genótipo.....70
- FIGURA 16- Dendrograma demonstrando a classificação genética do gene VP7 das amostras positivas para RVC em fezes de crianças hospitalizadas com gastroenterite entre maio/2008 a abril/2011 em Belém-PA. As representações das amostras desse estudo estão organizadas da seguinte forma: Vírus (RVC)/origem do hospedeiro (Hu)/país de coleta (Brasil)/código da amostra/anos de coleta/genótipo.....71
- FIGURA 17- Sequências aminoacídicas do gene VP7 das amostras do presente estudo, protótipo, amostras do Brasil e do mundo. Os retângulos vermelhos indicam as substituições dos aa identificadas. Siglas dos aa encontram-se no anexo B. ....72
- FIGURA 18- Dendrograma demonstrando a classificação genética do gene VP4 das amostras positivas para RVC em fezes de crianças hospitalizadas com gastroenterite entre maio/2008 a abril/2011 em Belém-PA. As representações das amostras desse estudo estão organizadas da seguinte forma: Vírus (RVC)/origem do hospedeiro (Hu)/país de coleta (Brasil)/código da amostra/anos de coleta/genótipo.....74
- FIGURA 19- Sequências aminoacídicas do gene VP4 das amostras do presente estudo, protótipo, amostras do Brasil e do mundo. Os retângulos vermelhos indicam as substituições dos aa identificadas. Siglas dos aa encontram-se no anexo B. ....75
- FIGURA 20- Dendrograma demonstrando a classificação genética do gene NSP4 das amostras positivas para RVC em fezes de crianças hospitalizadas com gastroenterite entre maio/2008 a abril/2011 em Belém-PA. As representações das amostras desse estudo estão organizadas da seguinte forma: Vírus (RVC)/origem do hospedeiro (Hu)/país de coleta (Brasil)/código da amostra/anos de coleta/genótipo.....76
- FIGURA 21- Sequências aminoacídicas do gene NSP4 das amostras do presente estudo, protótipo, amostras do Brasil e do mundo. Os retângulos vermelhos indicam as substituições dos aa identificadas. Siglas dos aa encontram-se no anexo B. ....77

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

|  |    |
|--|----|
| QUADRO 1- Função e localização das proteínas dos RVC.....  | 28 |
| QUADRO 2- Genótipos correspondentes aos 11 genes (VP1-VP4, VP6-VP7; NSP1-NSP6) do RVC .....  | 33 |
| QUADRO 3- Sequência dos iniciadores utilizados na RT-PCR para os genes VP4, VP6, VP7 e NSP4 do RVC .....   | 59 |
| QUADRO 4- Reagentes utilizados na MIX da primeira etapa para a síntese de cDNA pela transcrição reversa do ácido nucleico, de acordo com as concentrações e volumes usados por cada reação .....                 | 60 |
| QUADRO 5- Reagente utilizados na MIX da segunda etapa da amplificação do cDNA pela técnica da PCR, de acordo com as concentrações e volumes usados por cada reação. ....   | 61 |
| QUADRO 6- Reagentes utilizados na reação de sequenciamento nas amostras com positividade para os genes VP6, VP7, VP4 e NSP4 .....  | 65 |
| QUADRO 7- Dados dos espécimes clínicos positivos para RVC coletados na clínica Pediátrica do Pará no período de 2008 a 2011 .....  | 81 |
| TABELA 1- Frequência de positividade para RVC por RT-PCR de acordo com a faixa etária em crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda entre maio de 2008 a abril de 2011 na clínica Pediátrica do Pará ..... | 78 |
| TABELA 2- Frequência de RVC por RT-PCR e por gênero em crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda entre maio de 2008 a abril de 2011 na clínica Pediátrica do Pará.....                                    | 79 |
| TABELA 3- Principais sinais e/ou sintomas apresentados por crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda entre maio de 2008 a abril de 2011 na clínica Pediátrica do Pará.....                                | 80 |

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1- Detecção do RVC por EGPA em 279 espécimes fecais coletados de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda em Belém, Pará, no período de maio de 2008 a abril de 2011.....68
- GRÁFICO 2- Principais sinais e/ou sintomas apresentados por crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda na clínica Pediátrica do Pará, no período de maio de 2008 a abril de 2011 .....81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa – Aminoácido

AL – Aglutinação do Látex

DLP – Partícula de dupla camada

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dsRNA – Dupla fita de Ácido Ribonucleico

EIA ou ELISA – Ensaio Imunoenzimático

EGPA – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

GA – Gastrenterite aguda

IEC – Instituto Evandro Chagas

Kb – Quilobases

ME – Microscópio eletrônico

ng – Nanogramas

nt – Nucleotídeos

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – Pares de Bases

RNA– Ácido Ribonucleico

RE – Retículo endoplasmático

RT-PCR – Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa

RV - Rotavírus

RVA – Rotavírus do grupo/espécie A

RVC – Rotavírus do grupo/espécie C

UFPA – Universidade Federal do Pará

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                | <b>18</b> |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b>                             | <b>20</b> |
| <b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b>                       | <b>21</b> |
| 3.1. HISTÓRICO                                      | 21        |
| 3.2. O ROTAVÍRUS                                    | 23        |
| 3.2.1. Classificação viral                          | 23        |
| 3.2.2. Partícula viral                              | 24        |
| 3.2.3. Perfil eletroforético do RVC                 | 29        |
| 3.2.4. Mecanismo de evolução genética               | 30        |
| 3.2.5. Classificação genômica do RVC                | 32        |
| 3.3. INFECÇÃO POR RVC                               | 36        |
| 3.3.1. Replicação viral                             | 36        |
| 3.3.2. Transmissão                                  | 39        |
| 3.3.3. Patogenia e imunidade                        | 41        |
| 3.3.4. Quadro clínico                               | 44        |
| 3.3.5. Diagnóstico laboratorial                     | 45        |
| 3.3.6. Tratamento, controle e profilaxia            | 46        |
| 3.3.7. Vacina contra RV                             | 47        |
| 3.4. EPIDEMIOLOGIA DO RV                            | 48        |
| 3.5. EPIDEMIOLOGIA DO RVC                           | 49        |
| <b>4. OBJETIVO</b>                                  | <b>52</b> |
| 4.1. OBJETIVO GERAL                                 | 52        |
| 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS                          | 52        |
| <b>5. METODOLOGIA</b>                               | <b>53</b> |
| 5.1. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA             | 53        |
| 5.2. PACIENTES E ESPÉCIMES CLÍNICOS                 | 53        |
| 5.2.1. Critérios de seleção das amostras            | 55        |
| 5.3. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO                       | 55        |
| 5.4. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS                     | 55        |
| 5.4.1. Suspensão fecal a 10%                        | 55        |
| 5.4.2. Extração do genoma viral                     | 56        |
| 5.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) | 57        |



|   |           |
|---|-----------|
| 5.4.4. Reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) ..... | 57        |
| 5.4.5. Eletroforese em gel de agarose .....   | 61        |
| 5.4.6. Sequenciamento parcial do genoma viral.....  | 62        |
| 5.4.6.1. Purificação do produto da RT-PCR .....   | 62        |
| 5.4.6.2. Quantificação do DNA purificado .....  | 63        |
| 5.4.6.3. Sequenciamento de nucleotídeos .....   | 64        |
| 5.4.6.4. Purificação do produto do sequenciamento .....   | 65        |
| 5.4.6.5. Eletroforese em sequenciador automático .....  | 66        |
| 5.4.6.6. Dendrograma de similaridade .....  | 66        |
| 5.4.7. Análise estatística .....  | 67        |
| <b>6. RESULTADOS .....</b>  | <b>68</b> |
| 6.1. DETECÇÃO DE RVC .....  | 68        |
| 6.2. GENOTIPAGEM E SEQUENCIAMENTO .....   | 69        |
| 6.3. ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS.....   | 78        |
| <b>7. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>83</b> |
| 7.1. DETECÇÃO DO RVC .....  | 83        |
| 7.2. ANÁLISES MOLECULARES.....  | 84        |
| 7.2.1. Gene VP6.....  | 84        |
| 7.2.2. Gene VP7.....  | 85        |
| 7.2.3. Gene VP4.....  | 86        |
| 7.2.4. Gene NSP4 .....  | 87        |
| 7.3. ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS.....   | 88        |
| <b>8. CONCLUSÃO.....</b>  | <b>90</b> |
| <b>9. PERSPECTIVAS .....</b>  | <b>91</b> |
| REFERÊNCIAS .....   | 92        |
| APÊNDICE .....  | 107       |
| ANEXO .....   | 110       |

## 1. INTRODUÇÃO

A gastroenterite aguda (GA) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade resultando em 712.000 mortes por ano em todo o mundo em crianças menores de cinco anos (FISCHER-WALKER et al., 2013; WHO, 2013a). Nesse contexto, vários agentes virais são responsáveis por quadros de diarreia em seres humanos como os norovírus (KAPLAN et al., 1982), astrovírus (MADELEY et al., 1975), adenovírus entéricos (YAMASHITA et al., 2001), com destaque para os rotavírus (RV) (BISHOP et al., 1973). Estes últimos são responsáveis por cerca de 38,3% dos casos de hospitalizações, resultando em 197.000 óbitos de crianças menores de cinco anos anualmente, principalmente nos países em desenvolvimento (LANATA et al., 2013).

Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, possuem genoma dividido em 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA) e são classificados em oito grupos/espécies distintos (A ao H) (MATTHIJNSSENS et al., 2012). O rotavírus do grupo/espécie A (RVA) é o mais importante epidemiologicamente e disseminado mundialmente (ATTOUI et al., 2012; PATTON, 2012). Contudo, o rotavírus do grupo/espécie C (RVC) é o segundo mais comum encontrado em seres humanos e tem uma epidemiologia bastante distinta do RVA (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

O RVC vem assumindo importância nas gastroenterites, e geralmente se relaciona a quadros de diarreia de curso autolimitado tanto em crianças quanto em adultos, com possível transmissão de suínos, ocasionando surtos em escolas, hospitais ou ambientes militares (GABBAY et al., 1999; LINHARES et al., 2005).

O RVC foi detectado primeiramente em suínos no ano de 1980 (SAIF et al., 1980) e posteriormente em seres humanos (BRIDGER et al., 1986). Tem sido detectado em vários países, tanto associado a surtos de gastroenterites como no Japão (KUZUYA et al., 1998), Suécia (NILSSON et al., 2000) e Brasil (GABBAY et al., 1999), assim como em casos esporádicos como na África do Sul (SEBATA E STEEB, 1999), demonstrando que o RVC não era tão incomum como se pensava.

No Brasil, a primeira detecção ocorreu no Rio de Janeiro (PEREIRA et al., 1983a), e posteriormente em outras localidades como em São Paulo (SOUZA et al., 1998; LUCHS et al., 2009), Goiás (LUCHS et al., 2009) e Belém (GABBAY et al., 1999).

Na região norte do Brasil, esse grupo de RV é associado tanto a surtos quanto a casos esporádicos. No caso de surto, eles causaram infecção em 33% das crianças de uma creche de Belém (GABBAY et al., 1999) e em casos esporádicos, os mesmos causaram infecção em crianças de 0-3 anos, resultando em 6,5% das crianças positivas para RVC para o gene VP6 estritamente relacionados a seres humanos e 4% para o gene VP6 de suínos (GABBAY et al., 2008). Mais recentemente, Kaiano et al. (2010), analisaram espécimes fecais de crianças sintomáticas ou não para gastroenterites, residentes em uma comunidade remanescente de quilombos em Ananindeua, Pará e registraram o primeiro caso de RVC em uma criança com diarreia vivendo em uma comunidade semi isolada, representando 2,3% dos casos.

## 2. JUSTIFICATIVA

As doenças diarreicas representam um importante problema de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento, onde o rotavírus, calicivírus, *E. coli* enteropatogênica e enterotoxigênica são responsáveis por 55% de todas as mortes por diarreia. Estimativas apontam que é a segunda principal causa de mortalidade de crianças menores de cinco anos de idade, sendo responsável por 712.000 mortes de crianças a cada ano em escala mundial (LANATA et al., 2013; WHO, 2013a).

O RVC geralmente está relacionado a quadros de diarreia de curso autolimitado tanto em crianças quanto em adultos (GABBAY et al., 1999; LINHARES et al., 2005). A infecção por este grupo é subestimada, pois os métodos de diagnóstico apropriados tais como eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) e o sequenciamento automático são utilizados em nível de pesquisa e não de diagnóstico, o que dificulta a descoberta rápida e imediata da infecção para este tipo de RV (GABBAY et al., 1999).

Além disso, a inexistência de uma vacina específica para RVC, as epidemias desse patógeno e de outros agentes causadores de gastroenterite podem aumentar em resposta as reduções de GA ocasionadas pela vacinação de RVA (KUMAZAKI E USUKU, 2013).

Embora vários estudos em Belém tenham demonstrado a circulação de RVA, norovírus, astrovírus e adenovírus entéricos, em crianças com gastroenterite, muitos casos continuam sem uma etiologia definida, fato este que reforça a necessidade de uma investigação de outros agentes etiológicos que também possam estar envolvidos em casos de gastroenterite, como o RVC.

Para um maior conhecimento do RVC é importante se proceder à análise molecular de genes importantes tais como VP4, VP6, VP7 e NSP4 em amostras fecais oriundas de crianças menores de cinco anos, já que este grupo de RV foi detectado apenas associado a surtos e casos esporádicos nessa faixa etária, sendo de fundamental importância a pesquisa de RVC nessa população. Logo, o presente estudo configura-se de tal importância uma vez que visa contribuir para o conhecimento dos casos de gastroenterite sem um agente etiológico definido em crianças hospitalizadas na cidade de Belém, Pará, Brasil.

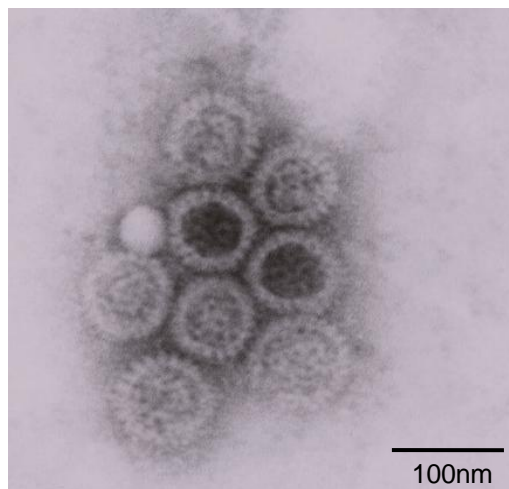
### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. HISTÓRICO

As gastroenterites agudas na infância representam um problema significativo de saúde pública, particularmente em crianças na faixa etária de zero a cinco anos de idade (WHO, 2013a). Na tentativa de explicar a diarreia aguda em crianças, foram necessárias pesquisas envolvendo agentes como bactérias, vírus e parasitas. (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

Em 1973, Bishop et al. (1973) em Melbourne, Austrália, observaram partículas virais e sua associação com diarreia grave em crianças, a qual foi identificada por biópsia da mucosa duodenal e visualização direta em microscopia eletrônica (ME). Concomitantemente, houve a identificação dessa mesma partícula viral em amostras fecais na Inglaterra por Flewett et al. (1973). Inicialmente tal vírus foi denominado de Duovírus, porém, ao considerar sua similaridade morfológica ao de uma roda em ME, o mesmo foi denominado de RV (FLEWETT E WOODE, 1978), como observado na FIGURA 1.

FIGURA 1- Micrografia eletrônica de extrato fecal contendo partículas completas de RV (75-100<sup>o</sup> nm de diâmetro).



Fonte: Cedida pelo setor de microscopia eletrônica do IEC (2004).

A primeira detecção do RVA no Brasil foi registrado por Linhares et al. (1977), a partir de um estudo piloto realizado em Belém, Pará, que reuniu 25 crianças com quadro de gastroenterite aguda sob atendimentos ambulatorial e hospitalar conduzido no Hospital Santa Casa de Misericórdia do Pará.

O RVC foi detectado nos EUA, pela primeira vez, em suínos que apresentavam diarreia (SAIF et al., 1980) e posteriormente, em suínos na Europa e Austrália (BRIDGER et al., 1982; VON BONSDORF E SVENSSON, 1988; LEE et al., 2011). Além disso, foi detectado em bezerras e bovinos adultos (TSUNEMITSU et al., 1991; CHANG et al., 1999a; MAWATARI et al., 2004), cães (OTTO et al., 1999) e furões (TORRES-MEDINA, 1987).

Após estes achados, Bridger et al. (1986) observaram que algumas amostras detectadas em seres humanos apresentavam eletroferotipos e propriedades antigênicas semelhantes ao vírus encontrado em suíno, notificando, assim, a patogenia do RVC em seres humanos.

No Brasil, a primeira detecção do RVC ocorreu, em 1983, na cidade do Rio de Janeiro por Pereira et al. (1983a). Em Belém, Pará, inicialmente foi identificado o RVC como um RV atípico (GABBAY et al., 1989). Logo após, foi realizado um estudo de coorte em crianças de ambientes urbanos de baixa renda com objetivo de investigar a epidemiologia do RVC em crianças com diarreia em Belém, Pará (LINHARES et al., 1989). Em outro estudo como o conduzido por Gabbay et al. (1999) o RVC foi identificado em 33% das crianças de uma creche de Belém, Pará.

Desde então, estas infecções têm sido identificadas esporadicamente ou associada a surtos em vários momentos e locais por todo o mundo (TIMENETSKY et al., 1993; GABBAY et al., 1989, 1999; SOUZA et al., 1998; TEIXEIRA et al., 1998; CUNLIFFE et al., 2001; PHAN et al., 2004; SCHNAGL et al., 2004; STEYER et al., 2006; ABID et al., 2007; LUCHS et al., 2011). Em decorrência disso, estudos de vigilância epidemiológica conduzidos no Brasil e no mundo têm sido realizados a fim de monitorar esse agente viral e a sua diversidade genética e antigênica (MARTELLA et al., 2007; GABBAY et al., 2008; ARAÚJO et al., 2011; LUCHS et al., 2011).

## 3.2. O ROTAVÍRUS

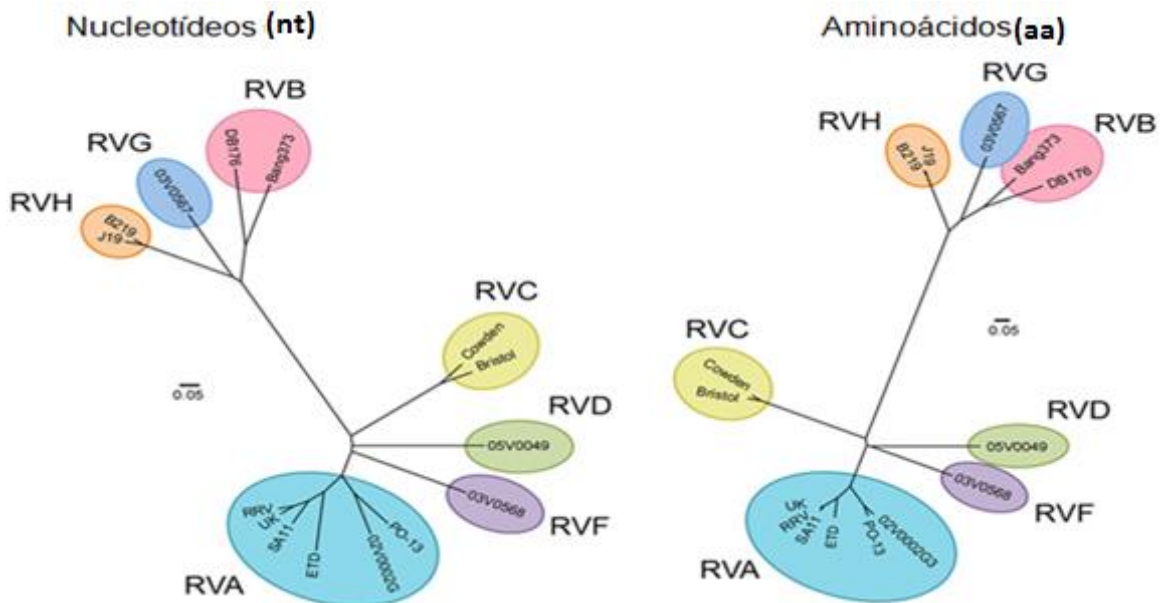
### 3.2.1. Classificação viral

O RVC pertence à família *Reoviridae*, subfamília *Sedoreovirinae*, a qual está organizada em seis gêneros, dentre eles o *Rotavirus*, que infecta muitas espécies de mamíferos (ESTES E KAPIKIAN, 2007; LEE et al., 2011; ICTV, 2012).

O RV é classificado em oito grupos/espécies determinado pela proteína VP6 (A, B, C, D, E, F, G e H). Tem sido encontrado em animais distintos, sendo que os grupos detectados acometendo seres humanos e animais foram o A, B, C e H, sendo este último mais recentemente descrito, também tem sido identificado como causador de diarreia em humanos adultos (ATTOUI et al., 2012; MATTHIJNSSENS et al., 2012; PATTON, 2012). Os demais foram identificados apenas em animais como os grupos D, E, F e G detectados em espécies de aves (ESTES E KAPIKIAN, 2007; SANTOS E SOARES 2008; TROJNAR et al., 2010).

A análise filogenética do gene VP1, revelou as sequências de aminoácidos (aa) e nucleotídeos (nt) em distintos grupos/espécies do RV, o que pode demonstrar a similaridade e divergência entre os mesmos. Destaca-se o RVC que demonstra similaridade ao nível de aa com os RVA, RVF e RVD na FIGURA 2 (OGDEN et al. 2012).

FIGURA 2- Árvore filogenética comparando a sequência de nt e aa do gene VP1 para vários isolados de RVA-RVH.



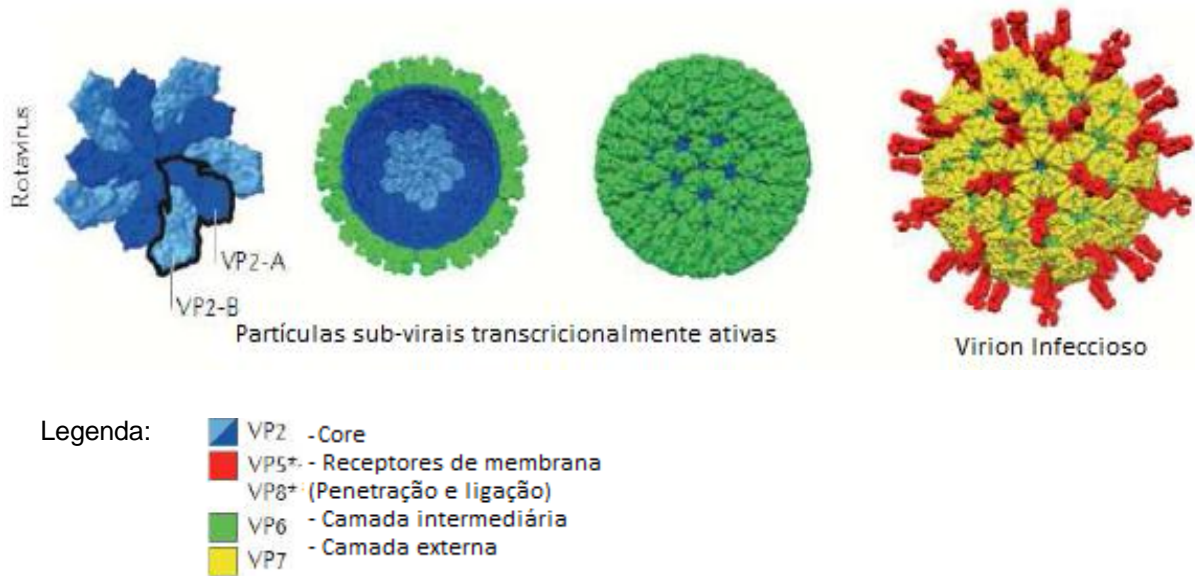
Fonte: Retirado e adaptado de Ogden et al. (2012).

### 3.2.2. Partícula viral

As partículas virais infecciosas do RV medem de 75 a 100 nanômetros de diâmetro, incluindo as espículas de VP4. São desprovidas de envelope lipoproteico e seu nucleocapsídeo possui simetria icosaédrica e forma arredondada se observado à microscopia eletrônica. Este vírus possui três camadas protéicas concêntricas contendo o capsídeo externo, intermediário e interno, no qual o core está intimamente associado ao genoma viral contendo ácido ribonucleico de fita dupla, denominado de dsRNA (**d**ouble-**s**tranded RNA), conforme observado na FIGURA 3 (ESTES E KAPIKIAN, 2007).



FIGURA 3- Representação esquemática da estrutura da partícula de RV demonstrando as proteínas dos capsídeos externo, intermediário e interno do virion.



Fonte: Adaptada de Trask et al. (2012).

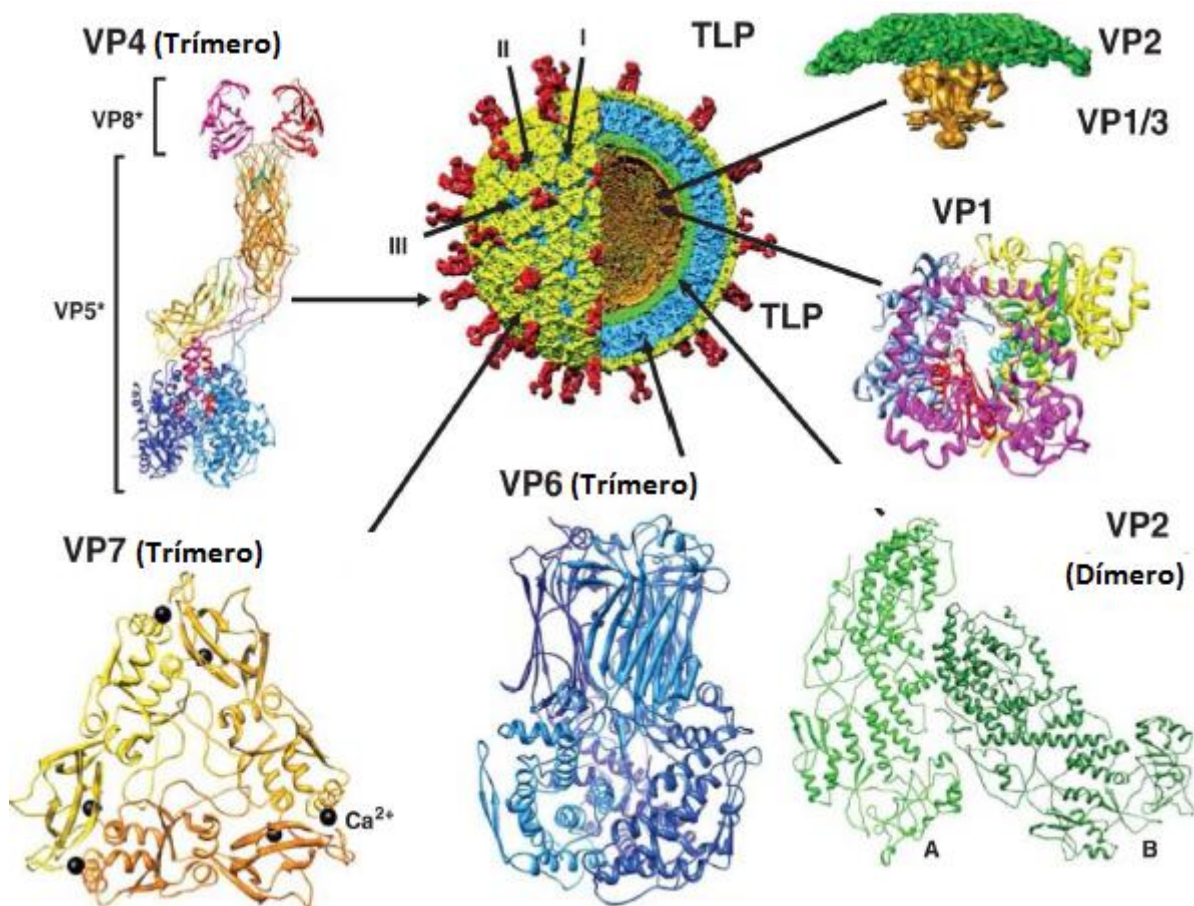
O genoma viral contém 18.556 pares de base (pb) divididos em 11 segmentos de dsRNA, com tamanhos que variam de 667 a 3.302 pb. Estes 11 segmentos codificam 12 proteínas específicas para o ciclo reprodutivo, sendo seis proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) e seis não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6). Cada segmento genômico sintetiza uma proteína, com exceção das proteínas NSP5 e NSP6 que são codificadas pela região de sobreposição de um único segmento (11º segmento) (ESTES, 2001; ESTES E KAPIKIAN, 2007; MATTHIJNSSENS et al., 2008; KHANANURAK et al., 2010).

