



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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENÓTIPOS G E P DE
ROTAVÍRUS TIPO G9 PROVENIENTES DE CRIANÇAS COM
GASTRENERITE AGUDA NA REGIÃO METROPOLITANA DE
BELÉM, PARÁ, NO PERÍODO DE 1999 A 2007**

SYLVIA DE FÁTIMA DOS SANTOS GUERRA

**Belém/PA
2010**

SYLVIA DE FÁTIMA DOS SANTOS GUERRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENÓTIPOS G E P DE
ROTAVÍRUS TIPO G9 PROVENIENTES DE CRIANÇAS COM
GASTRENERITE AGUDA NA REGIÃO METROPOLITANA DE
BELÉM, PARÁ, NO PERÍODO DE 1999 A 2007**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

Co-orientadora: Prof^ª. MSc. Luana da Silva Soares

Belém/PA

2010

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

Guerra, Sylvia de Fátima dos Santos

Caracterização molecular dos genótipos G e P rotavírus tipo G9 provenientes de crianças com gastroenterite aguda na região metropolitana de Belém, Pará, no período de 1999 a 2007 / Sylvia de Fátima dos Santos; orientadora , Joana D'Arc Pereira Mascarenhas. - 2010.

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

1. Rotavírus. 2. Infecções por rotavírus. I. Mascarenhas, Joana D'Arc Pereira. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.0194

Ficha catalográfica elaborada por Valdenira de Jesus NMT/UFPA

SYLVIA DE FÁTIMA DOS SANTOS GUERRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENÓTIPOS G E P DE
ROTAVÍRUS TIPO G9 PROVENIENTES DE CRIANÇAS COM
GASTRENERITE AGUDA NA REGIÃO METROPOLITANA DE
BELÉM, PARÁ, NO PERÍODO DE 1999 A 2007**

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

Data de aprovação: 05/07/2010

Banca Examinadora:

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

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

Membro: Prof^a. Dr^a. Ana Cecilia Ribeiro Cruz
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

Membro: Prof. Dr. José Paulo Gagliard Leite
Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ

Suplente: Prof^a. Dr^a. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

Belém/PA

2010

Aos meus pais, Mário e Nadir Guerra pelo incentivo e apoio. Aos meus irmãos, Márcio, Márcia Guerra e ao meu sobrinho Arthur pela compreensão e amizade. Ao meu esposo Luís Cláudio pelo amor, amizade e companheirismo. Ao meu filho Gustavo que já se tornou um amor incondicional em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus caminhos e dar-me a graça de mais esta conquista em minha vida.

Ao Instituto Evandro Chagas por todo apoio técnico científico ofertado.

A Dr^a. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas pelo apoio, incentivo, orientação, confiança, amizade e pelas oportunidades que vêm me proporcionando.

A Dr^a Luana Soares por todo conhecimento repassado, apoio, amizade e orientação dispensada.

Ao Dr. Alexandre Linhares por todo apoio e conhecimento repassados.

À toda equipe do Laboratório do Instituto Evandro Chagas, Dr^a Mirleide Cordeiro, Ian Carlos, Euzeni Menezes, Régis Maestri, Dr^a Yvone Gabbay, Darivaldo Neri, Maryelle Gonçalves com especiais agradecimentos a Dr^a. Alessilva Oliveira por toda amizade ofertada, companheirismo, enfim, por estar ao meu lado nas horas que mais precisei;

A Dr^a Darleise Oliveira por todo auxílio, paciência e dedicação ofertados.

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

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

“Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem em todos os teus caminhos. Eles te susterrão nas suas mãos, para que não tropeces em alguma pedra. Pisarás o leão e a áspide; calcarás aos pés o filho do leão e a serpente. Pois que tanto me amou, eu o livrarei; pô-lo-ei num alto retiro, porque ele conhece o meu nome. Quando ele me invocar, eu lhe responderei; estarei com ele na angústia, livrá-lo-ei, e o honrarei. Com longura de dias fartá-lo-ei, e lhe mostrarei a minha salvação”

Salmo 91

RESUMO

O rotavírus (RV) é o principal agente viral associado às gastroenterites, ocasionando em média 39% dos casos diarreicos que culminam em hospitalizações, sendo responsável por cerca de 520.000 óbitos entre crianças menores de cinco anos de idade a cada ano. Pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, possui RNA de dupla fita (dsRNA) com 11 segmentos codificando 12 proteínas, sendo seis estruturais (VPs) e seis não estruturais (NSPs). A proteína VP4, juntamente com a VP7, compõem a camada externa do RV, designando os genótipos P e G, respectivamente. Até o momento foram descritos 23 tipos G e 31 tipos P. O genótipo G9 emergiu em escala global e é possivelmente associado a manifestação clínica mais grave, estando geralmente acompanhado do genótipo P[8]. O genótipo G9 possui 6 linhagens distintas e o P[8] 4 linhagens. Este estudo objetivou caracterizar os genes VP7 e VP4 de RV do genótipo G9, circulantes na região metropolitana de Belém, Pará, no período de 1999 a 2007. O dsRNA viral de 38 amostras selecionadas foi extraído a partir das suspensões fecais e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida para determinação dos eletroferotipos, seguido da reação de seqüenciamento. Na presente investigação, foi possível a análise de 32 amostras selecionadas, sendo todas genótipo G9P[8] associadas ao eletroferotipo longo. A análise filogenética do gene VP7 demonstrou que as amostras G9 agruparam na linhagem 3 com elevados índices de similaridade, apresentando 8 substituições nucleotídicas. Contudo, apenas três modificações aminoacídicas foram observadas nas posições 43 (I→V), 66 (A→V) e 73 (Q→R), sendo estes resíduos 43 e 73 exclusivos das amostras do ano de 2007. A análise do gene VP4 demonstrou que as amostras P[8] agruparam na linhagem 3, identificando-se 15 substituições nucleotídicas, as quais ocasionaram quatro modificações aminoacídicas nos resíduos 108 (V→I), 172 (R→K), 173 (I→V) e 275 (K→R). As modificações nos resíduos 172 e 275 são exclusivos das amostras dos anos de 1999 a 2002. As amostras do presente estudo apresentaram elevada similaridade ao longo do tempo estudado. As amostras de 2007 foram as mais divergentes, tanto para o gene VP4 quanto para o gene VP7. É importante se proceder ao contínuo monitoramento do genótipo G9 na região metropolitana de Belém, a fim de detectar possíveis variantes emergentes que possam representar um desafio as estratégias de imunização atuais.

Palavras chaves: Análise molecular, Rotavírus, Genótipo G9, Genótipo P[8].

ABSTRACT

Rotavirus (RV) is the principal viral agent associated with gastroenterites, being responsible for 39% of the diarrhea cases that need hospitalization and with 520.000 deaths among children under five years. It belongs to the *Reoviridae* family, genus *Rotavirus*, the genome consists of 11 segments of double-stranded RNA that encoding 12 proteins, six structural (VPs) and six non-structural (NSPs). The VP4 protein, together with VP7 protein, compose the outer layer of the RV, defining genotypes P and G, respectively. Until now, at least 23 different G genotypes and 31 P genotypes have been established. The G9 genotype emerged in world scale, and is possibly associated with severe clinical manifestation, being generally associated with P[8] genotype. The G9 genotype has 6 distinct lineages and P[8] 4 lineages. The aim of this study was the characterization of VP4 and VP7 genes of the RV G9 genotype, that circulated in the metropolitan region of Belém, in the period of 1999 to 2007. The viral dsRNA of 38 selected samples were extracted from fecal suspensions and submitted to electrophoresis in gel of polyacrylamide to determine the electropherotypes, followed by sequencing reaction. In the present investigation, it was possible to analyze 32 selected samples, all of them G9P[8] genotype, with long electropherotype. Phylogenetic analysis of VP7 gene showed that all G9 strains belong to lineage 3 with high similarity indexes, with 8 nucleotide changes. However, only three amino acid changes were observed in the positions 43 (I→V), 66 (A→V) e 73 (Q→R), being the substitutions at positions 43 and 73 exclusive of the samples isolated in 2007 year. Phylogenetic analysis of VP4 gene revealed that all strains P[8] belong to lineage 3, with 15 nucleotide changes, that showed four amino acid substitutions at positions 108 (V→I), 172 (R→K), 173 (I→V) e 275 (K→R). The amino acid substitutions at positions 172 and 275 were exclusive of the strains isolated from 1999 to 2002. The samples of the present study showed high homology throughout the studied period. The strains isolated in 2007 were the most divergent either to VP4 as to VP7 gene. It is important the continuous surveillance of G9 genotype in the metropolitan region of Belém, to detect possible new genetic variants that can represent a challenge to the current strategies of immunization.

Key words: Molecular analysis, Rotavirus, G9 genotype, P[8] genotype

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Micrografia eletrônica de extrato fecal contendo partículas completas de rotavírus	18
Figura 2	Detalhes da estrutura tridimensional do rotavírus demonstrando as proteínas dos capsídeos externo, intermediário e interno (adaptada de Jayaram et al., 2004)	19
Figura 3	Representações esquemática e tridimensional da partícula viral de RV-A símio (SA11) com segmentação genômica (Adaptada de Prasad et al., 1996.).	22
Figura 4	Perfis eletroforéticos do genoma viral (dsRNA) do rotavírus (Adaptada de Kapikian et al., 2001)	23
Figura 5	Estrutura do gene do rotavírus (Adaptada de Estes e Kapikian, 2007)	24
Figura 6	Demonstração das regiões variáveis VR1 (aa 9 - 20), VR2 (aa 25 - 32), VR3 (aa 37 - 53), VR4 (aa 65 - 76), VR5 (aa 87 - 100), VR6 (aa 119 - 132), VR7 (aa 141 - 150), VR8 (aa 208 - 224) e VR9 (aa 235 - 245) e das principais regiões antigênicas (A, B, C e F) presentes no gene VP7.	26
Figura 7	Rearranjo no genoma do rotavírus (Retirado e adaptado de Desselberger, 1996)	29
Figura 8	Reestruturação genética entre rotavírus em uma co-infecção (Retirado e adaptado de Ramig, 1997)	30
Figura 9	Espécimes clínicos utilizados no presente estudo	56
Figura 10	Gel de poliacrilamida demonstrando o perfil eletroforético de RV. (1) Controle positivo longo; (2) Controle positivo curto; (3 - 12) Amostras com eletroferotipo longo, genótipo G9P[8]	68
Figura 11	Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP7 envolvendo 32 amostras G9P[8] da região metropolitana de Belém e protótipos. Os valores de <i>bootstrap</i> (2.000 pseudoréplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados.	71
Figura 12	Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene <i>VP7</i> das amostras do presente estudo, protótipos e amostras brasileiras. Os retângulos vermelhos indicam as substituições nucleotídicas identificadas (1/3)	73
Figura 12	Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene <i>VP7</i> das amostras do presente estudo, protótipos e amostras brasileiras. Os retângulos vermelhos indicam as substituições nucleotídicas	74

	identificadas (2/3)	
Figura 12	Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene <i>VP7</i> das amostras do presente estudo, protótipos e amostras brasileiras. Os retângulos vermelhos indicam as substituições nucleotídicas identificadas (3/3)	75
Figura 13	Alinhamento das sequências aminoacídicas do gene <i>VP7</i> das amostras do presente estudo, protótipos e amostras brasileiras. Os retângulos vermelhos indicam as substituições dos resíduos de aa identificadas. Os retângulos pretos indicam as VR em que ocorreram modificações aminoacídicas	76
Figura 14	Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene que codifica para a proteína <i>VP4</i> envolvendo 32 amostras G9P[8] da região metropolitana de Belém e protótipos. Os valores de <i>bootstrap</i> (2.000 pseudoréplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados	79
Figura 15	Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene <i>VP4</i> das amostras do presente estudo, protótipos, amostras do Brasil e do mundo. Os retângulos vermelhos indicam as substituições nucleotídicas identificadas (1/3)	80
Figura 15	Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene <i>VP4</i> das amostras do presente estudo, protótipos, amostras do Brasil e do mundo. Os retângulos vermelhos indicam as substituições nucleotídicas identificadas (2/3)	81
Figura 15	Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene <i>VP4</i> das amostras do presente estudo, protótipos, amostras do Brasil e do mundo. Os retângulos vermelhos indicam as substituições nucleotídicas identificadas (3/3)	82
Figura 16	Alinhamento das sequências aminoacídicas do gene <i>VP4</i> das amostras do presente estudo, protótipos, amostras do Brasil e do mundo. Os retângulos vermelhos indicam as substituições dos resíduos de aa identificadas	83

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	Sequência dos iniciadores utilizados na RT-PCR para os genes VP7 e VP4 de RV	61
Quadro 2	Reagentes usados na RT-PCR para a obtenção do Cdna	62
Quadro 3	Reagentes usados na PCR para a amplificação dos genes VP4 e VP7	62
Quadro 4	Reagentes usados na reação de sequenciamento dos genes VP4 e VP7	65
Tabela 1	Modificações nucleotídicas e aminoácidas no gene <i>VP7</i> observadas nas amostras genótipo G9 da Região metropolitana de Belém, no período de 1999 a 2007	77
Tabela 2	Modificações nucleotídicas e aminoácidas no gene <i>VP4</i> observadas nas amostras genótipo G9P[8]. Região metropolitana de Belém, no período de 1999 a 2007	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – Graus centígrados
μL – Microlitro
aa – aminoácido
cDNA - DNA complementar
DLP - partículas de dupla camada
dsRNA - ácido ribonucléico de dupla cadeia
EGPA - eletroforese em gel de poliacrilamida
FDA - Food and Drug Administration
IEC – Instituto Evandro Chagas
IFN - interferon
IgA – Imunoglobulina A
IgG – Imunoglobulina G
LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Pará
mA - milli-Âmperes
mg – miligrama
mL - mililitro
ng – nanogramas
nm – nanômetros
NSP – Proteína não estrutural
ORF - fase aberta de leitura
pb - pares de bases
pb – Pares de bases
RA - regiões antigênicas
RE - retículo endoplasmático
RNA (-) – RNA de polaridade negativa
RNAm - RNA mensageiro
RPM - rotações por minuto
RT-PCR - Reação em cadeia mediada pela polimerase, precedida de transcrição Reversa
RV – Rotavírus
SG - Subgrupo
TA - temperatura ambiente
TBE - tampão tris-borato-EDTA
TRO - terapia de reidratação oral
V – volts
VORH - Vacina Oral de Rotavírus Humano
VP – Proteína estrutural
VR - regiões variáveis
W – Watts

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE TABELAS E QUADROS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	12
I INTRODUÇÃO	15
II REVISÃO DA LITERATURA	17
II.1 HISTÓRICO	17
II.2 ROTAVIRUS	18
II.2.1 Partícula viral	18
II.2.2 Classificação	20
II.2.3 Genoma Viral	21
II.2.4 – Proteínas	24
II.2.4.1 – Estruturais	24
II.2.4.2 - Não estruturais	27
II.2.5 - Mecanismos de evolução genética	28
II.2.6 – Replicação viral	31
II.2.7 – Epidemiologia molecular	33
II.2.7.1 – Genótipo G9	36
II.3 – INFECÇÃO POR ROTAVÍRUS	39
II.3.1 - Transmissão:	39
II.3.2. – Patogenia da infecção pelo rotavírus	41
II.3.3 – Imunidade	42
II.3.4. – Características clínicas	43
II.3.5 – Tratamento	45
II.3.6 – Diagnóstico laboratorial	46
II.3.7. – Controle e prevenção	47
II.3.7.1 - Vacina contra rotavírus	48
III. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	53
IV. ASPECTOS ÉTICOS	54
V. OBJETIVOS	55
V.1 OBJETIVO GERAL	55
V.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55

VI. MATERIAL E MÉTODOS	56
VI.1 – MATERIAL	56
VI.2 – MÉTODOS	59
VI.2.1 Preparo da suspensão fecal	59
VI.2.2 Extração do genoma viral	59
VI.2.3 Determinação dos eletroferotipos por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)	60
VI.2.4 Reação em cadeia mediada pela polimerase, precedida de transcrição Reversa (RT-PCR)	61
VI.2.5. – Eletroforese em gel de agarose	63
VI.2.6 – Purificação do produto da RT-PCR	63
VI.2.7. – Quantificação do DNA	64
VI.2.8. – Reação de sequenciamento de nucleotídeos	65
VI.2.9. – Purificação do produto da reação de seqüenciamento	65
VI.2.10. – Eletroforese em sequenciador automático	66
VI.2.11. – Alinhamento e edição das sequências para construção da árvore filogenética.	67
VII. RESULTADOS	68
VII.1. DETERMINAÇÃO DOS ELETROFEROTIPOS DE ROTAVÍRUS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	68
VII.2. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	69
VII.3 – ANÁLISE DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS	69
VII.3.1 – Gene VP7	69
VII.3.2 – Gene VP4	78
VIII. DISCUSSÃO	86
VIII.1. ANÁLISE DO GENE VP7	88
VIII.2. ANÁLISE DO GENE VP4	90
IX. CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	125

I. INTRODUÇÃO

As doenças diarreicas constituem um relevante problema de saúde pública, apresentando-se como a segunda maior causa da mortalidade infantil em todo mundo, resultando em cerca de 1.5 milhões de óbitos a cada ano, com maior impacto nos países em desenvolvimento (BOSCHI-PINTO et al., 2008; UNICEF e OMS, 2009).

A morbidade associada à diarreia tem significativo impacto tanto na criança acometida quanto no seio familiar, traduzindo-se em danos à saúde e interferência no desenvolvimento infantil, gerando custos diretos pelo atendimento ambulatorial, pronto atendimento e hospitalizações e indiretos em perdas de dias de trabalho, de escola, gastos com medicamentos, transportes (SÃO PAULO, 2004; MAST et al., 2009).

A etiologia das doenças diarreicas pode envolver vários agentes, tais como bactérias, parasitas e principalmente os vírus, dentre os quais se destaca o rotavírus (RV), estimando-se que até os cinco anos de idade, quase toda criança já terá tido um episódio diarreico atribuído a esse agente viral (HART et al, 2002; PARASHAR et al., 2003).

A importância epidemiológica destes vírus está relacionada à elevada frequência de infecções, que podem ocorrer de forma subclínica ou se expressar como gastroenterite de forma moderada ou grave, manifestando-se com o aparecimento de vômitos, febre moderada/alta e diarreia aquosa que perduram por 5 a 8 dias, podendo levar à desidratação (DOAN et al., 2003; MOTA-HERNANDEZ et al., 2003; SANTOS et al., 2003; ESTES e KAPIKIAN, 2007; PALUMBO et al., 2009).

Os episódios diarreicos repetidos podem ocasionar desnutrição crônica, com retardo no desenvolvimento estado-ponderal e, até mesmo, da evolução intelectual, podendo evoluir ao óbito caso não haja intervenção hospitalar precoce (BRASIL, 2005).

O RV ocasiona em média 39% dos casos diarreicos que culminam em hospitalizações e é responsável por cerca de 520.000 óbitos entre crianças menores de cinco anos de idade a cada ano, estimando-se que > 85% desses óbitos ocorram em países da África e Ásia (PARASHAR et al., 2006; OMS, 2009b).

Embora os índices de morbidade sejam similares, se comparados os países desenvolvidos com aqueles em desenvolvimento, o impacto em termos de mortalidade é sobretudo mais expressivo nessas últimas regiões, provavelmente por estar associado a fatores como a maior prevalência de subnutrição ou menor acessibilidade a terapias de reidratação (PARASHAR et al., 2003; UNICEF e OMS, 2009).

Devido ao impacto do RV na saúde pública, várias estratégias para o desenvolvimento e implantação de uma vacina segura e eficaz contra este agente já foram realizadas, principalmente em países em desenvolvimento. No Brasil, em março de 2006, foi introduzida no calendário básico de imunizações para crianças a Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH), produzida pela Glaxo SmithKline, a qual obteve resultados satisfatórios contra gastroenterites graves e hospitalizações por tal vírus (LINHARES e BREESE, 2000; LINHARES et al., 2006a; LINHARES e VILLA, 2006; CARVALHO-COSTA et al., 2009).

Visando ainda o controle das infecções causadas por este agente em razão de sua ampla diversidade genética, o monitoramento das amostras virais, assim como sua caracterização, torna-se imprescindível para o conhecimento das

cepas circulantes e o impacto da vacina, proporcionando um melhor entendimento a respeito da genética dos RV.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

II.1- Histórico

A busca por agentes etiológicos que causavam diarreia grave em crianças despertou o interesse de pesquisadores a investigar bactérias, vírus ou parasitas. Contudo, apesar de significativas descobertas, até meados da década de 60, não havia sido detectado um agente responsável pela maioria dos casos graves de gastroenterite (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A relevância dos agentes virais começou a ser elucidada no início da década de 70 com a descoberta do vírus Norwalk, em 1972, e posteriormente do RV, em 1973, comprovando-se a participação desses agentes na maioria dos casos diarréicos de origem não bacteriana (KAPIKIAN et al., 1972; BISHOP et al., 1973).

Em um estudo conduzido por Bishop et al. (1973) em Melbourne, Austrália, com crianças que apresentavam diarreia grave de origem não bacteriana, o RV foi detectado pela primeira vez em finas seções do epitélio duodenal, utilizando a técnica de visualização direta por microscopia eletrônica. Foi denominado inicialmente de Duovírus, porém, considerando a sua similaridade morfológica ao de uma roda, foi posteriormente denominado de Rotavírus como demonstrado na figura 1 (FLEWETT e WOODE, 1978).

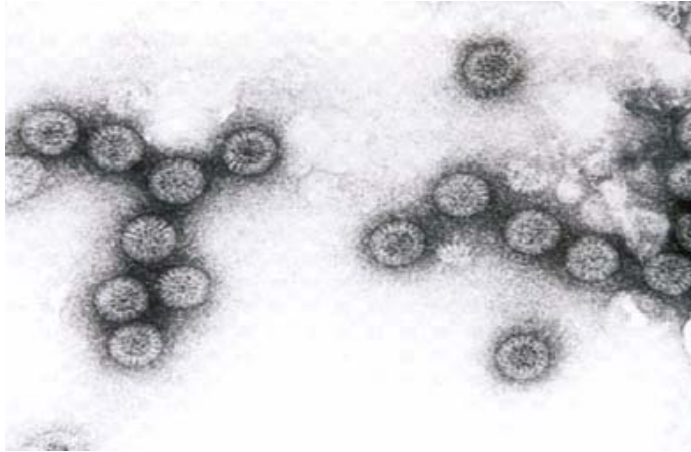


Figura 1. Micrografia eletrônica de extrato fecal contendo partículas completas de rotavírus.
Cortesia de Dr^a. Yvone Gabbay, IEC, 2004.

No Brasil, a primeira detecção do RV ocorreu no ano de 1976, em Belém, Pará, em um estudo-piloto conduzido no Hospital da Santa Casa de Misericórdia envolvendo crianças com gastroenterite aguda sob atendimentos ambulatorial e hospitalar (LINHARES et al., 1977).

Desde então, inúmeros estudos epidemiológicos foram realizados, enfatizando a importância desses agentes virais em âmbito mundial e demonstrando sua diversidade genética (WOODS et al., 1992; LINHARES, 2000; LUZ et al., 2005; SANTOS e HOSHINO, 2005; MATTHIJNSSENS et al., 2009).

II.2 - Rotavírus

II.2.1 - Partícula viral

O RV compreende um gênero específico da família *Reoviridae* e contém genoma formado por ácido ribonucléico de dupla cadeia (dsRNA) de natureza segmentada (MERTENS, 2004).

A partícula viral infecciosa mede cerca de 100 nanômetros (nm) de diâmetro, é desprovido de envelope lipoprotéico e dotado de nucleocapsídeo, exibindo simetria icosaédrica. As partículas completas são constituídas por três camadas proteicas concêntricas, sendo capsídeo externo, intermediário e interno, o qual está intimamente associado ao genoma viral conforme demonstrado na Figura 2 (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

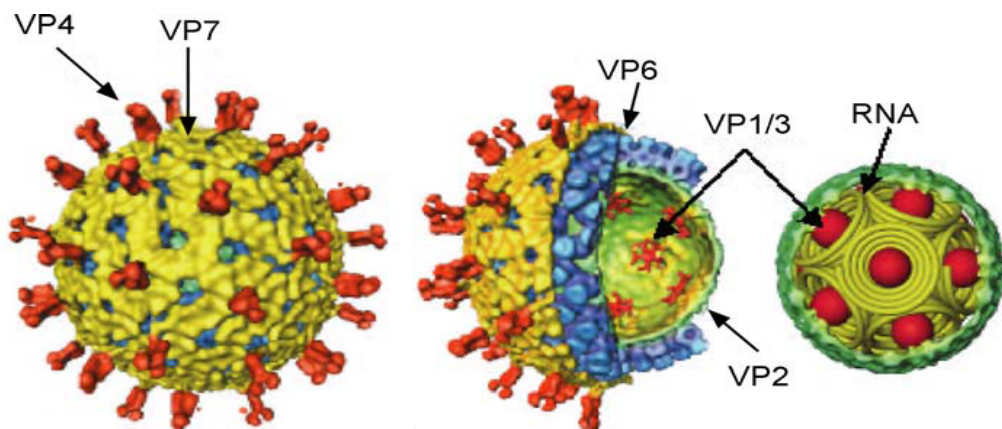


Figura 2: Detalhes da estrutura tridimensional do rotavírus demonstrando as proteínas dos capsídeos externo, intermediário e interno (adaptada de Jayaram et al., 2004).

O capsídeo interno é formado pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, sendo a proteína VP2, a mais abundante e a que mais interage com a proteína VP6 e com o genoma viral (JAYARAM et al., 2004).

O capsídeo intermediário é composto pela proteína VP6, constituindo 51% do vírus, determina grupos e subgrupos de RV e é uma das proteínas mais importantes do vírus (JAYARAM et al., 2004; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

O capsídeo externo é constituído pelas proteínas VP4 e VP7, as quais estão envolvidas na imunidade do hospedeiro. A VP7 é uma **G**licoproteína, compõe

30% da partícula viral e designa o genótipo G de RV, enquanto que a VP4 designa o genótipo P e compõe as 60 projeções (espículas) com cerca de 10 a 12 nm de comprimento localizadas no capsídeo externo, compreendendo 1,5% da partícula viral (JAYARAM et al., 2004; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

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

II.2.2 – Classificação

O RV pode ser classificado em grupo, subgrupo e genótipo. Até o momento, existem 7 grupos distintos (A-G) designados pela proteína VP6, sendo que os grupos A, B e C têm sido detectados acometendo seres humanos e animais, enquanto os demais foram identificados apenas em animais. O grupo de maior relevância epidemiológica é o grupo A, o qual é o responsável pela maioria dos episódios diarreicos, apesar do grupo C já ter sido detectado em surtos na região amazônica (ESTES e KAPIKIAN, 2007; GABBAY et al., 1999; GABBAY et al., 2008).

Dentro do grupo A, são definidos subgrupos (SG) e sorotipos/genótipos. Os SG são designados de SG I, SG II, SG I+II e SG não-I/não-II. Atualmente, baseando-se na caracterização molecular da proteína VP6, os mesmos podem ser distinguidos em dois genogrupos: Genogrupo I correspondendo ao SG I e genogrupo II, o qual reúne os demais SG (DESSELBERG, 1996; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002).

Os sorotipos/genótipos consistem em uma classificação binária designada pelos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7. Os sorotipos são determinados

por anticorpos monoclonais específicos e testes de neutralização, enquanto que os genótipos são determinados por métodos de biologia molecular. Até o momento, foram detectados 23 genótipos/sorotipos G e 31 diferentes genótipos P, com 14 sorotipos P (ESTES e KAPIKIAN, 2007; ABE et al., 2009; URSU et al., 2009).

Devido à grande diversidade de genótipos de RV existentes, fez-se necessário a concepção de uma nomenclatura própria para definir sorotipos e genótipos, dessa forma, descreve-se o sorotipo P, seguido do genótipo P entre colchetes e depois o tipo G, apresentado desta forma devido seu genótipo e seu sorotipo serem correlacionados (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Matthijnssens et al. (2008), propuseram uma nova classificação para o RV, baseado na caracterização molecular e análise filogenética do genoma completo de 53 protótipos. Esta nova classificação foi 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.

II.2.3 - Genoma Viral

O genoma viral do RV reúne 18.556 pares de bases (pb), divididos em 11 segmentos de dsRNA, que codificam 12 proteínas virais, sendo seis estruturais (VP1 – VP4; VP6 e VP7) e seis não estruturais (NSP1 – NSP6). Os segmentos variam de 667 pb a 3.302 pb, sendo que cada segmento é responsável pela síntese de uma única proteína, com exceção do 11º que codifica duas proteínas (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A segmentação do genoma viral, assim como a diferença de massa molecular entre os segmentos, permite que este vírus seja caracterizado pelo seu padrão eletroforético, que pode ser visualizado pela separação dos mesmos pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), técnica que é relativamente fácil e rápida, de acordo com o demonstrado na figura 3 (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

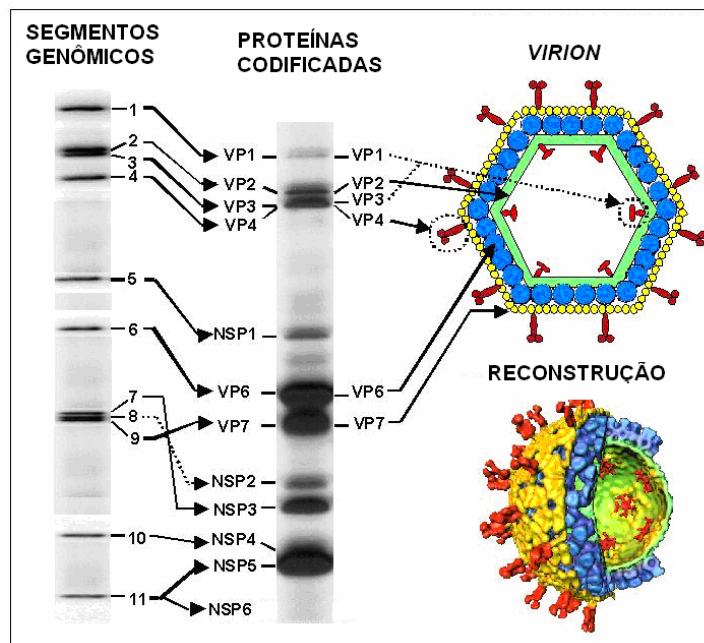


Figura 3: Representações esquemática e tridimensional da partícula viral de RV-A símio (SA11) com segmentação genômica (Adaptada de Prasad et al., 1996.)

De acordo com Estes e Kapikian (2007), a análise do padrão eletroforético permite que os segmentos sejam distribuídos em quatro classes distintas, com base na ordem de migração no gel, sendo: classe I, segmentos de alto peso molecular (genes 1 a 4); classe II, segmentos de médio peso molecular (genes 5 e 6); classe III, distinto trio de segmentos (genes 7 a 9) e classe IV, segmentos de baixo peso molecular (genes 10 e 11).

Baseando-se na mobilidade do segmento 11 do genoma viral, os perfis eletroforéticos podem ser caracterizados como longo, curto e supercurto, equivalendo, geralmente, cada perfil a determinados genótipos G, como o perfil longo aos tipos G1, G3, G4 e G9, o perfil curto ao tipo G2 e o perfil super curto ao genótipo G8 (MATSUI et al., 1990; TANIGUCHI e URASAWA, 1995).

Cada perfil eletroforético de RV geralmente exibe uma configuração que é típica do seu grupo de origem (Figura 4), sendo, esta técnica bastante empregada em estudos de caráter epidemiológico, já que possibilita a detecção de polimorfismo genômico nas amostras circulantes (NAKAGOMI et al., 1988b, 1999; MASCARENHAS et al., 1988, 1997 ; MATSUI et al., 1990; TANIGUCHI e URASAWA, 1995; AHMED et al., 2005; PAUL et al., 2006; ESTES e KAPIKIAN, 2007; MODARRES et al., 2008; CHOUIKHA et al., 2009).

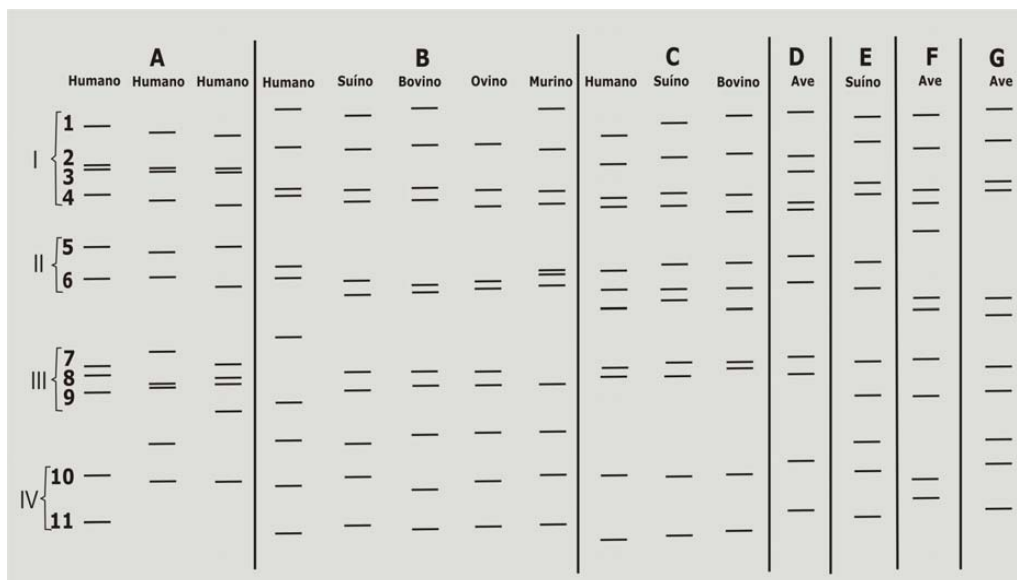


Figura 4: Perfis eletroforéticos do genoma viral (dsRNA) dos rotavírus (Adaptada de Kapikian et al., 2001)

Os segmentos genômicos são estruturalmente semelhantes e ricos em adenina e uracila, apresentando na fita positiva a extremidade 5'-guanidina seguida

de uma sequência conservada contida na região 5' não codificadora. Após o códon de iniciação, dá-se início a fase aberta de leitura (ORF), a qual codifica os produtos protéicos, seguida do códon de finalização e outra região não codificadora, situada na extremidade 3', que é finalizada com 3'-citidina terminal, segundo demonstrado na Figura 5 (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

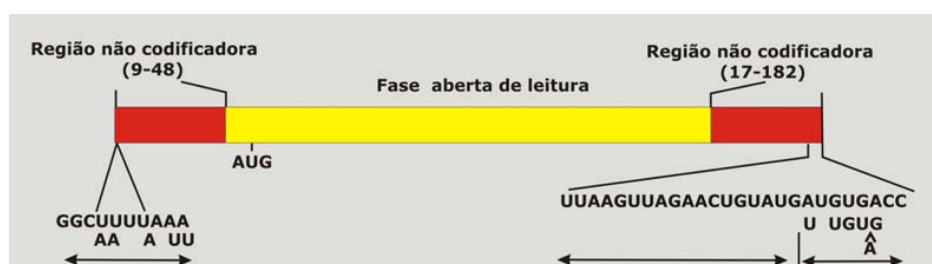


Figura 5: Estrutura do gene do rotavírus (Adaptada de Estes e Kapikian, 2007)

II.2.4 – Proteínas

II.2.4.1 - Estruturais:

As proteínas VP1, VP2 e VP3 formam o capsídeo interno. A proteína VP1 é uma RNA polimerase dependente de RNA e a proteína VP3 uma metil e guanililtransferase, estando ambas presentes em menor quantidade e estando envolvidas nas funções enzimáticas requeridas para o mecanismo de transcrição e revestimento do genoma viral (VALENZUELA et al., 1991; CHEN et al., 1999; JAYARAM et al., 2004; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A VP2 é a proteína mais abundante de sua camada e mantém estreita interação com o capsídeo intermediário e com o genoma, fazendo parte do processo

de replicação viral, em face a sua propriedade de se vincular ao dsRNA através de seus resíduos N-terminais (JAYARAM et al., 2004).

A proteína VP6 compõe o capsídeo externo e devido sua organização na partícula viral, está envolvida nas duas principais funções do vírus, quais sejam, o processo de entrada na célula hospedeira e a replicação viral, por meio de sua interação com a proteína VP2 e com as proteínas VP4 e VP7 (JAYARAM et al., 2004; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A VP7 é uma glicoproteína que compõe o capsídeo externo e induz a formação de anticorpos neutralizantes. A função precisa desta proteína nas primeiras interações do vírus com a célula hospedeira ainda não foi bem elucidada. Contudo, acredita-se que ela possa modular a função da proteína VP4 durante o processo de aderência e penetração, podendo também interagir com as moléculas da superfície celular do hospedeiro, após a interação inicial conduzida pela proteína VP4 (BEISNER et al., 1998; MENDEZ et al., 1996; 1999; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A especificidade do genótipo/sorotipo G é devido ao elevado grau de divergência na sequência do gene que codifica a proteína VP7, a qual apresenta uma *ORF* composta de 326 resíduos de aminoácido (aa) com dois códons de iniciação. Estudos com anticorpos monoclonais identificaram regiões antigênicas no gene da VP7, descrevendo-se até o momento nove regiões variáveis (VR) e dentro destas, seis regiões antigênicas (RA), quais sendo: A (aa 87 - 101), B (aa 143 - 152), C (aa 201 - 221), D (aa 291), E (aa 189 - 190) e F (aa 235 - 242), como descrito na figura 6 (DYALL-SMITH et al., 1986; COULSON e KIRKWOOD, 1991; KOBAYASHI et al., 1991; DUNN et al., 1993; KIRKWOOD et al., 1993; CIARLET et al., 1994; LAZDINS et al., 1995; ZAO et al., 1999).

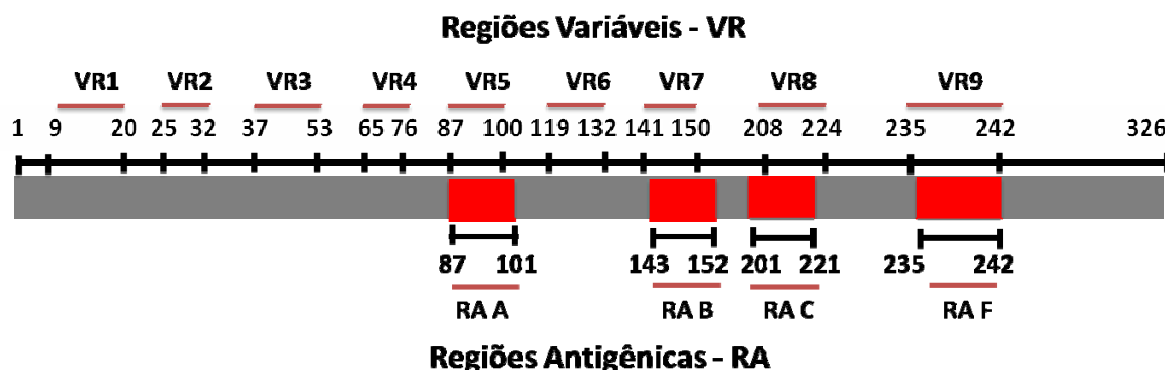


Figura 6: Demonstração das regiões variáveis VR1 (aa 9 - 20), VR2 (aa 25 - 32), VR3 (aa 37 - 53), VR4 (aa 65 - 76), VR5 (aa 87 - 100), VR6 (aa 119 - 132), VR7 (aa 141 - 150), VR8 (aa 208 - 224) e VR9 (aa 235 - 245) e das principais regiões antigênicas (A, B, C e F) presentes no gene VP7.

A proteína VP4, juntamente com a VP7, forma o capsídeo externo da partícula viral. É clivada por ação da enzima proteolítica tripsina, dando origem a um fragmento N-terminal, VP8*, e um fragmento C-terminal, VP5*, processo este que confere a esta proteína uma função determinante para a entrada do vírus na célula hospedeira. Esta proteína tem importante papel na aderência e penetração do vírus, também estando implicada na hemaglutinação, neutralização e virulência. Até o momento, tem-se o conhecimento de cinco epítomos de neutralização, recentemente mapeados, dentro da subunidade VP8* da proteína VP4, localizados nas posições aminoacídicas M1-L10, I35-R44, I55-D66, V115-G123 e L223-P234 (KOVACS-NOLAN et al. 2003; JAYARAM et al., 2004; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

O peptídeo VP5* possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírus a célula hospedeira e também é associado com a atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4, enquanto que o peptídeo VP8* contém a maior parte dos epítomos que são associados a reações tipo-específicas (JAYARAM et al., 2004).

II.2.4.2 - Não estruturais

A NSP1 é codificada pelo quinto segmento do dsRNA viral, sendo a proteína menos conservada por apresentar elevada diversidade entre as amostras. Esta proteína é associada ao citoesqueleto, contudo, evidenciou não ser uma proteína essencial a replicação e virulência viral, já que não está presente em todas as variantes. Recentemente, demonstrou estar envolvida no escape imune viral, atuando como antagonista do interferon tipo I (IFN) por diversos mecanismos, assim como na regulação da apoptose nas primeiras horas da infecção (MERTENS, 2004; ESTES e KAPIKIAN, 2007; GRAFF et al., 2009; BAGCHI et al., 2010).

A NSP2 localiza-se no viroplasma e está envolvida na replicação e empacotamento do RNA viral juntamente com a proteína NSP5. É codificada pelo oitavo segmento do RNA viral e apresenta atividades de NTPase e de desestabilização de hélices de ácidos nucléicos (TARAPOREWALA et al., 1999; JAYARAM et al., 2004; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A proteína codificada pelo sétimo segmento do genoma viral é a NSP3, a qual atua na regulação da tradução viral e previne a degradação do mRNA por nucleases celulares, além de possivelmente estar envolvida na disseminação sistêmica viral (MOSEL e RAMIG, 2002; JAYARAM et al., 2004; FUJITA et al., 2010).

A NSP4 é uma glicoproteína codificada pelo décimo segmento do dsRNA viral, transmembrana e está localizada, especificamente, no retículo endoplasmático da célula infectada, com significativo papel na morfogênese e patogênese viral (JAGANNATH et al., 2006; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A proteína NSP4 tem sido classificada geneticamente em 6 tipos, sendo: A, B, C, D, E e F, de acordo com os padrões KUN, WA, AU-1, EW, CH-1, P21-5, respectivamente, todavia, apenas os genótipos A, B e C foram detectados acometendo humanos (CUNLIFFE et al., 1997; HORIE et al., 1997; KIRKWOOD e PALOMBO, 1997; CIARLET et al., 2000; MORI et al., 2002; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2003; LIN e TIAN, 2003; KHAMRIN et al., 2008).

A NSP5 é a maior proteína codificada pelo décimo primeiro segmento. Demonstrou ter atividade autoquinase e, juntamente com a NSP2, evidenciaram serem necessárias e suficientes para a formação do viroplasma (TARAPOREWALA e PATTON, 2004; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A proteína NSP6 também é codificada pelo décimo primeiro segmento, localiza-se no viroplasma e interage com a NSP5, propriedade esta que evidencia sua participação na replicação e encapsidação viral (TARAPOREWALA e PATTON, 2004; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

II.2.5 - Mecanismos de evolução genética

O genoma naturalmente segmentado confere ao RV uma elevada variabilidade genética, a qual, nos seres humanos, pode se apresentar por meio de mecanismos distintos, quais sejam: mutações pontuais, rearranjo genético (recombinação intramolecular) e reestruturação genética (ITURRIZA-GOMARA et al, 2001).

As mutações pontuais são substituições de bases nucleotídicas que podem ocorrer com mais frequência, sendo algumas conservadas e estendidas para a progênie do vírus. A acumulação de tais mutações poderá dar origem a novas

linhagens ou sublinhagens genéticas as quais assumem relevância epidemiológica podendo causar surtos (MAUNULLA e VON BONSDORFF, 1998; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001).

As alterações na sequência genômica podem ocorrer devido a deleções ou duplicações, caracterizando-se desta forma o rearranjo genético, o qual ocorre com mais frequência em genes que codificam proteínas não estruturais (Figura 7). A contribuição deste mecanismo para a diversidade genética do RV é menor *in natura* quando comparado com os outros tipos de variações. Especulava-se que tal mecanismo ocorria apenas em crianças imunodeficientes sendo, posteriormente, identificado também em animais e crianças saudáveis (PEDLEY et al., 1984; DESSELBERG, 1996; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001; CAO et al., 2008).

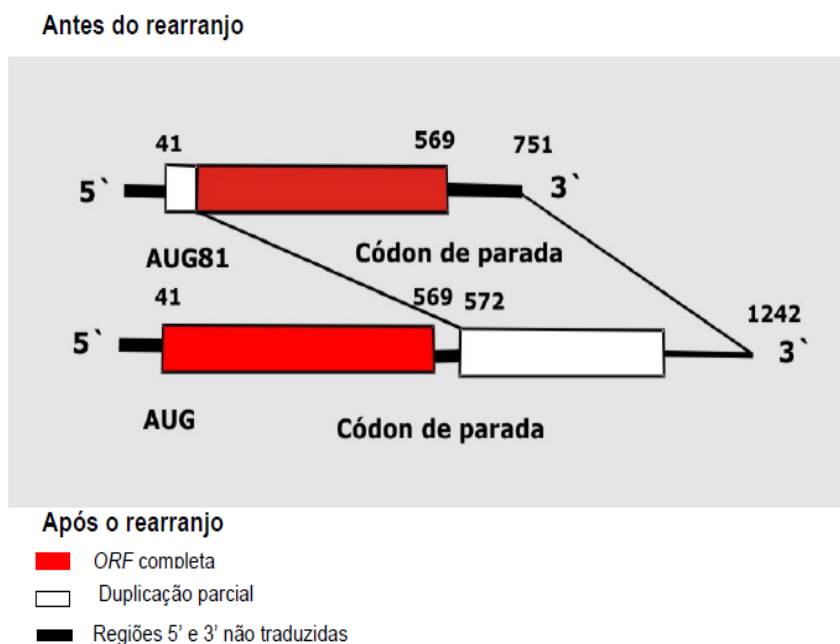


Figura 7: Rearranjo no genoma do rotavírus (Retirado e adaptado de Desselberger, 1996)

A reestruturação genética ocorre quando há a permuta de material genético entre vírus distintos, dentro do mesmo grupo, podendo gerar novas

variantes do RV, como descrito na figura 8. Esse fenômeno ocorre principalmente em países em desenvolvimento, provavelmente por estar associado a fatores como maior convívio do homem com o animal, proporcionando maior probabilidade de ocorrer infecções mistas e provavelmente transmissão entre espécies (MASCARENHAS et al., 1989, 2002, 2007a, 2007b; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001; JAIN et al., 2001; TEODOROFF et al., 2005; MARTELLA et al., 2006; McDONALD et al., 2009).

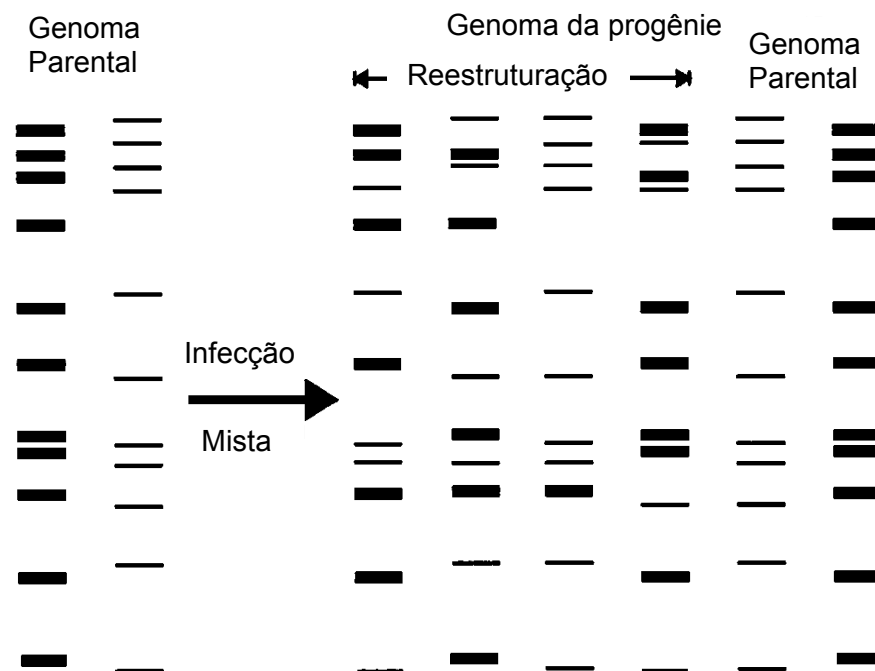


Figura 8: Reestruturação genética entre rotavírus em uma co-infecção (Retirado e adaptado de Ramig, 1997).

A detecção de RV animal acometendo seres humanos tem sido cada vez mais frequente, podendo ser tanto em transmissão direta do vírus como por contribuição de genes em reestruturação genética com segmentos genômicos de RV de origem humana, apesar de cada espécie de hospedeiro possuir barreiras e

restrições para o desenvolvimento do vírus (ITURRIZA-GOMARA et al., 2001; MATTHIJNSSENS et al., 2006; BÁNYAI et al., 2009).

II.2.6 – Replicação viral:

Em virtude da transmissão deste agente ser basicamente fecal-oral, após sua ingestão, as partículas virais evoluem para o intestino delgado, penetrando nas células epiteliais maduras que recobrem as microvilosidades por mecanismo ainda não plenamente elucidado. As partículas virais replicam-se no citoplasma das células infectadas, danificando permanentemente as mesmas e impedindo a efetiva absorção de fluidos e nutrientes (GRAY et al, 2008).