O capsídeo externo é constituído pelas proteínas VP4 e VP7, respectivamente, sendo responsáveis pela imunidade do hospedeiro e a indução de anticorpos neutralizantes. A Glicoproteína VP7 está relacionada ao genótipo G e a proteína VP4 está relacionada ao genótipo P (sensível a Protease) e compõe as 60 projeções (espículas) localizadas no capsídeo externo. Esta proteína é clivada por ação de enzimas proteolíticas, dando origem a dois fragmentos, VP5\* e VP8\*, envolvidos no processo de patogênese viral (ESTES E KAPIKIAN, 2007; SANTOS E SOARES, 2008).

O capsídeo intermediário é constituído pela proteína VP6, sendo esta a mais abundante, a qual interage tanto com as proteínas do capsídeo externo, quanto do interno. Esta proteína está relacionada a determinação dos grupos/espécie e subgrupos de RVA e é necessária para a transcrição viral, bem como à entrada na célula hospedeira (ESTES E KAPIKIAN, 2007; SANTOS E SOARES, 2008).

O core é constituído pelas proteínas VP1, VP2 e VP3. A proteína VP2 é a mais abundante, que interage com a VP1, VP3 e VP6 e com o genoma viral. Estão associadas ao processo de revestimento do genoma viral (JAYARAM et al., 2004; ESTES E KAPIKIAN, 2007). As proteínas estruturais VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7 estão representadas na figura abaixo.

FIGURA 4- Estrutura e localização das proteínas estruturais (VP1-4, VP6 e VP7) do RV.



Fonte: Retirado e adaptado de Estes e Greenberg (2013).

As proteínas não estruturais (NSP), não compõem a morfologia do vírus e estão presentes apenas na célula infectada, exercendo as funções vitais para a infectividade e replicação das partículas virais (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

A proteína NSP4 é uma das seis proteínas não estruturais presentes durante a biossíntese dos RV, sendo a única que não se liga ao RNA viral. É transmembrana e está localizada, especificamente, no retículo endoplasmático (RE) da célula infectada. Apresenta importante papel na morfogênese viral, uma vez que atua como receptor intracelular na membrana do RE para receber as partículas incompletas durante o processo de maturação. A NSP4 é capaz de ativar os canais dependentes de  $Ca^{++}$  no intestino e vem sendo descrita como a primeira enterotoxina viral com capacidade de induzir diarreia de natureza secretora com ação semelhante ao que se observa com a enterotoxina lábil da *Escherichia coli* (BALL et al., 1996, 2005; HUANG et al., 2004; JAGANNATH et al., 2006; ESTES E KAPIKIAN, 2007; SANTOS E SOARES, 2008).

No QUADRO 1 estão descritas esquematicamente as 12 proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6-VP7) e não-estruturais (NSP1-NSP6) dos 11 segmentos genômicos do RV.

QUADRO 1- Função e localização das proteínas dos RVC.

| Segmento Genômico | Proteína          | Localização      | Função   |
|-------------------|-------------------|------------------|--|
| 1                 | VP1               | Core             | RNA polimerase-RNA dependente  |
| 2                 | VP2               | Core             | Ligação ao RNA viral   |
| 3                 | VP3               | Core             | Guanililtransferase  |
| 4                 | VP4 (VP5* e VP8*) | Capsídeo Externo | Hemaglutinina, proteína de ligação à célula, peptídeo de fusão, antígeno neutralizante |
| 5                 | NSP1              | Não Estrutural   | Ligação ao RNA viral   |
| 6                 | VP6               | Capsídeo Interno | Antígeno de subgrupo, necessário para a transcrição                                    |
| 7                 | NSP3              | Não Estrutural   | Inibe a tradução de proteínas celulares, ligação ao terminal 3' do mRNA viral          |
| 8                 | NSP2              | Não Estrutural   | Ligação ao RNA, helicase, NTPase, forma viroplasmas com NSP5                           |
| 9                 | VP7               | Capsídeo Externo | Glicoproteína antígeno neutralizante   |
| 10                | NSP4              | Não Estrutural   | Glicoproteína, papel na morfogênese, modula Cálcio intracelular, enterotoxina          |
| 11                | NSP5              | Não Estrutural   | Ligação ao RNA, forma viroplasmas com NSP2, interage com VP2 e NSP6                    |
|                   | NSP6              | Não Estrutural   | Interage com NSP5, presente no viroplasma  |

\*Polipeptídeos originados pela clivagem da VP4 por ação da tripsina

Fonte: Retirada e adaptada de Santos e Soares, 2008.

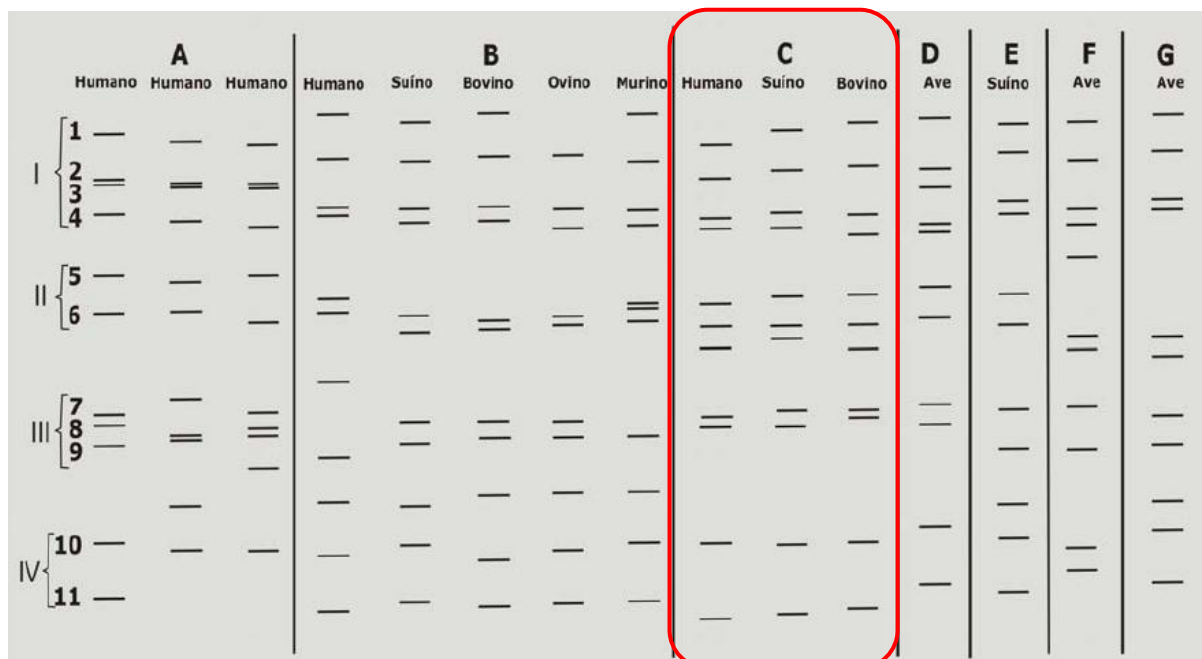
A partícula viral é estável em pH entre 3 e 9 e pode manter sua infecciosidade quando exposta ao fluorocarbono, éter, clorofórmio ou desoxilato a 4°C ou -20°C, quando estabilizada com cloreto de cálcio. No entanto, pode ser inativada por fenol, formalina, cloro e etanol a 95%, pois remove o capsídeo externo (KAPIKIAN et al., 2001; SANTOS E SOARES, 2008; ESTES E GREENBERG, 2013).

### 3.2.3. Perfil eletroforético do RVC

Pelo fato do genoma do RV ser segmentado, a disposição e mobilidade de cada segmento viral são exibidas em uma configuração que é típica do seu grupo de origem. A análise dos eletroferotipos é realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), técnica fácil e rápida para a detecção do vírus e para estudos de epidemiologia molecular que possibilita a detecção de polimorfismo genômico nas amostras circulantes (MASCARENHAS et al., 1988, 1997; ESTES E KAPIKIAN, 2007; MODARRES et al., 2008; CHOUIKHA et al., 2009).

A análise do padrão eletroforético permite que os segmentos de RNA sejam distribuídos em quatro classes distintas, com base na ordem de migração no gel. O RVC exibe o padrão 4:3:2:2, que significa classe I, segmentos de alto peso molecular (genes 1, 2, 3 e 4); classe II, segmentos de médio peso molecular (genes 5, 6 e 7); classe III, distinta dupla de segmentos (genes 8 e 9) e classe IV, segmentos de baixo peso molecular (genes 10 e 11) (ESTES E KAPIKIAN, 2007). A FIGURA 5 a seguir mostra os 11 segmentos genômicos do RV pertencentes aos grupos/espécies A a G, com ênfase para os RVC.

FIGURA 5- Perfis eletroforéticos dos grupos de rotavírus de A-G, associados à infecção no homem e outros animais.



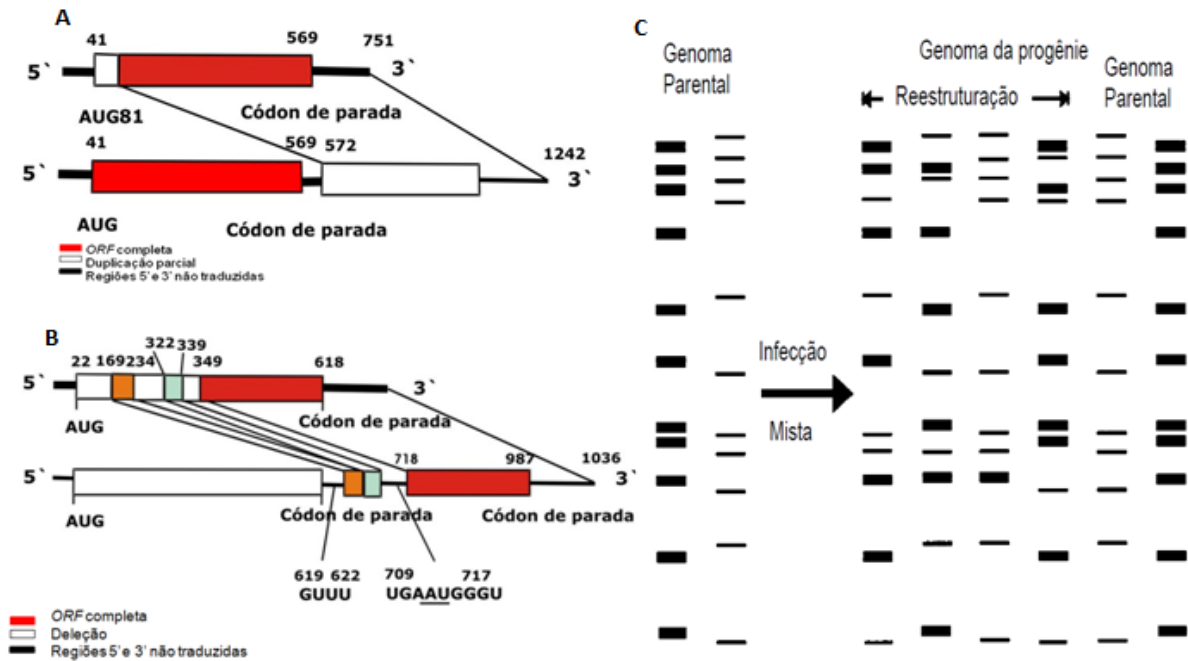
Fonte: Retirado e adaptada de Kapikian et al. (2001)

### 3.2.4. Mecanismo de evolução genética

Mundialmente, há uma grande diversidade genética no que tange à circulação de cepas do RV, as quais se encontram em constante mudança ao longo do ano e de país para país e que podem levar a quadros de gastroenterite grave (KIRKWOOD, 2010). Nos países em desenvolvimento, cepas do RV de origem humana com combinações incomuns de G/P, devido ao *reassortment* com RV de origem animal, pode ser a causa de doenças graves em crianças, já que estes são responsáveis por gastroenterites não só em seres humanos, mas também em animais comuns de fazenda (bovinos, ovinos e suínos), exóticos (lhamas, girafas), primatas não humanos (macacos), animais domésticos (cães e gatos), roedores e pássaros (MARTELLA et al., 2010; PATTON, 2012).

O RV possui elevada variabilidade genética, com destaque para os mecanismos: mutações pontuais (variantes intratípicas), que consistem nas trocas de bases nucleotídicas que geralmente ocorrem com mais frequência, que podem ser acumuladas e transmitidas para novas progênes do vírus; rearranjos genômicos (recombinação intramolecular), que são modificações na sequência do segmento genômico ocasionado por uma duplicação parcial ou deleção; reestruturação genética (*reassortment*), quando há a permuta de material genético entre dois vírus pertencentes ao mesmo grupo, durante infecções mistas *in natura* ou por meio de coinfeção em cultivo celular (FIGURA 6). A introdução de genes do RV de origem animal em amostras do RV de origem humana é o principal mecanismo de evolução que sugere o possível papel zoonótico do RVC em populações humanas (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001, 2004; GABBAY et al., 2008).

FIGURA 6- Mecanismos de mutação genética



Legenda: (A) Genoma rearranjado de rotavírus com duplicação parcial da região codificante, (B) Genoma rearranjado de rotavírus com deleção da região codificante e (C) Reestruturação genética entre RV em uma co-infecção.

Fonte: Retirada e Adaptada de Desselberger (1996) e Ramig (1997).

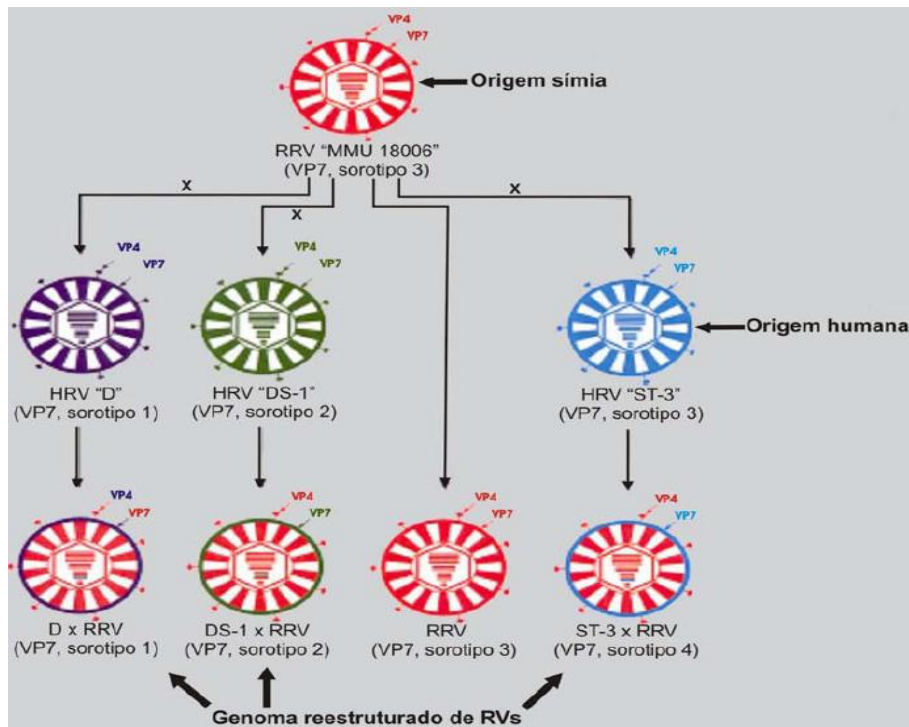
A ocorrência do RV de origem animal acometendo seres humanos se registra pela transmissão direta entre seres humanos e animais contribuindo para a reestruturação genética dos segmentos genômicos (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001; MATTHIJNSSENS et al., 2006; BÁNYAI et al., 2006; MARTELLA et al., 2010).

Essa reestruturação é mais frequente em países em desenvolvimento, provavelmente devido às precárias condições de higiene e saneamento básico, defesas imunológicas limitadas, infecções parasitárias concomitantes e maior convívio do homem com animais (domésticos e outros) favorecendo a ocorrência de infecções mistas e provavelmente transmissão entre espécies (DESSELBERGER, 1996; MASCARENHAS, 2006; DE GRAZIA et al., 2010; MARTELLA et al., 2010).

A reestruturação genética é muito utilizada na fabricação de vacinas contra RV, como foi o caso da primeira vacina, a RRV-TV. Esta foi realizada *in natura* por meio de co-infecção em culturas celulares infectadas com RV de origem bovina (Lincoln) e RV símio (SA11), resultando no primeiro clone reestruturado reunindo os

segmentos 4, 5 e 10 do RV SA11 e 1, 2, 3, 6 e 11 do RV bovino (TANIGUCHI E URASAWA, 1995; MASCARENHAS, 2006; LINHARES et al., 2009) (FIGURA 7).

FIGURA 7- Reestruturação no genoma de RV.



Fonte: Retirada e adaptada de Kapikian et al. (1996)

### 3.2.5. Classificação genômica do RVC

A classificação sorotípica/genotípica do RVC é similar ao do RVA. Baseando-se na especificidade antigênica dos 11 genes que codificam para as 12 proteínas (VP1-VP4, VP6-VP7; NSP1-NSP4), os genótipos podem ser determinados pelo sequenciamento de nucleotídeos após os testes de RT-PCR (ESTES E KAPIKIAN, 2007; MARTELLA et al., 2007; SANTOS E SOARES, 2008).

Matthijnssens et al. (2011) propuseram a seguinte classificação baseada nas características moleculares dos genes que codificam para as proteínas: VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, tais sendo Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, respectivamente. Desta forma, a classificação utilizada para o RVA também está sendo usada para o RVC.



As árvores filogenéticas relacionadas aos RVC demonstraram que todas as cepas humanas desse grupo até o presente momento são classificadas em um único genótipo, o G4P[2] como descrito por Martella et al. (2007). Contrariamente, vários tipos diferentes do RVC foram identificados para cepas suínas (G1, G3, G5 e G6; P [1]) e uma cepa bovina (G2P[3]) (JIANG et al., 1999; MARTELLA et al., 2007; COLLINS et al., 2008). Contudo, a sequência do genoma completo foi realizada por Yamamoto et al. (2011), revelando os genótipos correspondentes aos 11 genes como observado no QUADRO 2.

QUADRO 2- Genótipos correspondentes aos 11 genes (VP1-VP4, VP6-VP7; NSP1- NSP6) do RVC.

| Segmento Genômico | Proteína          | Tipos de Genótipos |                 |              |
|-------------------|-------------------|--------------------|-----------------|--------------|
|                   |                   | Cepa Humana*       | Cepa Suína*     | Cepa Bovina* |
| 1                 | VP1               | R2                 | R1              | -            |
| 2                 | VP2               | C2                 | C1              | -            |
| 3                 | VP3               | M2 e M3            | M1              | M4           |
| 4                 | VP4 (VP5* e VP8*) | P[2]               | P[1]            | P[3]         |
| 5                 | NSP1              | A2                 | A1              | -            |
| 6                 | VP6               | I2                 | I1              | I3           |
| 7                 | NSP3              | T2                 | T1              | T3           |
| 8                 | NSP2              | N2                 | N1              | -            |
| 9                 | VP7               | G4                 | G1, G3, G5 e G6 | G2           |
| 10                | NSP4              | E2                 | E1              | -            |
| 11                | NSP5 (NSP6)       | H2                 | H1              | H3           |

\*Referências das cepas utilizadas: Protótipo Bristol de humano; protótipo Cowden de suíno e protótipo Shintoku de bovino.

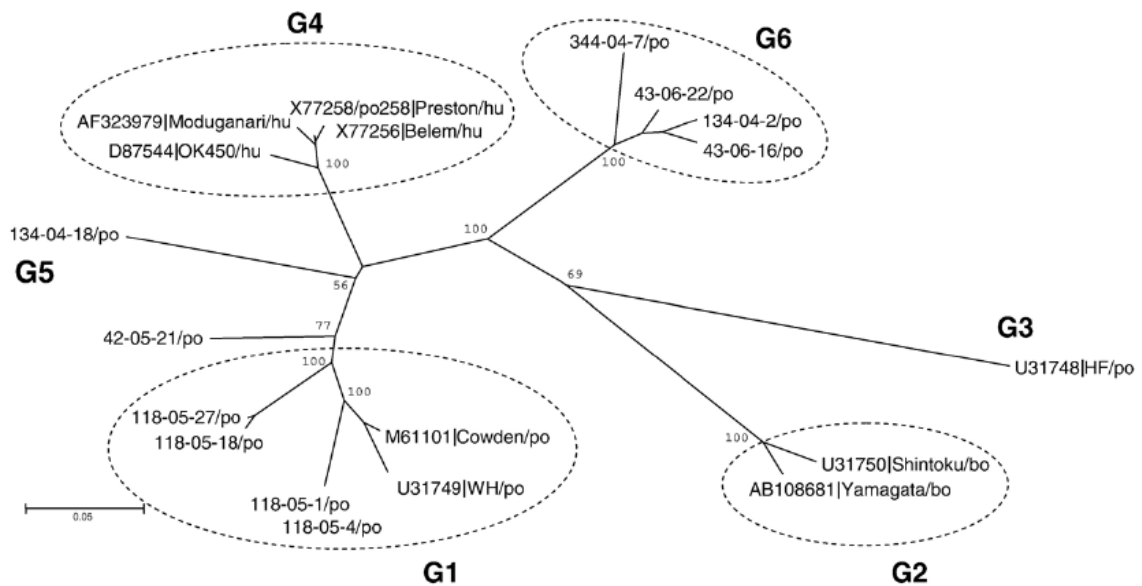
Fonte: Dados retirados de Yamamoto et al. (2011)

As sequências dos genes do RVC foram determinadas para as cepas de seres humanos, suínos e bovinos, principalmente para os genes VP7, VP4 e VP6. No que se refere à genotipagem dos segmentos de outros genes tal procedimento ainda é limitado (MARTELLA et al., 2007).

Atualmente, as análises das sequências de cepas humanas do RVC de diferentes países indicam que os genes VP7, VP4 e VP6 são altamente conservados e são considerados como pertencentes a um genótipo distinto do RVC de origem animal (SCHNAGL et al., 2004; RAHMAN et al., 2005; KUZUYA et al., 2007; KHAMRIN et al., 2008; MITUI et al., 2009; YAMAMOTO et al., 2011). Outro gene muito estudado atualmente é o codificante da proteína NSP4, devido seu papel na morfogênese viral e seu potencial enterotoxigênico, sendo relevante no RVC (ARAÚJO et al., 2011).

Todos os RVC de origem humana partilham um elevado grau de conservação no interior do gene VP7 e pertencem ao genótipo G4, distinto dos genótipos circulantes em animais e que pertencem ao G1 (JIANG et al., 1996; ADAH et al., 2002; CASTELLO et al., 2002; RAHMAN et al., 2005; BÁNYAI et al., 2006). Contudo, outros estudos demonstram a relação antigênica do RVC de origem humana com cepas semelhantes ao Cowden suíno demonstrando uma similaridade a nível de aa do gene VP7 o qual G4 está próximo aos genótipos suínos como exposto na FIGURA 8. Observou-se também, que oito regiões variáveis (VR-1 a VR-8) foram reconhecidas na proteína VP7 entre cepas antigenicamente distintas, em locais similares aos das regiões variáveis do RVA (TSUNEMITSU et al., 1992; MARTELLA et al., 2007).

FIGURA 8- Árvore filogenética baseada na sequência completa de aminoácidos do gene VP7 do RVC suíno.



Cepas de referência: suíno (Po): Cowden, HF, WH; bovinos (Bo): Shintoku, Yamagata; humano (Hu): Belém, Moduganari, OK450 e Preston. A barra de escala é proporcional com a distância filogenética.

Fonte: Adaptado de Martella et al. (2007).

No que se refere ao gene VP4, análises genéticas também revelaram três genótipos P distintos para cepas do RVC de origem humana agrupadas em genótipo do tipo P[2], RVC de origem suína agrupadas no genótipo do tipo P[1] e RVC de origem bovina agrupadas no genótipo P[3] (JIANG et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2011).

Na análise dos demais genes realizada por Yamamoto et al. (2011), especula-se que além dos genótipos para os genes VP7, VP6 e VP4, o genótipo M3 do gene VP3 pode ter se originado a partir de um RVC de origem suína. A ocorrência de recombinação do RVC de origem humana associados à transmissão entre espécies tem sido documentada com base na análise completa do genoma (RAHMAN et al., 2007; HEIMAN et al., 2008; MATTHIJNSSENS et al., 2006, 2008).

A transmissão do RVC de origem suína para seres humanos foi documentada em um estudo realizado em Belém, Brasil, onde o RVC tanto de origem humana, quanto suína era endêmico (GABBAY et al., 2008). Evidência de transmissão entre

espécies também foi relatada entre RVC de origem suína e bovina (CHANG et al., 1999a; JEONG et al., 2009; YAMAMOTO et al., 2011).

O papel zoonótico do RVC de origem animal tem sido postulado com base no aumento de taxas de soroprevalência desse grupo em populações humanas que vivem em áreas rurais (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2004). No entanto, ao contrário do RVA, análises moleculares de linhagens de humanos e animais não parecem apoiar esta hipótese, já que todos os RVC de origem humana sequenciados, até o momento, parecem ter uma origem monofilética (RAHMAN et al., 2005; BÁNYAI et al., 2006). Uma possível explicação para estas inconsistências pode ser a quantidade limitada de dados de sequências atualmente disponíveis a partir de cepas de origem animal. Assim como, para o RVA, a transmissão entre espécies do RVC também pode ocorrer levantando questões interessantes sobre a ecologia dos RVC de origem humana e animal (MARTELLA et al., 2007).

### 3.3. INFECÇÃO POR RVC

#### 3.3.1. Replicação viral

A transmissão do RVC também ocorre comumente por via fecal-oral, após a ingestão da partícula viral, que tem tropismo por células maduras que recobrem as vilosidades do intestino delgado chamadas de enterócitos e *in vitro* ligam-se a várias linhagens celulares, mas infectam apenas as de origem intestinal e epitelial (ARIAS et al., 2002; GRAY et al., 2008).

A partícula viral multiplica-se no citoplasma da célula, ocasionando a descamação dessas e impedindo a captação de fluidos e nutrientes. A infecção e descamação dos enterócitos aceleram a proliferação das células secretoras das criptas, levando para o lúmen intestinal grande quantidade de fluido e provocando uma perda temporária da capacidade absorptiva (LINHARES et al., 2005; GRAY et al., 2008).

A disfunção celular, também pode promover expressão de algumas enzimas digestivas e ocasionar um aumento no potencial osmótico. Promove a má absorção de glicose no intestino delgado, aumento da perda de fluido, resultando em uma diarreia com características más absorptivas e secretoras. Com relação ao vômito,

este mecanismo ainda não foi totalmente esclarecido (ESTES E KAPIKIAN, 2007; GRAY et al., 2008).

Sendo assim, o ciclo reprodutivo do RV inicia-se pela entrada do vírus na célula mediado pelas proteínas do capsídeo externo VP4 e VP7, as quais estão diretamente envolvidas no processo infeccioso, atuando na adesão celular, penetração da membrana e entrada na célula. O processo de penetração do vírus inicia pela clivagem da proteína VP4 pela ação da tripsina, gerando os polipeptídeos VP5\* e VP8\*, os quais interagem com receptores contendo ácido siálico (AS). Contudo nem todos os RV adsorvem por esta via, pois não se ligam ao receptor AS, os chamados ácido siálico independentes, sendo sugerida a participação de glicoconjugados (glicoproteínas, glicolipídeos e glicofosfolipídeos) (ESTES E KAPIKIAN, 2007; SANTOS E SOARES, 2008).

Vários tipos de proteínas celulares estão implicados na entrada do vírus na célula, podendo servir como coreceptores ou fatores de entrada. As integrinas celulares  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 7$  e a proteína de choque térmico (HSP 70), podem estar envolvidas na interação da VP5\*, enquanto que as integrinas  $\alpha \beta 2$  e  $\alpha \beta 3$  podem interagir com a VP7 em infecções graves (GUERRERO et al., 2000; HEWISH et al., 2000; ZARATE et al., 2000, 2003; CIARLET et al., 2001; LÓPEZ e ARIAS, 2004, 2006; SANTOS E SOARES, 2008).

O processo de internalização da partícula do RV ainda é controverso, tendo sido proposto duas vias: a penetração direta via membrana plasmática ou endocitose mediada por receptores. Nesta entrada, ocorre a perda do revestimento externo do RV pela ação enzimática devido às baixas concentrações de íons cálcio, dando origem a partícula de dupla camada (DLP), a qual será translocada através do plasma ou da membrana endossomal até o citoplasma celular (SANTOS E SOARES, 2008; RUIZ et al., 2009).

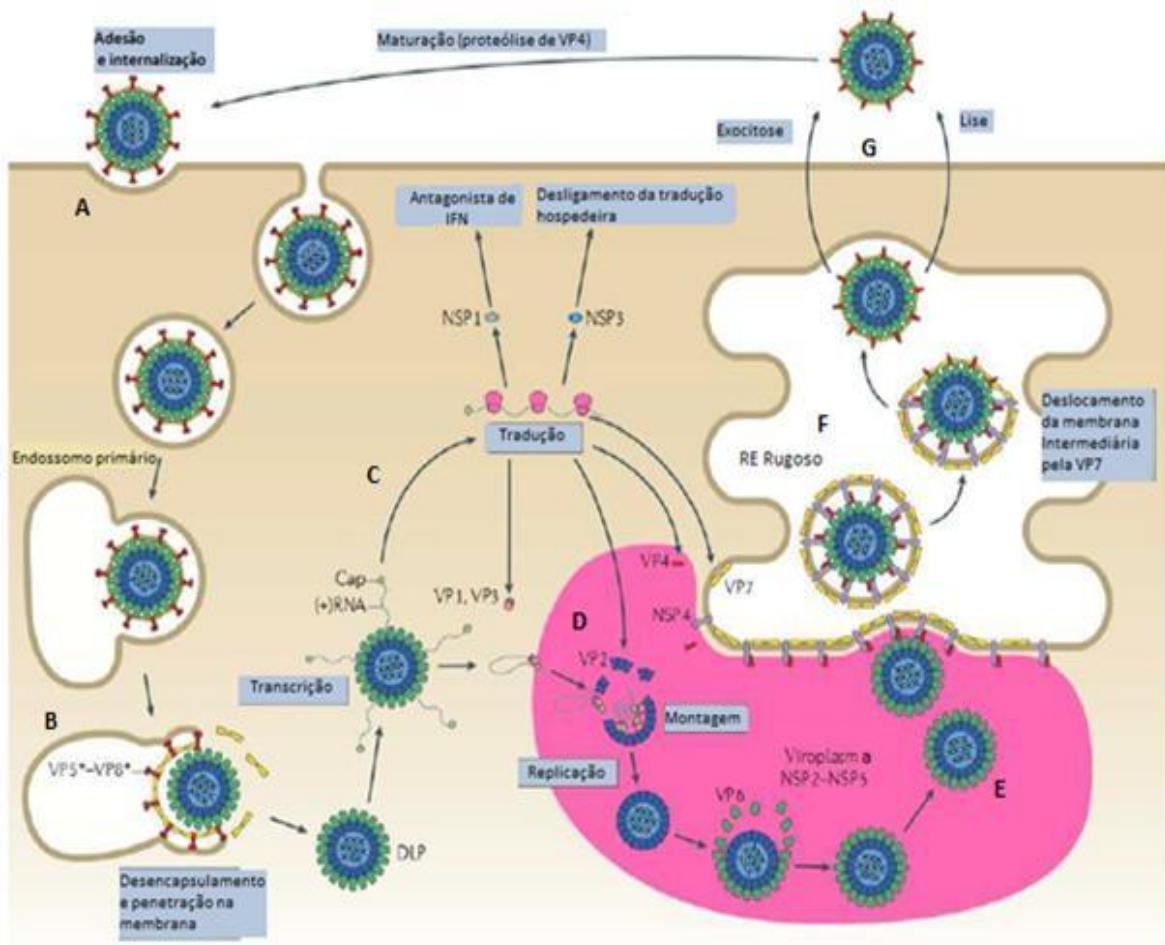
Em seguida há a ativação da transcriptase viral, promovendo a produção de RNA mensageiro (RNAm) tanto para a formação das proteínas virais como para constituir os moldes com vistas à formação das progênes. No dsRNA, a fita de RNA de polaridade negativa (-) servirá de molde para a fita de RNA de polaridade positiva (+), a qual será utilizada como RNAm e de molde para a produção de novas fitas de RNA (-). Os segmentos são transcritos dentro da estrutura da DLP pela VP1, que foi identificada como uma RNA polimerase RNA-dependente e recoberta pela VP3, a

qual possui atividades de guanilil e metiltransferase (LIU et al., 1992; CHEN et al., 1999; ESTES E KAPIKIAN, 2007, SANTOS E SOARES, 2008).

Os canais que atravessam o core e o capsídeo interno permitem o efluxo de tais RNAm que são traduzidos por meio da VP2 e VP6. As partículas subvirais são desenvolvidas e agrupadas em inclusões discretas e eletrodensas denominadas viroplasmas, localizadas próximas ao RE (FABBRETTI et al., 1999; SILVESTRE et al., 2004). As proteínas estruturais e não estruturais do vírus, em sua maioria, são produzidas nos ribossomos livres. A VP7 e NSP4 são sintetizadas nos ribossomos associados à membrana do RE e inseridas nessa membrana (SANTOS E SOARES, 2008).

Com isso, os viroplasmas atravessam para o interior do RE por ação da NSP4, que atua como um receptor intracelular para a DLP. Posteriormente, as mesmas adquirem um envelope transitório, o qual é perdido e substituído. Em seguida, ocorre a montagem das proteínas do capsídeo externo, o que resulta na formação de partículas virais maduras com diâmetro interno aproximado de 70nm (KAPIKIAN et al., 2001). Finalmente, o ciclo infeccioso termina quando as partículas virais são liberadas por meio da lise da célula hospedeira (ESTES, 2001; JAYARAM et al., 2004; LÓPEZ E ARIAS, 2004; ESTES E KAPIKIAN, 2007, SANTOS E SOARES, 2008). O ciclo reprodutivo está detalhado na FIGURA 9.

FIGURA 9: Esquema da replicação do RV.



Legenda: A) Internalização do vírus por endocitose; B) dissociação dos trimeros de VP7 e penetração no citoplasma celular; C) transcrição e tradução das proteínas virais como NSP1 e NSP3, que são importantes na continuação do processo de replicação, formação dos viroplamas; D) montagem e empacotamento do genoma; E) formação da dupla camada proteica (DLP); F) posterior montagem da tripla camada (TLP) no Retículo endoplasmático Rugoso (RE Rugoso), possivelmente por interação da VP4 e NSP4. G) O final do ciclo ocorre após a liberação do vírus da célula infectada, o qual fica exposto a ação proteolítica da tripsina, quando ocorre a divisão em VP5\* e VP8\*; IFN=interferon.

Fonte: Adaptada de Trask et al.(2012).

### 3.3.2. Transmissão

Os RVC são transmitidos principalmente pela via fecal-oral, ou por fômites, contato inter-humano, por meio da ingestão de água e alimentos contaminados com fezes, sendo também sugerida a transmissão zoonótica ou por via respiratória

devido ser um vírus com alta taxa de infecção (WARD et al., 1986; ESTES E KAPIKIAN, 2007; MELEG et al., 2008).

Estima-se que a cada evacuação seja liberado até um trilhão de partículas virais por milímetro cúbico de espécime fecal. O período de incubação é de um a três dias, sendo que a excreção máxima ocorre entre o 3º ou 4º dias após o início dos sintomas, e a dose infectante é de apenas dez partículas virais (WARD et al., 1986; ESTES E KAPIKIAN, 2007; MELEG et al., 2008).

A transmissão zoonótica tem sido descrita em surtos, que podem ser interpretados como a introdução de cepas do RVC a partir de uma fonte ou reservatório não identificado, devido este apresenta elevadas taxas de soroprevalência em populações humanas que vivem em áreas rurais (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2004; BÁNYAI et al., 2006; LUCHS et al., 2009).

Gabbay et al. (2008) documentaram a infecção do RVC suíno em crianças em Belém, Brasil, e estabeleceram este vírus como uma infecção zoonótica emergente em seres humanos. A possibilidade de propagação de zoonoses também tem sido considerada com base nos resultados de um inquérito soroepidemiológico realizado no Reino Unido em animais e em seres humanos que destacou o impacto do potencial zoonótico do RVC de animais para seres humanos. Nesse estudo, verificou-se a necessidade de outras pesquisas, principalmente, nos países em desenvolvimento onde os seres humanos e animais convivem muitas vezes em contato físico direto, uma possibilidade, mais comumente, da ocorrência de infecções mistas (JEONG et al., 2009).

A água e os alimentos contaminados exercem importante papel na disseminação do RVC, particularmente em situações epidêmicas, como os extensos surtos de gastroenterite registrados no Brasil (GABBAY et al., 1999; 2008; ARAÚJO et al., 2011; LUCHS et al., 2011; WALKER et al., 2011).

Novos estudos têm demonstrado a importância do monitoramento de amostras ambientais a fim de se avaliar a epidemiologia do RV e o possível risco de disseminação para a população (FUMIAN et al., 2011; GANIME et al., 2012; HE et al., 2012). Diversos estudos apontam a detecção de amostras de origem animal capazes de formar recombinantes gênicos com cepas do RV de origem humana e vice-versa (JAIN et al., 2001; MARTELLA et al., 2010).



### 3.3.3. Patogenia e imunidade

A infecção por RVC assim como a infecção causada por RVA induz a destruição e a descamação dos enterócitos e, em consequência, acelera a migração de células secretoras das criptas para as vilosidades intestinais, provocando assim uma perda temporária da capacidade absorptiva do intestino, o que leva ao quadro de diarreia (SANTOS E SOARES, 2008). Essa replicação evolui no sentido cefalo-caudal, no curso de um a dois dias, estendendo-se até o íleo (LINHARES et al., 2009).

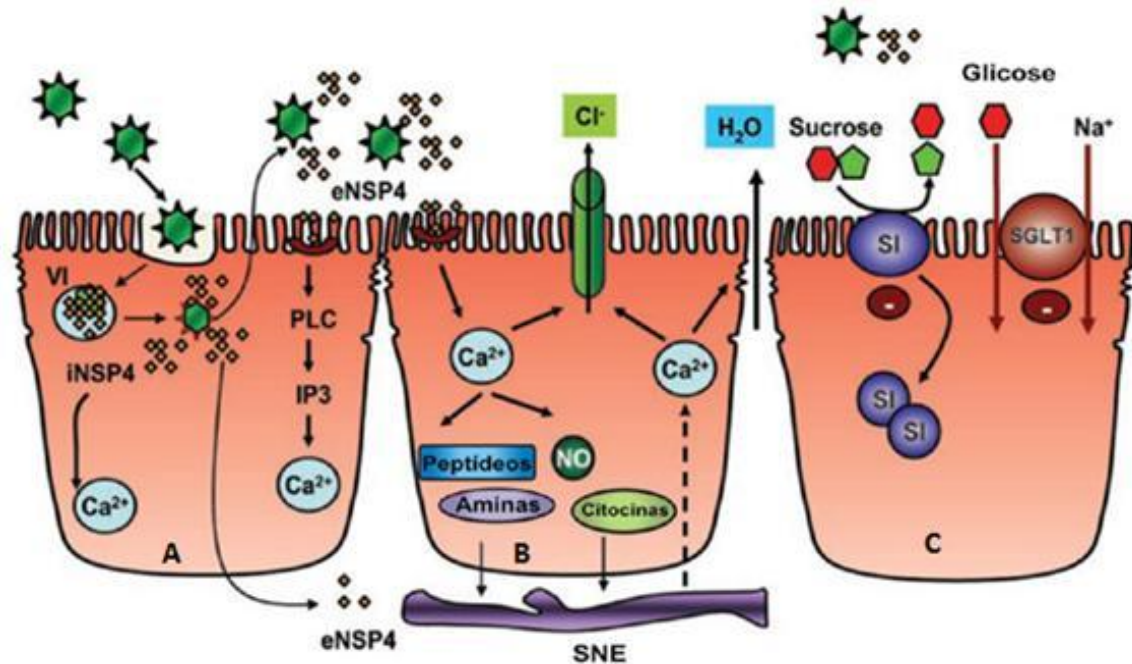
No entanto, como este mecanismo ainda não está bem elucidado, estudos demonstram que a diarreia pode ser atribuída a má absorção devido à destruição dos enterócitos, o efeito enterotóxico da proteína NSP4 e a ativação do sistema nervoso entérico (ESTES E KAPIKIAN, 2007; GRAY et al., 2008).

A diarreia de natureza osmótica ocorre devido a má absorção desencadeada pela lesão do epitélio, o que determina principalmente a depressão transitória no nível das dissacaridases, em particular a lactase. O açúcar não absorvido pode sofrer a ação das bactérias que colonizam as porções mais distais do intestino, resultando na eliminação de fezes dotadas de pH ácido e/ou com positividade para substâncias redutoras (BALL et al., 1996; LINHARES et al., 2009).

A diarreia de natureza secretora consiste na ação enterotoxigênica exercida pela proteína NSP4 e sua influência sobre o sistema nervoso entérico (SNE) (SANTOS E SOARES, 2008; LINHARES et al., 2009).

O mecanismo patogênico envolvendo esta proteína seria provavelmente de que a NSP4 promova uma desestabilização da membrana do RE, com consequente lise do mesmo, ocorrendo um aumento do  $\text{Ca}^{++}$  intracelular e o acréscimo da secreção de íons  $\text{Cl}^-$ , causando diarreia de natureza secretória (TIAN et al., 1995; HUANG et al., 2004; BALL et al., 2005; ESTES E KAPIKIAN, 2007). Os eventos ocorridos podem ser observados de forma esquemática na FIGURA 10.

FIGURA 10- Principais mecanismos envolvidos na patogênese da diarreia por RV.



Legenda: A) Após a formação de viroplastos (VI) há liberação de novos vírus e da NSP4. Esta proteína induz um aumento da concentração de  $\text{Ca}^{++}$  em células infectadas proporcionando a desestabilização do citoesqueleto e efluxo de água e íons  $\text{Cl}^-$ , provocando diarreia de natureza secretora. B) Ocorre a liberação de aminas e peptídeos as quais estimulam o sistema nervoso entérico. C) A má digestão dos carboidratos deve-se a uma diminuição nos níveis de enzimas digestivas e diminuição da função da SGLT-1 (transportador de glicose dependente de sódio).

Fonte: Adaptado de Hodges e Gill (2010).

Observações demonstraram que o mecanismo da diarreia por RV configura o envolvimento do sistema nervoso autônomo intestinal. Sustenta-se a hipótese de haver citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico pelo enterócito infectado, induzido pela NSP4. Uma vez que os neurônios são dotados de receptores para tais substâncias, ocorre a despolarização da membrana e o incremento no efluxo de fluidos e eletrólitos para o lúmen intestinal (RAMIG, 2004; LINHARES et al., 2009; ESTES E GREENBERG, 2013).

Os mecanismos envolvidos na resposta imune às infecções por RV não foram totalmente esclarecidos, embora seja considerada multifatorial envolvendo a produção e secreção de anticorpos neutralizantes pelas proteínas VP4 e VP7, além do envolvimento da imunidade celular e humoral (FRANCO et al., 2006; ESTES E KAPIKIAN, 2007; LINHARES et al., 2009).

Os anticorpos circulantes específicos das classes IgA e IgG para as proteínas VP4, VP7, NSP4 e VP6 estão envolvidos, sendo esta última detectada em níveis mais elevados, principalmente, em episódios graves. Contudo, nenhuma dessas proteínas, individualmente ou combinadas, proporcionam completa proteção aos indivíduos (GRAY et al., 2008; LINHARES et al., 2009).

A resposta imune na infecção viral pode ser tanto homotípica (sorotipo-específica), quanto heterotípica (LINHARES et al., 2009). Em uma primoinfecção, a proteção é homotípica, enquanto que em uma reinfecção, a proteção é heterotípica e associada a prevenção de infecções contra diferentes sorotipos do RV (JIANG et al., 2002; GRAY et al., 2008).

Segundo Linhares et al. (2009), crianças na cidade de Belém, Brasil, demonstraram resposta imune heterotípica induzida na vigência de uma infecção primária por RV constituindo-se, essencialmente, em uma propriedade intrínseca da cepa viral.

A importância da imunidade celular na infecção por esse vírus encontra-se sob investigação. Estudos demonstraram que várias citocinas, tais como IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  estão envolvidas no processo de proteção contra a infecção por RV por meio de mecanismos como a inibição da entrada desse vírus nas células do hospedeiro e o aumento da atividade dos linfócitos T citotóxicos. Todavia, a função que tais citocinas desempenham na patogênese e no controle da doença permanecem indefinidos (BASS, 1997; ROLLO et al., 1999; JIANG et al., 2002; GRAFF et al., 2009).

Durante a infecção primária por RV, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> têm um papel importante na resolução viral, bem como na proteção parcial contra reinfecção. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são essenciais para o desenvolvimento de imunoglobulina A intestinal específica contra RV (BASS, 1997; ROLLO et al., 1999; JIANG et al., 2002; GRAFF et al., 2009).

Os anticorpos maternos adquiridos passivamente, por via placentária ou pela secreção láctea, parecem justificar os quadros de infecções assintomáticas em neonatos e crianças com idade inferior a três anos. Além destas imunoglobulinas maternas, fatores não imunes, como certas glicoproteínas, parecem exercer potencial papel protetor no que diz respeito ao leite materno (LINHARES et al., 1989, 2009).

### 3.3.4. Quadro clínico

A sintomatologia clínica do RVC, geralmente, é relatada como uma infecção assintomática ou como uma doença diarreica leve, com poucos episódios de vômitos, variando de um a três episódios por dia, apresentando, geralmente, febre, náusea e dor abdominal. O grau de desidratação é menor e conseqüentemente, menor número de hospitalizações em crianças menores de três anos, quando comparado ao RVA (JIANG et al., 1995; GABBAY et al., 1999; 2008; SANCHEZ-FAUQUIER et al., 2003; LEE et al., 2011).

Em média, a soroprevalência global da infecção por RVC é de aproximadamente 33%, com um pico nos grupos etários mais velhos (JAMES et al., 1997; RIEPENHOFF-TALTY et al., 1997; STEELE E JAMES, 1999; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2004, MEDICI et al., 2009). Alguns estudos sugerem que a infecção por RVC é mais comum entre as crianças menores de cinco anos e em adultos (KUZUYA et al., 1998, NILSSON et al., 2000).

Os sintomas da infecção por RVC são semelhantes ao do RVA, o qual se manifesta em crianças menores de cinco anos na forma assintomática ou se expressa por gastroenterite de forma moderada ou grave com desidratação potencialmente fatal. A clínica da doença é caracterizada por vômito, febre moderada/alta com temperatura de 37,9°C ou acima, dor abdominal e diarreia aquosa, podendo levar à desidratação e, não havendo a intervenção precoce, culmina com o óbito (ESTES E KAPIKIAN, 2007; ESTES E GREENBERG, 2013).

O período de infecção e manifestação clínica do RVC é semelhante ao do RVA. O período de incubação é curto, variando de um a três dias, e é uma infecção autolimitada durando em torno de três a sete dias, podendo o vírus ser eliminado nas fezes por até 57 dias após a infecção. A infecção secundária é clinicamente leve ou assintomática (BISHOP, 1996; LINHARES et al., 2005; ESTES E KAPIKIAN, 2007; SANTOS E SOARES, 2008; ESTES E GREENBERG, 2013).

Manifestações clínicas atípicas foram observadas em infecções por RVC, o qual foi detectado em tecidos do fígado de pacientes com atresia biliar extra-hepática, uma condição neonatal grave (RIEPENHOFF-TALTY et al., 1997). Tais manifestações são observadas também para o RVA tais como encefalites, doença de Kawasaki, síndrome de Reye, enterocolite necrotizante e gastroenterite hemorrágica. Vale ressaltar os casos de intussuscepção registrados nos EUA devido

à administração da vacina RRV-TV (MASCARENHAS E LINHARES, 2005; ESTES E KAPIKIAN, 2007; ESTES E GREENBERG, 2013).

### 3.3.5. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial do RVC pode ser realizado pela detecção da partícula ou do antígeno viral nas fezes com o uso de testes sorológicos e moleculares (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

A EGPA é considerada o padrão ouro de diagnóstico laboratorial para RVC realizado no dsRNA do vírus extraído a partir da amostra fecal (PEREIRA et al., 1983b). Nessa metodologia, o diagnóstico das infecções por RVC revela o perfil genômico da amostra viral detectada. O padrão de migração do segmento genômico é importante para avaliar a diversidade da cepa circulante, que se identifica pelo padrão eletroforético 4:3:2:2, o qual difere do RVA que apresenta padrão eletroforético de 4:2:3:2, ou seja, a diferença básica entre o RVC e o RVA é a inversão dos três segmentos virais (tripé), localizado na classe II. A análise da dupla cadeia de RNA contendo os 11 segmentos requer a presença de pelo menos  $10^8$ - $10^{10}$  partículas virais / ml para um resultado positivo (XU et al., 1990; KUZUYA et al., 1996; KAPIKIAN, 2001; JEONG et al., 2009; LINHARES et al., 2009).

O diagnóstico do RVC apresenta muitas dificuldades, principalmente relacionada ao ensaio imunoenzimático (ELISA), que não reconhecem os antígenos-específicos do gene VP6 do RVC, embora já apresentem disponíveis reagentes para o diagnóstico dos RVC, RVA e RVB (LINHARES et al., 2009).

A sorotipagem do RVC ainda é restrita *in vitro*, devido este vírus possuir dificuldades de adaptação a cultura de células (OSETO et al., 1994; FUJII et al., 2000; MARTELLA et al., 2007). Porém, a propagação do vírus em cultura de células mesmo que difícil, é possível, utilizando linhagens celulares como MA-104 e LLC-células de rim de macaco (MK2) e células de carcinoma de cólon humano (CaCo-2). A MA-104 tem efeito citopático característico, com aumento na refrigência, seguido de redução do volume citoplasmático, com formação de alguns grumos celulares e células repuxadas, com distribuição focal (ESTES et al., 1979, SVENSSON et al., 1991, LONDRIGAN et al., 2000). Contudo, como a propagação do vírus em cultura é bastante lenta, o método não possui valor prático para diagnóstico, limitando-se à investigação científica (SANTOS E SOARES, 2008; LINHARES et al., 2009).

A RT-PCR e o sequenciamento automático caracterizam-se por elevadas sensibilidades e especificidades, se fundamentando na amplificação enzimática do RNA viral e as análises das sequências de nt e aa que sugere a diversidade genética de cepas do RVC de origem humana existente, embora tal diversidade seja menor que as do RVA (RAHMAN et al., 2005; ARAÚJO et al., 2011). Esta técnica é um importante recurso em estudos epidemiológicos, pois permite a identificação de genótipos circulantes, o qual utiliza iniciadores específicos para os genes do RVC sendo atualmente utilizado com maior frequência em laboratórios de pesquisa (GOUVEA et al., 1991; JIANG et al., 1995; KUZUYA et al., 2005; BÁNYAI et al., 2006; ESONA et al., 2008; GABBAY et al., 2008; LINHARES et al., 2009).

### **3.3.6. Tratamento, controle e profilaxia**

O primeiro tratamento a ser instituído em um episódio de gastroenterite por RVC é a reposição de fluidos e eletrólitos perdidos no vômito e na diarreia (ESTES E KAPIKIAN, 2007). Para a reposição hidroeletrólítica recomenda-se a Terapia de Reidratação Oral (TRO), utilizando-se uma fórmula padrão preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1975, do mesmo modo que é utilizado em infecções por RVA (BASS, 2003).

Diante de situações que inviabilizem a via oral como vômitos incoercíveis, estado de torpor, estomatite extensa, má absorção de glicose e íleo parálitico, recomenda-se administração venosa; sendo usado em gastroenterites graves por RV quando presentes indicadores de hipovolemia, choque, coma ou acentuada debilidade (LINHARES et al., 2009; ESTES E GREENBERG, 2013).