O capsídeo externo está diretamente envolvido no processo infeccioso, atuando na adesão celular, penetração da membrana e entrada na célula. O processo de penetração do vírus inicia-se pela clivagem da proteína VP4 pela tripsina, gerando os polipeptídeos VP5* e VP8*, os quais interagem com receptores contendo ácido siálico. Contudo, existem RV que não se ligam a este receptor, os chamados ácido siálico independentes, sendo sugerido a participação de glicoconjugados (glicoproteínas, glicolipídeos e glicofosfolipídeos). (ZARATE et al., 2000; HEWISH et al., 2000; GUERRERO et al., 2000; LOPES e ARIAS, 2004; CIARLET et al., 2001, 2002; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Vários tipos de proteínas celulares estão implicadas 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 hsc 70, podem estar envolvidas na interação da VP5*, enquanto que as integrinas $\alpha x\beta 2$ e $\alpha v\beta 3$, podem interagir com a VP7 (ZARATE et

al., 2000, 2003; HEWISH et al., 2000; GUERRERO et al., 2000; CIARLET et al., 2001; LOPES e ARIAS, 2004, 2006)

Tem sido proposto duas vias de internalização do RV: a penetração direta via membrana plasmática ou endocitose mediada por receptores. Nesta entrada, ocorre a perda do revestimento externo do RV por ação enzimática devido às baixas concentrações de íons cálcio, dando origem a partículas de dupla camada (DLP), a qual será translocada através do plasma ou da membrana endossomal até o citoplasma celular (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 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).

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 retículo endoplasmático (RE) (FABBRETTI et al., 1999; SILVESTRE et al., 2004). Tais partículas 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 por uma fina camada de proteína que constitui o capsídeo externo. Por

fim, as partículas virais maduras são liberadas por meio da lise celular (RAMIG, 1997; JAYARAM et al., 2004; BALL et al., 2005; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

II.2.7 – Epidemiologia molecular

Os estudos conduzidos até o momento demonstraram que a diversidade genética do RV do grupo A (RV-A) circulantes no mundo é ampla (LEITE et al, 1996, 2008; CUNLIFFE et al., 1999; GOUVEA e SANTOS, 1999; GUSMÃO et al., 1999; UNICOMB et al., 2000; GONZÁLES-LOSA et al., 2005; SANTOS e HOSHINO, 2005; GURGEL et al., 2008).

Presentemente, existem 23 genótipos G e 31 P, dentre os quais se descrevem 11 tipos G e 14 tipos P infectando seres humanos, em diferentes combinações (GENTSCH et al., 2005; RAHMAN et al., 2005a; SANTOS e HOSHINO, 2005; URSU et al., 2009).

As combinações binárias dos genótipos de RV-A podem ser usuais e não-usuais. As usuais reúnem os genótipos G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8] sendo frequentemente encontradas e correspondendo a 90% das infecções em várias partes do mundo. O genótipo G9, associado aos tipos P[8] e P[6], foi detectado em 4,1% dos episódios diarréicos causados por RV-A, emergindo como um genótipo usual em escala global (SANTOS e HOSHINO, 2005).

As demais combinações, consideradas não usuais, são menos frequentes e representam 4,9% das infecções descritas em todo o mundo, com destaque para os países em desenvolvimento. A emergência de genótipos não usuais pode surgir a partir de infecções mistas, sugerindo uma constante troca de material genético entre as amostras de RV-A humano ou entre amostras de RV-A humano e animal (DUNN

et al., 1993; GOUVEA et al, 1994; STEELE et al., 1995; MASCARENHAS et al, 1999, 2002; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001; MAUNULLA e VON BONSDORFF, 2002; SANTOS et al, 2003; SANTOS e HOSHINO, 2005; MASCARENHAS et al., 2007a).

As infecções mistas têm sido detectadas na América do Sul, na Ásia, África, América do Norte, Austrália e Europa na proporção de 15%, 12%, 10%, 4,8%, 2,3% e 1,8%, respectivamente, notando-se maior prevalência nos países em desenvolvimento (SANTOS e HOSHINO, 2005).

Barril et al (2006) afirmam, assim como em outros estudos, que a elevada prevalência de infecções mistas pode propiciar uma maior mutação genética *in vivo* do RV, podendo emergir novas combinações binárias não usuais. Tal fato ocorre principalmente nos países em desenvolvimento, onde há maior prevalência de infecções mistas e diversidade antigênica de RV, quando comparados com os países em desenvolvimento (GENTSCH et al., 1996; BÁNYAI et al., 2004a).

Este fenômeno pode causar um considerável impacto no processo de controle e prevenção contra o RV, principalmente no que concerne a implantação de imunizantes seguros e eficazes, propiciando o surgimento de novas combinações e conseqüentemente genótipos não usuais (SANTOS e HOSHINO, 2005; FREITAS et al., 2008).

Um genótipo não usual que está sendo considerado emergente em alguns países é o G12, o qual foi caracterizado em várias partes do mundo, com primeira detecção nas Filipinas na década de 80 (TANIGUCHI et al., 1990). A partir de 2000, foi reportado no Japão (SHINOZAKI et al., 2004), Tailândia (PONGSUWANNA et al., 2002), EUA (GRIFFIN et al., 2002), Índia (DAS et al.,

2003), Argentina (CASTELLO et al., 2006) e Brasil, entre outros (PIETRUCHINSKI et al., 2006; SOARES, comunicação pessoal).

Estudos envolvendo a caracterização molecular de RV são importantes, tanto para o monitoramento de amostras circulantes quanto para identificar a presença de novos genótipos, principalmente no cenário pós implantação da vacina, o qual pode sofrer interferências a longo prazo devido a tal diversidade (RAMACHANDRAN et al., 1998; RAHMAN et al., 2005a; LEITE et al., 2008; KHAMRIN et al., 2009; MATTHIJNSSENS et al., 2009).

O genótipo G1, antes da implantação da vacina contra RV-A, era o mais prevalente entre as amostras consideradas usuais. Contudo, na era pós-vacina, este genótipo foi detectado em 3% das amostras analisadas, devido à predominante detecção do genótipo G2 (SANTOS e HOSHINO, 2005; LEITE et al., 2008; SOARES et al. 2010; OLIVEIRA, comunicação pessoal).

Entretanto, após a implantação da vacina observou-se a predominância dos genótipos G2 e G9 sobre os outros tipos de RV-A em países que adotaram a vacina Rotarix® e a predominância do genótipo G3 em países que utilizam a vacina Rotateq® (KIRKWOOD et al., 2009; BOOM et al., 2010).

No Brasil, observou-se a predominância do genótipo G2 sobre os outros tipos de RV, fato este, provavelmente devido a uma seleção ocasionada após a implantação da vacina ou mesmo a um comportamento cíclico deste genótipo que circula a cada dez anos (LEITE et al., 2008; CARVALHO-COSTA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2008).

Mascarenhas et al. (2010), em estudo desenvolvido no sul do Pará nos anos de 2006 e 2008, envolvendo crianças com gastroenterite aguda, detectaram o genótipo G2 em 90% das amostras analisadas, revelando uma flutuação do genótipo

G2 e a identificação de duas novas possíveis sublinhagens na linhagem II (IIa e IIc). Neste estudo não foram observadas divergências significativas na composição aminoacídica, se comparados, crianças vacinadas e não vacinadas.

II.2.7.1 - **Genótipo G9**

A emergência ou reemergência do genótipo G9 em meados da década de 1990 tem sua importância em vários aspectos incluindo a epidemiologia, origem evolucionária e composição genética do vírus, assim como o desenvolvimento de vacinas contra este sorotipo.

O RV-A de genótipo G9 foi isolado pela primeira vez no Estados Unidos (EUA) em 1983, a partir de uma criança hospitalizada por gastroenterite com 18 meses de idade (CLARK et al., 1987). Posteriormente, em 1985, no Japão, este mesmo genótipo foi detectado (NAKAGOMI et al., 1988a). Contudo, em ambos os países, esse genótipo não foi detectado por cerca de uma década, sendo isolado em diferentes localidades do mundo, como na Índia em 1986 e na Tailândia em 1989 (DAS et al., 1993; URASAWA et al., 1992). Em meados da década de 90, o genótipo G9 foi detectado em vários países, como na Índia em 1993 (DAS et al., 1994), no EUA, Reino Unido e Bangladesh em 1995 (UNICOMB et al., 1999; CUBITT et al., 2000; GRIFFIN et al., 2000), em Japão e Tailândia em 1996 (MANEEKARN e USHIJIMA, 2000; OKA et al., 2000) e em Malawi no ano de 1997 (CUNLIFFE et al., 1999), entre outros.

Desde então, o G9 é considerado um genótipo cosmopolita, tendo sido isolado em diversos países dos cinco continentes com elevados índices de detecção e indicação de declínio nos últimos anos (KIRKWOOD et al., 2003; STEELE e

IVANOFF, 2003; WILHELMI et al., 2003; PARRA et al., 2005; REIDY et al., 2005; STEYER et al., 2005; CARMONA et al., 2006; KHAMRIN et al., 2006; 2007; YANG et al., 2007; STUPKA et al., 2007, 2009; LEITE et al., 2008; NARANJO et al., 2008; SOLBERG et al., 2009; KHANANURAK et al., 2010; ZURIDAH et al., 2010)

Barril et al (2006), em estudo desenvolvido na Argentina, comprovaram a circulação do genótipo G9 na década de 80, tornando-se então o país da América Latina que possui a descrição mais antiga de G9.

No Brasil, este genótipo, foi detectado pela primeira vez em Belém, Pará, em frequência de 1,2% pela técnica da imunomicroscopia eletrônica em fase sólida em espécimes fecais de crianças participantes de um estudo clínico com uma vacina tetravalente contra RV no período de 1990-1992 e re-emergiu em Belém com prevalência de 17% em estudo conduzido de 1998 a 2000 (LINHARES et al., 1996; MASCARENHAS et al., 2003).

Posteriormente foi isolado no Rio de Janeiro, Goiânia, Salvador, São Paulo, Acre, disseminando-se por todo Brasil (ARAÚJO et al., 2001; SANTOS et al., 2001, 2005; SOUZA et al., 2003; VOLOTÃO et al., 2005; CARMONA et al., 2006; MONTENEGRO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008).

Atualmente, o G9 é descrito como o segundo genótipo mais frequente no Brasil, correspondendo a 11% das infecções positivas para RV-A (LEITE et al., 2008). Estudos desenvolvidos na Austrália demonstraram que em estados no qual a vacina utilizada é a Rotarix®, há maior prevalência dos genótipos G2 e G9 (KIRKWOOD et al., 2009).

No Norte do Brasil, o genótipo G9 re-emergiu no final da década de 1990, e, desde então, tem sido caracterizado em todos os estudos conduzidos,

predominando em surtos ocorridos com cerca de 40% dos casos (MASCARENHAS et al., 2003; OLIVEIRA, comunicação pessoal).

Atualmente, surtos diarreicos ocasionados por RV tem sido reportado na Guatemala, República Dominicana e México. Nos dois primeiros, os elevados casos de RV foram confirmados, todavia o genótipo predominante ainda não foi divulgado, enquanto que no México, diferentes genótipos foram detectados, com amplo predomínio do G9 com padrão eletroforético curto (OPAS, 2010)

A diversidade genética do G9 possibilita a distinção deste genótipo em linhagens e sublinhagens. Inicialmente, a filogenia do genótipo G9 apresentou três linhagens distintas: linhagem I, representada por amostras isoladas no EUA (WI61) e no Japão (F45) em 1983; linhagem II, representada pela amostra 116E, isolada na Índia em 1986; linhagem III representada pelas amostras contemporâneas (CAO et al., 2008). Posteriormente, Rahman et al. (2005b) propuseram a classificação do G9 em quatro linhagens distintas.

Estudo levado a efeito por Phan et al. (2007), propuseram nova classificação para a filogenia do G9 em 6 linhagens e 11 sublinhagens. Entretanto, Martinez-Laso et al. (2009), em análise recente, discordaram quanto a existência das sublinhagens propostas, confirmando apenas a classificação em 6 linhagens.

Ao contrário dos outros genótipos G de RV-A que geralmente são detectados em combinação com um tipo P específico, o genótipo G9 já foi detectado com diversos genótipos P, apresentando diferentes eletroferotipos e subgrupos específicos, além de ter sido isolado em várias localidades em todo o mundo, tornando, este genótipo o mais disseminado e denominado “promíscuo” (HOSHINO et al., 2004).

Contudo, apesar de sua variedade, este genótipo é detectado principalmente associado aos tipos P[6] e P[8], representando 4,1% das infecções detectadas em escala global (SANTOS e HOSHINO, 2005).

No período de 1990 a 2004, o genótipo G9 associado ao tipo P[8], foi responsável por cerca de 5% das infecções por RV-A em escala global, estando 15% destes casos na América do Sul (GENTSCH et al., 2005).

O genótipo P[8] é um dos tipos P mais disseminados no mundo, estando envolvido em cerca de 80% das infecções por RV-A e associado aos diversos tipos G, o que torna este genótipo provavelmente o melhor adaptado aos tipos G circulantes (SANTOS e HOSHINO, 2005; RAHMAN et al., 2008).

A análise filogenética de amostras P[8] detectadas em escala global permitiu sua classificação em quatro linhagens distintas, quais sendo: Wa-like (linhagem P[8]-1), F45-like (linhagem P[8]-2), OP354-like (linhagem P[8]-3) e MW670-Like (linhagem P[8]-4) (MAUNULLA e VON BONSDORFF, 1998; GOUVEA et al., 1999; ARISTA et al., 2005b).

II.3 – Infecção por rotavírus:

II.3.1 - Transmissão:

O RV é excretado em elevada concentração, com cerca de um trilhão de partículas virais por milímetro cúbico de espécime fecal, por evacuação. O pico máximo de excreção se dá entre o 3º ou 4º dias após o início dos sintomas, sendo que são necessários apenas dez vírions para desencadear uma infecção no homem (WARD et al., 1986; LEBARON et al., 1990; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A transmissão viral é basicamente fecal-oral, contudo, outras vias têm sido estudadas, como trato respiratório e contaminação através de fômites como possíveis vias de infecção (COOK et al., 1990; ZHENG et al., 1991; SATTAR et al., 1994; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Apesar de estudos reportarem a detecção de RV-A no trato respiratório superior, há outros afirmando a inviabilidade de tal transmissão (VOLLET III et al., 1981; ZHAORI et al., 1991; ZHENG et al., 1991). Por outro lado, Azevedo et al. (2005), em estudo conduzido com suínos, inocularam via intranasal o RV-A humano e observaram o desenvolvimento de diarreia nos animais.

A estabilidade físico-química do RV contribui para uma eficiente transmissão deste vírus, sendo observada a persistência de infecções por RV em enfermarias neonatais e a elevada frequência de infecções nosocomiais (ESTES e KAPIKIAN, 2007). Teixeira (2010), em estudo desenvolvido no Rio de Janeiro em ambiente hospitalar, detectaram a contaminação de RV-A em diversas superfícies, sugerindo a utilização deste vírus como marcador biológico de contaminação de superfícies hospitalares.

Em estudo conduzido em Belém, Linhares et al. (2002) observaram que a cada nove neonatos que desenvolveram diarreia por RV-A, cinco casos foram infecções nosocomiais.

A transmissão entre espécies tem sido registrada sendo mais provável de ocorrer nos países em desenvolvimento, onde há influência das condições insalubres de higiene e do maior convívio dos homens com animais, principalmente bovino, suíno e aves (JAIN et al., 2001; TEODOROFF et al., 2005; MARTELLA et al., 2006).

Estudos recentes foram mais esclarecedores no que concerne à transmissão entre espécies. Na Bélgica, Matthijnssens et al. (2006) isolaram amostra de RV-A de uma criança com gastroenterite, sendo que todos os segmentos genômicos foram mais similares à amostra de RV lapino do que o humano. Em Belém, em um estudo com espécimes fecais de neonatos e crianças com diarreia foi observado similaridade com genes provenientes de amostras de origem suína (MASCARENHAS et al., 2007a; 2007b).

II.3.2. – Patogenia da infecção pelo rotavírus:

Presentemente, o conhecimento acerca da patogênese do RV-A é baseado em modelos animais, ainda não sendo totalmente elucidado. A diarreia causada por este vírus tem sido atribuída a diferentes mecanismos, incluindo a má absorção devido à destruição dos enterócitos, o efeito enterotóxico da proteína não estrutural NSP4 e a ativação do sistema nervoso entérico (ESTES e KAPIKIAN, 2007; GRAY et al., 2008).

A má absorção é desencadeada pela lesão do epitélio, o que determina principalmente a depressão transitória no nível das dissacaridases, em particular a lactase, gerando a diarreia de natureza osmótica (BALL et al., 1996).

A proteína NSP4 atua como uma enterotoxina viral no mecanismo patogênico, induzindo diarreia em camundongos jovens (BALL et al., 1996). Tal mecanismo seria provavelmente pela NSP4 promover uma desestabilização da membrana do retículo endoplasmático, com conseqüente lise do mesmo, ocorrendo um aumento do Ca^{++} intracelular e o acréscimo da secreção de íons Cl^- , causando

diarreia de natureza secretória (TIAN et al., 1995; HUANG et al., 2004; BALL et al., 2005; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Observações subsequentes demonstraram que a secreção de fluidos e eletrólitos nas infecções por RV decorre por ativação direta do sistema nervoso entérico, o qual, ainda não está bem elucidado. Acredita-se que a NSP4 ou ainda as citocinas possam ser liberadas pelas células infectadas (LUNDGREN et al., 2000; LUNDGREN e SVENSSON, 2001; RAMIG, 2004).

II.3.3 – Imunidade:

O mecanismo imunológico envolvido em uma infecção causada por RV não foi totalmente esclarecido, embora seja considerada multifatorial envolvendo a secreção de anticorpos, além da imunidade celular e humoral (FRANCO et al., 2006; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

As proteínas VP4 e VP7 demonstraram ser relevantes na resposta imune do hospedeiro, por estimularem a produção de anticorpos neutralizantes, induzindo a resistência à infecção por RV (OFFIT, 1996).

Os anticorpos específicos IgA e IgG para as proteínas VP4, VP7, NSP4 e VP6 estão envolvidos, sendo esta última detectada em níveis mais elevados. Contudo, nenhuma dessas proteínas, individualmente ou combinadas, proporcionam completa proteção clínica (GRAY et al., 2008).

A infecção por RV pode induzir a proteção imune homotípica e heterotípica. Em uma primoinfecção, a proteção é homotípica sorotipo-específica, enquanto que em uma reinfecção, a proteção heterotípica é associada a prevenção

de infecções contra diferentes sorotipos de RV (JIANG et al., 2002; GRAY et al., 2008).

Após a primoinfecção, 38% das crianças são protegidas contra infecções subsequentes pelo RV, 77% estão protegidas contra gastroenterite por RV e 87% estão protegidas contra episódios graves por RV. A segunda ou terceira infecção confere progressivamente maior proteção contra gastroenterite causada por este vírus (VELAZQUEZ et al., 1996).

A importância da imunidade celular na infecção por esse vírus encontra-se sob investigação. Estudos demonstraram que várias citocinas, tais como IFN- α , IFN- γ , IL-10 e TNF- α estão envolvidas no processo de proteção contra a infecção por RV através de mecanismos como inibição da entrada desse vírus nas células do hospedeiro, 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).

II.3.4. – Características clínicas:

As infecções por RV podem ser assintomáticas ou se expressarem como gastroenterite moderada ou grave. O período de incubação é curto (um a três dias), evoluindo para a tríade clássica: vômitos, febre moderada/alta e diarreia aquosa que perduram por 5 a 8 dias, podendo levar à desidratação. Caso não haja a intervenção terapêutica precoce o processo pode culminar com o óbito (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Em geral, a mais expressiva incidência das infecções sintomáticas por esse vírus ocorre principalmente na faixa etária de 6 a 24 meses, e estudos demonstram que ele causa 12-71% dos episódios de gastroenterites graves nessa idade (O'RYAN et al., 2001). Em contrapartida, prevalecem as formas inaparentes entre recém-nascidos e lactentes até os 3 a 4 meses de idade, provavelmente em decorrência da proteção conferida pelos anticorpos de origem materna (LINHARES et al., 1989; BISHOP et al., 1996, GLASS et al., 2006).

Postula-se que diferenças na gravidade dos episódios diarreicos podem ser explicadas pela variação da virulência entre os genótipos de RV, imunidade deficiente ou a um genótipo não usual inserido na população (CUBITT et al., 2000).

Recentemente, a gravidade dos episódios diarreicos foi atribuída a genótipos específicos, como ao G9 que, em comparação com o quadro clínico desencadeado nas infecções pelo tipo G1, manifestou clínica mais grave (LINHARES et al., 2006b).

Entretanto, outros estudos não detectaram a diferença de manifestações clínicas entre os genótipos, não atribuindo maior gravidade ao genótipo G9 (CLARK et al., 2004b; AUPIAIS et al., 2009).

Os episódios clínicos graves em crianças e adultos também têm sido associados ao genótipo G2, contudo, há estudos que discutem a pouca correlação entre genótipos e gravidade clínica (BARNES et al., 1992; POLANCO-MARIN et al., 2003; MIKAMI et al., 2004; ARISTA et al., 2005a; MARTELLA et al., 2005).

Manifestações clínicas atípicas, tais como encefalites, doença de Kawasaki, síndrome de Reye, ocasionadas pelo RV já foram relatadas em determinadas situações. Evidências apontam a associação entre infecções por RV e casos de enterocolite necrotizante e gastroenterite hemorrágica em neonatos além de

diarreia prolongada em pacientes imunocomprometidos. Nesse contexto, cabe ressaltar os casos de intussuscepção registrados nos EUA devido à administração da vacina quadrivalente RRV-TV contra RV (MASCARENHAS e LINHARES, 2005; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Também tem sido registrada a participação do RV como causa de infecções extraintestinais, associado a otite média, broncopneumonia, pneumonia fatal, convulsões e meningoencefalites, com detecção do RNA viral no soro ou fluido cérebro espinhal, sistema nervoso central, coração e células endoteliais (MORRISON et al., 2001; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002; LYNCH et al., 2003; ZAHN e MARSHALL, 2006; BLUTT et al., 2007; DICKEY et al., 2009).

II.3.5 – Tratamento:

O tratamento para gastroenterite causada por RV é feito essencialmente pela reposição de fluidos e eletrólitos liberados pelo vômito e pela diarreia, podendo ser por via oral ou endovenosa, dependendo da gravidade (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A diarreia evolui para cura espontânea, devendo ser administrado apenas soros de reidratação e dieta equilibrada, não sendo recomendado o uso de antimicrobianos ou qualquer outro medicamento, como adsorbantes ou antiespasmódicos, com a finalidade de interromper o curso da diarreia, salvo nos casos com comprometimento do estado geral, sugerindo associação bacteriana (BRASIL, 2005; OMS, 2005; OLIVEIRA et al., 2007).

A suplementação de zinco é um tratamento recomendado pela OMS, devido ao zinco provavelmente estar envolvido na recuperação imune e intestinal

durante a diarreia, sendo importante esta terapêutica principalmente para crianças de países em desenvolvimento, onde a deficiência de zinco é bastante acentuada (OMS, 2006).

Uma alimentação adequada também é importante, pois preservará o estado nutricional impedindo o agravamento do quadro com a instalação da desnutrição, recomendando-se leite materno ou dieta habitual com correção dos erros alimentares (OLIVEIRA et al., 2007).

Para possíveis estratégias de tratamento, destacam-se a utilização de nitazoxanida, racecadotril, probióticos (*Lactobacillus* GG) e drogas que inibem funções neuronais. Todavia, tais terapêuticas ainda necessitam de maiores estudos acerca de sua utilização (LUNDGREN et al., 2000; SALAZAR-LINDO, et al., 2004; CEZSARD e SALAZAR-LINDO, 2005; OLIVEIRA et al., 2007; PANT et al., 2007; TERAN et al., 2009).

II.3.6 – Diagnóstico laboratorial:

As infecções por RV manifestam-se com sintomatologia similar a outros agentes virais, inviabilizando, desta forma, um diagnóstico clínico, sendo de fundamental importância a utilização de métodos que permitam a detecção do patógeno ou de antígeno viral.

A primeira técnica utilizada para a detecção do RV foi a microscopia eletrônica, contudo, atualmente, o método mais difundido nos laboratórios é o ensaio imunoenzimático (EIE), devido sua sensibilidade e praticidade (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Outras técnicas utilizadas rotineiramente em laboratório para detecção de antígenos virais são a aglutinação em látex; método rápido (cerca de 20 minutos) e com considerável sensibilidade e a imunocromatografia, a qual também apresenta sensibilidades e especificidades satisfatórias (FLEWETT et al, 1989; GABBAY et al., 2005).

Devido o genoma do RV ser segmentado, e tais segmentos possuírem distintas massas moleculares, o método de EGPA é de extrema importância por ser uma técnica fácil e rápida para a detecção deste agente viral (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Outras técnicas têm sido empregadas para a detecção do genoma viral envolvendo a biologia molecular, como a reação em cadeia pela polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR), hibridização (“dot-blot”), PCR em tempo real, sequenciamento de nucleotídeos e *microarray* (*microarranjo*). Contudo, o emprego de tais métodos ainda se restringe a pesquisa, devido o custo gerado para sua aplicação (GOUVEA et al., 1990; HONMA et al., 2007; PANG et al., 2010).