Além disso, recomenda-se a manutenção da dieta alimentar, principalmente o leite materno por conter fatores imunes e não imunes, a administração de zinco recomendada pela OMS, o uso de mucilagens que aparentemente promove a redução no volume das evacuações durante as primeiras horas da doença e o uso de vitamina A, que se associa a sensível redução nas taxas de morbimortalidade em diarreia aguda (LINHARES et al., 2009; ESTES E GREENBERG, 2013).

A utilização de algumas drogas que podem amenizar os sintomas da infecção, como o uso de antibióticos para infecções secundárias por bactérias; drogas antissecretoras (racecadotril) inibidoras em potencial da degradação das encefalinas endógenas; administração de imunoglobulinas por via oral; probióticos,

representados por culturas vivas de bactérias não patogênicas, que tem como mecanismo básico o seu processo de colonização, competem com bactérias produtoras de urease; e o uso de drogas antivirais como a ribavirina, porém ainda não se tem eficácia considerando seu uso em seres humanos, o qual está sendo realizado em experimentos para avaliar seus potenciais terapêuticos (KAPIKIAN et al., 2001; LINHARES et al., 2009).

Segundo Walker et al. (2011) pesquisas recentes demonstraram que as práticas higiênicas como a lavagem das mãos, os cuidados com a água e os alimentos, bem como a destinação adequada de dejetos humanos e animais, e água encanada parecem exercer certo impacto no controle e na profilaxia das infecções por RV.

As profilaxias clássicas como o uso do leite materno contendo elevados níveis de anticorpos da classe IgA para RV, obtido de gestantes imunizadas tem-se revelado eficaz a partir da administração a indivíduos imunodeficientes (KAPIKIAN et al., 2001), e o uso imunoglobulinas humanas específicas para RV, por via oral ou parenteral, em crianças hospitalizadas de baixo peso parece conferir certa proteção (BASS, 2003). Ressalta-se também, a importância da vacinação contra RV como estratégia de prevenção e controle da doença (LINHARES et al., 2009; ESTES E GREENBERG, 2013).

### **3.3.7. Vacina contra RV**

Testes que utilizam imunomicroscopia eletrônica e ensaio imunoenzimático comprovaram que o anti-soro induzido específico para as partículas do RVC não reagem de forma cruzada com o RVA. Tais resultados sugerem que as crianças vacinadas com RVA não estão protegidas contra a infecção por RVC (CLARK et al., 2009; BAEK et al., 2013).

Isto levanta preocupação com o desenvolvimento de vacinas eficazes para o RVC emergente, o qual uma vacina eficaz para RVC humano apenas serviria em uma área geográfica onde este patógeno contribui para surtos de diarreia viral (BAEK et al., 2013).

Por não existir uma vacina específica para RVC, as epidemias desse patógeno e de outros agentes causadores de gastroenterite podem aumentar em resposta as reduções de GA ocasionadas pela vacinação de RVA (KUMAZAKI E USUKU, 2013).

Devido à importância epidemiológica que este vírus possa vir a assumir futuramente é importante que também uma vacina seja produzida contra esta espécie de RVC (LUCHS et al., 2011).

Portanto, a vacinação é a maneira mais eficaz de se evitar diversas doenças como varíola (erradicada), poliomielite (paralisia infantil), sarampo, tuberculose, rubéola, gripe, hepatite B, febre amarela, rotavirose, entre outras, e tem o objetivo de controlar algumas doenças infectocontagiosas existentes no território brasileiro (MS, 2013).

Atualmente estão disponíveis duas vacinas orais de cepas atenuadas contra o RVA no Brasil. A Rotarix®, produzida pela GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica é uma vacina monovalente de proteção homóloga (G1P[8]) e a RotaTeq® (Merck & Co. Inc., West Point, PA, EUA), que é uma vacina pentavalente, gerada a partir da cepa WC3 além dos genótipos G1, G2, G3, G4 e P1A[8], que foram inseridas no calendário nacional de imunização em 2006, sendo a primeira disponível nos postos de saúde e a segunda em clínicas privadas (WHO, 2013b).

Existem também outros imunizantes como a vacina de rotavírus Lanzhou lamb, fabricada pelo Instituto Lanzhou de Produtos Biomédicos na China, e a vacina Rotavin-M1, fabricada pela Polyvac no Vietnã, porém não são disponíveis mundialmente (WHO, 2013b).

O uso da vacina deve ser parte de uma estratégia abrangente para o controle das doenças diarreicas como a promoção da vacinação, o aleitamento materno exclusivo, a lavagem das mãos e melhores condições de abastecimento de água e saneamento (WHO, 2013b).

### 3.4. EPIDEMIOLOGIA DO RV

A GA é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Representam um importante problema de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento como aqueles localizados na África, Ásia e América Latina, onde a *Escherichia coli* e o RV são as causas mais comuns de diarreia (WHO, 2013a).

Estimativas apontam que GA é a segunda principal causa de mortalidade de crianças menores de cinco anos de idade, perdendo apenas para a pneumonia (WHO, 2013a). Os patógenos responsáveis pela alta taxa de mortalidade por GA



são os RV, calicivírus e *Escherichia coli* enteropatogênica e enterotóxica que estão associados a 55% das mortes ocorridas por diarreia (LANATA et al., 2013).

Segundo Lanata et al. (2013), é estimado, em todo o mundo a cada ano, que a diarreia por RV em crianças menores de cinco anos cause 38,3% das hospitalizações, resultando em 197.000 óbitos de crianças menores de cinco anos anualmente, principalmente nos países em desenvolvimento. Tal estudo foi realizado almejando crianças menores de cinco anos em seis regiões do mundo incluindo a região das Américas, África, Europa, Leste Mediterrâneo, sudeste da Ásia e Pacífico ocidental. As maiores proporções de diarreia por RV foram nas regiões do Pacífico ocidental (32,6%) e no leste mediterrâneo (31,3%) sendo que na região das Américas foi observado uma porcentagem abaixo da esperada (23,4%). Este fato pode ter ocorrido devido a introdução da vacina RVA em alguns países dessas regiões.

Estima-se ainda que o RV, no Brasil, na maior parte da América Latina e no Caribe ocasione cerca de dois milhões de consultas médicas, 75.000 internações e 15.000 mortes entre crianças de seis meses a cinco anos de idade (LINHARES, 2013).

### 3.5. EPIDEMIOLOGIA DO RVC

Estudos de epidemiologia molecular indicam que o RVC de origem humana evoluiu recentemente e constituiu um único genótipo distribuído ao redor do mundo, sendo responsável por causar gastroenterite aguda tanto em crianças menores de três anos quanto em adultos (JIANG et al., 1996; GABBAY et al., 1999; CASTELLO et al., 2000; ARAÚJO et al., 2011).

Sendo assim, este vírus vem assumindo uma importância epidemiológica mundial e tem sido detectado em espécimes fecais de crianças com diarreia, principalmente em surtos no âmbito familiar, escolas, hospitais ou militares ocorridos no mundo e no Brasil, com destaque para a região amazônica brasileira (ESTES E KAPIKIAN, 2007; GABBAY et al., 1999; 2008).

Jiang et al. (1995) relataram casos de infecções em crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda, porém detecções dessa natureza ainda são raras (CUNLIFFE et al., 2001; PHAN et al., 2004; SCHNAGL et al., 2004; STEYER et al., 2006; ABID et al., 2007).

Mundialmente, a gastroenterite aguda associada ao RVC em seres humanos foi encontrada inicialmente na Suécia e posteriormente na Inglaterra, Malásia e na África do Sul, nos quais este vírus foi identificado em casos esporádicos de diarreia e um surto de diarreia familiar (BRIDGER et al., 1986; RASOOL et al., 1994; JAMES et al., 1997; STEELE E JAMES, 1999; SEBATA E STEEB, 1999).

Este vírus foi observado nos países da África, Europa e na Ásia, com destaque para a detecção no Japão, na cidade de Matsuyama por Oseto et al. (1986) e depois em Tóquio por Ushijima et al. (1989). Desde então, foi encontrado em outras regiões do Japão, como Chiba, Okayama e Saga (KUZUYA et al., 1998). As taxas de positividade do RVC no Japão associada a casos esporádicos e surtos de gastroenterite aguda variou de 1-13,3%, sendo consideradas inferiores aos RVA (KUZUYA et al., 1998; PHAN et al., 2004; KUMAZAKI E USUKU, 2013).

No Brasil, o RVC foi detectado na região sudeste do país, em 1993, por Souza et al. (1998) e na região centro-oeste, em 1994, por Teixeira et al. (1998), no entanto, nenhuma informação genética foi descrita. Após 15 anos dos primeiros relatos de detecção nessas regiões, o RVC foi identificado, tanto associado a casos esporádicos como em surtos, acometendo adultos e crianças das áreas rurais dos estados de São Paulo (SP) e de Goiás (GO), durante a vigilância nacional para RV em 2007-2008 (LUCHS et al., 2009).

Luchs et al. (2011) detectaram o RVC em oito amostras: 0,4% do subgrupo testado (8/2205) e 0,3% do total estudado (8/3019); cinco delas são de surtos de gastroenterites e três de casos esporádicos com amostras também de São Paulo e Goiás. Este vírus também foi detectado em paciente com diarreia em outros estados brasileiros como no Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia e Rio Grande do Sul (ARAÚJO et al., 2011).

Na região norte do Brasil, o RVC foi observado inicialmente por Linhares et al. (1989) em uma pesquisa primária sobre a epidemiologia do RVA no município de Belém, Pará. Esse grupo/espécie do RV é associado tanto a surtos quanto a casos esporádicos. No caso de surto, ele causou infecção em 33% das crianças de uma creche de Belém (GABBAY et al., 1999) e em casos esporádicos, o mesmo foi relatado em um estudo longitudinal, no período de 1982 a 1986, causando infecção em crianças de 0-3 anos resultando em 6,5% das crianças positivas para RVC para o gene VP6 estritamente relacionado a seres humanos e 4% para o gene VP6 de origem suína (GABBAY et al., 2008).

Mais recentemente, Kaiano et al. (2010), analisaram espécimes fecais de crianças sintomáticas ou não para gastroenterite, no período de 2008 a 2009, residentes em uma comunidade remanescente de quilombola em Ananindeua, Pará e registraram o primeiro caso de RVC em uma criança com diarreia vivendo em uma comunidade semi isolada, representando 2,3% dos casos.

Relatos do RVC em pacientes hospitalizados ainda são escassos. Este evento foi observado, pela primeira vez, por Jiang et al. (1995) em 16 crianças menores de dois anos de idade internadas com diarreia no hospital Rhode Island, nos EUA, apresentando positividade pra RVC. Outro caso observado foi em uma criança menor de cinco anos (0,4%) internada com diarreia no hospital McCormick, Chiang Mai, na Tailândia, no período de 2002 a 2004 (KHAMRIN et al.,2008).

Além disso, o RVC foi encontrado em co-infecção com outros patógenos entéricos, tais como *Vibrio Cholerae*, *Shigella flexneri* e o RVA (CUNLIFFE et al., 2001; SANCHEZ-FAUQUIER et al., 2003; RAHMAN et al., 2005; ESONA et al., 2008). Co-infecção com o norovírus do tipo GII foi observada por Phan et al. (2004) com 8,3% e também por Mori et al. (2013) com 16,7%, destacando-se que essas porcentagens foram relativamente elevadas.

Após observações a respeito da epidemiologia do RVC, notou-se que este grupo vem, cada vez mais, assumindo uma importância epidemiológica global tanto associado à surtos e casos esporádicos, quanto à hospitalizações. Desta forma, este estudo se propõe verificar a associação entre crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda e a detecção do RVC.

## 4. OBJETIVO

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Detectar e genotipar o rotavírus pertencente ao grupo C em crianças de até 36 meses e 24 dias de idade com quadros de gastroenterite aguda internados na clínica Pediátrica do Pará em Belém, Pará.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a frequência do RVC em crianças com quadros de gastroenterite aguda;
- b) Determinar a sazonalidade do RVC, correlacionar com os fatores climáticos observados;
- c) Verificar a faixa etária mais acometida por esse vírus;
- d) Registrar os sinais e sintomas clínicos apresentados pelos menores com RVC;
- e) Demonstrar a diversidade de cepas circulantes e comparar o gene VP6, VP7, VP4 e NSP4 relacionados a seres humanos e/ou suínos presentes no banco de gene.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

A presente investigação foi aprovada pela Plataforma Brasil em respeito às normas nacionais e internacionais que regulamentam tal atividade, sob o número de CAAE 14592013.1.0000.5172 (ANEXO A).

Este estudo foi realizado com material biológico estocado nos acervos do IEC/SAVIR, portanto sem apresentar riscos aos menores envolvidos. A identidade dos menores envolvidos no estudo foi preservada.

Os aspectos de biossegurança utilizados nos procedimentos laboratoriais foram os equipamentos de proteção individual (EPI) como luva, jaleco, touca, máscara, óculos e pro pé. O material potencialmente contaminado (fezes) foi manipulado em laboratório de segurança NB2 com o uso de cabine de fluxo laminar tipo 2 e seus descartes foram eliminados em locais adequados.

### 5.2. PACIENTES E ESPÉCIMES CLÍNICOS

A população do estudo foi constituída por crianças na faixa etária de 3 meses a 47 meses e 29 dias de idade, hospitalizadas com o diagnóstico de GA na Clínica Pediátrica do Pará, no período de maio de 2008 a abril de 2011.

Essas crianças participaram de um estudo de vigilância intensiva de gastroenterite, tipo caso-controle, realizado em Belém, Pará, abrangendo quatro hospitais, que consistia basicamente em: i) avaliar a efetividade da vacina contra rotavírus do grupo A (Rotarix<sup>®</sup>) introduzida no Programa Nacional de Imunização do Brasil em março de 2006; ii) detectar a proporção de todas as crianças hospitalizadas por diarreia grave devido à infecção por RVA e iii) monitorar as cepas de RVA circulantes no município de Belém.

Os espécimes clínicos provenientes dessas crianças, estocados nos acervos do IEC/SAVIR foram utilizados neste estudo.

A Clínica Pediátrica do Pará, um dos quatro hospitais onde se desenvolveu o estudo de vigilância de RVA, foi escolhida para o presente estudo, por apresentar um maior quantitativo de pacientes e está localizado na região metropolitana de Belém, Pará. O clima da região é tropical e úmido, apresentando níveis

pluviométricos elevados no período de janeiro a abril. A cidade de Belém é a capital do estado do Pará, norte do Brasil e possui uma área de 1.059.406 Km<sup>2</sup> com a população estimada em 1.425.922 (IBGE, 2013). O mapa pode ser observado na FIGURA 11.

FIGURA 11- Mapa da região metropolitana de Belém, Pará.



Fonte: Figura retirada e adaptada do Google Imagens (2014).

Em três anos de vigência da investigação das gastroenterites realizada em clínicas pediátricas do Pará foram coletados 2904 espécimes fecais entre maio de 2008 a abril de 2011. Assim, utilizou-se 20% do total de espécimes clínicos que apresentaram resultados negativos para RVA e/ou norovírus.

Desta forma, foram selecionados os espécimes clínicos coletados mensalmente com um nível de confiança de 95% e erro amostral de 4%, um número amostral (n) de 483 de um total de 2276 amostras negativas para RVA e testadas para norovírus, de acordo com a calculadora on-line para cálculos amostrais (SANTOS, 2010). Destas, retirou-se 171 amostras positivas para norovírus, resultando em um n de 312 espécimes aptos a serem testados para RVC.

Para a verificação dos sinais e sintomas dos pacientes foram utilizados o banco de dados e as fichas clínicas presentes no acervo da Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas.

### **5.2.1. Critérios de seleção das amostras**

#### **Critérios de inclusão**

- Crianças hospitalizadas com o diagnóstico de GA na Clínica Pediátrica do Pará no período de maio de 2008 a abril de 2011, na faixa etária de 3 meses a 47 meses e 29 dias, cujo exame de fezes foi negativo para RVA e norovírus.

#### **Critérios de Exclusão**

- Crianças hospitalizadas com o diagnóstico de GA na Clínica Pediátrica do Pará no período de maio de 2008 a abril de 2011, fora da faixa etária de 3 meses a 47 meses e 29 dias, sem o resultado do exame de fezes ou com resultado positivo para RVA e/ou norovírus.

### **5.3. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO**

O presente estudo é caracterizado como descritivo transversal, pois é subordinado a uma ou mais questões científicas que sugerem hipóteses ao estudo relacionando uma suposta causa e um dado efeito ou doença (PEREIRA, 1995).

### **5.4. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS**

#### **5.4.1. Suspensão fecal a 10%**

A partir dos espécimes fecais selecionados, foram preparadas suspensões fecais a 10% em tampão Tris-Ca<sup>++</sup> 0,01M pH 7,2. Em seguida, as suspensões foram homogeneizadas e clarificadas por centrifugação a 4.000 Xg durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi colhido e estocado a -20° C para a realização dos testes. O preparo da solução em questão está descrito no Apêndice A.

#### 5.4.2. Extração do genoma viral

A extração do genoma viral foi desenvolvida segundo protocolo modificado e descrito por Boom et al. (1990).

Primeiramente, pipetou-se em um tubo de 1,5ml, 600µl da suspensão fecal. Adicionou-se 20µl de Proteinase K (20mg/ml), agitou-se em vórtex e após este procedimento, o material foi incubado em banho-maria a 56°C por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 500µl de Tampão L6, agitou-se em vórtex e retornou-se o material que foi incubado em banho-maria a 56°C por 10 minutos. Logo após, adicionou-se ao tubo 200µl de Etanol absoluto (4°C) e 20µl de sílica. Homogeneizou-se, novamente, em agitador orbital por 20 minutos à temperatura ambiente (TA) e centrifugou-se a 10.000 Xg por 1 minuto.

Em seguida, descartou-se o sobrenadante em frasco contendo NaOH 10N, logo após, adicionou-se 500µl de Tampão L2 e homogeneizou-se em vórtex, visando centrifugação a 10.000 Xg por 1 minuto descartando o sobrenadante em frasco contendo NaOH. Foi adicionado 500µl de Etanol 70% (4°C) e 500 µl de Acetona absoluta (4°C), seguida por homogeneização em vórtex e centrifugação a 10.000 Xg por 1 minuto, para posterior descarte do sobrenadante em frasco contendo NaOH.

Os sedimentos foram secos em banho-maria a 56°C por 15 minutos ou em estufa a 37°C por 15 minutos com a tampa do tubo aberta para evaporar a acetona. Em seguida, adicionou-se 60µl de água ultra pura (livre de DNase e RNase) e homogeneizou-se em vórtex por 15 segundos. O material foi incubado em banho-maria a 56°C por 15 minutos, já com a tampa do tubo fechada, com posterior centrifugação a 10.000 Xg por 4 minutos, com a coleta de aproximadamente 40 a 50 µl do sobrenadante (dsRNAs), o qual foi transferido para um tubo de 200 µl previamente identificado e armazenado a -20°C para a realização dos demais testes.

Durante o processo de extração, todas as medidas de controle de contaminação foram realizadas, incluindo a utilização de controles positivo (protótipo Cowden) e negativo (água ultra pura). O preparo das soluções em questão está descrito no Apêndice A.



#### **5.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)**

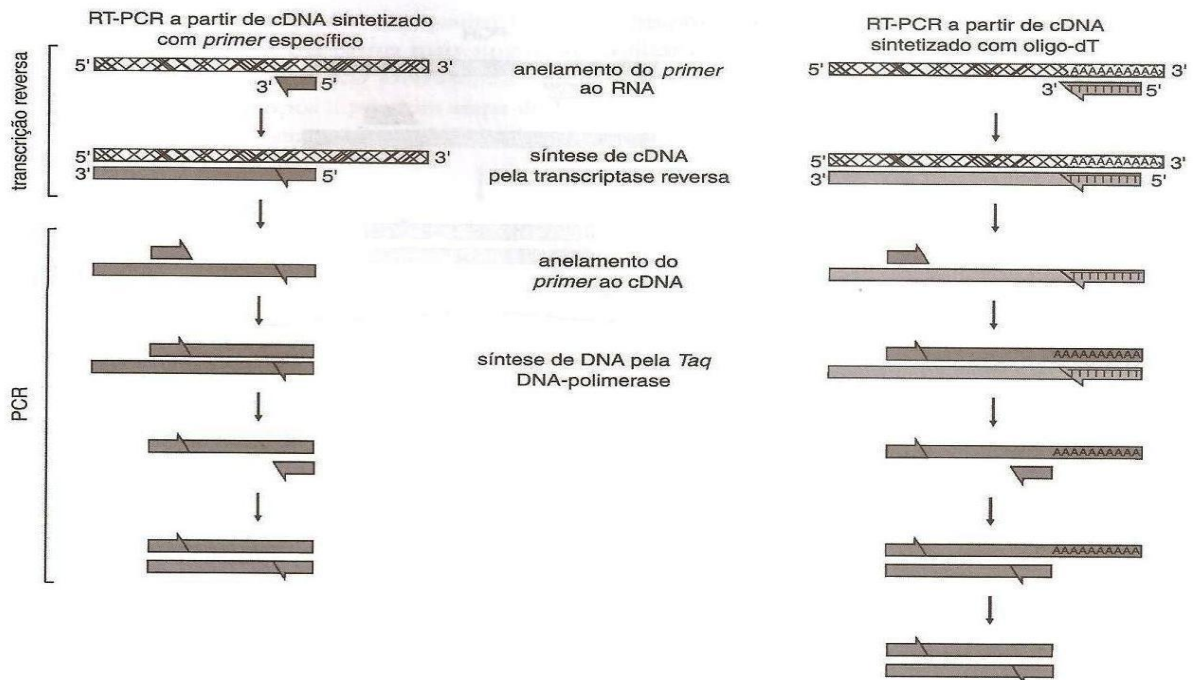
O genoma viral foi extraído e o dsRNA submetido à EGPA, visando a identificação do RVC caracterizado pelo aparecimento de 11 segmentos de RNA exibindo o padrão eletroforético 4:3:2:2, de acordo com o procedimento descrito por Pereira et al. (1983b).

Foram aplicados 10µl dos dsRNAs extraídos no gel de poliacrilamida a 5% juntamente com 2µl de Loading Buffer. Este gel foi submetido a eletroforese vertical, sob as condições 100 volts (V), 100 Watts (W) e 21 milli-Âmpères (mA) por 2 horas e 30 minutos. Posteriormente, o gel foi fixado utilizando-se etanol e ácido acético, seguido de coloração com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), revelação do gel com hidróxido de sódio 10M e formaldeído a 37% e posterior visualização do perfil eletroforético do RVC em negatoscópio de luz branca (HERRING et al., 1982). O preparo das soluções em questão está descrito no Apêndice B.

#### **5.4.4. Reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR)**

Esta técnica consiste em obter a informação genética a partir da amplificação da síntese de uma fita de DNA complementar (cDNA) tendo uma molécula de RNA como molde, realizada pela enzima transcriptase reversa, de acordo esquema demonstrado na FIGURA 12.

FIGURA 12- Desenho esquemático da amplificação por RT-PCR. PCR realizada a partir de cDNA sintetizado pela transcriptase reversa, em que o molde inicial é uma molécula de RNA, utilizando iniciadores específicos.



Fonte: Adaptado de Rossetti, Silva e Rodrigues (2006).

A RT-PCR desenvolvida de acordo com o preconizado por Gouvea et al. (1991) para o gene VP6 utilizando os iniciadores C1/C4 que amplificam fragmentos de 354 pares de base (pb) do RVC tanto de origem humana, quanto animal. Para o gene VP7, foram utilizados os iniciadores G8S/G8A que amplificam fragmentos de 1063 pb conforme descrito por Kazuya et al. (1996), com modificações detalhadas a seguir.

Para o gene VP4 os iniciadores utilizados foram os T434/T435 que amplificam fragmentos de 843 pb como descrito por Wu et al. (1994). Já para o gene NSP4, foi utilizado iniciadores NSP4 (+) e (-) preconizado por Chang et al. (1999b), de acordo com o demonstrado no QUADRO 3. Foi incluído ainda um controle positivo para RVC (protótipo Cowden) e um controle negativo em todos os testes que foram realizados.

QUADRO 3- Sequência dos iniciadores utilizados na RT-PCR para os genes VP4, VP6, VP7 e NSP4 do RVC.

| Iniciador | Sequência 5' → 3'                        | Gene | Amplicon | Referência              |
|-----------|--|------|----------|-------------------------|
| C1 (+)    | 5'-CTC GAT GCT ACT ACA GAA<br>TCA G-3'   | VP6  |          | Gouvea et al.<br>(1991) |
| C4 (-)    | 5'-AGC CAC ATA GTT CAC ATT<br>TCA TCC-3' | VP6  | 354pb    | Gouvea et al.<br>(1991) |
| G8S (+)   | 5'-GGC ATT TAA AAA AGA AGA<br>AGC TGT-3' | VP7  |          | Kazuya et al.<br>(1996) |
| G8A(-)    | 5'-AGC CAC ATG ATC TTG TTT<br>ACG C -3'  | VP7  | 1063pb   | Kazuya et al.<br>(1996) |
| T434(+)   | 5'- GGC TTA AAA AGT AGA GAT<br>CG - 3'   | VP4  |          | Wu et al. (1994)        |
| T435(-)   | 5' – CTT CTT GCC ACA ATG<br>AGT CC – 3'  | VP4  | 843pb    | Wu et al. (1994)        |
| NSP4(-)   | 5' – GGC TTT AAA TTT TTC AGA<br>TC- 3'   | NSP4 |          | Chang et al.<br>(1999b) |
| NSP4(+)   | 5' – AGC CAC ATG AAT TTT<br>TCA TA – 3'  | NSP4 | 615pb    | Chang et al.<br>(1999b) |

Fonte: Elaborado pela autora (2014).

A RT-PCR foi desenvolvida em duas etapas. Na primeira, o material genético constituído pelo RNA, foi usado como molde para a produção de um cDNA, sendo realizada segundo os protocolos descritos por Kazuya et al. (1996), Gouvea et al. (1991), Wu et al. (1994) e Chang et al. (1999b). Já na segunda, foi amplificado os genes do vírus pela PCR com vistas a amplificar fragmentos de 354 pb, 1063 pb, 843 pb, 615 pb para os genes VP6, VP7, VP4 e NSP4, respectivamente.

### - Produção do DNA complementar (cDNA) - Primeira etapa

Esta etapa inicia-se com a formação do DNA complementar (cDNA), com adição de 5µl do dsRNA de RVC que foi acrescida a 4µl dos pares de iniciadores C1/C4 (VP6), G8S/G8A (VP7), T434/T435 (VP4) e NSP4 (+) e (-) (NSP4) concentrados a 20mM, os quais foram desnaturados a 97°C em termociclador por 7 minutos, seguido de imersão em banho de gelo (0°C) por 5 minutos.

Após desnaturação, foi realizada a transcrição reversa visando à obtenção do cDNA, durante 1 hora a 42°C, utilizando uma mistura (MIX) contendo os itens listados no QUADRO 4.