II.3.7. – Controle e prevenção

As habituais práticas de controle, como o acesso amplo à água potável e a implementação de medidas visando ao saneamento básico, parecem não exercer impacto significativo nas infecções por RV, o que é evidenciada pelo fato de as taxas de incidência da doença nos países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento serem comparáveis. O mais efetivo controle das infecções por RV se condiciona ao uso de uma vacina segura e eficaz contra este agente (LINHARES, 2000; LINHARES e BREESE, 2000; FISCHER et al., 2004; GLASS et al., 2004).

II.3.7.1 - Vacina contra rotavírus:

Devido à gravidade da doença causada por RV, imunizantes seguros e eficazes contra esse vírus são extremamente necessários, principalmente para uso nos países em desenvolvimento. Várias candidatas a vacinas têm sido desenvolvidas ou estão sob estudo, com o principal objetivo de oferecer proteção contra as gastroenterites de maior gravidade (MASCARENHAS e LINHARES, 2005).

A primeira vacina contra RV testada foi de origem bovina, RIT 4237, genótipo G6, a qual apresentou resultados satisfatórios na Finlândia, todavia, em países em desenvolvimento, apresentou desempenho inexpressivo de proteção contra RV (VESIKARI et al., 1985; LINHARES e BRESEE, 2000). Tal fato ocorreu da mesma forma com as vacinas WC3, também genótipo G6 de origem bovina e com a vacina RRV, derivada da amostra MMU 18006, obtida de símios, sendo do genótipo G3, as quais obtiveram resultados variáveis, sendo então, testadas outras vacinas que apresentassem resultados mais satisfatórios (JOENSUU et al., 1997; BRESEE et al., 1999).

Após tais testes, foi proposto o uso de imunizantes polivalentes com genótipos importantes epidemiologicamente, incluindo RV de origem animal e humano, gerando assim, entre outras, a vacina RRV-TV (RotashieldTM), derivada de co-infecção em culturas celulares das amostras MMU18006 sorotipo 3 e de RV humano sorotipos 1, 2 e 4 (BERNSTEIN et al., 1995).

A RRV-TV foi avaliada em crianças de vários países, como EUA, Peru, Brasil, Venezuela e Finlândia. Em países, como Peru e Brasil, a eficácia se revelou, com indicadores de proteção variando de 66% a 57% no primeiro ano de vida, principalmente contra o genótipo G1. Nos EUA, a vacina alcançou níveis de

proteção de 80% contra os casos de diarreia por RV (BERNSTEIN et al., 1995; LANATA et al., 1996; LINHARES et al., 1996).

Em 1998, a *Food and Drug Administration* (FDA) licenciou a Rotashield™ para uso no EUA, entretanto, em 1999 foi suspensa por ter sido associada a casos de intussuscepção (obstrução intestinal) envolvendo crianças nas quais a vacina havia sido administrada (CDC/MMWR, 1999; HOSHINO et al., 2003).

A vacina monovalente de origem ovina contra RV Lanzhou Lamb, genótipo G10P[12], foi licenciada formalmente na China desde 2000. Em estudo pós licenciamento esta vacina demonstrou ser moderadamente efetiva na prevenção de casos de RV requerendo hospitalização (FU et al., 2007).

Na Índia duas vacinas contra RV, obtidas a partir das amostras neonatais, 116E, sorotipo G9P[11], e a I321, sorotipo G10P[11], que são naturalmente bovino-humano recombinantes foram preparadas como lotes piloto para ensaios clínicos a ser conduzido em Nova Delhi, dentro de um programa de desenvolvimento clínico objetivando introduzir uma vacina na Índia. Foram administradas duas doses orais dessas vacinas, e a segurança e a imunogenicidade foram avaliadas, não sendo observado valores significativos de eventos adversos. A vacina obtida a partir da 116E é atenuada, clinicamente segura e foi observada elevada imunogenicidade com uma simples dose (GLASS et al., 2005; BHANDARI et al., 2006).

Em 2009, a Organização Mundial de saúde (OMS) recomendou a inclusão das vacinas licenciadas Rotateq® e Rotarix® no programa nacional de imunização de países onde demonstrou ter significativo impacto na saúde pública.

A vacina Rotarix®, produzida pela Glaxo Smith-Kline (Biologicals, Rixsensart, GSK), de origem humana, genótipo G1P[8], foi testada na Finlândia e em onze países da América Latina, obtendo-se eficácia de até 85% contra os

episódios mais graves de diarreia por RV e reduzindo em 42% as admissões hospitalares devido as diversas causas de gastroenterite (RUIZ-PALACIOS et al., 2006).

Esta vacina foi também testada em Belém, Pará, e apresentou eficácia de 86% e 93% contra gastroenterites graves e hospitalizações por RV, respectivamente. Esse imunizante mostrou induzir tanto proteção homóloga, ou seja, sorotipoespecífica para o genótipo G1P[8] (92%), quanto heteróloga, isto é, produção de anticorpos também contra outros sorotipos P[8] específicos, G3, G4 e G9 (87%), apresentando menor proteção ao genótipo G2P[4] (41%), embora, este último não seja estatisticamente significativo devido à circulação deste tipo de RV ter sido baixa nos anos de estudo (LINHARES et al., 2006a; O'RYAN e LINHARES, 2009).

Em Belém, Pará, Araújo et al., (2007a) em estudo com crianças que receberam duas doses deste imunizante, observaram índices satisfatórios (81,5%) contra gastroenterite ocasionada por RV, principalmente nos casos que envolveram o genótipo G9 (79,8%).

Segundo Linhares et al., (2008), duas doses deste imunizante revelaram-se eficazes contra a diarreia grave por RV durante os dois primeiros anos de vida na América Latina. Desta forma, a inclusão desta vacina nas imunizações infantis podem reduzir os casos de gastroenterite por RV em todo o mundo.

Atualmente, a OMS indicou a inclusão desta vacina em todos os programas nacionais de imunização infantil e a mesma encontra-se licenciada em pelo menos 100 países (McCORMACK e KEAN, 2009; OMS, 2009a).

No Brasil, esta vacina passou a fazer parte do calendário proposto pelo Programa Nacional de Imunizações desde 2006, encontrando a VORH disponível

nos postos de saúde para ser administrada em duas doses via oral, aos segundo e quarto meses de idade (BRASIL, 2006).

Após a implantação da vacina Rotarix®, diversos estudos desenvolvidos no Brasil, demonstraram a prevalência do genótipo G2P[4] circulando no país, com resultado semelhante em estudos conduzidos em várias partes do mundo, inclusive em países em que ainda não foi implementada a utilização desta vacina. Tal panorama indica a possibilidade de re-emergência natural deste genótipo (GURGEL et al., 2007, 2008; RAHMAN et al., 2007; NAKAGOMI et al., 2008; LEITE et al., 2008; CARVALHO-COSTA et al., 2009).

Outra vacina promissora que demonstrou ser bastante eficaz em testes clínicos foi a Rotateq®, produzida pela Merck e licenciada nos EUA desde 2006. Esta vacina foi construída a partir do protótipo viral WC3, de origem bovina, reestruturada com cepas humanas, formando assim, o imunizante pentavalente de origem humano-bovino, que confere imunidade contra os genótipos mais prevalentes de RV (G1, G2, G3, G4 e P[8]) e proteção cruzada contra o genótipo G9, demonstrando eficácia de até 100% nos episódios diarréicos mais graves e de 68,8% a 76,6% contra gastroenterites por RV (CLARK et al., 2004a; HEATON et al., 2005; VESIKARI et al., 2006; 2007).

A Rotateq® foi responsável pela redução de 86% na incidência de consultas médicas, de 94% nas emergências, 96% de redução nas hospitalizações ocasionadas por RV e 59% por gastroenterite por outros agentes etiológicos (DENNEHY, 2008).

O principal desafio para a implantação global de vacinas contra RV são os países em desenvolvimento, como Ásia e África, onde se sustenta que fatores como subnutrição, infecções por enterovírus e bactérias, infecções por RV ocorrendo

precocemente em crianças. Além disso, são registrados significativo número de coinfeções de RV com outros agentes, maior circulação de tipos incomuns de RV, que atuam como determinantes de interferência em potencial para a efetiva proteção das vacinas contra esse vírus (LINHARES e BRESEE, 2000; GLASS et al., 2006; BRESEE et al., 2005; O'RYAN e LINHARES, 2009). Desta forma, a OMS recomendou estudos de eficácia das vacinas contra RV na Ásia e África antes de recomendá-la a nível mundial (OMS, 2009).

Na África do Sul e Malawi, a vacina Rotarix® foi avaliada contra episódios graves ocasionados pelo RV durante o primeiro ano de vida e alcançou eficácia de 76,9% e 61,2%, respectivamente. Neste estudo foi possível observar a redução de 30% nos casos de gastroenterite grave, confirmando o significativo impacto na saúde pública com a introdução da vacina em países menos desenvolvidos (CUNLIFFE et al., 2009; O'RYAN e LINHARES, 2009).

Estudo conduzido com a vacina Rotarix® em três países da Ásia (Hong Kong, Taiwan e Singapura), mostrou eficácia de 96% e 94% contra casos graves por RV e hospitalizações, respectivamente. A proteção de 100% contra os casos ocasionados por G1 e 94% contra os casos causados por RV tipo não G1 (PHUA et al., 2009).

A vacina Rotateq® foi avaliada na Nicarágua e apresentou eficácia de 46% contra casos requerendo admissão ou tratamento com hidratação intravenosa, 60% contra casos graves e 78% contra casos muito graves de RV. Todavia, os resultados obtidos neste estudo não foram tão significativos quanto aos apresentados em países industrializados (PATEL et al., 2009).

III - RELEVÂNCIA DO ESTUDO:

A relevância epidemiológica do genótipo G9 de RV desde sua emergência em meados da década de 90 até o momento tem sido demonstrada em diversos estudos desenvolvidos em todo o mundo. Este genótipo de RV pode ser associado a diversos tipos P, o que demonstra seu complexo padrão e o difere dos demais tipos de RV usuais detectados, além de supostamente estar associado a uma manifestação clínica mais grave e, apesar de tais evidências, este genótipo não compõe nenhuma das vacinas ora licenciadas para uso em escala global. Em Belém, Pará, este genótipo foi detectado pela primeira vez no ano de 1996 e surgiu novamente a partir do ano de 1999, sendo responsável por um número considerável de casos, e perdura até os tempos atuais, associado geralmente ao tipo P[8], já sendo reconhecido como um genótipo comum nas infecções. Diversos surtos foram atribuídos a este genótipo, destacando-se, neste contexto, o ocorrido no Acre no ano de 2005, ocasionando 12.145 hospitalizações e 8 óbitos. Desta forma, é importante a caracterização genética de amostras G9 detectadas na região metropolitana de Belém, visando a um melhor entendimento acerca da epidemiologia molecular deste tipo na região.

IV – ASPECTOS ÉTICOS:

O estudo não apresentou qualquer risco ou prejuízo para as crianças ou seus responsáveis. A presente investigação foi avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas n 0022/2009 em respeito às normas nacionais e internacionais que regulamentam tal atividade (Anexo A).

V – OBJETIVOS:

V.1 – OBJETIVO GERAL

Caracterização molecular e fenotípica de amostras de RV genótipo G9 provenientes de crianças com gastroenterite aguda na região metropolitana de Belém, Pará, no período de 1999 a 2007.

V.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a variabilidade de eletroferotipos do RV G9;
- b) Caracterizar geneticamente as proteínas VP4 e VP7 do RV G9;
- c) Realizar a análise filogenética, comparando as sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos genes VP4 e VP7 do RV G9;
- d) Verificar a ocorrência de polimorfismo nos genes VP4 e VP7 deste genótipo.

VI – MATERIAL E MÉTODOS:

VI.1 – Material

Os espécimes clínicos analisados foram provenientes de três estudos desenvolvidos no Instituto Evandro Chagas (IEC) conduzidos no período de 1998 a 2000 (Projeto Hospital Sentinela), 2001 a 2003 (Projeto Vigilância 006) e 2006 a 2007 (Projeto Rede de Vigilância) conforme demonstrado na figura X.

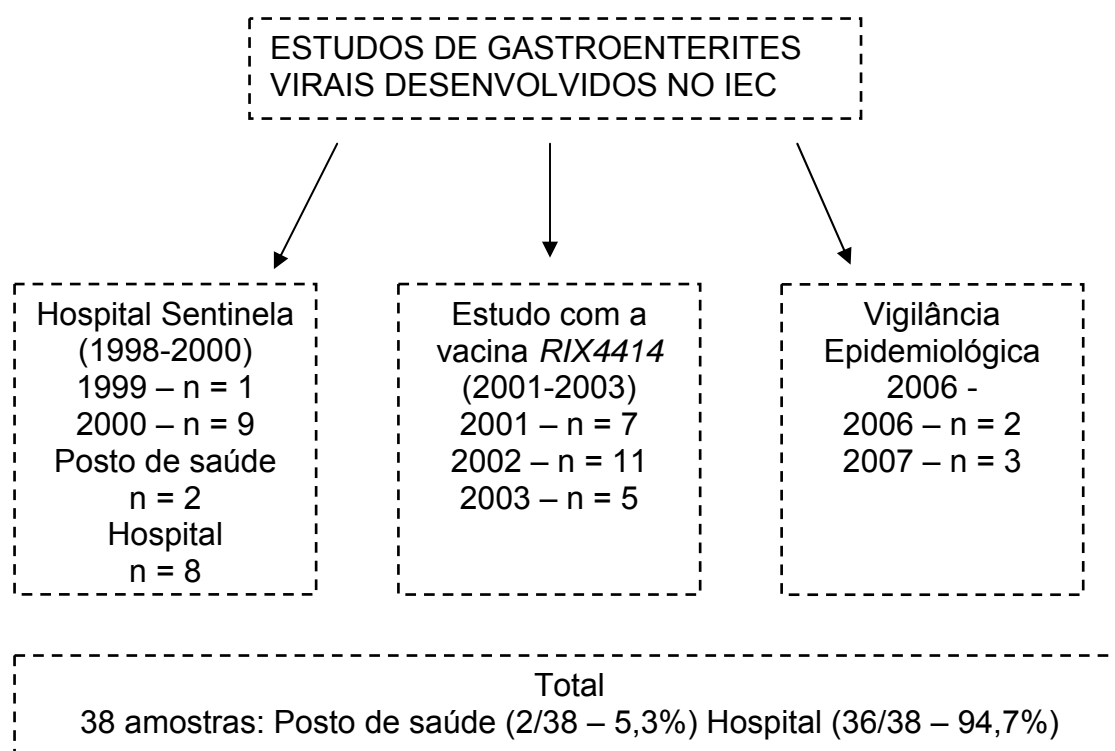


Figura 9: Espécimes clínicos utilizados no presente estudo

Todas as amostras selecionadas para o presente estudo foram previamente caracterizadas genótipo G9 por meio das técnicas de reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa e posteriormente por nested-PCR.

O critério de inclusão dos genótipos G9 no estudo foi a quantidade suficiente de espécimes fecais disponíveis para as análises e a distribuição deste genótipo no período do estudo:

1. Estudo de vigilância da doença diarréica por RV em Belém, Pará, antes da implementação de vacinas (Estudo Hospital-Sentinela).

Foi realizado em Belém, Pará, no período de maio de 1998 a maio de 2000 e objetivou analisar espécimes fecais de crianças com diarreia aguda, não sanguinolenta, de até três anos de idade, internadas no Hospital Santa Terezinha ou fazendo uso de terapia de reidratação oral (TRO), no Posto de Saúde do Marco. Foram coletadas 834 amostras fecais sendo 281 positivas para RV, destas, 24 (8,5%) pertenceram ao genótipo G9. Deste projeto, foram analisados dez espécimes coletados em 1999 (n = 1) e 2000 (n = 9), sendo duas foram provenientes do posto de saúde (ano 2000) e o restante oriundo de crianças em âmbito hospitalar e representando 41,7% dos genótipos G9 circulantes no período do estudo.

2. Estudo da imunogenicidade, segurança e eficácia de duas doses da vacina atenuada de origem humana contra RV (RIX4414) em crianças saudáveis de Belém, Brasil – Vigilância 006.

Esse estudo foi conduzido no período de maio de 2001 a abril de 2003 e objetivou avaliar a imunogenicidade, segurança e eficácia de duas doses da vacina atenuada de origem humana (RIX 4414), em crianças saudáveis em Belém, Brasil. Das amostras fecais colhidas, 136 foram amostras positivas para RV, sendo o genótipo G9 detectado em 58 espécimes (42,7%). Destes, foram selecionadas 23 amostras, sendo sete de 2001, 11 de 2002 e cinco de 2003, ou seja, 39,7% dos genótipos G9 desse período.

3. Estudo de vigilância epidemiológica das gastroenterites por RV no Brasil: determinação do impacto da doença

Este estudo iniciou em fevereiro de 2006 incluindo cinco municípios, um de cada região do país (Marituba-PA; Ceará Mirim-RN; Dourados-MS; Cachoeira do Itapemirim-ES e Lages-SC) e tem como objetivo estabelecer uma rede nacional de vigilância epidemiológica das gastroenterites por RV, a fim de definir-se o impacto da doença causada por esses patógenos no país e monitorar a diversidade antigênica das amostras virais circulantes. Foram colhidas amostras fecais de crianças menores de cinco anos internadas com diarreia aguda ou sob terapia de reidratação oral, por um período igual ou superior a 4 horas, nas unidades de saúde de referência para o projeto. Após a inclusão da criança no estudo, foi colhido o espécime fecal e encaminhado para o Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Pará (LACEN), que processou os espécimes utilizando o ensaio imunoenzimático do grupo A, visando à detecção de antígeno de RV. Subsequentemente, o LACEN enviou para o IEC/SVS/MS, os espécimes fecais positivos para a caracterização dos genótipos circulantes.

Deste projeto, no ano de 2006 foram recebidas no IEC 28 amostras positivas para RV, sendo duas do tipo G9 (7,1%), as quais participaram do presente estudo. Quanto ao ano de 2007, das 18 amostras positivas para RV encaminhadas ao IEC, em três (16,7%) foram detectadas o genótipo G9, estando, todas, inclusas no presente estudo.

Desta forma, o presente estudo foi composto por 38 amostras genótipo G9 ($n = 38/87 - 43,7\%$) coletadas no período de 1999 a 2007, sendo destas, duas ($n = 2/38 - 5,3\%$) oriundas de posto de saúde e 36 ($n = 36/38 - 94,7\%$) provenientes de âmbito hospitalar.

VI.2 – Métodos

VI.2.1 Preparo da suspensão fecal

A partir dos espécimes fecais selecionados, foram preparadas suspensões fecais a 10% em tampão Tris-Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2. Em seguida, as suspensões foram homogeneizadas e clarificadas por centrifugação a 3.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi colhido e estocado a -20° C para a realização dos testes.

VI.2.2 Extração do genoma viral

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

Primeiramente, pipetou-se em um tubo de 1,5 mL 300 µL da suspensão fecal. Adicionou-se 20 µL de Proteinase K (20mg/mL) e 800 µL de Tampão L6, agitando-se posteriormente em vótex. O material foi incubado em banho-maria a 56°C por 10 minutos e logo após adicionado ao tubo 200 µL de Etanol absoluto (4°C) e 20µL de sílica. Homogeneizou-se em agitador tipo kline por 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugado a 16.000 x g por 40 segundos.

Descartou-se o sobrenadante em frasco contendo NaOH 10N, adicionando-se logo após 500 µL de Tampão L2 e homogeneizando em vortex visando centrifugação a 16.000 x g por 30 segundos. Descartou-se o sobrenadante em frasco contendo NaOH 10N e adicionou-se 500 µL de Etanol 70%. Homogeneizou-se em vortex e centrifugou-se a 16.000 x g por 40 segundos para

posteriormente se descartar o sobrenadante em frasco contendo hipoclorito de sódio.

Secou-se o sedimento em banho-maria a 56°C por 15 minutos e, em seguida, adicionou-se 60µL de água ultra pura (livre de DNase e RNase) e homogeneizou-se em vortex.

Posteriormente, o material foi incubado em banho-maria a 56°C por 15 minutos e homogeneizado em vórtex. O tubo foi centrifugado à 16.000 x g por 4 minutos, a fim de realizar a coleta do sobrenadante (30 a 40µL) o qual foi transferido para um tubo previamente identificado e armazenado à -20°C para a realização dos testes.

Durante o processo de extração todas as medidas de controle de contaminação foram realizadas, inclusive a utilização de controles positivo (amostra positiva para RV) e negativo (água ultra pura).

VI.2.3 – Determinação dos eletroferotipos por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)

O dsRNA extraído foi submetido à EGPA, para determinação dos eletroferotipos de RV segundo procedimento descrito por Pereira et al. (1983). Foram aplicados 10 µL dos dsRNA extraídos no gel de poliacrilamida 5% juntamente com 2 µL de azul de bromofenol. Este gel foi submetido a eletroforese vertical, sob as condições 100 volts (V), 100 Watts (W) e 21 milli-Ámperes (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 (AgNO₃), revelação do gel com hidróxido de sódio

10M e formaldeído a 37% e posterior visualização do perfil eletroforético dos RV em negatoscópio de luz branca (HERRING et al., 1982).

VI.2.4 – Reação em cadeia mediada pela polimerase, precedida de transcrição Reversa (RT-PCR)

A RT-PCR foi desenvolvida em duas etapas e realizada segundo protocolo descrito por Das et al. (1994), Gentsch et al. (1992) e Gouvea et al (1990) com modificações de Leite et al. (1996).

A primeira etapa inicia-se com a formação do DNA complementar (cDNA). Inicialmente, o dsRNA extraído foi acrescido dos pares de iniciadores 4con3/4con2 ou 9con1/9con2 ou Beg9/End9 foi desnaturado a 97°C em termociclador por 7 minutos, seguido de imersão em banho de gelo (0°C) por 5 minutos. Esses iniciadores amplificaram fragmentos dos genes VP4 e VP7 respectivamente conforme demonstrado no quadro 1.

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

Iniciador	Sequência	Gene	Amplicon em pares de bases (pb)	Referência
9con1 (+)	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	VP7	-	Das et al., 1994
9con2 (-)	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	VP7	904	Das et al., 1994
Beg9 (+)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	VP7	-	Gouvea et al., 1990
End9 (-)	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	VP7	1062	Gouvea et al., 1990
4con3 (+)	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	VP4	-	Gentsch et al., 1992
4con2 (-)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	VP4	875	Gentsch et al., 1992

Após desnaturação, foi adicionado uma mistura, visando à obtenção do cDNA por meio de transcrição reversa, durante 1 hora a 42°C (quadro 2).

Quadro 2. Reagentes usados na RT-PCR para a obtenção do cDNA

RT	1X/ μ L
H ₂ O	11,25
dNTP*25mM	4
Tampão 10X	2,5
MgCl ₂ 50mM	2
RT** 20U	0,25
Total	20

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

**II RNase Reverse Transcriptase 10000U, 200 U/ μ L

Após a obtenção do cDNA, iniciou-se a segunda etapa, a qual consistiu na amplificação dos genes pela PCR. Adicionou-se uma segunda mistura (quadro 3) com as seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 2 minutos (desnaturação prévia), seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 42°C por 30 segundos (hibridização) e 72°C por 1 minuto (extensão), finalizando com um ciclo de 72°C por 10 minutos de extensão final. A seguir, os produtos da RT-PCR foram armazenados a -20°C.

Quadro 3. Reagentes usados na PCR para a amplificação dos genes VP4 e VP7

PCR	1X/ μ L
H ₂ O	18,25
dNTP25Mm	4
Tampão 10X	2,5
MgCl ₂	1
Taq DNA Polimerase	0,25
Total	25

VI.2.5. – Eletroforese em gel de agarose

Os produtos obtidos na RT-PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% com Sybr safe DNA gel stain® (Invitrogen) em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x. Os produtos da RT-PCR foram aplicados com azul de bromofenol juntamente com o marcador de peso molecular 123 pb diluído em TBE 1x e submetidos a condições 120 V e 400 mA por 30 minutos.

Os produtos da RT-PCR em que foi visualizado o amplicon foram submetidas à purificação e posterior seqüenciamento; e nas que não amplificaram, a RT-PCR foi repetida.

VI.2.6 – Purificação do produto da RT-PCR

Após a RT-PCR, o DNA foi purificado, visando o sequenciamento de nucleotídeos. Utilizou-se o kit QIAQuick PCR purification (QIAGEN), para purificar o produto da RT-PCR, baseando-se na inexistência de ampliações secundárias observadas no gel de agarose, segundo protocolo descrito pelo fabricante como descrito abaixo:

Adicionou-se 5 vezes o volume do tampão PB para cada volume do volume da PCR usado seguida da homogeneização. Transferiu-se a mistura obtida para a coluna aclopada com o tubo coletor de 2 ml, centrifugando-se por 60 segundos. Descartou-se o líquido do tubo coletor o qual foi recolocado na coluna. Adicionou-se 0,75 ml do tampão PE já diluído na coluna, a qual foi centrifugado por 60 segundos para lavagem da coluna.