QUADRO 4- Reagentes utilizados na MIX da primeira etapa para a síntese de cDNA pela transcrição reversa do ácido nucleico, de acordo com as concentrações e volumes usados por cada reação.

| cDNA MIX                                   | Concentração<br>1X/µl | Volume/reação |
|--|-----------------------|---------------|
| H <sub>2</sub> O (livre de RNase/DNase)    | -                     | 10,25 µl      |
| dNTP*                                      | 25Mm                  | 2µl           |
| Tampão 10X Buffer (sem MgCl <sub>2</sub> ) | 1X                    | 2,5µl         |
| MgCl <sub>2</sub>                          | 50mM                  | 1µl           |
| RT**                                       | 20 U                  | 0,25µl        |
| <b>Total</b>                               |                       | <b>16µl</b>   |

\*Mistura dos quatro desoxiribonucleotídeos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP e dTTP.

\*\*SuperScript™ II RNase Reverse Transcriptase 10000U, 200 U/µL.

Fonte: Elaborado pela autora (2014).

### - Reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) – Segunda etapa

Após a obtenção do cDNA, iniciou-se a segunda etapa, a qual consistiu na amplificação dos genes pela PCR. Adicionou-se uma segunda MIX contendo os produtos do cDNA, apresentando os item listados no QUADRO 5.

QUADRO 5- Reagente utilizados na MIX da segunda etapa da amplificação do cDNA pela técnica da PCR, de acordo com as concentrações e volumes usados por cada reação.

| PCR MIX                                    | Concentração<br>1X/ $\mu$ l | Volume/reação              |
|--|-----------------------------|----------------------------|
| H <sub>2</sub> O (livre de RNase/DNase)    | -                           | 19,25 $\mu$ l              |
| dNTP*                                      | 25nM                        | 2 $\mu$ l                  |
| Tampão 10X Buffer (sem MgCl <sub>2</sub> ) | 10X                         | 2,5 $\mu$ l                |
| MgCl <sub>2</sub>                          | 50mM                        | 1 $\mu$ l                  |
| TAQ DNA polymerase                         | 20U                         | 0,25 $\mu$ L               |
| <b>Total</b>                               |                             | <b>25<math>\mu</math>L</b> |

\*Mistura dos quatro desoxiribonucleotídeos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP e dTTP.

Fonte: Elaborado pela autora (2014).

As condições necessárias para a amplificação dos genes que codificam as proteínas VP6 e VP7 englobam: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos (desnaturação prévia), 30 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 48°C por 1 minuto (hibridização) e 72°C por 1 minuto (extensão), finalizando com um ciclo de 72°C por 7 minutos de extensão final. Em seguida, os produtos da RT-PCR foram armazenados a -20°C.

Para reação de amplificação da proteína VP4 foram utilizadas as seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos (desnaturação prévia), 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 50°C por 30 segundos (hibridização) e 72°C por 1 minuto (extensão), finalizando com um ciclo de 72°C por 7 minutos de extensão final.

Para a reação de amplificação da proteína NSP4 foram utilizadas as seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos (desnaturação prévia), 40 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 50°C por 30 segundos (hibridização) e 72°C por 1 minutos (extensão), finalizando com um ciclo de 72°C por 7 minutos de extensão.

#### 5.4.5. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos obtidos na RT-PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) a 1,5% em Tampão Tris-Borato-

EDTA (TBE) 1X. Foram adicionados 10µl dos produtos e aplicados a 2µl do corante *Loading buffer* e SyBR<sup>®</sup> safe DNA Gel Stain (Invitrogen<sup>™</sup>, Eugene, Oregon, USA). Em outro orifício foi aplicado o marcador de peso molecular de 123pb (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad, CA, USA) diluído em 8µl de TBE 1X. O gel foi submetido à eletroforese horizontal na condição de 120 V e 400 mA por 25 a 35 minutos. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada no aparelho de foto-documentação GEL DOC 1000 (Vilber Lourmat, France) com auxílio do programa BioCapt.

Os produtos da RT-PCR foram visualizados e submetidos à purificação e posterior sequenciamento. Apenas a produtos que não amplificaram na RT-PCR foram repetidos. Em todas as eletroforeses foram utilizados os controles positivos e negativos das respectivas reações de RT-PCR. O preparo da solução questão está descrito no Apêndice B.

#### **5.4.6. Sequenciamento parcial do genoma viral**

##### **5.4.6.1. Purificação do produto da RT-PCR**

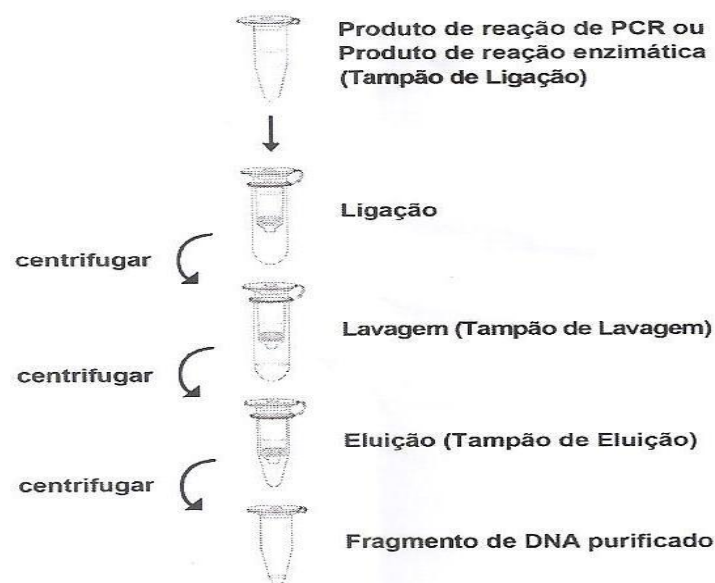
Os produtos obtidos a partir da RT-PCR foram purificados visando o sequenciamento de nucleotídeos. Foi utilizado o kit EasGen - EasyPrep PCR clean-up Mini (EasyPath<sup>®</sup>, SP, BR), para purificar o produto da RT-PCR, o qual baseia-se na purificação de fragmentos de DNA de produtos da PCR na faixa de 100pb até 10kb, retirando as amplificações secundárias observadas na eletroforese em gel de agarose, segundo protocolo descrito pelo fabricante detalhado abaixo.

Transferiu-se 10-100µl de produto da PCR e adicionou-se 5 vezes o volume de tampão de ligação para cada volume da PCR em um microtubo de 1,5ml, seguido de agitação em vórtex. A mistura obtida foi transferida para a coluna acoplada com o tubo coletor de 2ml, centrifugando-a por 1 minuto a 10.000 Xg. Descartou-se o líquido do tubo coletor o qual foi recolocado na coluna. Adicionou-se 750 µl do tampão de lavagem na coluna, o qual foi centrifugado a 10.000Xg por 1 minuto para lavagem da coluna.

Logo após, descartou-se o líquido do tubo coletor e, para remover resíduos de reagentes, centrifugou-se a coluna novamente por 3 minutos a 10.000 Xg sem adicionar nenhum reagente para secar a coluna. Posteriormente, transferiu-se a coluna do tubo coletor, com muito cuidado, para um tubo de eluição (1,5ml). Em

seguida, para eluir o DNA, adicionou-se 40 µl do tampão de eluição ou ddH<sub>2</sub>O (pH 7,0~8,5) no centro da membrana, incubando-a em temperatura ambiente por 2 minutos. Logo após, centrifugou-se por 1 minuto a 10.000 Xg, para então recolher e armazenar o produto final a -20°C. O processo descrito é ilustrado na FIGURA 13.

FIGURA 13- Esquema de purificação do produto da RT-PCR seguindo o protocolo do kit EasGen - EasyPrep PCR clean-up Mini.



Fonte: EasyPath<sup>®</sup>, SP, BR.

#### 5.4.6.2. Quantificação do DNA purificado

A quantificação do DNA para a determinação da concentração do mesmo foi realizada segundo o protocolo descrito pelo fabricante com o uso do marcador de peso molecular Low Mass Ladder (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, CA, USA).

O DNA purificado juntamente com o corante *Loading buffer* e SyBR<sup>®</sup> safe DNA Gel Stain (Invitrogen<sup>™</sup>, Eugene, Oregon, USA) foram aplicados em gel de agarose (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, CA, USA) a 2% em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X. Foi aplicado também em outro orifício, o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, CA, USA).

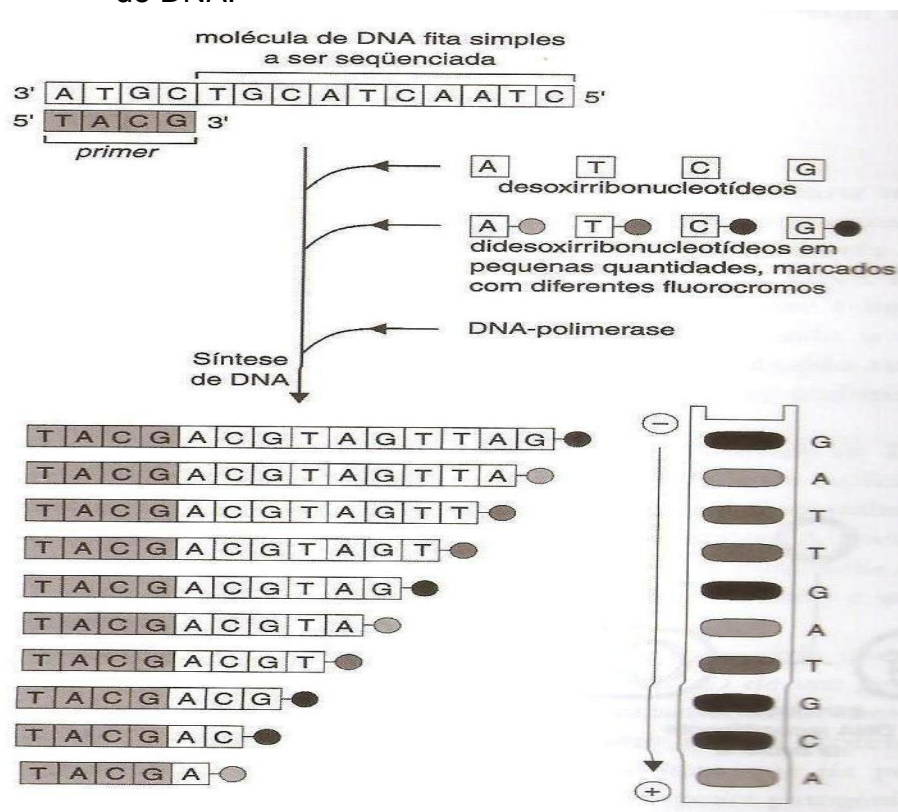
Em seguida, as bandas de interesse no gel foram comparadas com o peso molecular, segundo a intensidade da banda, e a concentração do DNA calculado

que foi expressa em nanogramas (ng), servindo de parâmetro para a reação de sequenciamento.

#### 5.4.6.3. Sequenciamento de nucleotídeos

A reação de sequenciamento foi realizada visando a caracterização dos genes seguindo a técnica descrita no esquema mostrado na FIGURA 14.

FIGURA 14- Esquema da reação de sequenciamento automático de DNA.



Legenda: A sequência de nucleotídeos de determinada molécula de DNA é obtida por meio da reação de síntese de DNA que ocorre na presença dos quatro desoxirribonucleotídeos e de uma pequena quantidade de didesoxirribonucleotídeos (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP). Esses últimos são nucleosídeos terminadores de cadeia, pois não possuem o grupo OH na extremidade 3', e, por isso, a DNA-polimerase não consegue continuar a síntese, sendo sintetizado moléculas de diversos tamanhos. Após transcorrido o tempo necessário, a reação é aplicada em um capilar contendo gel de acrilamida e submetida a uma eletroforese. Cada ddNTP é ligado a um fluorocromo diferente, o qual é detectado pelo laser do sequenciador. Os dados são enviados a um computador acoplado ao sequenciador e analisados por um programa específico.

Fonte: Adaptado de Rossetti, Silva e Rodrigues (2006).



O sequenciamento foi conduzido nas amostras que amplificaram para os genes VP6, VP7, VP4 e NSP4 segundo o protocolo descrito pelo fabricante do kit Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA), utilizando-se uma mistura da reação conforme o QUADRO 6.

QUADRO 6- Reagentes utilizados na reação de sequenciamento nas amostras com positividade para os genes VP6, VP7, VP4 e NSP4.

| Reação de sequenciamento              | Concentração<br>1X/ $\mu$ l | Volume/reação                                      |
|---------------------------------------|-----------------------------|--|
| Tampão de sequenciamento 5X           | -                           | 1 $\mu$ L  |
| Big Dye Terminator v.3.1              | 25mM                        | 2 $\mu$ L  |
| Iniciador* 4pmol                      | 2 $\mu$ M                   | 2 $\mu$ L  |
| DNA purificado                        | -                           | Depende da concentração<br>(máximo 5 $\mu$ l)      |
| H <sub>2</sub> O livre de RNase/DNase | -                           | Depende da quantidade<br>de DNA (máximo 3 $\mu$ l) |
| <b>Total</b>                          |                             | <b>10<math>\mu</math>L</b>                         |

\*Iniciadores utilizados de acordo com o quadro 1

Fonte: Elaborado pela autora (2013).

A mistura da reação foi adicionada à cada orifício da placa, juntamente com o DNA purificado e posteriormente, a placa foi selada com a septa e colocada no temociclador nas seguintes condições: 25 ciclos de 96°C por 30 segundos (desnaturação), 50°C por 15 segundos (hibridização) e 60°C por 3 minutos (extensão).

#### 5.4.6.4. Purificação do produto do sequenciamento

O produto dessa reação foi purificado por precipitação com isopropanol e etanol, com a finalidade de retirar o excesso de “terminadores” não incorporados na reação de sequenciamento. Esta reação foi realizada conforme procedimento descrito a seguir.

Primeiramente, adicionou-se 40 $\mu$ l do isopropanol 70% em cada produto da reação, agitando posteriormente em vórtex por 3 a 5 segundos. Selou-se a placa

com papel adesivo e incubou-se à TA por 15 minutos, deixando a placa dentro da centrífuga e em seguida, centrifugou-se por 45 minutos a 4.000 Xg.

Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante por inversão da placa. Em seguida, adicionou-se 200µl de etanol a 70% em cada orifício e centrifugou-se a placa por 10 minutos a 4.000 Xg, retirando o sobrenadante novamente por inversão da placa. Todavia, desta vez, manteve-se a placa invertida para, então, realizar uma centrifugação rápida na mesma sobre um papel absorvente (~1000Xg/30seg). Secou-se a placa em termociclador a 60°C por 4 minutos com a tampa aberta para, posteriormente, suspender o sedimento.

#### 5.4.6.5. Eletroforese em sequenciador automático

Para a realização da eletroforese as amostras foram ressuspensas em 10µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems®, England), desnaturadas a 95°C por 5 minutos, em termociclador e colocadas em banho de gelo a 0 °C por 3 minutos, e posterior centrifugação 1000Xg/30seg. Em seguida, a placa foi conduzida ao sequenciador automático ABI PRISM 3130 XL DNA Sequencer (Applied Biosystems®, Foster City, USA), mediante a utilização de marcadores com partículas fluorescentes que ao contato com raios laser, emitem fluorescência em distintos comprimentos de onda, correspondendo a cada nucleotídeo na extremidade 3' (SANGER et al., 1977).

#### 5.4.6.6. Dendrograma de similaridade

As sequências obtidas para os genes VP6, VP7, VP4 e NSP4 foram alinhadas e editadas utilizando o programa BioEdit Sequence alignment Editor (Version 0.7.9.1). Em seguida, as sequências foram comparadas com as de outros vírus isolados e disponíveis no banco de genes (*Genbank- National Center for Biotechnology Information, US-* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]), utilizando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Os dendrogramas foram construídos empregando-se o programa MEGA v. 5 (TAMURA et al., 2011), com distância genética calculada pelo modelo Kimura- 2 parâmetros, utilizando-se o algoritmo de *Neighbor-Joining*, empregando o teste de

confiabilidade não paramétrico de 2000 pseudorréplicas (KIMURA, 1980; FELSENSTEIN, 1985).

As sequências obtidas das amostras selecionadas foram avaliadas quanto a presença de substituições nucleotídicas e aminoacídicas a fim de verificar a possível presença de polimorfismo nas amostras analisadas.

#### **5.4.7. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no programas BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2008). Os dados obtidos nos testes juntamente com as informações obtidas nas fichas clínicas foram organizados e adicionados a Planilha da Microsoft Office Excel 2010. O universo amostral foi calculado utilizando a calculadora on-line para cálculos amostrais (SANTOS, 2010).

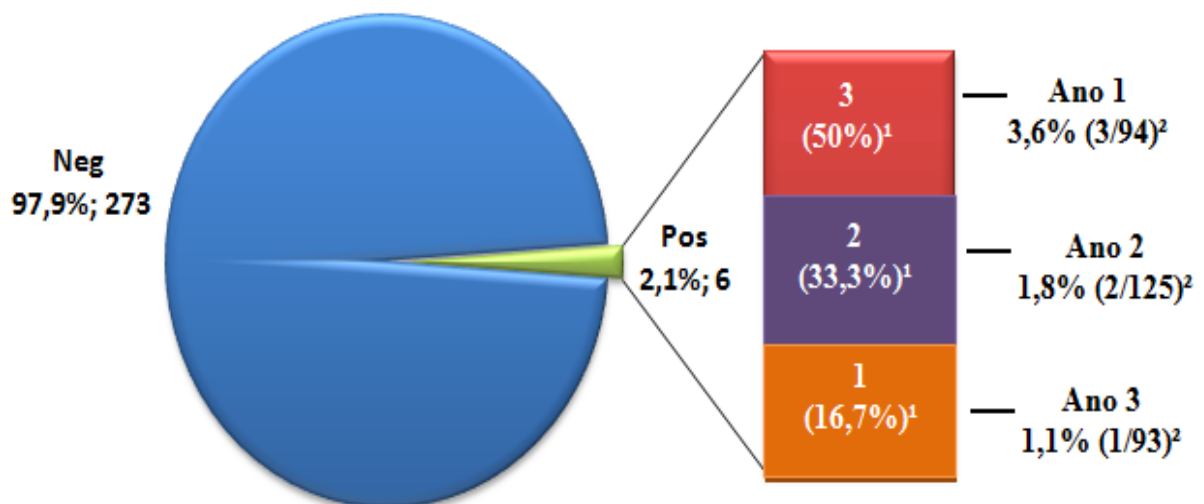
O qui-quadrado partição foi utilizado para avaliar a significância estatística entre as faixas etárias das crianças infectadas. Foi empregado o teste exato de Fisher para correlacionar a infecção pelo patógeno com o gênero das crianças. O teste de regressão logística simples foi realizado a fim de analisar os sinais e sintomas das crianças acometidas pelo RVC. Em todos os testes executados no estudo, as diferenças estatisticamente significativas foram expressas por valores de  $p \leq 0,05$ . Os gráficos apresentados neste estudo foram produzidos no programa Microsoft Office Excel 2010.

## 6. RESULTADO

### 6.1. DETECÇÃO DE RVC

A positividade encontrada para RVC por EGPA foi de 2,1% (6/279). Vale ressaltar que 33 amostras relacionadas para o estudo não tinham material suficiente para análise e por isso foram excluídas. Os resultados obtidos por esta técnica estão detalhados no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1- Detecção do RVC por EGPA em 279 espécimes fecais coletados de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda em Belém, Pará, no período de maio de 2008 a abril de 2011.



<sup>1</sup> percentual de positividade calculado em relação ao total de amostras positivas do estudo.

<sup>2</sup> percentual de positividade calculado em relação ao total de amostras positivas obtidas por ano.

Fonte: Elaborado pela autora (2014).

## 6.2. GENOTIPAGEM E SEQUENCIAMENTO

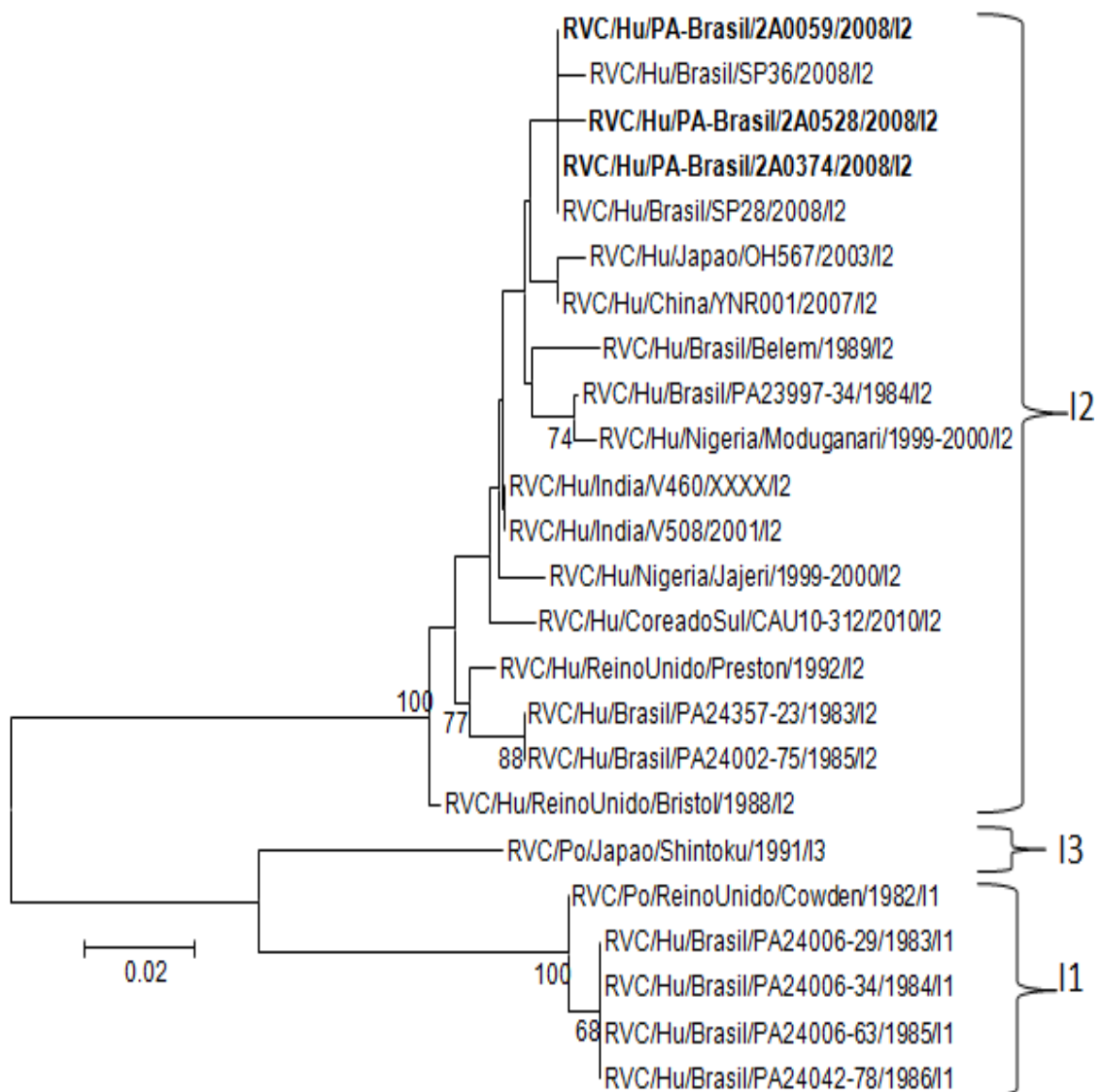
A RT-PCR demonstrou positividade em seis amostras (6/279–2,1%) com três delas submetidas ao sequenciamento automático, em razão do restante apresentar amplificação muito fraca e ficar impossibilitado para análise. As amostras sequenciadas foram classificadas nos genótipos I2, G4, P[2] e E2 para os genes VP6, VP7, VP4 e NSP4, respectivamente, e nas análises aminoacídicas foram utilizadas as regiões codificantes de cada gene.

O sequenciamento de nucleotídeos para o gene VP6 demonstrou agrupamento no genótipo humano I2 circulante no período de 2008 com similaridade entre as mesmas de 99,5 a 100% para nucleotídeos (nt) e de 98,4 a 100% para aminoácidos (aa). Tais amostras ficaram agrupadas no mesmo braço com outras do Japão (OH567), China (YNR001) e Índia (V508 e V460) com similaridades de nt  $\geq$  98% e de aa  $\geq$  98,4%.

Foram também observadas similaridade de nt de 99 a 100% e aa de 100% para amostras de RVC que circularam no Brasil nos anos de 2008 como SP28 e SP36. Já em Belém, Brasil, circularam as seguintes cepas: Belém, PA23997-34, PA24002-75 e PA24357-23 com similaridades de nt  $\geq$  96,5% e aa  $\geq$  93,5%. Esses dados estão apresentados no dendrograma de classificação genética do gene VP6 das amostras positivas observado na FIGURA 15.

As amostras do presente estudo com genótipo I2 não apresentaram substituições aminoacídicas na região codificante.

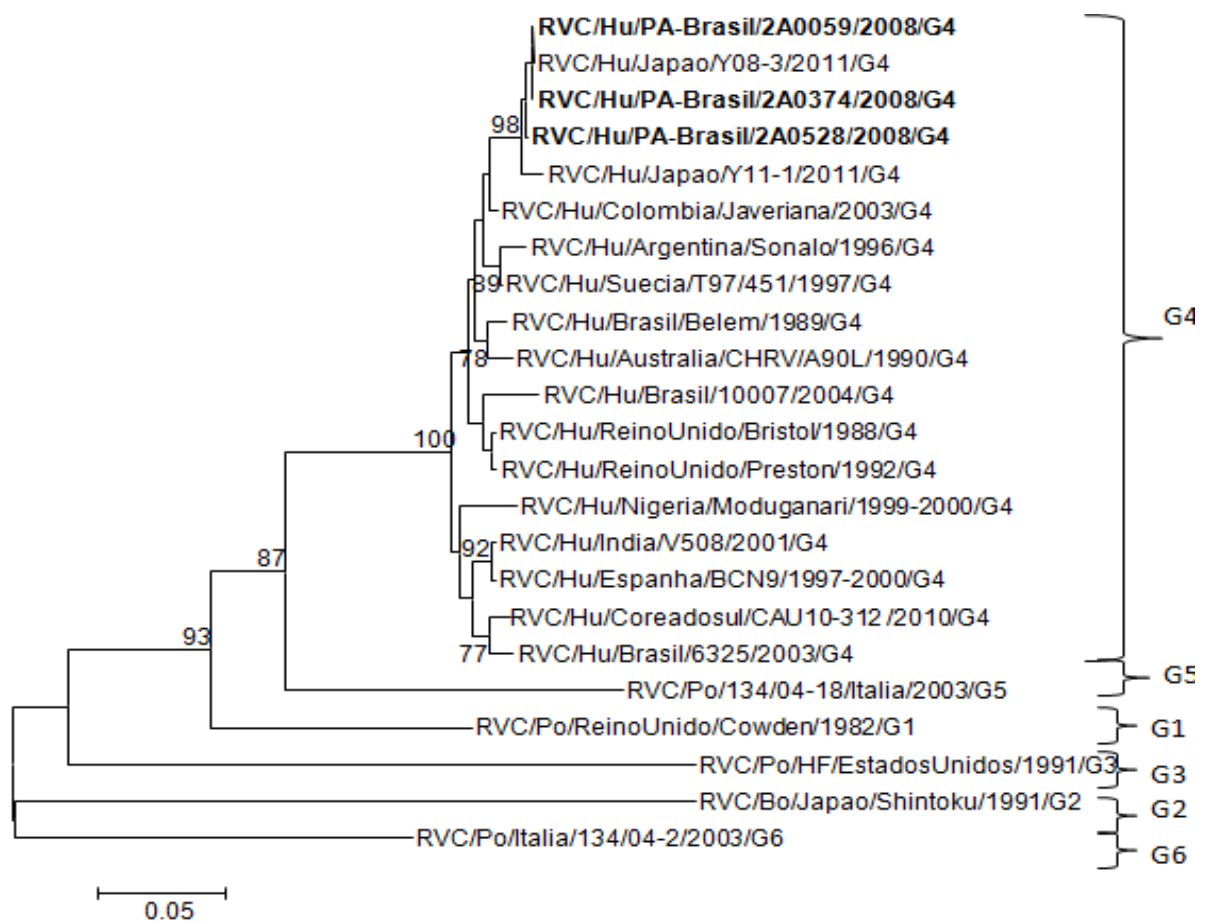
FIGURA 15: Dendrograma demonstrando a classificação genética do gene VP6 das amostras positivas para RVC em fezes de crianças hospitalizadas com gastroenterite entre maio/2008 a abril/2011 em Belém-PA. As representações das amostras desse estudo estão organizadas da seguinte forma: Vírus (RVC)/origem do hospedeiro (Hu)/país de coleta (Brasil)/código da amostra/anos de coleta/genótipo.