Descartou-se o líquido do tubo coletor e, para remover resíduos de reagentes, centrifugou-se a coluna novamente por 60 segundos sem adicionar nenhum reagente. Posteriormente, transferiu-se a coluna do tubo coletor para um tubo tipo eppendorf limpo de 1,5 ml sem tampa. Em seguida, para eluir o DNA, adicionou-se 50 µL do tampão EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5) com muito cuidado no centro da membrana, incubando-se em temperatura ambiente por 1 minuto. Logo após, centrifugou-se por 1 minuto, para então recolher e armazenar o produto final a -20°C.

VI.2.7. – Quantificação do DNA

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). O DNA purificado foi aplicado, juntamente com azul de bromofenol, em gel de agarose a 2% com sybr safe DNA gel stain (Invitrogen) diluído em TBE a 1X, sendo aplicado também em um outro orifício o peso molecular.

Em seguida, os amplicons de interesse no gel foram comparados com o peso molecular, segundo a intensidade da banda, e a concentração do DNA foi expressa em nanogramas (ng), o qual serviu de parâmetro para a reação de sequenciamento.

VI.2.8. – Reação de sequenciamento de nucleotídeos

A reação de sequenciamento foi conduzida segundo o protocolo descrito pelo fabricante do kit Big Dye Terminator® (Applied Biosystems), utilizando-se a mistura da reação conforme o quadro 4. A mistura foi adicionada a placa, juntamente com o DNA purificado e colocada no termociclador nas seguintes condições: 25 ciclos de 96°C por 30 segundos (desnaturação), 50°C por 15 segundos (hibridização) e 60°C por 3 minutos (extensão).

Quadro 4. Reagentes usados na reação de sequenciamento dos genes VP4 e VP7

Reagentes	1X/ μ L
Iniciador*	2
Tampão	2
Big Dye Terminator	2
DNA	Depende da concentração (máximo 4 μ L)
H ₂ O	Depende da quantidade de DNA (máximo 3 μ L)
Total	10

* Iniciadores descritos no quadro 1

VI.2.9. – Purificação do produto da reação de 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.

Primeiramente, adicionou 40 μ L do isopropanol 65% ao produto da reação da placa, agitando posteriormente em vortex por 3 a 5 segundos. Em seguida,

incubou-se a temperatura ambiente (TA) por 15 minutos, deixando a placa dentro da centrífuga e em seguida centrifugando por 45 minutos a 4000 x g a TA.

Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante por inversão da placa. Em seguida, adicionou-se 200 µL em cada orifício de etanol a 70% e centrifugou-se a placa por 10 minutos a 4000rpm a TA, retirando o sobrenadante novamente por inversão. Todavia, desta vez, manteve-se a placa invertida para, então, dar-se um spin na mesma sobre papel absorvente, repetido a ação.

Secou-se a placa em termobloco a 50 °C por 5 a 10 minutos para, posteriormente, ressuspender o sedimento.

VI.2.10. – Eletroforese em sequenciador automático

As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida, desnaturadas a 96°C por 5 minutos em termociclador e colocadas em banho de gelo a 0°C por 3 minutos. Em seguida, a placa foi adicionada ao sequenciador automático ABI PRISM 3130 xl (Applied Biosystems), 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' (SAGER et al., 1977).

VI.2.11. – Alinhamento e edição das sequências para construção da árvore filogenética.

Após o término da eletroforese foram obtidas as sequências para os genes VP4 e VP7. O programa Bioedit (v. 6.05) foi utilizado para alinhar e editar as sequências, obtendo-se uma sequência consenso para cada amostra. Após, realizou-se uma pesquisa no banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) no programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para comparar as sequências de RV. As árvores filogenéticas foram construídas a partir das sequências alinhadas no programa MEGA versão 4.0, no qual foi calculada uma matriz de distancia usando a fórmula de dois parâmetros de Kimura adotando-se assim, o método de Neighbour-joining. A análise de *bootstrap* foi realizada usando 2.000 réplicas objetivando a obtenção de resultados reprodutíveis além de proporcionar maior confiabilidade aos grupamentos (KIMURA, 1980; FELSENSTEIN, 1985).

As sequências obtidas das amostras selecionadas foram avaliadas quanto a presença de substituição nucleotídicas e aminoacídicas, verificando a possível presença de polimorfismo nos dados obtidos.

VII – RESULTADOS

VII.1 – DETERMINAÇÃO DOS ELETROFEROTIPOS DE ROTAVÍRUS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.

No presente estudo foram analisadas 38 amostras previamente caracterizadas como genótipo G9 circulantes no período de 1999 a 2007 provenientes de crianças com gastroenterite aguda sendo 5,3% oriundas de posto de saúde e 94,7% de hospital. Na EGPA foi possível a caracterização do perfil eletroforético em 81,6% (31/38) das amostras, nas quais foi identificado apenas o perfil longo. Na figura 9 pode-se observar a migração eletroforética do perfil longo detectado nas amostras.

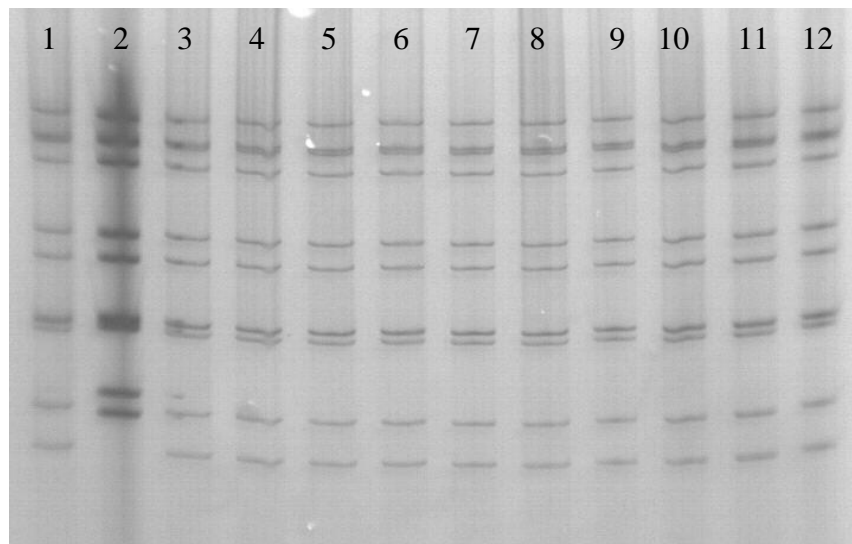


Figura 10: Gel de poliacrilamida demonstrando o perfil eletroforético de rotavírus. (1) Controle positivo longo; (2) Controle positivo curto; (3 - 12) Amostras com eletroferotipo longo, genótipo G9P[8].

Em sete amostras, 18,4% (n =7/38), não foi possível a visualização do perfil eletroforético, entretanto, essas amostras foram submetidas a RT-PCR e posteriormente à reação de sequenciamento.

VII.2 – REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

As 38 amostras selecionadas para o sequenciamento foram repetidas por RT-PCR para a amplificação dos genes VP7 e VP4, de acordo com o protocolo descrito por Das et al. (1994), Gentsch et al. (1992) e Gouvea et al (1990), e posterior purificação e sequenciamento. Duas amostras, uma do ano de 2002 e outra de 2006, não amplificaram para ambos os genes, não sendo, desta forma, submetidas a reação de sequenciamento.

Entre as amostras selecionadas e inicialmente caracterizadas como genótipo G9 por nested-PCR, segundo protocolo descrito por Das et al., (1994), em quatro houve discordância do genótipo pelo sequenciamento, caracterizando-se como tipo G1.

Desta forma, das 38 amostras selecionadas como G9P[8], foi possível sequenciar e analisar os genes que codificam as proteínas VP7 e VP4 de 32 espécimes.

VII.3 – ANÁLISE DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS.

VII.3.1 – Gene *VP7*

Os produtos da RT-PCR do gene VP7 de 32 amostras foram purificados, quantificados e sequenciados.

A análise realizada nas sequências de nucleotídeo do gene VP7, representada na figura 10, demonstrou que todas as amostras do tipo G9 agruparam na linhagem 3, segundo classificação proposta por Martinez-Laso et al. (2009), juntamente com amostras contemporâneas provenientes de várias regiões do mundo, incluindo o Brasil.

As amostras do presente estudo apresentaram-se bem coesas em um braço da árvore, com similaridade de nucleotídeo, entre as mesmas, variando de 98,5% a 100%, e o valor de confiabilidade do agrupamento inferido por “*bootstrap*” de 99%. Ao compararmos as amostras da região metropolitana de Belém, retirando as amostras do ano de 2007, a similaridade variou de 99% a 100%, demonstrando que as mesmas são as que apresentaram maior divergência.

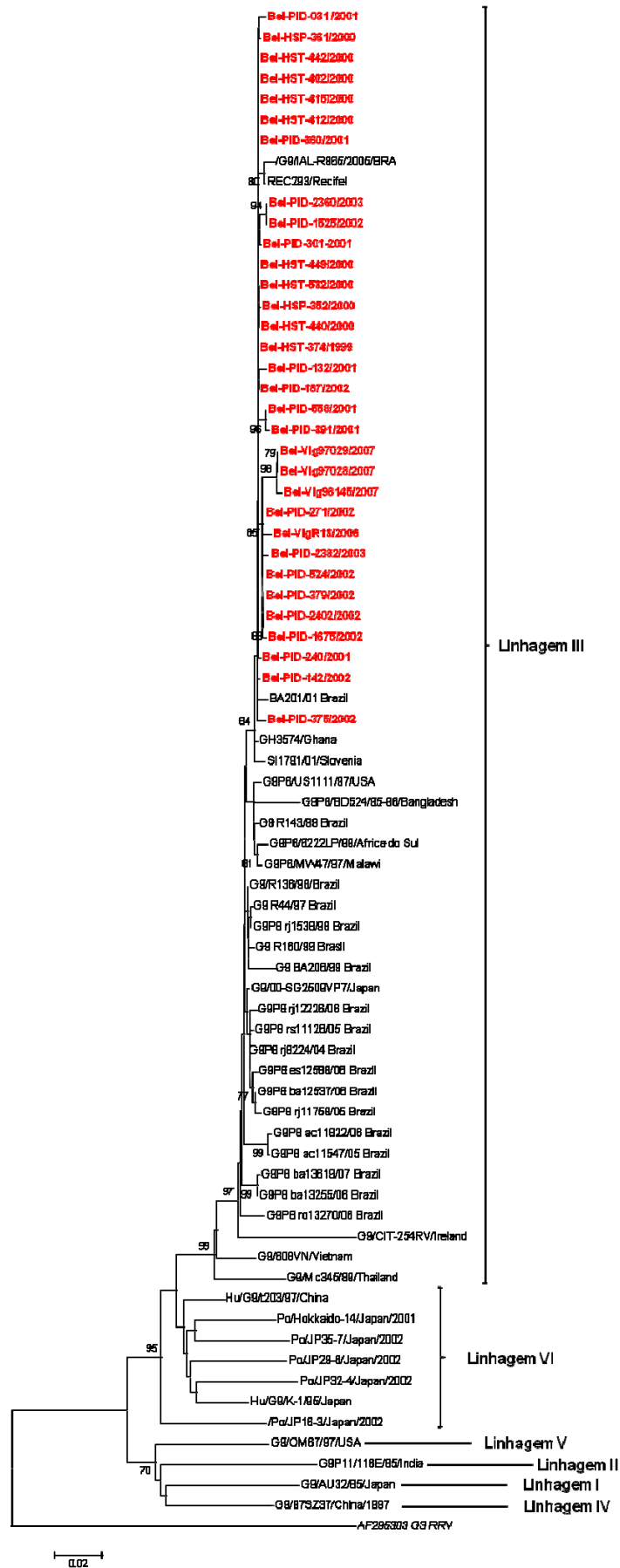


Figura 11: Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP7 envolvendo 32 amostras G9P[8] da região metropolitana de Belém e protótipos. Os valores de *bootstrap* (2.000 pseudoréplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados.

As amostras da região metropolitana de Belém apresentaram 3 substituições nucleotídicas quando comparadas com as demais amostras nacionais presentes na linhagem 3 com mudanças nos resíduos: 197 e 576 (C→T); e 582 (A→G) (Figura 11). Destas modificações nucleotídicas, apenas na posição 197 houve mudança aminoacídica correspondendo ao resíduo 66 (A→V), como demonstrado na figura 12 (Anexo B).

As amostras que circularam no ano de 2007 apresentaram cinco substituições nucleotídicas, como indicado na figura 11, em relação aos dos anos de 1999 a 2006, quais sendo: posições 127 e 218 (A→G); 543 (G→A), 621 (T→C) e 729 (C→T). Destas, apenas nos resíduos 127 e 218 ocorreram modificações aminoacídicas (aa 43 [I→V] e 73 [Q→R], respectivamente), conforme demonstrado na figura 12 (Anexo B).

Ao comparar-se as amostras provenientes do posto de saúde (n = 2) com as demais, oriundas de casos hospitalares (n = 30), não foi observado divergências nucleotídicas e aminoacídicas no gene VP7, observando-se elevado índice de identidade nucleotídica (98,5% a 100%).

Não foi observado nas amostras selecionadas do ano de 1999 a 2006, modificações de nucleotídeo ou aminoácido peculiares a cada ano de circulação, não sendo detectada modificação temporal. Todavia, as amostras de 2007 apresentaram modificações de nucleotídeo e aa únicas. As substituições detectadas no gene VP7 estão sumarizadas na tabela1.

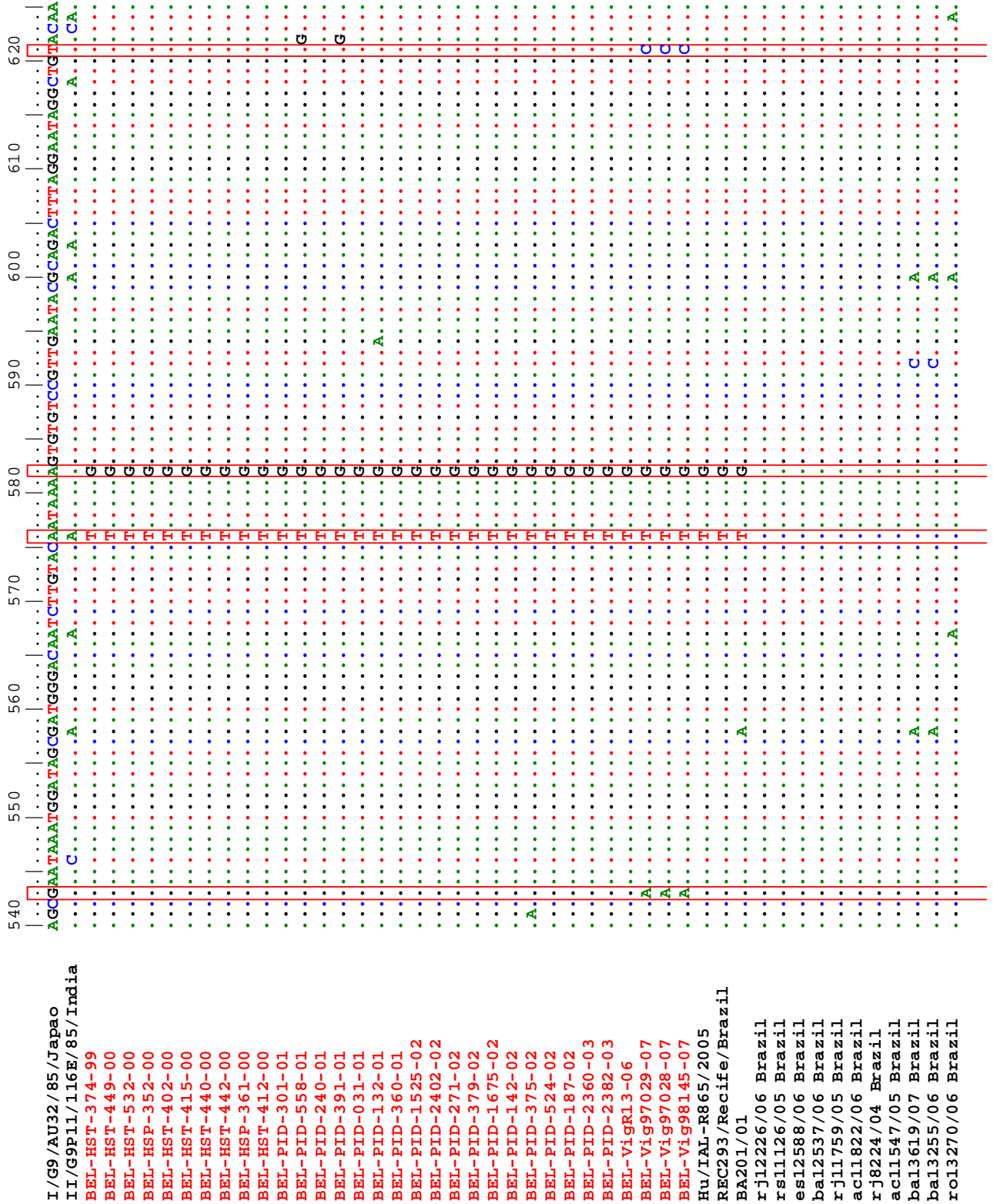


Figura 12: Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene VP7 das amostras do presente estudo, protótipos e amostras brasileiras. Os retângulos vermelhos indicam as substituições nucleotídicas identificadas (2/3).

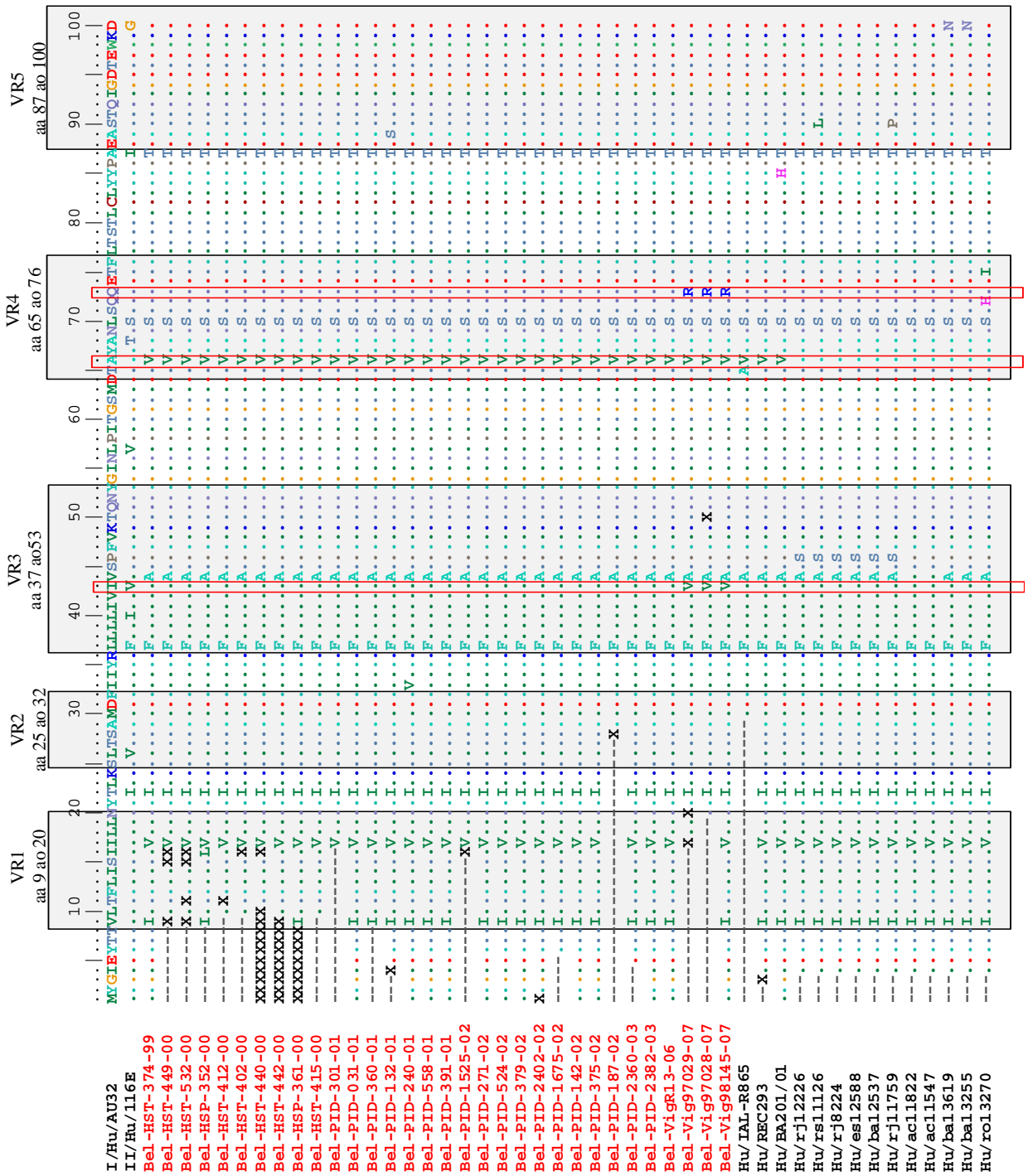


Figura 13: Alinhamento das seqüências aminoacídicas do gene *VP7* das amostras do presente estudo, protótipos e amostras brasileiras. Os retângulos vermelhos indicam as substituições dos resíduos de aa identificadas. Os retângulos pretos indicam as VR em que ocorreram modificações aminoacídicas. Siglas dos aa estão no anexo B.

Tabela 1: Modificações nucleotídicas e aminoácidas no gene *VP7* observadas nas amostras genótipo G9 da Região metropolitana de Belém, no período de 1999 a 2007

Posição nucleotídica	Substituição nucleotídica	Posição aminoácídica	Substituição aminoácídica (Região variável – VR/Região antigênica - RA)	Amostras que apresentam substituições
127	A→G	43	I→V (VR3/sem substituição)	Ano 2007
197	C→T	66	A→V (VR4/ sem substituição)	Ano de 1999 a 2007
218	A→G	73	Q→R (VR4/ sem substituição)	Ano 2007
543	G→A	181	Não ocorreu substituição	Ano 2007
576	C→T	192	Não ocorreu substituição	Ano de 1999 a 2007
582	A→G	194	Não ocorreu substituição	Ano de 1999 a 2007
621	T→C	207	Não ocorreu substituição	Ano 2007
729	C→T	243	Não ocorreu substituição	Ano 2007

VII.3.2 – Gene VP4

O gene VP4 foi da mesma forma caracterizado, sendo determinado o genótipo P[8] para todas as amostras. A análise realizada nas sequências nucleotídicas e representada na figura 13, demonstrou que todas as amostras selecionadas tipo P[8] agruparam na linhagem 3.

As amostras do tipo P[8] do presente estudo apresentaram-se em um braço da árvore, com similaridade de nucleotídeo, entre as mesmas, variando de 97,8% a 100%, e o valor de confiabilidade do agrupamento inferido por “*bootstrap*” de 99%.

A análise filogenética apresentou um grupo presente na linhagem 3 composto por amostras da região metropolitana de Belém do ano 2002 a 2007, obtendo este grupo, identidade nucleotídica média de 99,5%.

Na análise da sequência de nucleotídeo do gene *VP4* detectou-se substituição nucleotídica nas amostras de 1999 a 2002 de Belém na posição 555 (T→C) e 515 (G→A) como pode ser observado na figura 14, representando esta última, modificação aminoacídica na posição 172 (R→K) (Figura 15). Outra substituição nucleotídica observada nas amostras P[8] de Belém dos anos de 2000 a 2002 foi no resíduo 213 (T→A), não originando modificação de aa.