Fonte: Elaborado pela autora (2014).

Para o gene VP7, as mesmas agruparam-se no genótipo humano G4 circulantes no período de 2008, com similaridade, entre as mesmas de 99,7 a 100% para nt e de 100% para aa. Agruparam-se no mesmo braço das amostras do Japão (Y08-3) e Colombia (Javeriana) com similaridades de nt  $\geq$  99,7% e de aa de 100%. Apresentaram, também, similaridade de nt  $\geq$  94,2% e aa  $\geq$  93,5% nas cepas do Brasil, Belém, 6325 e 10007 circulantes nos anos de 1989, 2003 e 2004, respectivamente (FIGURA 16).

FIGURA 16: Dendrograma demonstrando a classificação genética do gene VP7 das amostras positivas para RVC em fezes de crianças hospitalizadas com gastroenterite entre maio/2008 a abril/2011 em Belém-PA. As representações das amostras desse estudo estão organizadas da seguinte forma: Vírus (RVC)/origem do hospedeiro (Hu)/país de coleta (Brasil)/código da amostra/anos de coleta/genótipo.



Fonte: Elaborado pela autora (2014).



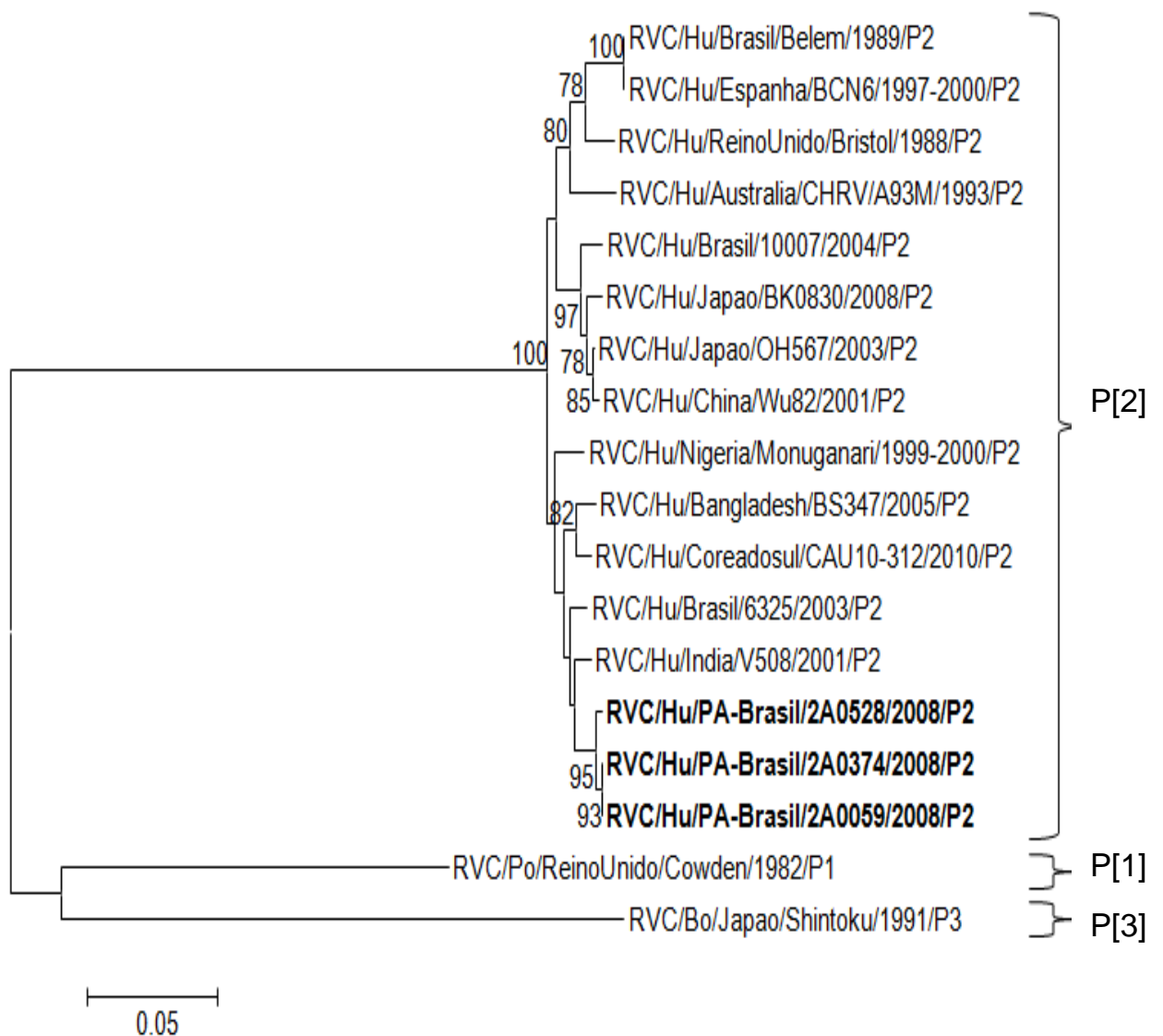


Já para o gene VP4, as amostras agruparam no genótipo humano P[2] circulantes no período de 2008, com similaridade, entre as mesmas de 99,6 a 100% para nt e 100% para aa.

Essas amostras agruparam no mesmo braço com amostras da Índia (V508) e Bangladesh (BS347) com similaridades de nt  $\geq$  97,4% e de aa  $\geq$  98%. As cepas que circularam no Brasil (6325, 1007 e Belém) nos anos de 2003, 2004 e 1989, respectivamente, e apresentaram similaridades de nt  $\geq$  94,9% e aa  $\geq$  97,4% (FIGURA 18).

As amostras do estudo apresentaram 12 substituições aminoacídicas quando comparadas com o protótipo Bristol, sendo elas: posições 31 (V→I); 55 (I→T); 124 (T→A); 129 (N→D), 132 (N→T); 139 (D→V); 181 (R→K); 224 (S→N); 238 (A→V); 241 (V→I); 243 (M→I), 252 (N→I). Destacam-se os resíduos das posições 55 e 243 por apresentarem-se apenas nas amostras circulantes na região Amazônica brasileira. As substituições de aa ocorridas nesse gene nas amostras do presente estudo estão destacadas na FIGURA 19.

FIGURA 18: Dendrograma demonstrando a classificação genética do gene VP4 das amostras positivas para RVC em fezes de crianças hospitalizadas com gastroenterite entre maio/2008 a abril/2011 em Belém-PA. As representações das amostras desse estudo estão organizadas da seguinte forma: Vírus (RVC)/origem do hospedeiro (Hu)/país de coleta (Brasil)/código da amostra/anos de coleta/genótipo.

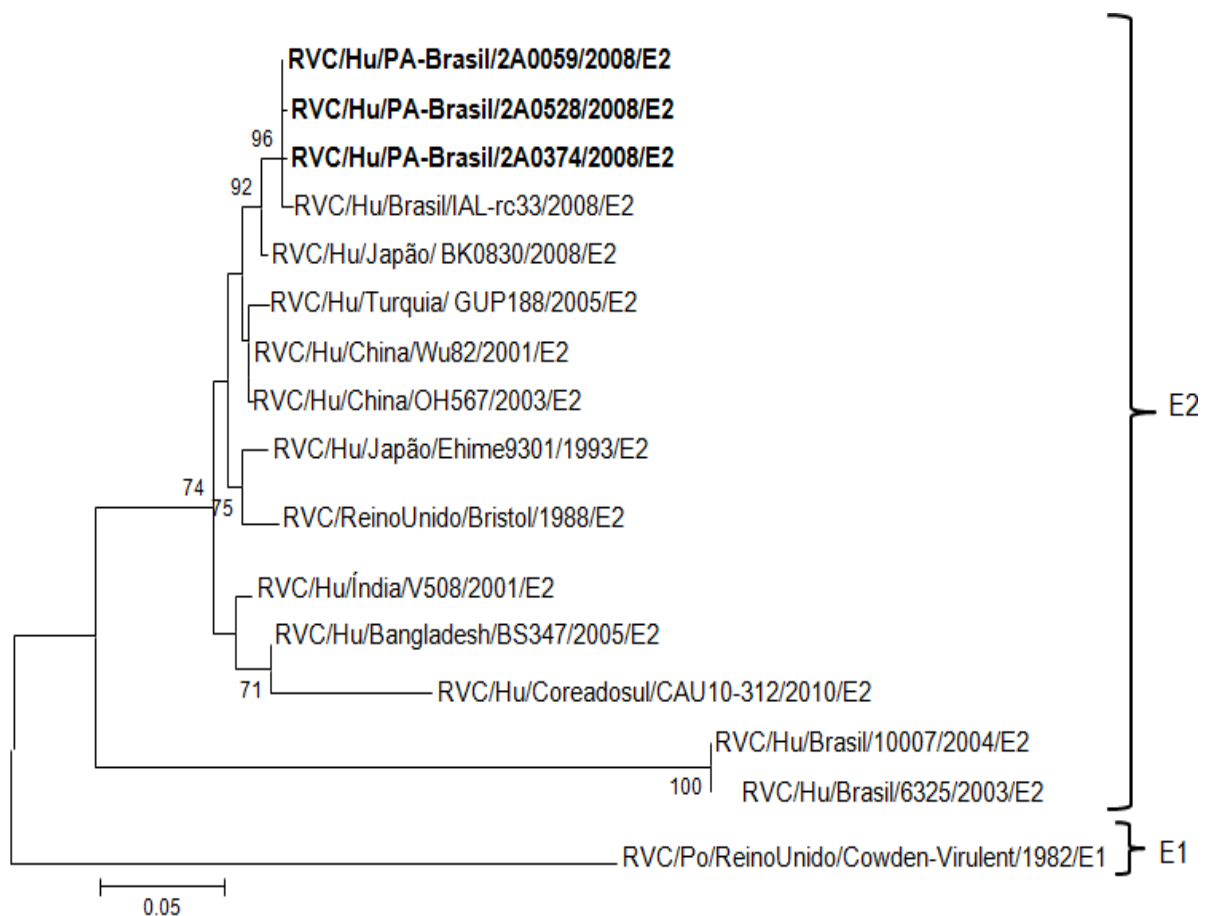


Fonte: Elaborado pela autora (2014).



Para o gene NSP4, as amostras do presente estudo agruparam no genótipo humano E2 circulantes no período de 2008, com similaridade, entre as mesmas de 99,6 a 99,8% para nt e 99,3 a 100% para aa. Agruparam-se no mesmo braço da amostra do Brasil (IAL-rc33), do Japão (BK0830) e China (Wu82 e OH567) com similaridades de nt  $\geq 97,7\%$  e de aa  $\geq 97,3\%$ . As demais cepas do Brasil (10007 e 6325) tiveram pouca similaridade com as amostras do estudo apresentando nt  $\geq 67,5\%$  e aa  $\geq 93,8\%$  (FIGURA 20).

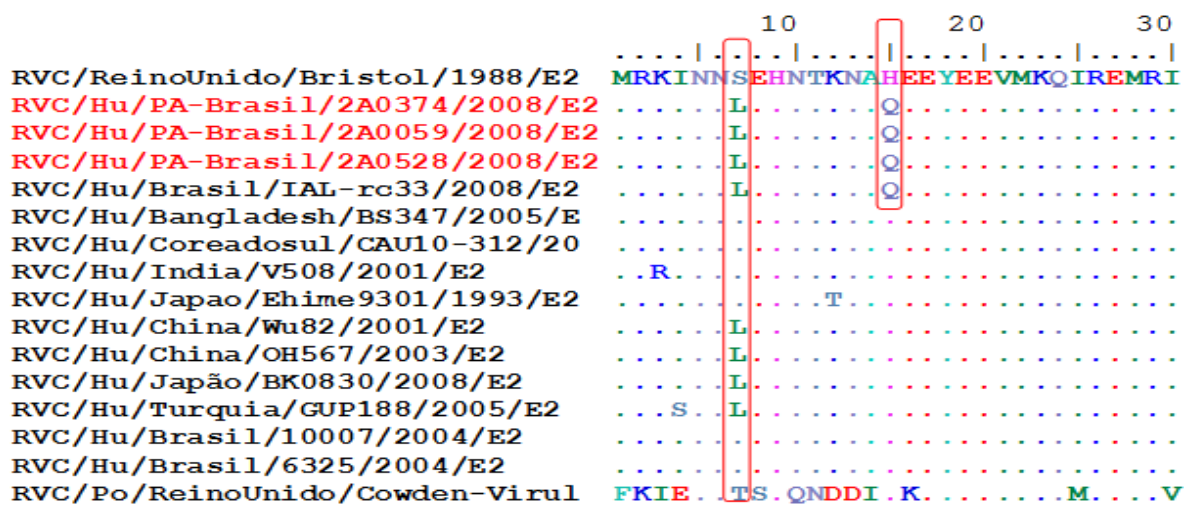
FIGURA 20: Dendrograma demonstrando a classificação genética do gene NSP4 das amostras positivas para RVC em fezes de crianças hospitalizadas com gastroenterite entre maio/2008 a abril/2011 em Belém-PA. As representações das amostras desse estudo estão organizadas da seguinte forma: Vírus (RVC)/origem do hospedeiro (Hu)/país de coleta (Brasil)/código da amostra/anos de coleta/genótipo.



Fonte: Elaborado pela autora (2014).

As amostras sob análise para o gene NSP4 apresentaram duas substituições aminoacídicas quando comparadas com o protótipo Bristol, sendo elas: posições 7 (S→L) e 15 (H→Q), este último foi observado apenas nas amostras do Brasil formando um grupamento regional, o qual é observado na sequência de aa em destaque na FIGURA 21.

FIGURA 21: Sequências aminoacídicas do gene NSP4 das amostras do presente estudo, protótipo, amostras do Brasil e do mundo. Os retângulos



vermelhos indicam as substituições dos aa identificadas. Siglas dos aa encontram-se no anexo B.

Fonte: Elaborado pela autora (2014).

### 6.3. ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

A frequência do RVC foi maior entre crianças com idades de 24 a 36 meses (5,7%- 3/53). As crianças menores de dois anos apresentaram correlação positiva com a infecção por RVC demonstrado pelo teste de qui-quadrado partição com  $p$  ( $p=0,0493$ ) estatisticamente significativa (TABELA 1).

TABELA 1- Frequência de positividade para RVC por RT-PCR de acordo com a faixa etária em crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda entre maio de 2008 a abril de 2011 na clínica Pediátrica do Pará

| <b>Idade em meses</b>  | <b>Positivos</b> | <b>Negativos</b> | <b>Porcentagem</b> |
|------------------------|------------------|------------------|--------------------|
| <b>0 + 6</b>           | 0                | 18               | 0%                 |
| <b>6 + 12</b>          | 0                | 66               | 0%                 |
| <b>12 + 24</b>         | 2                | 110              | 1,8%               |
| <b>24 ≥ 36</b>         | 4                | 77               | 5,2%               |
| <b>* Não informado</b> | 0                | 2                | 0%                 |
| <b>Total</b>           | 6                | 273              | 2,1%               |

\*pacientes sem informação nas suas fichas clínicas a respeito da data de seu nascimento.

Fonte: Elaborado pela autora (2014).

O teste exato de Fisher revelou que o gênero dos pacientes hospitalizados não teve relação com a infecção por RVC, demonstrado pelo valor de  $p$  estatisticamente não significativo ( $p=0,2167$ ). Porém, o gênero masculino se apresentou em maior frequência nos pacientes positivos para RVC com 83,3% (5/6) e também entre as amostras testadas com 3,5% (5/144) como observado na TABELA 2.

TABELA 2- Frequência de RVC por RT-PCR e por gênero em crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda entre maio de 2008 a abril de 2011 na clínica Pediátrica do Pará

| <b>Gênero</b>    | <b>Pos/Total pos<br/>n=6</b> | <b>Frequência<br/>por gênero<br/>dos pos<br/>(%)</b> | <b>Pos/ total<br/>testado por<br/>gênero<br/>N= 276</b> | <b>Frequência<br/>por gênero<br/>do total<br/>testado<br/>(%)</b> |
|------------------|------------------------------|--|---|---|
| <b>Feminino</b>  | 1/6                          | 16,7%  | 1/135   | 0,7%  |
| <b>Masculino</b> | 5/6                          | 83,3%  | 5/144   | 3,5%  |

Fonte: Elaborado pela autora (2014).

Os sinais e/ou sintomas clínicos das crianças menores de três anos com RVC foi avaliado pelo teste de regressão logística simples, que apresentou os valores de  $p$  estatisticamente não significativos (TABELA 3).

TABELA 3- Principais sinais e/ou sintomas apresentados pelas crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda entre maio de 2008 a abril de 2011 na clínica Pediátrica do Pará

| Sinais e sintomas | Frequência      |                 | p valor   |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------|
|                   | Casos positivos | Casos Negativos |           |
| Vômito            | 83,3% (5/6)     | 89,1% (181/203) | p=0, 6812 |
| Febre             | 80% (4/5)       | 94% (219/233)   | p=0, 2379 |
| Diurese diminuída | 100% (1/1)      | 97,4% (38/39)   | p=0, 9633 |
| Desidratação      | 100% (3/3)      | 98,9% (89/90)   | p=0, 9434 |
| Recusa alimentar  | 0               | 100% (59/59)    | *NE       |
| Palidez           | 100% (2/2)      | 100% (82/82)    | *NE       |
| Astenia           | 0               | 100% (34/34)    | *NE       |
| Náuseas           | 100% (1/1)      | 100% (35/35)    | *NE       |

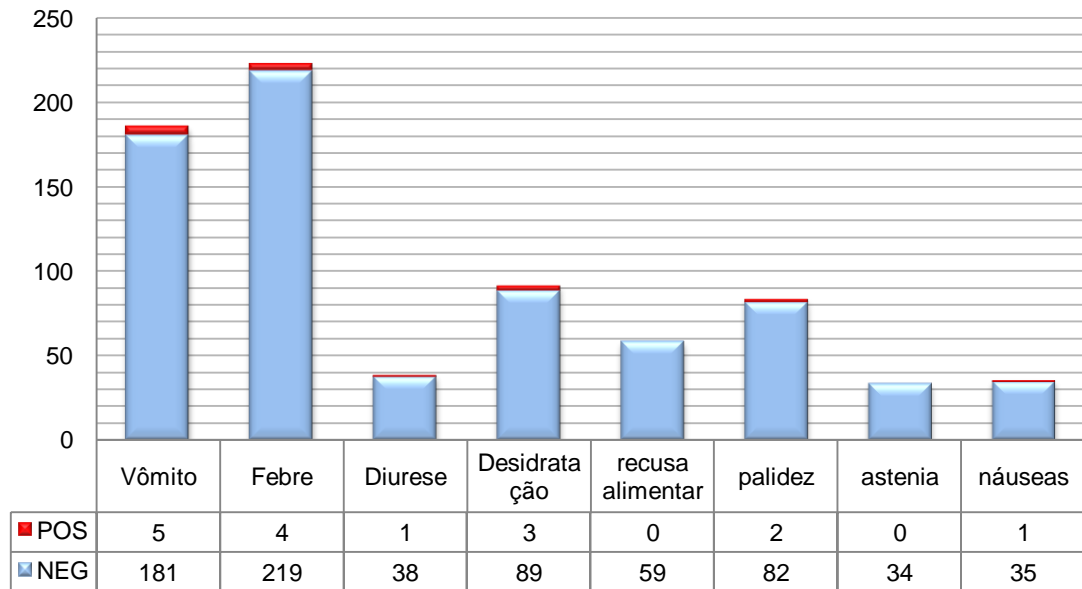
\*NE – O teste não foi realizado devido todos os pacientes apresentarem os sinais e/ou sintomas em questão.

Fonte: Elaborado pela autora (2014).

Os principais sinais e sintomas apresentados pelos seis pacientes positivos para RVC foram vômito, febre, diurese diminuída, náuseas, desidratação e palidez (GRÁFICO 2). A diarreia variou de três a sete dias com três a quatro evacuações ao dia. Nos dados clínicos desses pacientes não há registro de vacinação prévia para RVA nem alimentação por leite materno.



GRÁFICO 2- Principais sinais e/ou sintomas apresentados por crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda na clínica Pediátrica do Pará, no período de maio de 2008 a abril de 2011.



Fonte: Elaborado pela autora (2014).

Não foi possível observar um padrão de sazonalidade para RVC no presente estudo em razão de ter se detectado apenas seis casos como detalhado no QUADRO 7.

QUADRO 7- Dados dos espécimes clínicos positivos para RVC coletados na clínica Pediátrica do Pará no período de 2008 a 2011.

| <b>Espécimes</b> | <b>Mês de coleta</b> | <b>Ano de coleta</b> |
|------------------|----------------------|----------------------|
| 2A0059           | Maio                 | 2008                 |
| 2A0374           | Agosto               | 2008                 |
| 2A0528           | Setembro             | 2008                 |
| 2A1508           | Maio                 | 2009                 |
| 2A2986           | Abril                | 2009                 |
| 2A4134           | Abril                | 2010                 |

Fonte: Elaborado pela autora (2014).

Os fatores climáticos, também, não foram definidos, visto que as seis amostras positivas para RVC ocorreram em meses distintos em um clima constantemente quente e úmido, portanto, não sendo possível se estabelecer uma relação com a infecção por RVC.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. DETECÇÃO DE RVC

Estudos realizados em vários países confirmaram que os RVC não são tão incomuns em humanos como se pensava. No caso de vigilâncias intensivas de GA, o RVC foi encontrado em países como Japão (KUZUYA et al., 1998; PHAN et al., 2004), Suécia (NILSSON et al., 2000), Brasil (GABBAY et al., 1999; 2008), Espanha (SANCHEZ-FAUQUIER et al., 2003), Estados Unidos (JIANG et al., 1995; ESONA et al., 2008), Itália (MEDICI et al., 2009), Turquia (MITUI et al., 2009) e Argentina (CASTELLO et al., 2009) variando de 0,6% a 35% dos casos.

Estudos conduzidos em São Paulo e Goiás nos anos de 2007 e 2008 mostraram que o RVC foi encontrado em prevalência de 0,8% e de 0,4% em 2011 (LUCHE et al., 2009; 2011). Em Belém, Pará, GABBAY et al. (2008) detectaram infecção por RVC em crianças de 0-3 anos, resultando em 13% dos casos diarreicos. Mais recentemente, Kaiano et al. (2010), analisaram espécimes fecais de crianças sintomáticas ou não para GA, residentes em uma comunidade remanescente de quilombos em Ananindeua, Pará e registraram o primeiro caso de RVC em uma criança com diarreia vivendo em uma comunidade semi isolada, representando 2,3% dos casos.

Nos casos de surtos, o RVC foi detectado em 1,2% de creches e escolas do Japão (KUMAZAKI E USUKU, 2013). No Brasil, um estudo realizado por Souza et al. (1998) demonstrou positividade para RVC de 6,5% em um surto de GA em São Paulo no ano de 1993.

Com relação a crianças hospitalizadas por GA, o presente estudo demonstrou que os RVC circularam em 2,1% das crianças, resultado similar aos 3% detectados nos Estados Unidos com cepas humanas do RVC entre crianças hospitalizadas (JIANG et al., 1995). Foi registrado também em ambiente hospitalar na Coreia do sul com o RVC sendo detectado em 0,7% das crianças (MOON et al., 2011).

Vale ressaltar que a vigilância intensiva para GA foi realizada para o RVA o qual foi detectado em 21,6% (628/2904) das amostras, seguido pela detecção de NoV 35,4% (171/483) nas amostras negativas para RVA (SIQUEIRA et al., 2013). Para a pesquisa de RVC, os dados do presente estudo demonstram que o vírus circulou em 2,1% da população infantil hospitalizada na clínica Pediátrica do Pará

que também se mostrou negativa para RVA e/ou NoV. Desta forma, a ampliação dos métodos de detecção e vigilância de patógenos ainda desconhecidos favorecerão a elucidação diagnóstica e o controle de patógenos emergentes em crianças hospitalizadas com GA, principalmente na região Amazônica do Brasil.

## 7.2. ANÁLISES MOLECULARES

O sequenciamento parcial de nucleotídeos foi analisado conjuntamente com cepas de origens suínas e bovinas e demonstrou que as amostras do presente estudo agruparam nos genótipos de RVC humano I2, G4, P[2] e E2 para os genes VP6, VP7, VP4 e NSP4, respectivamente. Tal achado se mostrou similar aos genótipos encontrados por Kumazaki e Usuku (2013) ao sequenciarem esses quatro genes humanos em espécimes clínicos coletadas de surtos de gastroenterite aguda ocorrido no Japão no período de 2006 a 2012.

### 7.2.1. Gene VP6

As amostras da região metropolitana de Belém, Pará analisadas para o gene VP6 apresentaram maior similaridade (nt  $\geq$  98% e aa  $\geq$  98,4%) com as amostras do Brasil (SP28 e SP36), Japão (OH567), China (YNR001), Índia (V508 e V460) e menor similaridade (nt  $\geq$  96,5% e aa  $\geq$  93,5%) com as amostras humanas de Belém, Brasil (Belém, PA-23997-34, PA-24002-75 e PA-24357-23) que circularam no período de 1983 a 1989. Estudos conduzidos no Japão, China, Índia, Brasil, Argentina, Coréia do Sul, entre outros, apresentaram agrupamento das amostras no genótipo I2 de origem humana semelhante ao presente estudo (GABBAY et al., 2008; CASTELLO et al., 2000; LUCHS et al., 2011; YAMAMOTO et al., 2011; KUMAZAKI E USUKU, 2013; BAEK et al., 2013).