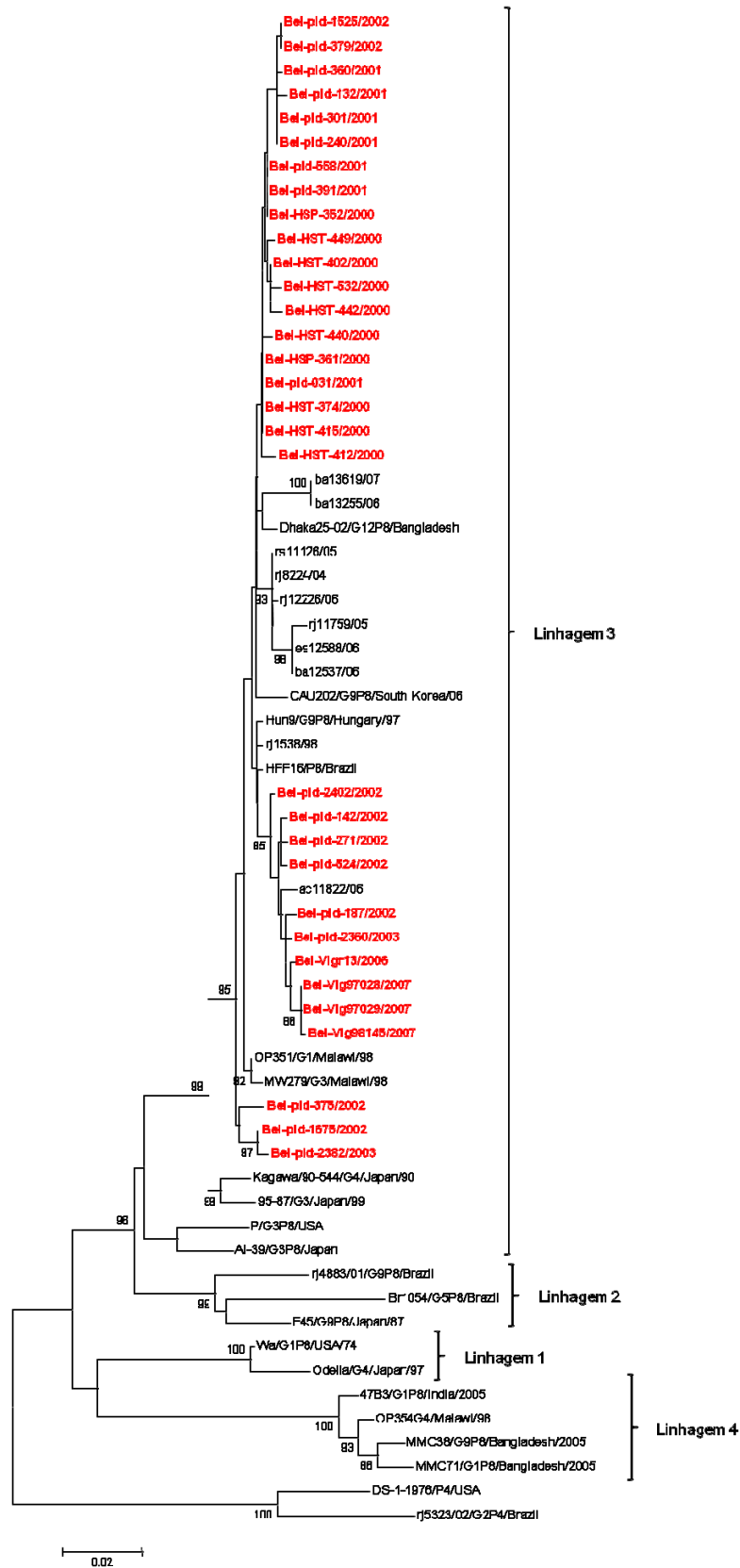


Figura 14: Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP4 envolvendo 32 amostras G9P[8] da região metropolitana de Belém e protótipos. Os valores de *bootstrap* (2.000 pseudoréplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados.

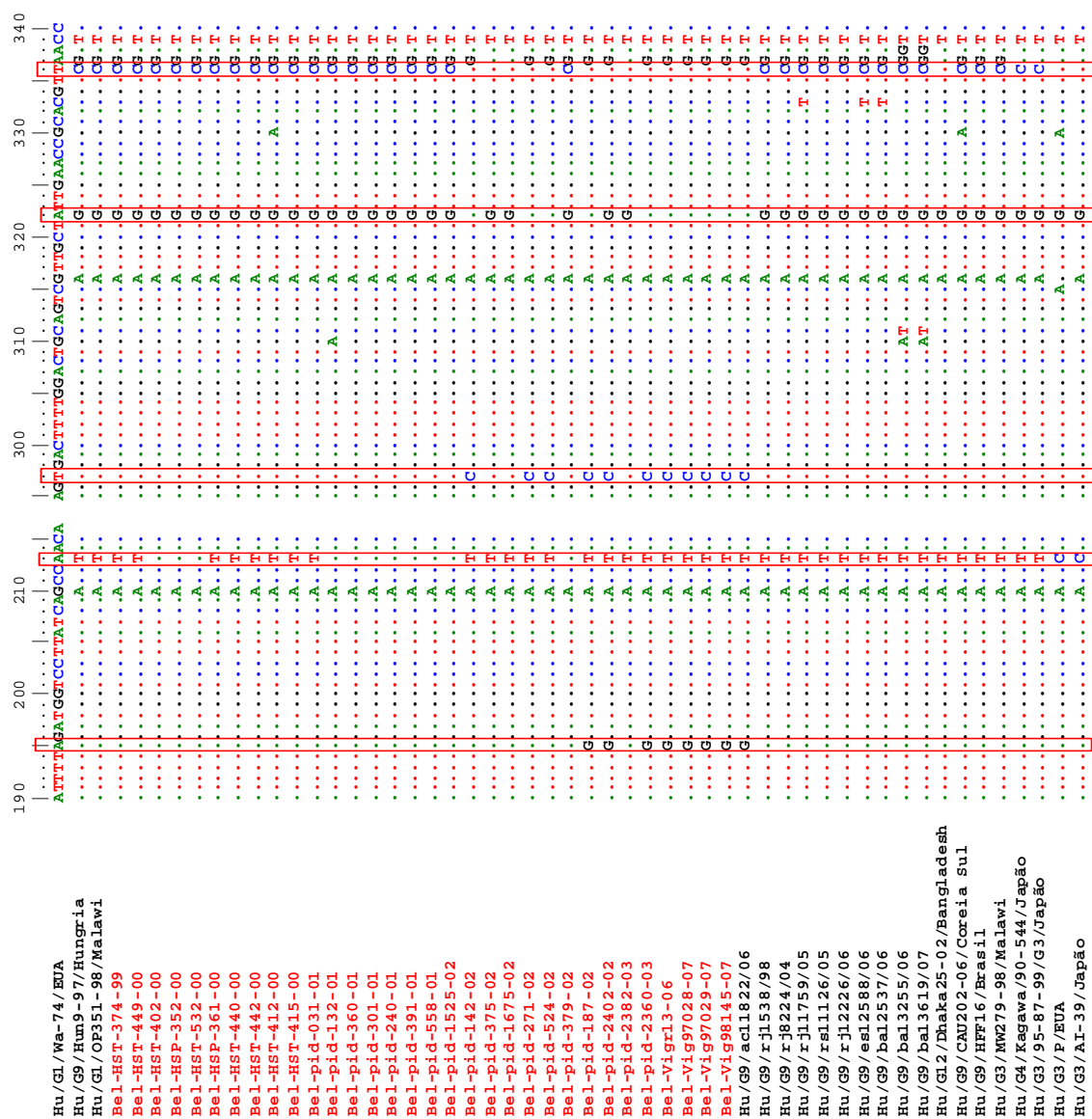


Figura 15: Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene *VP4* das amostras do presente estudo, protótipos, amostras do Brasil e do mundo. Os retângulos vermelhos indicam as substituições nucleotídicas identificadas (1/3).

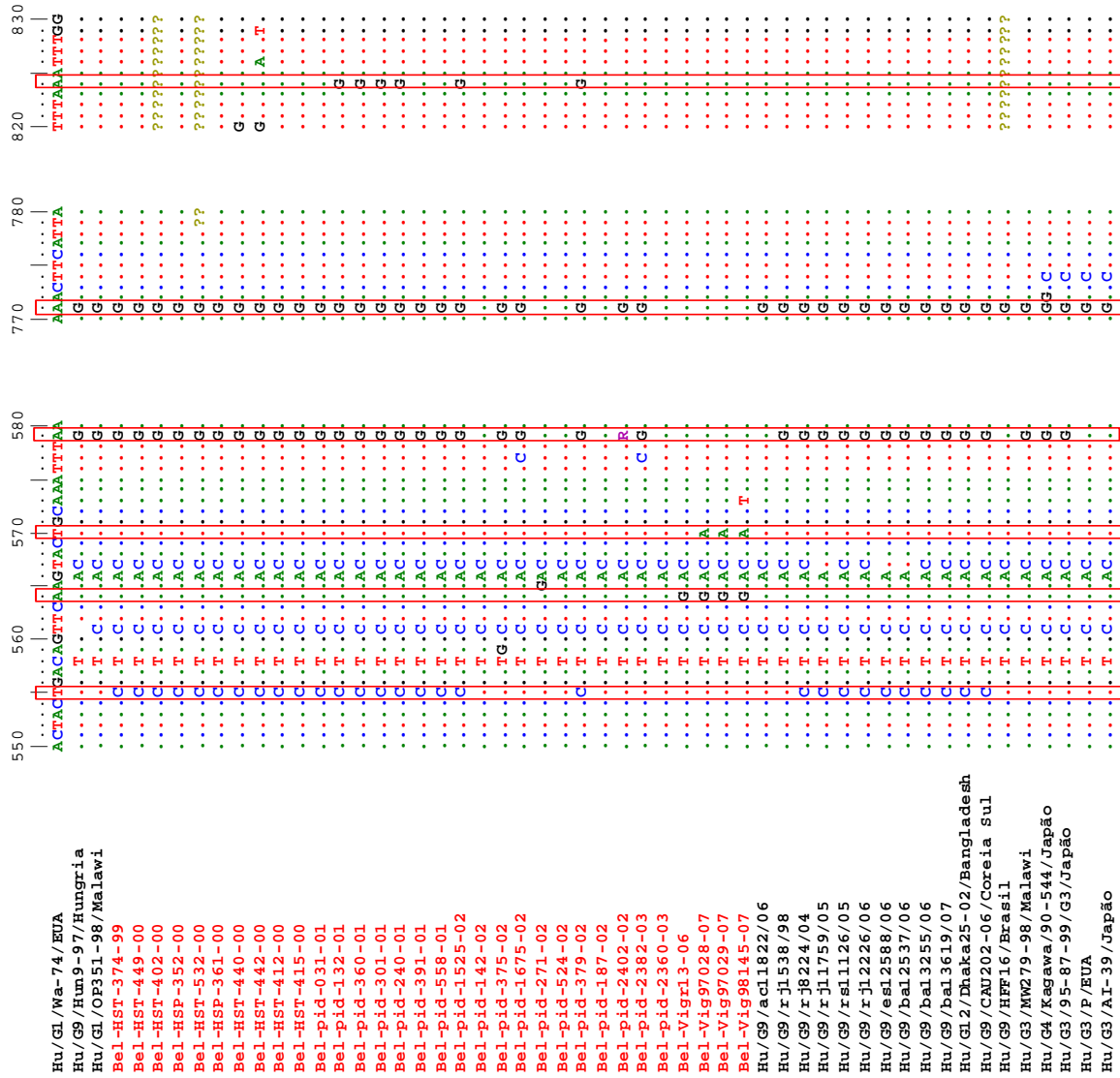


Figura 15: Alinhamento das seqüências nucleotídicas do gene *VP4* das amostras do presente estudo, protótipos, amostras do Brasil e do mundo. Os retângulos vermelhos indicam as substituições nucleotídicas identificadas (3/3).

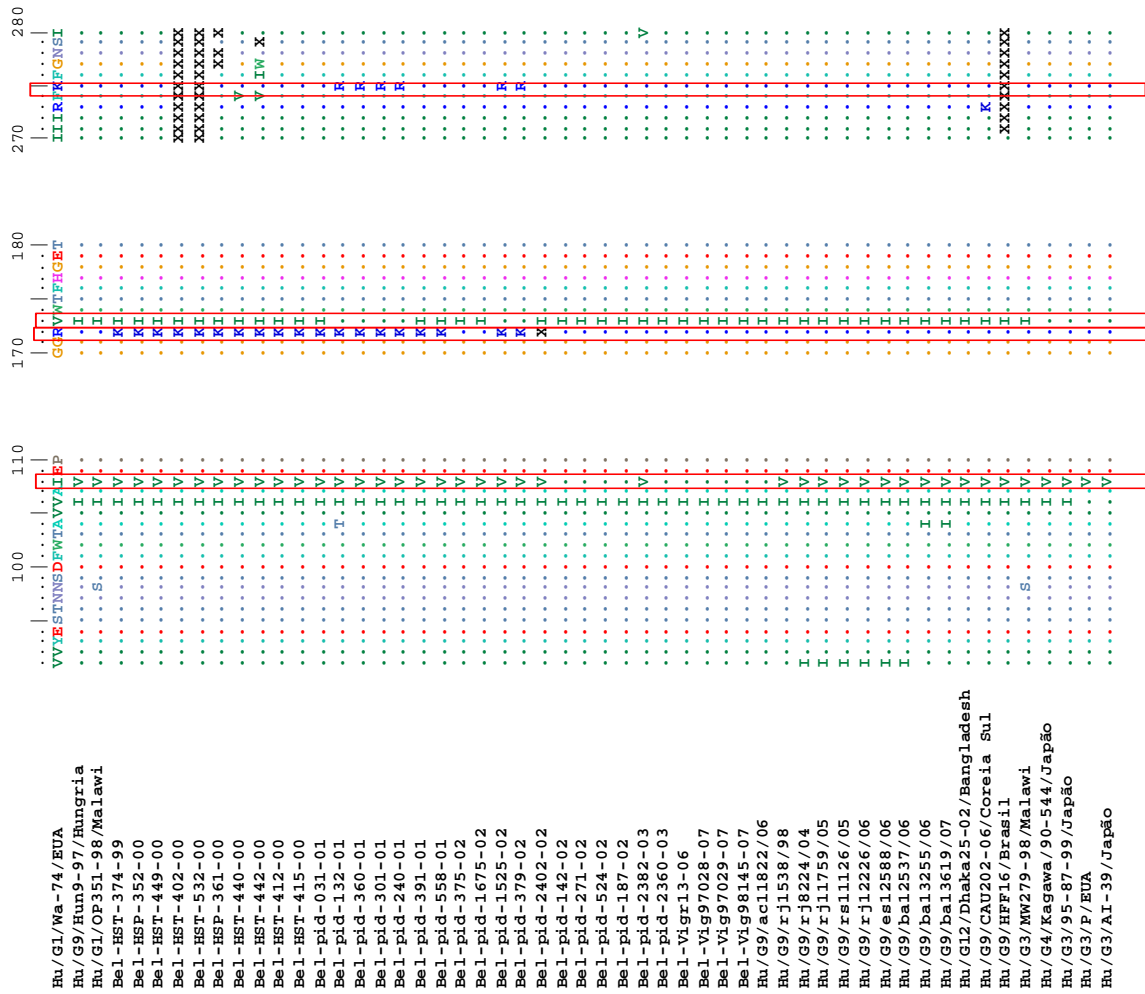


Figura 16: Alinhamento das seqüências aminoacídicas do gene *VP4* das amostras do presente estudo, protótipos, amostras do Brasil e do mundo. Os retângulos vermelhos indicam as substituições dos resíduos de aa identificadas. Siglas dos aa encontram-se no anexo B.

Em Belém, nos anos de 2001 e 2002, circularam amostras genótipo P[8] com substituição nos nucleotídeos 517 (A→G) e 824 (A→G), modificações estas que ocasionaram mudanças aminoacídicas nas posições 173 (I→V) e 275 (K→R), respectivamente.

O grupo presente na linhagem 3, composto por amostras da região metropolitana de Belém do ano 2002 a 2007, apresentou modificações nucleotídicas, quando comparado com todas as outras amostras do presente estudo, nas posições: 195 e 468 (A→G), 297 (T→C), 336 (C→T) e 322, 579 e 771 (G→A), com substituição aminoacídica apenas na posição 322 (aa 108 [V→I]).

A substituição nucleotídica na posição 564 (A→G) foi observada nas amostras de 2006 e 2007, enquanto que as modificações nos resíduos 570 (T→A) e 384 (T→C) foram detectadas apenas nas amostras de 2007, não havendo, em ambas, substituição de aminoácido.

Não foi observada divergências nucleotídicas e aminoacídicas no gene *VP4* entre as amostras provenientes do posto de saúde e hospitalares, apresentando elevados índices de similaridade (97,8% a 100%).

Na análise do tipo P[8] notou-se que a exemplo do tipo G9, todas as amostras apresentaram-se em um grupo monofilético da árvore filogenética. Observou-se ainda que houveram substituições nucleotídicas e aminoacídicas peculiares a cada grupo, principalmente no que se refere as amostras de 1999 a 2002, no grupo de 2002 a 2007 e naquelas provenientes dos anos de 2006 e 2007. As substituições detectadas no gene *VP4* estão sumarizadas na tabela 2.

Tabela 2: Modificações nucleotídicas e aminoácidas no gene *VP4* observadas nas amostras genótipo G9P[8]. Região metropolitana de Belém, no período de 1999 a 2007

Posição nucleotídica	Substituição nucleotídica	Posição aminoácida	Substituição aminoácida (Domínio de neutralização)	Amostras que apresentam as substituições
195	A→G	65	Não ocorreu substituição	Anos 2002 a 2007
213	T→A	71	Não ocorreu substituição	Anos 2000 a 2002
297	T→C	99	Não ocorreu substituição	Anos 2002 a 2007.
322	G→A	108	V→I (Não ocorreu substituição)	Anos 2002 a 2007.
336	C→T	112	Não ocorreu substituição	Anos 2002 a 2007.
384	T→C	128	Não ocorreu substituição	Ano 2007
468	A→G	156	Não ocorreu substituição	Anos 2002 a 2007.
515	G→A	172	R→K (Não ocorreu substituição)	Anos 1999 a 2002
517	A→G	173	I→V (Não ocorreu substituição)	Anos 2001 e 2002
555	T→C	185	Não ocorreu substituição	Anos 1999 a 2002
564	A→G	188	Não ocorreu substituição	Anos 2006 e 2007.
570	T→A	190	Não ocorreu substituição	Anos 2007.
579	G→A	193	Não ocorreu substituição	Anos 2002 a 2007
771	G→A	257	Não ocorreu substituição	Anos 2002 a 2007
824	A→G	275	K→R (Não ocorreu substituição)	Anos 2001 e 2002

VIII – DISCUSSÃO

No atual cenário pós implantação da vacina contra RV, torna-se imprescindível estudos de cunho epidemiológico visando monitorar os tipos de RV circulantes, assim como a caracterização molecular dos mesmos, frente aos diversos mecanismos de evolução deste vírus, capaz de gerar variantes que possam a vir escapar a proteção conferida pelos imunizantes utilizados atualmente.

O genótipo G9 foi detectado no Brasil pela primeira vez em Belém, em estudo conduzido de 1990 a 1992, re-emergiu a partir do ano 1999 e, desde então, tem sido detectado, tornando-se um genótipo frequente na região. O foco principal da presente discussão reside na caracterização molecular de amostras genótipo G9 provenientes dos estudos Hospital Sentinela (1998 a 2000), Vigilância 006 (2001 a 2003) e Rede de Vigilância (2006 e 2007), permitindo a análise das modificações temporais deste genótipo na região metropolitana de Belém.

A variabilidade genética do genótipo G9 é evidenciada a partir dos eletroferotipos longo e curto. Os genótipos G9P[4] e G9P[6] já foram detectados apresentando os dois tipos de perfil eletroforético, dependendo do local em que o estudo foi desenvolvido (UNICOMB et al., 1999; GRIFFIN et al., 2000; OKA et al, 2000; RAMACHANDRAN et al, 2000; ARAÚJO et al., 2001; CUNLIFFE et al., 2001a; JAIN et al., 2001; ZHOU et al., 2001; KHAMRIN et al., 2006; MASCARENHAS et al., 2007a)

O G9P[8], em geral, apresenta o perfil longo, com poucos estudos detectando o perfil de migração curto, como em estudo desenvolvido em Buenos Aires, Argentina por Esteban et al. (2010), em amostras detectadas em crianças com até 15 anos de idade no ano de 2006 que desenvolveram gastroenterite e na Turquia, em estudo levado a efeito por Bozdayi et al., (2008), com crianças de até 5 anos de idade no período de 2004-2005.

No estudo conduzido na região metropolitana de Belém, o padrão longo foi o único perfil de migração encontrado e associado ao genótipo G9P[8]. Tal achado corrobora os de prévios estudos, realizados em várias regiões do mundo, que obtiveram o mesmo resultado, associando o padrão longo ao genótipo G9P[8], como no Brasil, Bangladesh, Argentina, Hungria, Tailândia, Nicarágua, EUA entre outros (RAMACHANDRAN et al., 1998; ARAÚJO et al., 2001; BÁNYAI et al., 2005; KHAMRIN et al., 2006, BUCARDO et al., 2007; AHMED et al, 2010; ESTEBAN et al., 2010).

Entre as amostras selecionadas e inicialmente caracterizadas como genótipo G9 por nested-PCR, segundo protocolo descrito por Das et al., (1994), quatro não confirmaram o genótipo pelo sequenciamento, caracterizando-se como tipo G1. Esse achado também foi descrito em diversos estudos, nos quais há uma hibridização errônea do iniciador devido a variações na seqüência nucleotídica, induzindo a uma caracterização não fidedigna da amostra (NAKAGOMI et al., 1991; SANTOS et al., 1998, 2002; CUNLIFFE et al., 2001a,b; ESPÍNOLA et al., 2008a; ALADIN et al., 2010).

VIII.1 – Análise do gene VP7

O genótipo G9 apresenta elevada diversidade genética o que permite sua classificação em 6 linhagens: I (representada por amostras detectadas no Japão e EUA na década de 80); II (detectada exclusivamente na Índia em 1986); III (amostras emergentes em meados da década de 90); IV (detectada exclusivamente na China em 1997); V (amostras detectadas em 1997-1998 no EUA) e VI (amostras detectadas no Japão e China de 1997 a 2002). Estudos conduzidos na Hungria, Tailândia, Bangladesh, Índia, Brasil, entre outros, apresentaram elevada similaridade deste genótipo ao longo do tempo, agrupando as amostras na linhagem III (BÁNYAI et al., 2004b; KHAMRIN et al., 2007; ARAUJO et al., 2007; SAMAJDAR et al., 2008; THEAMBOONLERS et al., 2008; AHMED et al., 2010).

As amostras do presente estudo agruparam na linhagem III apresentando elevada similaridade de nucleotídeo entre as mesmas (98,5% a 100%) e com as outras amostras presentes na linhagem, apresentando maior divergência as amostras do ano de 2007 (1,5%).

As amostras de Ghana (GH1416), Recife (R293) e Bahia (BA201/01) foram as que apresentaram maior similaridade (valores médios de 99,3%, 99,2% e 99,1%, respectivamente) com as amostras da região metropolitana de Belém. O genótipo G9 de Ghana foi descrito em estudo desenvolvido com crianças de até 2 anos de idade, do ano de 1998 a 2000 por Armah et al. (2003) e que, portanto, circularam no mesmo período em que emergiu o genótipo G9 em Belém. O G9 da Bahia foi obtido a partir de um estudo

conduzido com crianças hospitalizadas com até 5 anos de idade no ano 1999 a 2002 (SANTOS et al., 2005).

Os genótipos detectados ao longo de anos presentes em uma mesma linhagem e apresentando elevada similaridade, denotam a contínua circulação da mesma variante ao longo do tempo. Tal fato pode ser evidenciado em estudos conduzidos por Theamboonlers et al. (2008) na Tailândia, no período de 2004 a 2006; em Buenos Aires, Argentina por Esteban et al., (2010), em amostras detectadas no período de 2004 a 2007; por Wang et al., (2009) na China, com amostras dos anos de 2004 a 2007 e o estudo levado a efeito por Araújo et al., (2007b), no Rio de Janeiro, com amostras G9 detectadas no período de 2001 a 2004.

As amostras do presente estudo apresentaram elevada similaridade agrupando em uma mesma linhagem ao longo do tempo, apesar de ter sido detectado oito substituições nucleotídicas, algumas próprias das amostras de Belém, ocorreram apenas três modificações aminoacídicas nos resíduos 66 (A→V), 43 (I→V) e 73 (Q→R), presentes nas regiões variáveis VR3 e VR4 e detectadas apenas nas amostras de 2007.

Khamrin et al., (2009) em estudo conduzido na Tailândia, observaram a elevada similaridade do gene VP7 ao longo do tempo (2000 – 2005), com maior detecção do genótipo G9P[8] nos anos de 2000 a 2002 e declínio deste tipo de RV nos anos de 2003 a 2005, provavelmente devido a elevada exposição a cepa nos anos de 2000 a 2002, induzindo a uma proteção da comunidade. Todavia, como abordado pelos autores, qualquer substituição de aa, principalmente aquelas localizadas nas regiões antigênicas pode gerar

variantes que escapem a imunidade estabelecida por infecções anteriores ou até mesmo por imunizantes disseminados mundialmente, alterando a antigenicidade, infectividade e patogenicidade deste genótipo.

Na presente análise, observou-se elevada similaridade nas amostras selecionadas ao longo dos anos (1999 a 2007), os quais apresentaram elevadas frequências de detecções de 1999 a 2003, com declínio nos anos de 2006 e 2007 (dados não apresentados). As amostras mais divergentes são as de 2007 e, apesar de não haver modificações de aa em regiões antigênicas, possuem substituições aminoacídicas únicas, quando comparadas com as amostras analisadas na linhagem 3, nas regiões variáveis (VR3 e VR4), diferenciando-se das demais detectadas.

VIII.2 – Análise do gene VP4

Estudos desenvolvidos em vários países, como no Brasil, China, Paraguai, Bangladesh, Tailândia, entre outros, associaram o P[8] do genótipo G9, a linhagem 3 (ESPÍNOLA et al., 2008b; PAUL et al., 2008; RAHMAN et al., 2008; THEAMBOONLERS et al., 2008; TORT et al., 2010). Contudo, Araújo et al (2007b), em estudo desenvolvido no Rio de Janeiro, detectaram amostras G9P[8] na linhagem 3 de P[8], em sua grande maioria, além da linhagem 2. Nossos resultados estão de acordo com o da maioria dos estudos desenvolvidos, agrupando as amostras na linhagem 3 do genótipo P[8], mostrando elevada similaridade nucleotídica entre as amostras selecionadas (97,8% a 100%).