O genótipo I2 detectado por Luchs et al. (2011) em São Paulo, Brasil, em espécimes clínicos oriundos de um surto de diarreia em crianças ocorrido nos anos de 2007 e 2008 (SP28 e SP36), apresentou similaridade de nt  $\geq$  99% e aa  $\geq$  100% com as amostras do presente estudo. Tal fato, também foi observado por Yamamoto et al. (2013) em espécimes clínicos de crianças entre dois meses a nove anos com diarreia que tiveram atendimento ambulatorial.

As amostras do presente estudo demonstraram ser de origem humana apresentando pouca similaridade ( $nt \geq 78,8\%$  e  $aa \geq 77,3\%$ ) com as amostras do genótipo I1 de origem suína relatado por Gabbay et al. (2008) durante surto ocorrido em crianças com diarreia, em Belém, Pará que relacionaram o gene VP6 de 6,5% das amostras estritamente relacionada a seres humanos (13% crianças diarreicas e 3,7% não diarreicas), além de 4% das amostras relacionados a VP6 de suínos, destacando-se desta forma a possível transmissão zoonótica do RVC.

As amostras do genótipo I2 do presente estudo não apresentaram modificações aminoacídicas, corroborada por estudos previamente relatados de que o gene VP6 tem um alto grau de conservação (KUMAZAKI E USUKU, 2013; BAEK et al., 2013).

### **7.2.2. Gene VP7**

As amostras dos pacientes pediátricos de Belém, Pará analisadas para o gene VP7 apresentaram similaridade ( $nt \geq 94,6\%$  e  $aa \geq 95,7\%$ ) com as amostras do Japão (Y08-3 e Y11-1), Colômbia (Javeriana) e Brasil (Belém, 10007 e 6325), apresentando-se todas no agrupamento do genótipo G4 de RVC humano, de acordo com a descrição de Martella et al. (2007).

Em estudo conduzido por Kumazaki e Usuku (2013), a amostra do Japão, Y08-3, apresentou similaridade de  $nt$  e  $aa$  de 100% com as amostras do estudo, demonstrando a semelhança de cepas circulantes entre 2006 a 2012 com as que circularam na região metropolitana de Belém em 2008 a 2011.

O genótipo G4 identificado por Araújo et al. (2011), no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, Brasil, oriundos de espécimes clínicos de crianças com diarreia ocorridos nos anos de 2003 e 2004, apresentaram baixa similaridade de  $nt$  e  $aa$  ( $nt \geq 94,2\%$  e  $aa \geq 93,5\%$ ) com as amostras do presente estudo, observado a formação de dois grupos na árvore evolutiva, o que possivelmente pode ter ocorrido devido a circulação simultânea de duas linhagens de RVC no Brasil.

As amostras do presente estudo apresentaram modificações de  $aa$  nos resíduos 37, 49, 53, 169, 215 e 259. O resíduo 215 apresentou modificação exclusiva da amostra 2A0059 oriunda da região metropolitana de Belém circulante no ano de 2008. Modificações aminoacídicas também ocorreram nas amostras Asiáticas (Y08-3 e Y11-1), porém em sítios distintos das amostras do presente

estudo (KUMAZAKI E USUKU, 2013). Comparações a respeito de modificações aminoacídicas da proteína VP7 do RVC ainda são muito escassas na literatura, requerendo futuras pesquisas em relação a essas modificações.

### 7.2.3. Gene VP4

Na análise do gene VP4, foi observado que as amostras estudadas possuem similaridade (nt  $\geq$  97,4% e aa  $\geq$  98%) com amostras da Índia (V508), Bangladesh (BS347), e, também do Brasil (6325, 10007 e Belém) (nt  $\geq$  94,9% e aa  $\geq$  97,4%), no qual todas agruparam no genótipo P[2] de humano como descrito por Jiang et al. (1999).

Araújo et al. (2011) observaram que as cepas com mesmo genótipo P[2], amostras 6325 e 10007, apresentaram uma distância significativa na árvore filogenética formando dois agrupamentos. Este fato pode ser observado em relação às amostras do presente estudo, no qual a divergência com a amostra do Rio Grande do Sul (10007) é maior do que com amostras do Rio de Janeiro (6325) demonstrando agrupamentos distintos assim como, ocorrido para o gene VP7.

A amostra de Belém circulante no ano de 1989, apresentou similaridade significativa (nt  $\geq$  94,9% e aa  $\geq$  97,4%) com as amostras do presente estudo. Por se tratar de uma proteína de superfície, é possível que as modificações genéticas ou mutações ocorridas ao longo do tempo surgiram de uma possível evolução em relação ao hospedeiro. Tal ideia é reforçada pelo fato da cepa de Belém ter sido obtida de uma criança assintomática em um estudo longitudinal de RV ocorrido na periferia de Belém (GABBAY et al., 1989), enquanto que as crianças do presente estudo apresentaram uma diarreia grave necessitando de hospitalização.

Na análise aminoacídica do gene em questão, pode-se observar um elevado número de resíduos de aa modificados (31, 55, 124, 129, 132, 139, 181, 224, 238, 241, 243 e 252) como, também, descrito por Kumazaki e Usuku (2013) que demonstraram que nas nove cepas estudadas houve alteração de aa nos resíduos (55, 121, 124, 129, 139, 167, 181, 186, 192, 199, 217, e 224) semelhante ao encontrado no presente estudo. Sugere-se que essas sequências podem ter alterado para escapar do sistema imune do hospedeiro, já que a proteína VP4 é clivada pela tripsina em dois polipeptídeos designados de VP8\* e VP5\*, no qual o VP8\* é responsável pela fixação inicial da partícula viral à célula alvo, tornando-se

um alvo importante dos anticorpos neutralizantes dirigida contra o RV (ESTES E KAPIKIAN, 2007; MONNIER et al., 2006; KUMAZAKI E USUKU, 2013).

#### **7.2.4. Gene NSP4**

Os espécimes clínicos, circulantes nos anos de 2008 a 2011, foram também analisados para o gene NSP4. Esta glicoproteína ainda é pouco estudada nas infecções por RVC, porém ela tem um papel importante na morfogênese, modula o cálcio intracelular e é uma enterotoxina viral com capacidade de induzir diarreia de natureza secretora (ESTES E KAPIKIAN, 2007; CHANG et al., 1999b).

As cepas do Brasil (IAL-rc33), Japão (BK0830) e China (Wu82 e OH567) apresentaram similaridades (nt  $\geq 97,7\%$  e aa  $\geq 97,3\%$ ) com as amostras do presente estudo. Já as demais cepas do Brasil (10007 e 6325) tiveram baixa similaridade de nt ( $\geq 67,5\%$ ) e alta similaridade de aa ( $\geq 93,8\%$ ) com as mesmas. Todas as cepas apresentaram o genótipo humano E2 similar ao encontrado por outros estudos (ARAÚJO et al., 2011; YAMAMOTO et al., 2011; KUMAZAKI E USUKU, 2013)

No presente estudo, houve apenas duas alterações aminoacídicas nos resíduos 7 e 15. Pode-se observar que a mudança de aa no resíduo 15 aconteceu apenas nas amostras que circularam em 2008 em Belém, sendo sugestivo de uma alteração regional.

O contrário foi relatado por Zhang et al. (1998) que encontraram várias diferenças de aa nas sequências de NSP4 utilizando cepas virulentas e atenuadas, porém de suínos, o qual foi demonstrado em modelo experimental em ratos que essas alterações causavam mudanças na patogênese da glicoproteína NSP4. Já Chang et al. (1999b) encontraram diferenças de aa da cepa Cowden de suíno, sugerindo que estas alterações apareceram de forma aleatória e acreditando-se que certas modificações possam afetar a conformação e/ou a atividade desta glicoproteína.

### 7.3. ASPÉCTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

As crianças com 24 a 36 meses foram as mais acometidas pela infecção por RVC. A semelhança de faixa etária foi observada em estudo conduzido em Belém (GABBAY et al., 2008) e na Argentina (CASTELLO et al., 2000), apresentando padrões semelhantes aos RVA que ocorrem em crianças menores de três anos (ESTES E GREENBERG, 2013). Entretanto, essa faixa etária não foi verificada por Luchs et al. (2011) que registraram uma média de 4,5 anos e Kumazaki e Usuku (2013) que verificaram uma média de 7,5 anos, sendo a maior prevalência desse vírus em crianças maiores de quatro anos e/ou em adultos (JIANG et al., 1995; GABBAY et al., 1999; NILSSON et al., 2000; ESONA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2011).

No presente estudo, o gênero masculino se apresentou em maior frequência nos pacientes positivos para RVC com 83,3% (5/6) e também entre as amostras testadas com 3,5% (5/144). Tal positividade no gênero masculino foi semelhante às observadas nos estudos realizados por Luchs et al. (2011) e por Kumazaki e Usuku (2013) que 75% e 54%, respectivamente, dos casos positivos por RVC ocorreram no gênero masculino, não sendo justificado a ocorrência de tal frequência.

Os pacientes pediátricos hospitalizados apresentaram em maior proporção os sinais/sintomas: vômito, febre e desidratação, mesmo que estatisticamente não significativo, considerando que a diarreia era critério de inclusão no grupo. Deste modo, foi demonstrada a tríade clássica das rotavirose (RVA e RVC) relatada na literatura (JIANG et al., 1995; GABBAY et al., 1999; 2008; SANCHEZ-FAUQUIER et al., 2003; LEE et al., 2011, ESTES E GREENBERG, 2013).

Relata-se ainda, que as crianças com RVC apresenta outros sinais e sintomas como dores abdominais, náuseas, palidez e dor de cabeça observado por Kumazaki e Usuku (2013). Estes dados podem não ter sido evidenciados devido à ausência de algumas informações nas fichas clínicas dos pacientes do presente estudo.

Observou-se a duração do tempo de diarreia de três a sete dias e o número de evacuações diárias de três a quatro vezes ao dia nos pacientes acometidos pela infecção por RVC, o qual ocorre em concordância com muitos autores (JIANG et al., 1995; GABBAY et al., 1999; 2008; SANCHEZ-FAUQUIER et al., 2003; LEE et al., 2011). De modo diferente do presente estudo, Nilsson et al. (2000) verificaram que



os pacientes hospitalizados apresentavam diarreia aquosa de 1 a 15 episódios por dia, com duração de 6 a 14 dias, e, também apresentando sintomas como vômito, febre e dor abdominal.

Ao se estabelecer uma comparação dos sinais e sintomas clínicos dos pacientes pediátricos infectados por RVC com os vírus RVA e NoV, verificou-se similaridades (ESTES E GREENBERG, 2013). Estudo realizado por Nilsson et al. (2000), constatou que os pacientes infectados por RVC apresentaram dor abdominal (75%), vômitos (75%), febre (38%) e diarreia com duração de 7 dias, sintomas semelhantes aos de pacientes com infecção por RVA. As crianças com NoV também manifesta sintomas como vômito, desidratação, dores abdominais e náuseas, com diarreia variando de 3 a 9 dias dependendo da gravidade e da população acometida (CDC, 2011; SIQUEIRA, 2012).

Não foi observado um padrão de sazonalidade na distribuição das infecções por este patógeno entre as amostras estudadas, o vírus foi detectado de forma esporádica ao longo dos três anos (2008-2011) de estudo, sem apresentar também, fatores climáticos envolvidos com as crianças acometidas por RVC.

Nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil, estudo conduzido por Souza et al. (1998) que constataram que as maiores taxas de positividade para esse vírus ocorreu nos meses de julho e agosto de 1993. Porém, em estudo conduzido por Nilsson et al. (2000) nos Estados Unidos, verificou sazonalidade no inverno, com incidência do RVC nos meses de novembro a março.

Com relação ao padrão sazonal apresentado pelos menores com RVC se comparado aos RVA e NoV para o mesmo período, mostra que o NoV, em países de clima tropical é observado ao longo do ano, como foi relatado por Siqueira et al. (2013) demonstrando que em Belém não havia um padrão definido, embora a infecção apresentasse picos, se comparado ao RVA, com estes dois vírus apresentando efeito “gangorra”, evidenciado pela taxa de NoV alta, concomitante com o RVA baixo e vice-versa. Contudo para o RVC, tal parâmetro não foi possível de se verificar devido à baixa positividade encontrada para tal vírus.

## 8. CONCLUSÃO

- O RVC acometeu crianças (2,1%) de 24 a 36 meses de idade levando a um quadro de gastroenterite grave, evidenciando a circulação desse vírus na população hospitalizada.
- Os genótipos circulantes foram I2, G4, P[2] e E2 para os genes VP6, VP7, VP4 e NSP4, respectivamente, concluindo que as cepas do presente estudo são estritamente relacionadas à origem humana.
- O gene VP6 apresentou similaridade ao protótipo Bristol e cepas do Brasil e da Ásia, concluindo-se a presença de um elevado grau de conservação aminoacídica.
- O gene VP7 apresentou alta similaridade nucleotídica em relação ao protótipo Bristol e cepas do Brasil, Colômbia e Japão e apresentou substituições aminoacídicas semelhantes a cepas do Japão, requerendo futuras pesquisas em relação a essas modificações.
- O gene VP4 apresentou similaridade ao protótipo Bristol e cepas do Brasil concluindo-se a presença de um elevado número de substituições aminoacídicas, sugerindo que alterações nas sequências ocorreram para que o vírus escape do sistema imune do hospedeiro.
- O gene NSP4 apresentou substituições aminoacídicas sugerindo-se que estas modificações possam afetar a conformação e/ou a atividade desta glicoproteína.
- Os sintomas e sinais clínicos encontrados no presente estudo foram semelhantes aos apresentados pelos RVA, concluindo que as crianças infectadas por RVC manifestaram a tríade clássica das rotavirose.
- Não foi possível observar a sazonalidade e nem um padrão climático definido nas amostras do presente estudo em razão do pequeno número amostral e a diversidade nos meses de detecção.

## 9. PERSPECTIVAS

Realizar a análise molecular completa do vírus, seqüenciando e demais genes (VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3, NSP5 e NSP6) das amostras já testadas, a fim de verificar se em algum dos onze genes ocorreu recombinação (*reassortment*).

Intensificar a vigilância epidemiológica do RVC com vistas a identificar de forma mais rápida e eficaz em eventuais surtos causados por este vírus.

## REFERÊNCIAS

ABID, I.; GUIX, S.; AOUNI, M.; PINTO, R.; BOSCH, A. Detection and characterization of human group C rotavirus in the pediatric population of Barcelona, Spain. **J. Clin. Virol.**, v. 38, p.78–82. 2007.

ADAH, M.I.; WADE, A.; OSETO, M.; KUZUYA, M.; TANIGUCHI, K. Detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6, and VP7 proteins. **J. Med. Virol.**, v. 66, p. 269–275. 2002.

ARAÚJO, I. T.; HEINEMANN, M. B.; FIALHO, A. M.; LEITE, J. P. G. Detection and Molecular Characterization of Human Group C Rotavirus in Brazil. **Intervirology**, v. 54, p. 261–267. 2011.

ARIAS, C.F.; ISA, P.; GUERRERO, C.A.; MÉNDEZ, E.; ZÁRATE, S.; LÓPEZ, T.; ESPINOSA, R.; ROMERO, P.; LÓPEZ, S. Molecular biology of rotavirus cell entry. **Arch Med Res.**, v. 33, p. 356-361. 2002.

ATTOUI, H.; MERTENS, P. P. C.; BECNEL, J.; BELAGANAHALLI, S.; BERGOIN, M.; BRUSSAARD, C. P.; et al. Reoviridae. In: King, A.; Adams, M.; Carstens, E.; Lefkowitz, E. (eds.). **Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. p. 497-650. 2012.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat 5: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. 5.ed. Belém: Instituto de Desenvolvimento sustentável Mamirauá - IDSM/MCT/CNPq, p. 364. 2008.

BALL, J. M.; TIAN, P.; ZENG, C. Q. Y.; MORRIS, A.P.; ESTES, M. K. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 101-104, 1996.

BALL, J.M.; MITCHELL, D. M.; GIBBONS, T. F.; PARR, R. D. Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin. **Viral Immunol**, v. 18, n. 1, p. 27-40, 2005.

BÁNYAI, K.; JIANG, B.; BOGDAN, A.; HORVATH, B.; JAKAB, F.; MELEG, E.; MARTELLA, V.; et al. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. **J. Clin. Virol.**, v. 37, p. 317–322. 2006.

BASS, D. M. Interferon gamma and interleukin 1, but not interferon alpha, inhibit rotavirus entry into human intestinal cell lines. **Gastroenterology**, v. 113, n. 1, p. 81-89, 1997.

BASS, D. Treatment of viral gastroenteritis. In: Desselberger, U.; Gray, J. (eds). **Viral Gastroenteritis**. Amsterdam: Elsevier, p. 93-104. 2003.

BAEK I. H.; THAN V. T.; KIM H.; LIM I.; KIM W. Full Genomic Characterization of a Group C Rotavirus Isolated From a Child in South Korea. **J. of Med.I Virology**, v.85, p. 1478–1484. 2013.

BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H.; et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, p. 1281-1283. 1973.

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

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purifications of nucleic acids. **J Clin Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BRIDGER, J. C.; CLARKE, I. N.; MCCRAE, M. A. Characterization of an antigenically distinct porcine rotavirus. **Infect. Immun.**, v. 35, p. 1058-1062. 1982.

BRIDGER, J. C.; PEDLEY, S.; MCCRAE, M. A. Group C rotaviruses in humans. **J. Clin. Microbiol**, v. 23, p. 760–763. 1986.

CASTELLO, A. A.; ARGUELLES, M. H.; VILLEGAS, G. A.; GHIRINGHELLI, D. P.; SEMORILE, L.; GLIKMANN, G. Characterization of human group C rotavirus in Argentina. **J. Med. Virol.**, v. 62, p. 199–207. 2000.

CASTELLO, A. A.; ARGUELLES, M. H.; VILLEGAS, G. A.; OLTHOFF, A.; GLIKMANN, G. Incidence and prevalence of human group C rotavirus infections in Argentina. **J. Med. Virol.**, v. 67, p. 106–112. 2002.

CASTELLO, A. A.; ARGUELLES, M. H.; ROTA, R.P.; HUMPHREY, C. D.; OLTHOFF, A.; GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I.; GLIKMANN, G.; JIANG, B. Detection and Characterization of Group C Rotavirus in Buenos Aires, Argentina, 1997–2003. *J. of Med. Virology*, v. 81, p. 1109-1116. 2009.

CDC. Update Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines. **MMWR**. n. 3, p.1-20. 2011.

CHANG, K. O.; NIELSEN, P. R.; WARD, L. A.; SAIF, L. J. Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine-like group C rotaviruses influences pathogenesis of the group C rotavirus. **J. Virol.**, v. 73, p. 9284–9293. 1999a.

CHANG, K. O.; KIM, Y. J.; SAIF, L. J. Comparisons of nucleotide and deduced amino acid sequences of nsp4 genes of virulent and attenuated pairs of group A and C rotaviruses. **Virus Genes**, v. 18, n. 3, p. 229-233, 1999b.

CHEN, D.; LUONGO, C. L.; NIBERT, M. L.; PATTON, J. T. Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. **Virology**, v. 265, p. 120–130, 1999.

CHOUIKHA, A.; FODHA, I.; BEN HADJ FREDJ, M.; ARDHAOU, M.; et al. Relationship between electropherotypes and VP7/VP4 genotypes of group A rotaviruses detected between 2000 and 2007 in Tunisian children. **Pathol Biol**, v. 59, n. 3, p.43-48, jun. 2009.

CIARLET, M.; CRAWFORD, S. E.; ESTES, M. K. Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. **J. Virol.**, v. 75, p. 11834–11850, 2001.

CLARK, K. B.; LIN, S. C.; HUMPHREY, C.; FOYTICH, K.; ESONA, M.; WANG, Y.; LIU, M.; JIANG, B. Expression and characterization of human group C rotavirus virus-like particles in insect cells. **Virology**, v. 387, p. 267–272. 2009.

COLLINS, P. J.; MARTELLA, V.; O'SHEA, H. Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 2973–2979. 2008.

CUNLIFFE, N.A.; DOVE, W.; BUNN, J.E.; BEN RAMADAM, M.; NYANGAO, J.W.; RIVERON, R.L.; CUEVAS, L.E.; HART, C.A. Expanding global distribution of rotavirus serotype G9: detection in Libya, Kenya, and Cuba. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, n. 5, p. 890–892. 2001.

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

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

ESONA, M. D.; HUMPHREY, C. D.; DENNEHY, P. H.; JIANG, B. Prevalence of group C rotavirus among children in Rhode Island, United States. **J. of Clin. Virology**, v. 42, p. 221–224. 2008.

ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y.; GERBA, C. P.; SMITH, E. M. Simian rotavirus AS-11 replication in cell cultures. **J Virol**, v. 31, p. 810-815.1979.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E. (eds). **Fields Virology**. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, p. 1426-1454. 2001.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: KNIP, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds). **Fields Virology**, 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins., p. 1917-1974. 2007.

ESTES, M. K.; GREENBERG, H. B. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**, 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins., p 1347 – 1401. 2013.

FABBRETTI, E.; AFRIKANOVA, I.; VASCOTTO, F.; BURRONE, O. R. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. **J. Gen. Virol.**, v. 80, p. 333–339, 1999.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FISCHER-WALKER, C.L.; RUDAN, I.; LIU, L.; NAIR, H.; THEODORATOU, E.; et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhea. **Lancet**. v. 381, p. 1405-16, 2013.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H. Virus particles in gastroenteritis (letter). **Lancet**, v. 2, p. 1497. 1973.

FLEWETT, T. H.; WOODE, G. N. The rotaviruses. Brief review. **Arch. Virol.** v. 57, n. 1, p. 1-23. 1978.

FRANCO, M. A.; ANGEL, J.; GREENBERG, H. B. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 2718-2731, 2006.

FUJII, R.; KUZUYA, M.; HAMANO, M.; OGURA, H.; YAMADA, M.; MORI, T. Neutralization assay for human group C rotaviruses using a reverse hemagglutination test for endpoint determination. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 50-54. 2000.

FUMIAN, T. M.; LEITE, J. P.; ROSE, T. L.; PRADO, T.; MIAGOSTOVICH, M. P. One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix® vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. **Water Res**, v. 45, n. 17, p. 5755-5763, 2011.

GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D.; LINHARES, A. C.; FREITAS, R. B. Atypical rotavirus among diarrhoeic children living in Belem, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 5-8. 1989.

GABBAY, Y. B.; JIANG, B.; OLIVEIRA, C. S., MASCARENHAS, J. D.; LEITE, J. P.; et al. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care centre in Belem, Brazil. **J Diarrhoeal Dis Res.**, v. 17, n. 2, p. 69-74. 1999.

GABBAY, Y. B.; JIANG, B.; OLIVEIRA, C. S.; MASCARENHAS, J. D.; et al. Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belém, Brazil. **J med. Virol.**, v. 80, p. 166-1674, mai. 2008.

GANIME, A. C.; CARVALHO-COSTA, F. A.; MENDONÇA, M. C.; VIEIRA, C. B.; SANTOS, M.; FILHO, R. C.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LEITE, J. P. Group A rotavirus detection on environmental surfaces in a hospital intensive care unit. **Am J Infect Control**, v. 40, n. 6, p. 544-547, ago. 2012.

GOUVEA, V.; ALLEN, J. R.; GLASS, R.I.; FANG, Z.Y., BREMONT, M.; COHEN, J.; et al. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol.**, v. 29, p. 519-523. 1991.

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

GRAY, J.; VESIKARI, T.; DAMME, P.V.; GIAQUINTO, CARLO.; MRUKOWICZ, J.; GUARINO, A.; DAGAN, R.; SZAJEWSKA, H.; USONIS, V. Rotavirus. **J. of Ped. Gastroent. and Nutrition.**, v. 46, p. 24-31. 2008.

GUERRERO, C. A.; MÉNDEZ, E.; ZÁRATE, S.; ISA, P.; et al. Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 97, n. 26, p.14644-14649. 2000.

HE, X.; WEI, Y.; CHENG, L.; ZHANG, D.; WANG, Z. Molecular detection of three gastroenteritis viruses in urban surface waters in Beijing and correlation with levels of fecal indicator bacteria. **Environ Monit Assess**, v. 184, n. 9, p. 5563-70, set. 2012.

HEIMAN, E. M.; MCDONALD, S. M.; BARRO, M.; TARAPOREWALA, Z. F.; BARMAGEN, T.; PATTON, J. T. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. **J. Virol.**, v. 82, p. 11106-11116. 2008.

HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, n. 3, p. 473-477. 1982.

HEWISH, M. J.; TAKADA, Y.; COULSON, B. S. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. **J. Virol.**, v. 74, n. 1, p. 228-236. 2000.

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

HUANG, H.; Schroeder, F.; Estes, M. K.; et al. Interaction (s) of rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) Cterminal peptides with model membranes. **Biochem J.**, v. 380, p. 723-733. 2004.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), CENSO POPULACIONAL. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=150140&search=para|bel>> Acesso em: 24/02/14.

ICTV. **Virus Taxonomy: 2012 Release** Disponível em: <[http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode\\_id=20120373](http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=20120373)> Acesso em: 22/03/13.

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

ITURRIZA-GÓMARA, M.; CLARKE, I.; DESSELBERGER, U.; BROWN, D.; THOMAS, D.; GRAY, J. Seroepidemiology of group C rotavirus infection in England and Wales. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 19, p. 589-595. 2004.



JAGANNATH, M. R.; KESAVULU, M. M.; DEEPA, R.; et al. N- and C- Terminal Cooperation in Rotavirus Enterotoxin: Novel Mechanism of modulation of the Properties of a Multifunctional Protein by a Structurally and Functionally Overlapping Conformational Domain. **J. Virol.**, v. 80, n. 1, p. 412-425, 2006.

JAIN, V.; DAS, B. K.; BHAN, M. K.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R.; laboratórios colaboradores. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 10, p. 3524-3529, 2001.

JAMES, V. L. A.; LAMBDEN, P. R.; CAUL, E. O.; COKE, S. J.; CLARKE, I. N. Seroepidemiology of human group C rotavirus in the UK. **J. Med. Virol.**, v. 52, p. 86-91. 1997.

JAYARAM, H.; ESTES, M. K.; PRASAD, B. V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. **Virus Res.**, v. 101, n. 1, p. 67-81. 2004.

JEONG, Y. J.; PARK, S. I.; HOSMILLO, M.; SHIN, D. J.; CHUN, Y. H.; KIM, H. J.; KWON, H. J.; KANG, S. Y.; WOO, S. K.; et al. Detection and molecular characterization of porcine group C rotaviruses in South Korea. **Vet. Microbiol.**, v. 138, p. 217–224. 2009.

JIANG, B.; DENNEHY, P. H.; SPANGENBERGER, S.; GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I. First detection of Group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 45–50. 1995.

JIANG, B.; TSUNEMITSU, H.; DENNEHY, P. H.; OISHI, I.; BROWN, D.; SCHNAGL, R. D.; OSETO, M.; FANG, Z. Y.; AVENDANO, L. F.; SAIF, L. J.; GLASS, R. I. Sequence conservation and expression of the gene encoding the outer capsid glycoprotein among human group C rotaviruses of global distribution. **Arch. Virol.**, v. 141, p. 381–390. 1996.

JIANG, B.; GENTSCH, J. R.; TSUNEMITSU, H.; SAIF, L. J.; GLASS, R. I. Sequence analysis of the gene encoding VP4 of a bovine group C rotavirus: molecular evidence for a new P genotype. **Virus Genes**, v. 19, p. 85–88. 1999.

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, n. 10, p. 1351-1361, 2002.

KAIANO, J. H. L.; LINHARES, A. L.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P.; et al. Ocorrência de rotavírus do grupo C em criança com gastroenterite aguda da Comunidade Quilombola do Abacatal, Ananindeua, Pará. **Livro de resumos do XLVI Congresso da sociedade brasileira de medicina tropical**, 2010.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M.; PÉREZ-SCHAEL, I. Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against diarrhea using a quadrivalent rhesus rotavirus (RRV) and human-RRV reassortant vaccine. **Arch. Virol.**, v. 12, p. 163-75. 1996.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E. (eds). 4 ed. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1787-833. 2001.

KAPLAN, J. E.; FELDMAN, R.; CAMPBELL, D. S.; LOOKABAUGH, C.; GARY, G. W. Frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. **Am. J. Public Health**, v.;72, p. 1329-1332. 1982.

KAZUYA, M.; FUJII, R.; HUMANO, M.; NAKAMURA, J.; YAMADA, M.; NII, S.; et al. Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 3185-3189. 1996.

KHAMRIN, P.; PEERAKOME, S.; MALASAO, R.; MIZUGUCHI, M.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H.; MANEEKARN, N. Genetic characterization of group C rotavirus isolated from a child hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. **Virus Genes**, v. 37, p. 314–321. 2008.

KHANANURAK, K.; VUTITHANACHOT, V.; SIMAKACHORN, N.; THEAMBOONLERS, A.; CHONGSRISAWAT, V.; POOVORAWAN, Y. Prevalence and phylogenetic analysis of rotavirus genotypes in Thailand between 2007 and 2009. **Infect. Gen. Evol.**, v. 10, n. 4, p. 537-545. 2010.

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

KIRKWOOD, C. D. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. **J. Infect. Dis.**, v. 202, p. 43-48. 2010.

KUMAZAKI, M. and USUKU, S. Epidemiological and genetic analysis of human group C rotaviruses isolated from outbreaks of acute gastroenteritis in Yokohama, Japan, between 2006 and 2012. **Arch Virol**. 2013.

KUZUYA, M.; FUJII, R.; HAMANO, M.; NAKAMURA, J.; YAMADA, M.; NII, S.; MORI, T. Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 3185–3189. 1996.

KUZUYA, M.; FUJII, R.; HAMANO, M.; YAMADA, M.; SHINOZAKI, K.; et al. Survey of human group C rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 6–10.1998.

KUZUYA, M.; HAMANO, M.; NISHIJIMA, M.; FUJII, R.; OGURA, H.; TANAKA, M.; ODA, A.; KUSAKA, S.; NAITOU, M. An outbreak of acute gastroenteritis caused by human group C rotavirus in a welfare institution in Okayama prefecture. **J. Infect. Dis.**, v. 58, p. 255–257. 2005.

KUZUYA, M.; FUJII, R.; HAMANO, M.; NISHIJIMA, M.; OGURA, H. Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture, Japan, between 1986 and 2005. **J. Med. Virol.**, v. 79, p. 1219–1228. 2007.

LANATA, C.F.; FISCHER-WALKER, C.L.; OLASCOAGA, A.C.; TORRES, C.X.; ARYEE, M.J.; BLACK, R.E. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: A systematic review. **Plos one**. v. 8, p.1-11. 2013.

LEE, S. G.; YOUN, S. H.; OH, M. H.; RHEE, O. J.; OH, S.; PAIK, S. Y. Molecular Characterization of Two Strains of Porcine Group C Rotavirus. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1058-1062. 2011.

LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; SCHMETZ, C.; MÜLLER, G.; PETERS, D. DUOVIRUS (Rotavírus) em Belém do Pará, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 19, n. 4, p. 278-279, Jul./Ago. 1977. (Nota Prévia).

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; FREITAS, R. B.; et al. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. **Epidemiol. Infect.**, v. 102, n. 1, p. 129-45. 1989.

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P.; et al. Gastroenterites por rotavírus. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (eds.). **Tratado de Infectologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, v. 1, p. 411-423. 2005.

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P.; OLIVEIRA, C. S.; JUSTINO, M. C. A. **Tratado de Infectologia**. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (eds.). 4ª ed. São Paulo: Atheneu. Cap. 21. p. 465-484, 2009.

LINHARES, A. C. ¿Por qué todos los países de América Latina no han introducido aún la vacuna de rotavirus en sus programas nacionales de inmunización? Disponible em: <<http://miradorsalud.com/site/2837/>>. Publicado em: 26/02/2013.

LIU, M.; MATTION, N. M.; ESTES, M. K. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. **Virology**, v. 188, p. 77–84, 1992.

LONDRIGAN, S. L.; HEWISH, M. J.; THOMSON, M. J.; SANDERS, G. M.; MUSTAFA, H.; COULSON, B. S. Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins. **J. Gen Virol.**, v. 81, n. 9, p. 2203-2213, 2000.

LÓPEZ, S.; ARIAS, C. F. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. **Trends Microbiol.**, v.12, n. 6, 2004.

LÓPEZ, S.; ARIAS, C. F. Early steps in rotavirus cell entry. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v.309, 39–66, 2006.

LUCHS, A.; MORILLO, S. G.; KISIELIUS, J. J.; UEDA, M.; CARMONA, R. C.; TIMENETSKY, M. C. Group C rotavirus, detection in Southeastern Brazil after 15 years. **J. Clin. Virol.**, v. 46, p. 389–390. 2009.

LUCHS, A.; MORILLO, S. G.; OLIVEIRA, C. M.; TIMENETSKY, M. C. Monitoring of Group C Rotavirus in Children With Acute Gastroenteritis in Brazil: An Emergent Epidemiological Issue After Rotavirus Vaccine? **J. of Medical Virology**, v. 83, p. 1631-1636. 2011.

MADELEY, C. R.; COSGROVE, B. P. Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, p. 451-452. 1975.

MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; LORUSSO, E.; DECARO, N.; BELLACICCO, A.; DESARIO, C.; CORRENTE, M.; et al. Genetic heterogeneity in the VP7 of group C rotaviruses. **Virology**, v. 367, p. 358–366. 2007.

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

MASCARENHAS, J. D. P.; GABBAY, Y. B.; FREITAS, R. B.; LINHARES, A. C. Distribuição temporal de perfis eletroforéticos de ácido nucléico de rotavirus em fezes de crianças em Belém, Pará. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 4, p. 415-419. 1988.

MASCARENHAS, J. D. P.; ARIAS, C. F.; PADILLA-NORIEGA, L.; LÓPEZ, S.; et al. Characterization of rotavirus strains with unusual electrophoretic profiles. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 6, p. 771-774, 1997.

MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C. Rotavirus gastroenteritis and the urgent need for a vaccine in developing countries. **Postgrad. Doct. Caribb.**, v. 21, n. 5, p. 152-161. 2005.

MASCARENHAS, J.D.P. **Caracterização molecular de genótipos de Rotavírus do grupo A em Belém, Pará, no período de 1990 a 2003: estudo em neonatos, crianças diarreicas de 0-3 anos e ensaio clínico com vacinas.** 2006. 160p. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

MATTHIJNSSENS, J. RAHMAN, M.; MARTELLA, V.; XUELEI, Y.; et al. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. **J. Virol.**, v. 80, p. 3801–3810, 2006.

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

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, S. M.; ATTOUI, H.; et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Arch. Virol.**, v. 156, n. 8, p. 1397-1413. 2011.

MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P. H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M.; JOHNE, R. VP6 sequence-based cut-off values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Arch. Virol.**, v. 157, n. 6, p.1177-1182. 2012.

MAWATARI, T.; TANEICHI, A.; KAWAGOE, T.; HOSOKAWA, M.; TOGASHI, K.; TSUNEMITSU, H. Detection of a bovine group C rotavirus from adult cows with diarrhea and reduced milk production. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 66, p. 887–890. 2004.

MEDICI, M. C.; ABELLI, L. A.; MARTINELLI, M.; MARTELLA, V.; DETTORI, G.; CHEZZI, C. Molecular characterization of group C rotaviruses detected in children in Italy. **J. Clin. Virol.**, v. 44, p. 62–65. 2009.

MELEG, E.; BÁNYAI, K.; MARTELLA, V.; JIANG, B.; et al. Detection and Quantification of Group C Rotaviruses in Communal Sewage. **App. and Env. Microbiology**, v. 74, n. 11, p. 3394–3399. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **VACINAÇÃO 2013**. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=29489](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=29489)> Acesso em: 04/04/2013.

MITUI, M. T.; BOZDAYI, G.; DALGIC, B.; BOSTANCI, I.; NISHIZONO, A.; AHMED, K. Molecular characterization of a human group C rotavirus detected first in Turkey. **Virus Genes**, v. 39, p. 157–164. 2009.

MODARRES, S.; RAHBARIMANESH, A. A.; KARIMI, M.; et al. Eletroproretic RNA genomic profiles of rotavírus strains prevailing among hospitalized children with acute gastroenterite in Tehran, Iran. **Arch. Iranian. Med.**, v. 11, n. 5, p. 526-531. 2008.

MONNIER, N.; HIGO-MORIGUCHI, K.; SUN, Z. Y.; PRASAD, B. V.; TANIGUCHI, K.; DORMITZER, P. R. High-resolution molecular and antigen structure of the VP8\* core of a sialic acid independent human rotavirus strain. **J. Virology**, v. 80, p.1513–1523. 2006.

MOON, S.; Humphrey, C. D.; KIM, J. S.; BAEK, L.J.; SONG, J-W.; SONG, K-J.;JIANG, B. First detection of group C rotavirus in children with acute gastroenteritis in South Korea. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 17,p. 244–247. 2011.

MORI, K.; HAYASHIA, Y.; AKIBAA, T.; NAGANO, M.; et al. Multiplex real-time PCR assays for the detection of group C rotavirus, astrovirus, and Subgenus F adenovirus in stool specimens. **J. of Virological Methods**, v. 191, p.141– 147. 2013.

NILSSON, M.; SVENUNGSSON, B.; HEDLUND, K-O.; UHNOO, I.; LAGERGREN, A.; AKRE, T.; SVENSSON, L. Incidence and genetic diversity of group C rotavirus among adults. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 678–684. 2000.

OGDEN, K. M.; JOHNE, R.; PATTON, J. T. Rotavirus RNA polymerases resolve into two phylogenetically distinct classes that differ in their mechanism of template recognition. **Virology**, v. 431, n. 1-2, p. 50-57. 2012.

OSETO, M.; YAMASHITA, Y.; OKUYAMA, M.; KUWABARA, H.; INOUE, H. Detection of atypical rotaviruses by polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Clin. Exp. Med.**, v. 136, p. 223–224. 1986.

OSETO, M.; YAMASHITA, Y.; HATTORI, M.; MORI, M.; INOUE, H.; ISHIMARU, Y.; MATSUNO, S. Serial propagation of human group C rotavirus in a continuous cell line (CaCo-2). **J. Clin. Exp. Med.**, v. 168, p. 177–178. 1994.

OTTO, P.; SCHULZE, P.; HERBST, W. Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany. **Arch. Virol.**, v. 144, p. 2467–2473. 1999.

PATTON, J. T. Rotavirus Diversity and Evolution in the Post-Vaccine World. **Dis. Medicine**, v. 13, n. 68, p. 85-97. 2012.

PEREIRA, H. G.; LEITE, J. P.; AZEREDO, R. S.; DE FARIAS, V.; SUTMOLLER, F. An atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 78, p. 245–250. 1983a.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, 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**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 483-90. 1983b.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: Teoria e prática**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 596p. 1995.

PHAN, T. G.; NISHIMURA, S.; OKAME, M.; NGUYEN, T. A.; et al. Virus diversity and an outbreak of group C rotavirus among infants and children with diarrhea in Maizuru City, Japan during 2002–2003. **J. Med. Virol.**, v. 74, p. 173–179. 2004.

RAHMAN, M.; BANIK, S.; FARUQUE, A. S.; TANIGUCHI, K.; SACK, D. A.; VAN RANST, M.; AZIM, T. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 4460–4465. 2005.

RAHMAN, M.; MATTHIJNSSENS, J.; YANG, X.; DELBEKE, T.; et al. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. **J. Virol.**, v. 81, p. 2382–2390. 2007.

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

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

RASOOL, N. B. G.; HAMZAH, M.; JEGATHESAN, M.; WONG, Y. H.; QIAN, Y.; GREEN, K. Y. Identification of a human group C rotavirus in Malaysia. **J. Med. Virol.**, v. 43, p. 209–211. 1994.

RIEPENHOFF-TALTY, M., MORSE, K.; WANG, C. H.; et al. Epidemiology of group C rotavirus infection in Western New York women of childbearing age. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 486-488. 1997.

ROLLO, E. E.; KUMAR, K. P.; REICH, N. C.; et al. The epithelial cell response to rotavirus infection. **J. Immunol.**, v. 163, p. 4442-4452, 1999.

ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. Doenças infecciosas: Diagnóstico molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 17-39, 2006.

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

SAIF, L. J.; BOHL, E. H.; THEIL, K. W.; CROSS, R. F.; HOUSE, J. A. Rotaviruslike, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 12, p. 105–111. 1980.

SANCHEZ-FAUQUIER, A.; ROMAN, E.; COLOMINA, J.; WILHELMI, I.; GLASS, R. I.; JIANG, B. First detection of group C rotaviruses in children with acute diarrhea in Spain. **Arch. Virol.**, v. 148, p. 399-404. 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 74, p. 5463–5467. 1977.

SANTOS, G. E. O. **Cálculo amostral: calculadora on-line**. 2010. Disponível em: <[www.calculoamostral.vai.la](http://www.calculoamostral.vai.la)> Acesso em: 15/06/2012.

SANTOS, N. S. O.; SOARES, C. C. **Introdução à virologia humana**. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2º Ed., cap. 6, p. 147- 160. 2008.

SCHNAGL, R. D.; BONIFACE, K.; CARDWELL, P.; MCCARTHY, D.; ONDRACEK, C.; COULSON, B.; ERLICH, J.; MOREY, F. Incidence of group C human rotavirus in central Australia and sequence variation of the VP7 and VP4 genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 2127–2133. 2004.

SEBATA, T.; STEELE, A. D. Human group C rotavirus identified in South Africa. **S. Afr. Med. J.**, v. 89, n. 10, p. 1073-1074. 1999.

SILVESTRI, L. S.; TARAPOREWALA, Z. F.; PATTON, J. T. Rotavirus replication: plussense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. **J. Virol.**, v. 78, p. 7763–7774, 2004.

SIQUEIRA, J. A.; LINHARES, A. DA C.; GONÇALVES, M. S.; DE CARVALHO, M. S.; JUSTINO, M. C.; MASCARENHAS, J. D.; GABBAY, Y. B. Group A rotavirus and norovirus display sharply distinct seasonal profiles in Belém, northern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 661-664. 2013.

SIQUEIRA, J. A. M. **Caracterização das infecções por norovírus nas hospitalizações pediátricas por gastroenterite na cidade de Belém, Pará.** 2012. 125p. Dissertação de Mestrado. Núcleo de Medicina Tropical, UFPa, Pará.

SOUZA, D. F.; KISIELIUS, J. J.; UEDA, M.; GABBAY, Y. B.; CARMONA, R. C.; et al. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among adults living in Valentim Gentil, São Paulo State, Brazil. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v. 16, n. 2, p. 59-65. 1998.

STEELE, A. D.; JAMES, V. L. A.. Seroepidemiology of human group C rotavirus in South Africa. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 4142–4144. 1999.

STEYER, A.; POLJSK-PRIJATELJ, M.; BUFON, T.; SEDMAK, M.; VIDMAR, L.; MIJOVSKI, J. Z.; MARIN, J. First detection of group C rotavirus in patients with gastroenteritis in Slovenia. **J. Med. Virol.**, v. 78, p. 1250–1255. 2006.

SVENSSON, L.; FINLAY, B. B.; BASS, D.; VON BONSDORFF, C. H.; GREENBERG, H. B. Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. **J. Virol.**, v. 65, n. 8, p. 4190-4197. 1991.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetcs Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.**, n. 28, p. 2731-2739, 2011.

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

TEIXEIRA, J. M.; CAMARA, G. N.; PIMENTEL, P. F.; FERREIRA, M. N.; FERREIRA, M. S.; ALFIERI, A. A.; GENTSCH, J. R.; LEITE, J. P. Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p.1397–1403. 1998.

TIAN, P.; ESTES, M. K.; HU, Y.; et al. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum. **J. Virol.**, v. 69, n. 9, p. 5763-72. 1995.

TIMENETSKY, M. do C.; KISIELIUS, J. J.; GRISI, S. J.; ESCOBAR, A. M.; UEDA, M.; TANAKA, H. Rotavirus, adenovirus, astrovirus, calicivirus and small round virus particles in feces of children with and without acute diarrhea, from 1987 to 1988, in the greater São Paulo. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 35, p. 275–280. 1993.

TORRES-MEDINA, A. Isolation of an atypical rotavirus causing diarrhea in neonatal ferrets. **Lab. Anim. Sci.**, v. 37, p. 167–171. 1987.

TRASK, S. D.; MCDONALD, S. M.; PATTON, J. T.; Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 10, n. 3, p. 165-77. 2012.



TROJNAR, E.; OTTO, P.; ROTH, B.; REETZ, J.; JOHNE, R. The genome segments of a group D rotavirus possess group A-like conserved termini but encode group-specific proteins. **J. Virol.**, v. 84, n. 19, p. 10254-10265. 2010.

TSUNEMITSU, H.; SAIF, L. J.; JIANG, B. M.; SHIMIZU, M.; HIRO, M.; YAMAGUCHI, H.; ISHIYAMA, T.; HIRAI, T. Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104). **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 2609–2613. 1991.

TSUNEMITSU, H.; JIANG, B.; YAMASHITA, Y.; OSETO, M.; USHIJIMA, H.; SAIF, L. Evidence of serologic diversity within group C rotaviruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 3009–3012. 1992.

USHIJIMA, H.; HONMA, H.; MUKOYAMA, A.; SHINOZAKI, T.; FUJITA, Y.; KOTAYASHI, T.; OSETO, M.; et al. Detection of group C rotaviruses in Tokyo. **J. Med. Virol.**, v. 27, p. 299–303. 1989.

VON BONSDORF, C. H.; SVENSSON, L. Human serogroup C rotavirus in Finland. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 20, p. 475-478. 1988.

WALKER, C. L. F.; FRIBERG, I. K.; BINKIN, N.; YOUNG, M. Up Diarrhea Prevention and Treatment Interventions: A Lives Saved Tool Analysis. **PLoS Medicine**, v. 8. 2011.

WARD, R. L.; BERNSTEIN, D. I.; YOUNG, E. C.; et al. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. **J. Infect. Dis.**, v. 154, n. 5, p. 871- 880. 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhoeal Diseases**. Abr. 2013. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>>. Acesso em: 20.05.2013a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological Record: Rotavirus vaccines.**, v. 5, n. 88, p. 49–64, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/wer>>. Acesso em: 19.04.2013b.

WU, H.; TANIGUCHI, K.; WAKASUGIF, F.; UKAE, S.; CHIBA, S.; OHSETO, M.; HASEGAWA, A.; URASAWA, T.; URASAWA, S. Survey on the distribution of the gene 4 alleles of human rotaviruses by polymerase chain reaction. **Epidemiol. Infect.**, v. 112, p. 615-622, 1994.

XU, L.; HARBOUR, D.; MCCRAE, M. A. The application of polymerase chain reaction to the detection of rotaviruses in faeces. **J. Virol. Methods**, v. 27, p. 29–38. 1990.

YAMAMOTO, D.; GHOSH, S.; KUZUYA, M.; WANG, Y. H.; ZHOU, X.; CHAWLA-SARKAR, M.; PAUL, S. K.; ISHINO, M.; KOBAYASHI, N. Whole-genome characterization of human group C rotaviruses: identification of two lineages in the VP3 gene. **J. of Gen. Virology**, v. 92, p. 361–369. 2011.

YAMASHITA, T.; ITO, M.; TSUZUKI, H.; SAKAE, K.; Identification of Auchi virus infection by measurement of immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 4178-4180. 2001.

ZHANG, M. D.; ZENG, C. Q-Y.; DONG, Y. J.; BALL, J. M.; SAIF, L. J.; MORRIS, A. P.; ESTES, M. K. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. **J. Virol.** v. 72, n. 5, p. 3666-3672. 1998.

ZARATE, S.; ESPINOSA, R.; ROMERO, P.; et al. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. **J Virol.**, v. 74, n. 2, p, 593- 599, 2000.

ZARATE, S.; CUADRAS, M. A.; ESPINOSA, R.; et al. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. **J. Virol.**, v. 77, p. 7254–7260, 2003.

**APÊNDICE A**

## Preparo de soluções - Suspensão e Extração do RVC

a) Tampão Tris-Ca<sup>++</sup> 0.01M, pH 7,2

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

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

## b) Sílica

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

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

## c) Tampão L2

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

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

## d) Tampão L6

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

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

## APÊNDICE B

Preparo de soluções – Tampões para corrida e coloração de géis de poliacrilamida e agarose

a) Tampão Tris glicina 10X

|   |         |
|---|---------|
| Tris-Base (hidroximetil-tris-aminometano) | 24g     |
| Glicina                                   | 115,3g  |
| Água destilada q.s.p                      | 1000 mL |

Estocar a 4°C. Diluir para uso essa solução de corrida para 1X antes do uso

b) Reagente fixador

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Etanol P.A.          | 10mL   |
| Ácido acético P.A.   | 0,5mL  |
| Água destilada q.s.p | 100 mL |

c) Reagente Corante

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Nitrato de prata     | 1mL    |
| Água destilada q.s.p | 100 mL |

d) Reagente revelador

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Hidróxido de sódio 10M | 7,5mL  |
| Formaldeído P.A.       | 0,8mL  |
| Água destilada q.s.p   | 100 mL |

e) Solução de parada

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Etanol               | 5mL    |
| Água destilada q.s.p | 100 mL |

f) Tampão TBE 10X

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

Diluir para uso essa solução 1X antes do uso.

## ANEXO A

NÚCLEO DE MEDICINA  
TROPICAL-NMT/  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



NÚCLEO DE MEDICINA  
TROPICAL-NMT/  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Continuação do Parecer: 275.504

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ROTAVÍRUS DO GRUPO C ASSOCIADO À HOSPITALIZAÇÃO DE CRIANÇAS MENORES DE TRÊS ANOS COM GASTREENTERITE EM BELÉM, PARÁ.

**Pesquisador:** Patrícia dos Santos Lobo

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 14592013.1.0000.5172

**Instituição Proponente:** Núcleo de Medicina Tropical-NMT/ Universidade Federal do Pará - UFPA

**Patrocinador Principal:** Núcleo de Medicina Tropical-NMT/ Universidade Federal do Pará - UFPA

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 275.504

**Data da Relatoria:** 25/04/2013

**Apresentação do Projeto:**

A gastroenterite aguda é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. São responsáveis por 36% dos casos de gastroenterite que culminam em hospitalizações entre crianças menores de cinco anos, resultando em 453.000 óbitos anualmente, principalmente nos países em desenvolvimento. Vários agentes virais são responsáveis pelos casos de diarreia com destaque para os rotavírus que são classificados em sete grupos sorológicos distintos (A ao G). O mais comumente encontrado pertence ao grupo A, contudo o Rotavírus do Grupo C (RVs-C) vem assumindo importância nas gastroenterites, além dos Picobirnavírus, Astrovírus, Norovírus e Calicivírus. Os RVs-C geralmente se relacionam a quadros de diarreia infantil de curso autolimitado, com possível transmissão de suínos. Os rotavírus pertencem à família Reoviridae, gênero Rotavirus e possuem genoma dividido em 11 segmentos de RNA de dupla fita (dsRNA). Este projeto tem por objetivo: Estudar a prevalência de rotavírus pertencentes ao grupo C em crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda menores de 3 anos de idade em Belém, Pará.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Detectar o rotavírus pertencentes ao grupo C em crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda

menores de 3 anos de idade em Belém, Pará.

**Objetivo Secundário:**

Determinar a sazonalidade dos RVs-C e correlacionar com os fatores climáticos observados e comparar com àquela demonstrada para RVs-A e norovírus no mesmo período de estudo; verificar a faixa etária mais acometida por esse vírus; definir os sinais e sintomas clínicos apresentados pelos menores com RVs-C e comparar com aquela demonstrada para RVs-A e norovírus no mesmo período de estudo; demonstrar a diversidade de cepas circulantes e comparar o gene VP6 relacionado a seres humanos e suínos; e verificar a diversidade de cepas circulantes para os genes VP6, VP7, VP4 e NSP4 nos anos de 2008 a 2011 com cepas circulantes antes e após a introdução da vacina de RVs-A.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Amostras coletadas anteriormente, sem apresentar riscos aos menores envolvidos; e divulgação da identidade dos menores envolvidos no estudo na etapa de coleta e na análise dos resultados.

**Benefícios:**

Subsidiar pesquisas relacionadas a epidemiologia do rotavírus do grupo C circulantes na cidade de Belém, em crianças hospitalizadas com gastroenterites.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Justificativa de dispensa de TCLE (de acordo). Este estudo é oriundo do projeto anteriormente desenvolvido, o estudo original "Estudo caso-controle para avaliar a efetividade da vacina Rotarix® na prevenção de gastroenterite grave por rotavírus (SGE por RV) entre crianças hospitalizadas nascidas após 06 de março de 2006 e com pelo menos 12 semanas de idade, em Belém, no Brasil. Desta forma, constata-se grande dificuldade em obter todos os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que foram aplicados individualmente em cada estudo, bem como, por se tratar de um estudo que envolve indivíduos contatados as amostras estão estocadas no acervo biológico da seção de virologia e que a utilização das mesmas já foi autorizada pela direção do Instituto Evandro Chagas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

De acordo.

**Recomendações:**

sem recomendações

NÚCLEO DE MEDICINA  
TROPICAL-NMT/  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 275.504

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Parecer do relator acatado.

BELEM, 17 de Maio de 2013

Assinador por:  
**ANDERSON RAIOL RODRIGUES**  
(Coordenador)

**ANEXO B**

## Lista de Aminoácidos

| <b>Letra</b> | <b>Sigla</b> | <b>Nomes dos aminoácidos</b> | <b>Caráter</b> |
|--------------|--------------|------------------------------|----------------|
| 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          |