Paul et al. (2008), em estudo conduzido em Bangladesh com crianças e adultos, no período de 2004 a 2006, analisaram o tipo P[8] associados ao G1, G2, G9 e G12 e observaram que todos agruparam na linhagem 3 de P[8], apresentando elevados índices de similaridade.

Da mesma forma, Espínola et al (2008b) em estudo desenvolvido no Paraguai de 1998 a 2005 com crianças de até 5 anos de idade analisaram o genótipo P[8] associado aos tipos G1, G4 e G9, todos agrupando, com elevada identidade nucleotídica, na linhagem 3 de P[8]. Tais autores afirmam que esta linhagem tornou-se importante para os RV emergentes e que a mudança das linhagens circulantes pode ser um mecanismo de escape da imunidade que o RV apresenta.

As amostras da região metropolitana de Belém dos anos de 1999 a 2002 apresentaram substituições nucleotídicas, que não foram detectadas nas outras selecionadas do presente estudo. Dentre tais substituições, foram observadas duas modificações aminoacídicas nas posições 173 (I→V) e 808 (K→R) referente aos anos de 2001 e 2002. Essas modificações foram também detectadas também em amostras dos EUA e Japão e associados a diferentes tipos G (GORZIGLIA et al, 1988; CAO et al., 1999; KUDO et al., 2001).

Estudo desenvolvido por Tort et al. (2010) com amostras do Brasil provenientes do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Rio Grande do Sul e Acre, coletadas de crianças hospitalizadas com até 5 anos de idade no período de 2004 a 2007, observaram modificações aminoacídicas no gene VP4 nas posições 91 (I→V), 108 (V→I) e 196 (I→V), sendo a última exclusiva das amostras do Acre. Contudo, nenhuma dessas substituições ocorreram nos

domínios de neutralização, estando apenas a do aa 108 próxima a região V115 – 123G. Os autores especulam que tais mutações podem vir a afetar a infectividade viral. Além das substituições do gene VP4, outras foram detectadas nos genes VP7, NSP1, NSP3 e NSP5, observando-se, desta forma, o surgimento de uma nova variante de G9P[8] no Norte do Brasil.

No que tange a análise da linhagem 3 de P[8] das amostras da região metropolitana de Belém, observou-se a presença de um grupo composto por amostras do ano 2002 a 2007 e uma amostra do Acre, com elevada identidade nucleotídica (média de 99,5%). Este grupo apresentou várias substituições nucleotídicas e destas, houve modificação aminoacídica apenas na posição 108 (V→I).

Martinez-Lazo et al (2008) postulam que mudanças nucleotídicas detectadas em várias partes do mundo sejam determinadas como mecanismo de evolução convergentes do genótipo G9, enquanto que substituições nucleotídicas específicas neste genótipo ocorrido apenas em determinada comunidade, são geradas por mutações pontuais.

A modificação do aa 173 foi detectada em todas as amostras do presente estudo, assim como em outras provenientes dos EUA e Japão. Contudo, as modificações nos resíduos 172 (R→K) e 275 (K→R) foram observadas apenas nas amostras do presente estudo no período de 1999 a 2002, anos em que houve maior detecção deste genótipo na região metropolitana de Belém.

Segundo Linhares et al (2006b), a gravidade dos episódios diarreicos pode ser atribuída a genótipos específicos, como o G9 que

manifestou clínica mais grave, em comparação com o quadro desencadeado nas infecções pelo tipo G1,. Contudo, outros estudos não detectaram a diferença de manifestações clínicas entre os genótipos, não atribuindo maior gravidade ao genótipo G9 (CLARK et al., 2004; AUIPAIS et al., 2009).

No presente estudo, não foi observada divergências nucleotídicas ou aminoacídicas nos genes VP4 e VP7 do genótipo G9 se comparadas as amostras provenientes de posto de saúde com as oriundas de hospital. No entanto, a presente análise não pode concluir tal fato com precisão em razão da quantidade de amostras provenientes do posto de saúde ser pequena (n = 2) se comparadas ao do hospital (n = 30).

Estudo conduzido por Hoshino et al. (2005), envolvendo análise filogenética e sorológica, afirmaram que anticorpos induzidos por amostras G9 da linhagem 1 são capazes de neutralizar antígenos da linhagem 2 e 3, enquanto que anticorpos da linhagem 3 não possuem a mesma capacidade em relação a linhagem 1. Estes resultados denotam a importância do contínuo monitoramento das amostras circulantes e posterior caracterização molecular em busca de um melhor entendimento quanto a natureza e evolução do RV.

Estudos de efetividade das vacinas contra RV introduzidas mundialmente, também são de notória importância frente a novas variantes com possíveis modificações antigênicas. No Brasil, tal análise está sendo conduzida pelo MS (2010) nas cinco regiões do país e em Belém por Linhares et al. (2010), demonstrando este último, bons resultados de efetividade do imunizante contra RV implantado no Brasil.

O presente estudo demonstra a diversidade genética observada nos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 do genótipo G9 na região

metropolitana de Belém, com modificações genéticas peculiares as amostras circulantes na região.

Tal análise corrobora para a relevância deste genótipo em escala global, representando o primeiro estudo da epidemiologia molecular do genótipo G9 no Estado do Pará e impõe a necessidade de seu contínuo monitoramento frente as suas peculiaridades genéticas de adaptação e propagação, a fim de detectar possíveis variantes emergentes que possam representar um desafio as estratégias de imunização atuais.

IX – CONCLUSÃO

- Todas as amostras do presente estudo apresentaram eletroferotipo longo e genótipo G9P[8].

- Agruparam na linhagem 3 do genótipo G9, sendo considerada homogênea e consistente

- O gene VP7 das amostras da região metropolitana de Belém apresentaram elevada similaridade ao longo do tempo estudado (1999 a 2003 e 2006-2007).

- Foram observadas oito substituições nucleotídicas e três alterações aminoacídicas no gene VP7 (43 [I→V], 66 [A→V] e 73 [Q→R]), as quais ocorreram nas regiões variáveis VR3 e VR4, sendo as modificações nos aa 43 e 73 observadas apenas nas amostras de Belém provenientes do ano de 2007.

- As amostras P[8] de Belém agruparam na linhagem 3 apresentando elevada similaridade.

- Observou-se para o gene VP4, 15 substituições nucleotídicas e 4 aminoacídicas (108 [V→I], 172 [R→K], 173 [I→V] e 275 [K→R]). Destas, as modificações nos resíduos 172 e 275 são exclusivos das amostras dos anos de 1999 a 2002.

- As amostras do presente estudo apresentaram elevada similaridade ao longo do tempo estudado, sendo as amostras de 2007 as mais divergentes, tanto para o gene VP4 quanto para o gene VP7

- Apesar da detecção de modificações aminoacídicas nos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7, não foi possível estudar possíveis alterações conformacionais das proteínas, assim como a propagação de tais mutações para a progênie viral, sendo estes pontos possíveis focos para estudos a serem desenvolvidos.

- A análise dos demais genes e suas influências na virulência e infectividade viral também se tornam objetos de interesse, tanto frente às peculiaridades observadas no genótipo G9, quanto devido ao o desafio que variantes emergentes poderiam representar no atual cenário pós implantação da vacina contra RV.

X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABE, M. et al. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. **Virus Res.**, v: 144, n. 1-2, p. 250-7, 2009.

AHMED, K. et al. Molecular characterization of VP7 gene of human rotaviruses from Bangladesh. **Virus Genes**, v 40, p. 347–356, 2010.

AHMED, K.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. Isolation and Molecular Characterization of a Naturally Occurring Non-Structural Protein 5 (NSP5) Gene Reassortant of Group A Rotavirus of Serotype G2P[4] With a Long RNA Pattern. **J Med Virol.**, 77, P. 323 – 330, 2005.

ALADIN, F. et al. Identification of G8 rotavirus strains determined as G12 by rotavirus genotyping PCR: Updating the current genotyping methods. **J. Clin. Virol.**, v. 48, p. 340 – 344, 2010.

ARAÚJO, E.C. et al. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of two doses of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in healthy Brazilian infants. **J. Pediatría**. v. 83, n. 3, p.: 217-224, 2007a.

ARAÚJO, I. T. et al. Brazilian P[8],G1, P[8],G5, P[8],G9, and P[4],G2 Rotavirus Strains: Nucleotide Sequence and Phylogenetic Analysis. **J Med Virol**, v. 79, p. 995–1001, 2007b.

ARAÚJO, I. T. et al. Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 1999-2001, 2001.

ARISTA, S. et al. G2 rotavirus infections in an infantile population of the South of Italy: variability of viral strains over time. **J Med Virol.**, v. 77, n. 4, p.:587-94, 2005a.

ARISTA, S. et al. Genetic variability among serotype G4 Italian human rotaviruses. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 1420–1425, 2005b.

ARMAH, G. E. et al. Changing Patterns of Rotavirus Genotypes in Ghana: Emergence of Human Rotavirus G9 as a Major Cause of Diarrhea in Children. **J. CLIN MICROBIOL**, v. 41, n. 6, p. 2317–2322, 2003.

AUPIAIS, C. et al. Severity of acute gastroenteritis in infants infected by G1 or G9 rotaviruses. **J Clin Virol.**, v. 46, p. 282–285, 2009.

AZEVEDO, A. S. et al. Viremia and nasal and retal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. **J. Virol**, v. 79, p. 5428 – 5436, 2005.

BAGCHI, P. et al. Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection. **J Virol.**, v. 84, n. 13, p.: 6834-45, 2010.

BALL, J. M. et al. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science**, v. 272, p. 101-104, 1996.

BALL, J. M. et al. Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin. **Viral Immunol.**, v.18, n.1, p.27-40, 2005.

BÁNYAI, K. et al. Dominating Prevalence of P[8],G1 and P[8],G9 Rotavirus Strains Among Children Admitted to Hospital Between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary. **J Med Virol**, v. 76, p. 414–423, 2005.

BÁNYAI, K. et al. Eight-Year Survey of Human Rotavirus Strains Demonstrates Circulation of Unusual G and P Types in Hungary. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, p. 393-397, 2004a.

BÁNYAI, K. et al. Genetic heterogeneity in human G6P[14] rotavirus strains detected in Hungary suggests independent zoonotic origin. **Journal of Infection**, p. 1-3, 2009.

BÁNYAI, K. et al. Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001. **J Med Microbiol**, v. 53, p. 791–801, 2004b.

BARNES, G. L. et al. Severity of rotavirus infection in relation to serotype, monotype and electropherotype. *J Paediatr Child Health*, v. 28, n. 1, p.:54-7, 1992.

BARRIL, P. A. et al. Detection of Group A Human Rotavirus G9 Genotype Circulating in Córdoba, Argentina, as Early as 1980. **J Med. Virol.** 78: 1113-1118,

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.

BEISNER, B. et al. Characterization of G serotype dependent non-antibody inhibitors of rotavirus in normal mouse serum. **Arch. Virol.**, v. 143, p. 1277–1294, 1998.

BERNSTEIN DI. et al. Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in US children. **JAMA**, v. 273, p. 1191-1196, 1995.

BHANDARI, N. et al. Safety and immunogenicity of two live attenuated human rotavirus vaccine candidates, 116E and I321, in infants: Results of a randomised controlled trial. **Vaccine.**, v.24, p. 5817-5823, 2006.

BISHOP, R. F. et al. Serum, fecal, and breast milk rotavirus antibodies as indices of infection in mother-infant pairs. **J. Infect. Dis.**, v. 96, n. 174, p. S23-29, 1996.

BISHOP, R. F. et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet.**, v. 2, n. 7841, p. 1281-1283, 1973.

BLUTT, S. E. et al. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. **Plosmedicine**, v. 4, p. 660-668, 2007.

BOOM, J. A. et al. Effectiveness of pentavalent rotavirus vaccine in a large urban population in the United States. **Pediatrics.**, v. 125, n. 2, p.:199-207, 2010.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purifications of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BOSCHI-PINTO, C.; VELEBIT, L.; SHIBUYA, K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. Disponível em: <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/9/07-050054/en/print.html>, 2008. Acesso: 20 mar. 2010.

BOZDAYI, G. et al. Diversity of Human Rotavirus G9 Among Children in Turkey. **J Med Virol**, v. 80, p. 733–740, 2008.

BRASIL. Doença diarréica por rotavírus: Vigilância Epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano – VORH. **Informe técnico**, Versão Preliminar, Brasília, 2005.

BRASIL. Pesquisas em andamento monitoradas pela SVS. Retirado de: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31415> . Em, 21 jun 2010.

BRASIL. Rotavírus: vacina evita 850 óbitos de bebês por ano. Agência Saúde, Retirado de: <http://www.brasil.gov.br/noticias/ultimas_noticias/24263_saude_060306> . Acesso em: 06 mar. 2009, 2006.

BRESEE, J. S. et al. Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. **Vaccine**, v.17, p.: 2207-22, 1999.

BRESEE, J. S. et al. Update on rotavirus vaccines. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 24, n. 11, p. 947-952, 2005.

BUCARDO, F. et al. Mutated G4P[8] rotavirus associated with a nationwide outbreaks of gastroenterite in Nicaragua in 2005. **J. Clin Microbiol.**, v. 45, n.3, p. 990 – 7, 2007.

CAO, D. et al. Genetic variation in the VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in China and Japan. **Microbiol. Immunol.**, v. 43, n. 2, p. 171 – 5, 1999.

CAO, D. et al. The VP7 genes of two G9 rotaviruses isolated in 1980 from diarrheal stool samples collected in Washington, DC, are unique molecularly and serotypically. **J. Virol.**, v. 82, p. 4175 – 4179, 2008.

CARMONA, R. C. et al. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996-2003. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, n. 6, p. 963-968, 2006.

CARVALHO-COSTA, F. A. et al. Rotavírus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infect Dis.** v. 15, n. 1, p. 95 – 97, 2009.

CASTELLO, A. A. et al. Molecular Epidemiology of Group A Rotavirus Diarrhea among Children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and Emergence of the Infrequent Genotype G12. **J Clin Microbiol.**, v. 44, p.: 2046–2050, 2006.

CDC/MMWR. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine--United States, 1998-1999. **Morb Mortal Wkly Rep.**, v. 48, n. 27, p. 577-81, 1999.

CEZARD, J. P.; SALAZAR-LINDO, E. Racecadotril in acute diarrhea. **Indian Pediatr**, v. 42, n. 5, p. 502 – 3, 2005

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

CIARLET, M. et al. Characterization of neutralization epitopes on the VP7 surface protein of serotype G11 porcine rotaviruses. **J. Gen. Virol.**, v. 75, p. 1867–1873, 1994.

CIARLET, M. et al. Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. **J. Virol.**, v. 76, p. 4087–4095, 2002.

CIARLET, M. et al. Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 analysis of animal rotaviruses. **Arch. Virol.**, v. 145, n. 2, p. 371-383, 2000.

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, H. F. et al. A. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 1757– 1762, 1987.

CLARK, H. F. et al. Assessment of the epidemic potential of a new strain of rotavirus associated with the novel G9 serotype which caused an outbreak in the United

States for the first time in the 1995–1996 season. **J Clin Microbiol.**, v. 42, p. 1434–1438, 2004b.

CLARK, H. F. et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of a live, quadrivalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine in healthy infants. **J Pediatr.**, v. 144, n. 2, p. 184-190, 2004a.

COOK, S. M. et al. Global seasonality of rotavirus infections. **Bull WHO**, 68,p. 171 – 177, 1990.

COULSON, B. S.; KIRKWOOD, C. Relation of VP7 amino acid sequence to monoclonal antibody neutralization of rotavirus and rotavirus monotype. **J. Virol.**, v. 65, p. 5968–5974, 1991.

CUBITT, W. D.; STEELE, A. D.; ITURRIZA, M. Characterisation of rotaviruses from children treated at a London hospital during 1996: emergence of strains G9P2A[6] and G3P2A[6]. **J Med Virol.**, v. 61, p.150–154, 2000.

CUNLIFFE, K. et al., Efficacy of human rotavirus vaccine RIX 4414 in Africa during the first year of life. Apresentado em: **26 th Encontro anual da sociedade européia de doenças infecciosas pediátricas**. p. 9 – 13, 2009.

CUNLIFFE, N. A. et al. Expanding global distribution of rotavirus serotype G9: detection in Libya, Kenya, and Cuba. **Emerg Infect Dis**, v. 7, p. 890–892, 2001a.

CUNLIFFE, N. A. et al. Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: predominance of novel P[6]G8 strains. **J. Med. Virol.**, v. 57, p. 308-312, 1999.

CUNLIFFE, N. A. et al. Rotavirus Strain Diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 3, p. 836 – 843, 2001b.

CUNLIFFE, N. A. et al. Sequence analysis of NSP4 gene of human rotavirus allows classification into two main genetic groups. **J. Med. Virol.**, v. 53, p. 41-50, 1997.

DAS, B. K. et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **J. Clin. Microbiol.** v. 32, n. 7, p. 1820-1822, 1994.

DAS, B. K. et al. Characterization of the G serotype and genogroup of New Delhi newborn rotavirus Strain 116E. **Virology**, v. 197, n. 1, p. 99-107, 1993.

DAS, S. et al. Emergence of novel human group A rotavirus G12 strains in India. **J Clin Microbiol.**, v. 41, p.: 2760–2762, 2003.

DENNEHY, P. H. Rotavirus Vaccines: an Overview. **CLIN MICROBIOL REVIEWS**, v. 21, n. 1, p. 198–208, 2008.

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

DICKEY, M. et al. Rotavirus meningoencephalitis in a previously healthy child and a review of the literature. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 28, n. 4, p.:318-21, 2009.

DOAN, L. T. P. et al. Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. **J. Med. Virol.**, v. 69, n° 4, p. 588-594, 2003.

DUNN, S. T. et al. Identification of a new neutralization epitope on VP7 of human serotype 2 rotavirus and evidence for electropherotype differences caused by single nucleotide substitutions. **Virology**, v. 197, p. 397–404, 1993.

DYALL-SMITH, M. L. et al. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. **Proc. Natl. Acad.** V. 83, p. 3465–3468, 1986.

ESPÍNOLA, E. E. et al. Genetic diversity of the VP4 and VP7 genes affects the genotyping of rotaviruses: analysis of Paraguayan strains. **Infect. Genet. Evol.**,v. 8, p. 94 – 99, 2008a.

ESPÍNOLA, E. E. et al. Sequence and phylogenetic analysis of the VP4 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. **Arch Virol.**, v. 153, n. 6, p. 1067 – 73, 2008b.

ESTEBAN, L. E. et al. Molecular Epidemiology of Group A Rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004–2007: Reemergence of G2P[4] and Emergence of G9P[8] Strains. **J Med. Virol.**, v. 82, p. 1083–1093, 2010.

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

FABBRETTI, E. et al. 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, T. K.; BRESEE, J. S.; GLASS, R. S. Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. **Vaccine**, v. 22, p. 49–54, 2004.

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

FLEWETT, T. H. et al. Comparative evaluation of the WHO and DAKOPATTS enzymelinked immunoassay kits for rotavirus detection. **Bull World Health Organ**; v. 67, n. 4, p. 369-74, 1989.

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

FREITAS, E. R. L. et al. Occurrence of group A rotavirus mixed P genotypes infections in children living in Goiânia-Goiás, Brazil. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 2008.

FU, C. et al. Effectiveness of Lanzhou lamb rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis requiring hospitalization: A matched case-control study. **Vaccine**, v. 25, p. 8756–8761, 2007.

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

GABBAY, Y. B et al. Evidence for Zoonotic Transmission of Group C Rotaviruses Among Children in Belém, Brazil. **Journal of Medical Virology** v. 80, p.1666–1674, 2008.

GABBAY, Y. B. et al. An Outbreak of Group C Rotavírus Gastroenteritis Among Children Attending a Day-care Centre in Belém, Brazil. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v 17, n. 2, p. 69 – 74, 1999.

GABBAY, Y. B. et al. Detecção de rotavírus por imunocromatografia: ensaio simples e de rápida execução. **Rev Par Méd.**, v. 19, n. 1, p. 13-18, 2005.

GENTSCH, J. R. et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 6, p. 1365-1373, 1992.

GENTSCH, J. R. et al. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: Implications for vaccine development. **J Infect Dis.**, v. 174, p.:30-33, 1996.

GENTSCH, J. R. et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. **J. Infect. Dis.**, v. 192, p. 146 – 159, 2005.

GLASS, R. I. et al. Development of candidate rotavirus vaccines derived from neonatal strains in India. **J. Infect. Dis.**, v. 192, n. 1, p. 30-35, 2005.

GLASS, R. I. et al. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. **Lancet**, v. 368, p. 323 – 332, 2006.

GLASS, R. I. et al. The future of rotavirus vaccines: a major setback leads to new opportunities. **Lancet.**, v. 363, n. 9420, p. 1547-1550, 2004.

GONZÁLES-LOSA, M. R. et al. Detection of unusual strain of RV in patients with acute diarrhoea in México. **J. Clin. Virol.**, v.32, p. 325-328, 2005.

GORZIGLIA, M. et al. Sequence of the Fourth Gene of Human Rotaviruses Recovered from Asymptomatic or Symptomatic Infections. **J Virol**, v. 62, n. 8, p. 2978-2984, 1988.

GOUVEA, V. et al. Identification of two lineages (WA-like and F45-like) within the major rotavirus genotype P[8]. **Virus Res**, v. 59, p. 141–147, 1999.

GOUVEA, V. et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus

nucleic acid from stool specimens. **J Clin Microbiol.**, v. 28, n. 2, p. 276-82, 1990.

GOUVEA, V. et al. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p. 1408-1409, 1994.

GOUVEA, V.; SANTOS, N. Rotavirus serotype G5: a emerging cause of epidemic childhood diarrhea. **Vaccine**, v.17, p. 1291-1292, 1999.

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. et al. Rotavirus. **J. Pediat Gastro and Nutri.**, v. 46, p. 24 – 31, 2008.

GRIFFIN, D. D. et al. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: Identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6],G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. **Virology**, v. 294, p: 256–269, 2002.

GRIFFIN, D. D. et al. Surveillance of rotavirus strains in the United States: identification of unusual strains. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 2784–2787, 2000.

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

GURGEL, R. Q. et al. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. **Emerg. Infect Dis**, v. 13, p. 1571-1573, 2007.

GURGEL, R. Q. et al. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review. **J, Clin, Virol**, v. 43, p. 1 – 8, 2008.

GURGEL, R. Q.; CORREIA, J. B.; CUEVAS, L. E. Effect of rotavirus vaccination on circulating virus strains. **Lancet**, 2008.

GUSMÃO, R. H. et al. Rotavirus subgroups, G serotypes, and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhea in Belém, Brazil. **J. Trop. Pediatr.** v.45, p. 81-86, 1999.

HART, C. A.; CUNLIFFE, N. A. e BREESE, J. S. Diarrhoea caused by viruses. **In: Manson's tropical Diseases.** 21st ed. Edited by COOK GC & ZUMIA A. London: WB Saunders; p. 823-830, 2002.

HEATON, P. M. et al. Development of a pentavalent rotavirus vaccine against prevalent serotypes of rotavirus gastroenteritis. **J. Infect. Dis.**, v. 192, p. 17-21, 2005.

HERRING, A. J. et al. 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.

HONMA, S. et al. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. **J Clin Microbiol.**, v. 45, n. 8, p.:2641-8, 2007.

HORIE, Y.; MASAMUNE, O.; NAKAGOMI, O. Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins identified by sequence analysis. **J. Gen. Virol.**, v. 78, p. 2341-2346, 1997.

HOSHINO, Y. et al. A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains. **Virology**. v. 332, n. 1, p. 177-188, 2005.

HOSHINO, Y. et al. Horizontal transmission of rhesus monkey rotavirus-based quadrivalent vaccine during a phase 3 clinical trial in Caracas, Venezuela. **J Infect Dis.**, v. 187, n. 5, p.:791-800, 2003.

HOSHINO, Y. et al. Rotavirus Serotype G9 Strains Belonging to VP7 Gene Phylogenetic Sequence Lineage 1 May Be More Suitable for Serotype G9 Vaccine Candidates than Those Belonging to Lineage 2 or 3. **J VIROL.**, v. 78, n. 14, p. 7795–7802, 2004.

HUANG, H et al. Interaction (s) of rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) C-terminal peptides with model membranes. **Biochem J.**, v. 380, p. 723-33, 2004.

ITURRIZA-GÓMARA, M. et al. Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 8, p. 3566-3573, 2003.

ITURRIZA-GÓMARA, M. et al. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J. Virol** , v. 76, p. 6596 – 6601, 2002.

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

JAGANNATH, M. 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. et al. The Indian strain surveillance collaborating laboratories. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed infections in India. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p. 3524-3529, 2001.

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.

JIANG, B.; GENTSCH, J. R. e 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.

JOENSUU, J. et al. Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. **Lancet.**, v. 350, n. 9086, p.:1205-9, 1997.

KAPIKIAN, A. Z. et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infections nonbacterial gastroenteritis. **J. Virol.**, v. 10, p. 1075 – 81, 1972.

KHAMRIN, P. et al. Changing Pattern of Rotavirus G Genotype Distribution in Chiang Mai, Thailand From 2002 to 2004: Decline of G9 and Reemergence of G1 and G2. **J. Med.Virol.**, v. 79, p. 1775–1782, 2007.

KHAMRIN, P. et al. Emergence of Human G9 Rotavirus With an Exceptionally High Frequency in Children Admitted to Hospital With Diarrhea in Chiang Mai, Thailand. **J. Med. Virol.**, v. 78, p. 273–280, 2006.

KHAMRIN, P. et al. Evolutionary consequences of G9 rotaviruses circulating in Thailand. **Infect. Genet. Evol.**, v. 9, n. 6, p. 1394-9, 2009.

KHAMRIN, P. et al. Novel Nonstructural Protein 4 Genetic Group in Rotavirus of Porcine Origin. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 4, p. 686 – 687, 2008.

KHANANURAK, K. et al. Prevalence and Phylogenetic Analysis of Rotavirus Genotypes in Thailand between 2007 and 2009. **Infect Genet Evol**, v. 10, n. 4, p. 537-45 2010.

KIMURA, M. A. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **J Gen Virol**, v. 77, p. 1761 – 1768, 1980.

KIRKWOOD, C. D.; PALOMBO, E. A. Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4. **Virology**. v. 236, n. 2, p. 258-265, 1997.

KIRKWOOD, C. et al. Genetic and antigenic characterization of rotavirus serotype G9 strains isolated in Australia between 1997 and 2001. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 3649–54, 2003.

KIRKWOOD, C. et al. Rotavirus genotype distribution in Australian children – what has happened during the first 18 months after introduction of Rotateq™ and Rotarix™. Apresentado em: **Vaccines for Enteric Diseases Meeting**. Malaga, Espanha, p. 9 – 11, 2009.

KIRKWOOD, C.; MASENDY CZ, P. L.; COULSON, B. S. Characteristics and location of cross-reactive and serotype-specific neutralization sites on VP7 of human G type 9 rotaviruses. **Virology**, v. 196, p. 79–88, 1993.

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

KOVACS-NOLAN, J.; YOO, D.; MINE, Y. Fine mapping of sequential neutralization epitopes on the subunit protein VP8 of human rotavirus **BIOCHEM J.**, v. 15, n. 376, p. 269-75, 2003.

KUDO, S., et al. Molecular characterization in the VP7, VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 4 (G4) isolated in Japan and Kenya. **Microbiol. Immunol.**, v. 45, n. 2, p. 167 – 171, 2001.

LANATA, C. F. et al. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of one and three doses of the tetravalent rhesus rotavirus vaccine in infants in Lima, Peru. **J Infect Dis.**, v. 174, n. 2, p. 268-75, 1996.

LAZDINS, I. et al. Rotavirus antigenicity is affected by the genetic context and glycosylation of VP7. **Virology**, v. 209, p. 80–89, 1995.

LEBARON, C. H. et al. Viral agents of gastroenteritis. Public health importance and outbreak management. **Morbidity and Mortality Weekly Report.**, v. 39, p. 1 – 24, 1990.

LEITE, J. P. et al. Rotavírus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. **Arch. Virol.**, v. 141, n. 12, p. 2365-2374, 1996.

LEITE, J. P. G.; CARVALHO-COSTA, F. A.; LINHARES, A. C. Group A rotavírus genotypes and the ongoing Brazilian experience – a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 745-753, 2008.

LIN, S. L.; TIAN, P. Detailed computational analysis of a comprehensive set of group A rotavirus NSP4 proteins. **Virus Genes**, v. 26, n. 3, p. 271-282, 2003.

LINHARES, A. C. e BRESEE, J. S. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. **Ver Panam Salud Publica**, v. 8, n. 5, p. 305-31, 2000.

LINHARES, A. C. e VILLA, L. L. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). **J Ped. Rio de Janeiro**, v. 82, p. 25-34, 2006.

LINHARES, A. C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios

para o seu controle. **Cadern. Saúde Públ.**, v. 16, n. 3, p. 629-646, 2000.

LINHARES, A. C. et al. A short report on highlights of world-wide development of RIX4414: a Latin American experience. **Vaccine**, p. 3784-3785, 2006a.

LINHARES, A. C. et al. 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. et al. Effectiveness of the human rotavirus vaccine against hospitalization for severe rotavirus gastroenterite in Belém, Brazil. **ESPID**, 2010.

LINHARES, A. C. et al. Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. **Lancet.**, v. 371, p. 1181–89, 2008.

LINHARES, A. C. et al. Immunogenicity, safety and efficacy of rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil. **Bull World Health Organ.**, v. 74, n. 5, p. 491-500, 1996.

LINHARES, A. C. 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. et al. Neonatal rotavirus infection in Belém, Northern Brazil: Nosocomial Transmission of a P[6]G2 strain. **J Med Virol.**, v. 67, n. 3, p. 418-426, 2002.

LINHARES, A. C. et al;. Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. **Clin. Infect. Dis.**, 43, n. 3, p. 312-314, 2006b.

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

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

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

LUNDGREN, O. et al. Role of enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 491-495, 2000.

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

LUZ, C. R. et al. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop**, vol. 47, n. 5, p. 287-293, 2005.

LYNCH, M. et al. The pathology of rotavirus-associated deaths, using new molecular diagnosis. **Clin Infect Dis.**, v. 37, p. 1327-1333, 2003.

MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. Epidemiology of rotavirus infection in Thailand. **Pediatr. Int.**, v. 42, p. 415 – 521, 2000.

MARTELLA, V. et al. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: Evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. **Virology**, v. 344, p. 509-519, 2006.

MARTELLA, V. et al. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. **Virology**, v. 337, n. 1, p.:111-23, 2005.

MARTINEZ-LASO, J. et al. Phylogeny of G9 rotavirus genotype: A possible explanation of its origin and evolution. **J Clin Virol**, v. 44, p. 52-57, 2009.

MASCARENHAS, J. D. et al. Characterization of rotavirus P genotypes circulating among paediatric inpatients in northern Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.41, n. 3, p. 165-170, 1999.

MASCARENHAS, J. D. P. 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. et al. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belem, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 113 – 117, 2002.

MASCARENHAS, J. D. P. et al. Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin. **J Med Microbiol.**, 2007a.

MASCARENHAS, J. D. P. et al. Distribuição temporal de perfis eletroforéticos de ácido nucléico de rotavirus em fezes de crianças em Belém, Pará. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 4, p. 415 – 419, 1988.

MASCARENHAS, J. D. P. et al. Genomic characterization of rotavirus strains among children participating in a surveillance for diarrhoea in Belém, Pará. **XIV ENCONTRO DE VIROLOGIA**, p. 233, 2003.

MASCARENHAS, J. D. P. et al. Identification of Two Sublineages of Genotype G2 Rotavirus Among Diarrheic Children in Parauapebas, Southern Pará State, Brazil. **J.Med. Virol.**, v. 82, p. 712–719, 2010.

MASCARENHAS, J. D. P. et al. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. **Virus Research**, 2007b.

MASCARENHAS, J. D. P. et al. Naturally occurring serotype 2/ subgroup II rotavirus reassortants in Northern Brazil. **Virus Res.**, v. 14, n. 3, p. 235-40, 1989.

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.

MAST, T. C. et al. The impact of rotavirus gastroenteritis on the family. **BMC Pediatrics**. v. 11, n. 9, p. 1 – 9, 2009.

MATSUI, S. M. et al. Sequence analysis of gene 11 equivalentes from 'short' and 'super short' strains of rotavirus. **J. Virol.**, v. 28, p. 1033 – 1038, 1990.

MATTHIJNSSENS, J. 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. et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments.. **Arch Virol.**, v. 153, n. 8, p. 1621-9, 2008.

MATTHIJNSSENS, J. et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. **Future Microbiol.**, v. 4, n. 10., p.: 103 – 116, 2009.

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

McCORMACK, P. L; KEAN, S. J. Rotavirus vaccine RIX4414 (Rotarix). A review of its use in the prevention of rotavirus gastroenteritis. **Paediatr Drugs.**, v. 11, n. 1, p. 75 – 88, 2009.

McDONALD, S. M. et al. Evolutionary Dynamics of Human Rotaviruses: Balancing Reassortment with Preferred Genome Constellations. **Plos Path.**, v. 5, n. 10, 1 – 14, 2009.

MENDEZ, E. et al. Entry of rotaviruses is a multistep process. **Virology**, v. 263, p. 450–459, 1999.

MENDEZ, E., ARIAS, C.F., LOPEZ, S. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. **J. Virol.**, v. 70, p. 1218–1222, 1996.

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

MIKAMI, T. et al. An outbreak of gastroenteritis during school trip caused by serotype G2 group A rotavirus. **J Med Virol.**, v. 73, n. 3, p.:460-4, 2004.

MODARRES, S. et al. Eletroproretic RNA genomic profiles of rotavirus strains prevailing among hospitalized children with acute gastrenterite in Tehran, Iran, **Arch Iranian Med.**, v. 11, n. 5, p. 526 – 531, 2008.

MONTENEGRO, F. M. et al. Anticipating rotavirus vaccines in Brazil: detection and molecular characterization of emerging rotavirus serotypes G8 and G9 among children with diarrhoea in Recife, Brazil. **J Med Virol.**, v. 79, n. 3, p.: 335 – 340, 2007.

MORI, Y. et al. Sequential analysis of nonstructural protein NSP4s derived from

Group A avian rotaviruses. **Virus Res.**, v. 89, p. 145-151, 2002.

MORRISON, C.; GILSON, T.; NUOVO, G. J. Histologic distribution of fatal rotaviral infection: An immunohistochemical and reverse transcriptase in situ polymerase chain reaction analysis. **Hum Pathol**, v. 32, p. 216-221, 2001.

MOSSEL, E. C.; RAMIG, R. F. Rotavirus genome segment 7 (NSP3) is a determinant of extraintestinal spread in the neonatal mouse. **J. Virol.** v. 76, n. 13, p.: 6502 – 09, 2002.

MOTA-HERNANDEZ, F. et al. Rotavirus diarrhea severity is related to the VP4 type in Mexican children. **J Clin Microbiol.**, v.41, n° 7, p. 3158–3162, 2003.

NAKAGOMI, O.; OYAMADA, H. NAKAGOMI, T. Experience with serotyping rotavirus strains by reverse transcription and two-step polymerase chain reaction with generic and type-specific primers. *Mol Cell Probes.*, v. 5, n. 4, p. 285 – 9, 1991.

NAKAGOMI, T. et al. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. **Arch Virol**, 2008.

NAKAGOMI, T. et al. Isolation of a human rotavirus strain with a super-short RNA pattern and a new P2 subtype. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 4, p. 1213-6, 1999.

NAKAGOMI, T. et al. Occurrence of changes in human rotavirus serotypes with concurrent changes in genomic RNA electrophoretotypes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, n. 12, p. 2586-2592, 1988a.

NAKAGOMI, T., KATSUSHIMA, N.; NAKAGOMI, O. Relative frequency of human rotavirus subgroups I and II in relation to 'short' and 'long' electrophoretotypes of viral RNA. **Ann Inst Pasteur Virol**, v. 139, p. 295 – 300, 1988b.

NARANJO, A. et al. Prevalence of VP4 and VP7 genotypes of human rotavirus in Ecuadorian children with acute diarrhea. **J Med Virol**, v. 80, n. 6, p. 1106–1111, 2008.

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

OFFIT, P. A. Host factors associated with protection against disease. The skies are clearing. **J. Infect. Dis.**, v. 174, p. 59-64, 1996.

OKA, T., NAKAGOMI, T., NAKAGOMI, O. Apparent reemergence of serotype G9 in 1995 among rotaviruses recovered from Japanese children hospitalized with acute gastroenteritis. **Microbiol. Immunol.**, v. 44, p. 957 – 961, 2000.

OLIVEIRA, A. S. L et al. Reemergence of G2 rotavirus serotypes in Northern Brazil reflects a natural changing pattern over time. **The 8th Rotavirus International Symposium**, Istanbul, Turkey, Abstracts p. 60-61, 2008.

OLIVEIRA, C. S. et al. Infecções por rotavírus. **Infectologia Pediátrica**. Ed. Atheneu, Cap. 48, 2007.

OMS. **Implementing the new recommendations on the clinical management of diarrhoea : guidelines for policy makers and programme managers.**, 2006.

OMS. Meeting of the immunization Strategic Advisory Group of Experts, April 2009 – conclusions and recommendations. **Weekly epidemiological record.**, n. 23, p. 220 – 236, 2009a.

OMS. Rotavirus vaccines. **Wkly Epidemiol Rec.**, n. 82, p. 282 – 295, 2007.

OMS. Rotavirus. Última atualização: 2009. Disponível em: < <http://www.who.int/nuvi/rotavirus/en/>>. Acesso em: 19 out. 2009b.

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

OPAS. Epidemiological alert: Update on Rotavirus diarrheal syndrome. 7 April 2010. Retirado de: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=2678&Itemid=1167, 2010.

O'RYAN, M. et al. Rotavirus-associated medical visits and hospitalizations in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 20, n. 7, p. 685-93, 2001.

PALUMBO, E. et al. Diarrhoea in children: aetiology and clinical aspects. **Le Infezioni in Medicina**, n. 2, p. 95-99, 2009.

PANG, X. et al. Increased sensitivity for various rotavirus genotypes in stool specimens by amending three mismatched nucleotides in the forward primer of a real-time RT-PCR assay. **J Virol Methods**, 2010.

PANT, N. et al. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. **BMC Microbiol.**, v. 27, n. 7, p. 86, 2007.

PARASHAR, U. D. et al. Global Illness and deaths Caused by Rotavirus disease in Children. **Emerg Infect Dis.**, v. 9, n. 5, p. 565-572, 2003.

PARASHAR, U. D. et al. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerg Infect Dis.** v. 12, n° 2, p. 304-306, 2006.

PARRA, G. I. et al. Molecular characterization and genetic variation of the VP7 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. **J Med Virol**, v. 77, p. 579–86, 2005.

PATEL, M. et al. Association between pentavalent rotavirus vaccine and severe rotavirus diarrhea among children in Nicaragua. **JAMA.**, v. 301, n. 21, p. 2243-51, 2009.

PAUL, S. K. et al. Eletrophoretic patterns of human rotavirus strains prevailing among hospitalized children with acute gastroenteritis. **Mymensingh Med J.**, v. 15, p. 49 – 54, 2006.

PAUL, S. K. et al. Phylogenetic analysis of rotaviruses with genotypes G1, G2, G9 and G12 in Bangladesh: evidence for a close relationship between rotaviruses from children and adults. **Arch Virol**, v. 153, p. 1999 – 2012, 2008.

PEDLEY, S. et al. The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. **J. Gen. Virol.**, v. 65, p.1141-1150, 1984.

PEREIRA, H. G. et al. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 78, n. 4, p. 483-490, 1983.

PHAN, T. G. et al. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. **Infect Genet Evol.** v. 7, p. 656-663, 2007.

PHUA, K. B. et al. Safety and efficacy of human rotavirus vaccine during the first 2 years of life in Asian infants: randomised, double-blind, controlled study. **Vaccine.**, v. 27, n. 43, p. 5936-41, 2009.

PIETRUCHINSKI, E. et al. Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. **J Med Virol.** v. 78, p. 1241-1249, 2006.

POLANCO-MARIN, G. et al. Clinical manifestations of the rotavirus infection and his relation with the electropherotypes and serotypes detected during 1998 and 1999 in Merida, Yucatan, Mexico. **J Clin Virol.**, v. 27, n. 3, p.:242-6, 2003.

PONGSUWANNA, Y. et al. Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. **J Clin Microbiol.**, v. 40, p.: 1390–1394, 2002.

PRASAD, B. V. et al. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. **Nature.**, v. 382, n. 6590, p. 471-3, 1996.

RAHMAN, M. et al. Characterization of a novel P[25],G11 human group A rotavirus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n 7, p. 3208-3212, 2005a.

RAHMAN, M. et al. Emerging G9 rotavirus strains in the northwest of China. **Virus Res.**, v. 137, p. 157–162, 2008.

RAHMAN, M. et al. Predominance of rotavirus G9 genotype in children hospitalized for rotavirus gastroenteritis in Belgium during 1999-2003. **J Clin Virol.**, v. 33, n. 1, p. 1-6, 2005b.

RAHMAN, M. et al. Prevalence of G2P[4] and G12P[6] rotavirus, Bangladesh. **Emerg Infect Dis**, v. 13, p. 18-24, 2007.

RAMACHANDRAN, M. et al. Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, n 11, p. 3223–3229, 1998.

RAMACHANDRAN, M. et al. Molecular characterization of serotype G9 rotavirus

strains from a global collection. **Virology**, v. 278, p. 436–444, 2000.

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. 10213-20, 2004.

REIDY, N. et al. Emergence of G3 and G9 Rotavirus and Increased Incidence of Mixed Infections in the Southern Region of Ireland 2001–2004. **J. Med. Virol.**, v. 77, p. 571–578, 2005.

RIBEIRO, L. R. et al. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. **Mem Inst Oswaldo cruz**, v. 103, n. 2, p.: 201-206, 2008.

ROLLO, E. E. et al. The epithelial cell response to rotavirus infection. **J. Immunol.**, v.163, p.4442-4452, 1999.

RUIZ, M. C. et al. Molecular Biology of Rotavirus Entry and Replication. **The Scient World J.**, v. 9, p. 1476–1497, 2009.

RUIZ-PALACIOS, G. M. et al. Safety and efficacy of na attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, n. 1, p. 11-22, 2006.

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.

SALAZAR-LINDO, E. et al. Lactobacillus casei strain GG in the treatment of infants with acute watery diarrhea: a randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial. **BMC Pediatr.**, v. 2, n. 4, p. 18, 2004.

SAMAJDAR, S. et al. Human group A rotavirus P[8] Hun9-like and rare OP354-like strains are circulating among diarrhoeic children in Eastern India. **Arch Virol**, v. 153, p. 1933–1936, 2008.

SANTOS, N. e HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Rev. Med. Virol.**, v. 15, n. 1, p. 29-56, 2005.

SANTOS, N. et al. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 8, p. 4064-4069, 2005.

SANTOS, N. et al. Rotavirus strains bearing genotype G9 or P[9] recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 3, p. 1157-1160, 2001.

SANTOS, N. et al. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n° 7, p. 3399-3402, 2003.

SANTOS, N. et al. Detection of Rotavirus Types G8 and G10 among Brazilian Children with Diarrhea. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 9, p. 2727–2729, 1998.

SANTOS, N. et al. VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR. **Virus Res.**, v 90, p. 1-14, 2002.

SÃO PAULO, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Diarréia e Rotavírus. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n° 6, p. 844-845, 2004.

SATTAR, S.A. et al. Interruption of rotavirus spread through chemical disinfection. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v.15, n.12, p.751-756, 1994.

SHINOZAKI, K. et al. Characterization of human rotavirus strains with G12 and P[9] detected in Japan. **J Med Virol.**, v. 73, p.: 612–616, 2004.

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

SOARES, L. S. et al. Molecular characterization of G1 human rotaviruses detected in children from Belém, Pará, Brazil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 1, n. 1, p.: 125 – 130, 2010.

SOLBERG, O. D. et al. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. **Virology.**, v. 385, n. 1, p. 58 – 67, 2009.

SOUZA, M. B. et al. Molecular and serological characterization of group a rotavirus

isolates obtained from hospitalized children in Goiania, Brazil, 1998-2000. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, n. 7, p. 441-443, 2003.

STEELE, A. D.; IVANOFF, B. Rotavirus strains circulating in Africa during 1996-1999: emergence of G9 strains and P[6] strains. **Vaccine.**, v. 21, n. 5-6, p 361-7, 2003.

STEELE, A. D.; VAN NIEKERK, M. C.; MPHALELE, M. J. Geographic distribution of human rotavirus VP4 genotypes and VP7 serotypes in five South African regions. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 6, p. 1516-1519, 1995.

STEYER, A. et al. The emergence of rotavirus genotype G9 in hospitalised children in Slovenia. **J. Clin. Virol.**, V. 33, p. 7–11, 2005.

STUPKA, J. A. et al. National Rotavirus Surveillance in Argentina: High incidence of G9P[8] strains and detection of G4P[6] strains with porcine characteristics. **Infect Genet Evol**, v. 9, p. 1225–1231, 2009.

STUPKA, J.A. et al. Detection of human rotavirus G9P[8] strains circulating in Argentina: phylogenetic analysis of VP7 and NSP4 genes. **J. Med. Virol.**, v. 79, n. 6, p. 838–842, 2007.

TANIGUCHI, K. et al. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new G serotype specificity., **J Virol.**, v. 64, n. 11, p. 5640-4, 1990.

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

TARAPOREWALA, Z. F.; PATTON, J. T. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. **Virus Research**, v. 101, n. 1, P. 57 – 66, 2004.

TARAPOREWALA, Z.; CHEN, D.; PATTON, J.T. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. **J. Virol.** v. 73, p. 9934–9943, 1999.

TEODOROFF, T. A. et al. Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9

strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 1377-1384, 2005.

TERAN, C. G.; TERAN-ESCALERA, C. N.; VILLARROEL, P. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. **Int J Infect Dis.**, v. 13, n. 4, p. 518-23, 2009.

TEIXEIRA, A. C. G. A. **ROTAVÍRUS GRUPO A COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE CONTAMINAÇÃO DE SUPERFÍCIES HOSPITALARES.** Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2010.

THEAMBOONLERS, A. et al. Molecular characterization of group A human rotaviruses in Bangkok and Buriram, Thailand during 2004 – 2006 reveals the predominance of G1P[8], G9P[8] and a rare G3P[19} strain. **Virus Genes**, v. 36, n. 2, p. 289 – 98, 2008.

TIAN, P. et al. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum. **J Virol.**, v. 69, n. 9, p. 5763-72, , 1995.

TORT, L. F. et al. Phylogenetic analysis of human P[8]G9 rotavirus strains circulating in Brazil reveals the presence of a novel genetic variant. **J. Clin. Virol.**, v. 47, n. 4, p. 345 – 55, 2010.

UNICEF & OMS. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. **WHO Library Cataloging-in-Publication data**, 2009.

UNICOMB, L. E. et al. Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p. 1161-1162, 2000.

UNICOMB, L. E. et al. Evidence of High-Frequency Genomic Reassortment of Group A Rotavirus Strains in Bangladesh: Emergence of Type G9 in 1995. **J. CLIN. MICROBIOL.**, v. 37, n. 6, p. 1885–1891, 1999.

URASAWA, S. et al. Antigenic and genetic analyses of human rotaviruses in Chiang Mai, Thailand: evidence for a close relationship between human and animal rotaviruses. **J. Infect. Dis.**, v. 166, p. 227-234, 1992.

URSU, K. et al. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses

identifies a new genotype, designated G23. **Arch Virol**, v. 154, n. 8, p. 1365-9, 2009.

VALENZUELA, S. et al. Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. **J. Virol.**, v. 65, p. 3964–3967, 1991.

VELAZQUEZ, F. R. et al. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 14, p. 1022 – 1028, 1996.

VESIKARI, T. et al. Clinical efficacy of the RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine in infants vaccinated before a rotavirus epidemic. **J Pediatr**, v. 107, p.:189–194, 1985.

VESIKARI, T. et al. Efficacy of a pentavalent rotavirus vaccine in reducing rotavirus-associated health care utilization across three regions (11 countries). **Int. J. Infect. Dis.** v. 11, p. 29-35, 2007.

VESIKARI, T. et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. **N Engl J Med.**, v. 354, n. 1, p. 23-33, 2006.

VOLLET III, J. J.; DUPON, H. L.; PICKERING, L. K. Nonenteric sources of rotavirus in acute diarrhea. **J. Infect Dis**, v. 144, p. 495, 1981.

VOLOTÃO, E. M. et al. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro – Brazil during 2000-2004: Detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. **J Med Virol**, v. 9999, p. 1-10, 2005.

WANG, Y. H. et al. Phylogenetic Analysis of Rotaviruses With Predominant G3 and Emerging G9 Genotypes From Adults and Children in Wuhan, China. **J Med Virol**, v. 81, p. 382–389, 2009.

WARD, R. L. 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.

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clin Microbiol Infect.**, v. 9, n. 4, p. 247-62, 2003

WOODS, P. A. et al. Distribution of serotypes of human rotavirus in different

populations. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 781-785, 1992.

YANG, J. et al. Emergence of Human Rotavirus Group A Genotype G9 Strains, Wuhan, China. **Emerg. Infect Dis**, v. 13, n. 10, p. 1587 – 1589, 2007.

ZAHN, M.; MARSHALL, G. S. Clinical and epidemiological aspects of rotavirus infection. **Pediatr Ann.**, v. 35, n. 1, p. 23-8, 2006.

ZAO, C. L. et al. Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. **J. Gen. Virol.**, v. 80, p. 1407–1415, 1999.

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

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

ZHAORI, G. T. et al. Detection of rotavirus antigen in tracheal aspirates of infants and children with pneumonia. **Chin Med J.**, v. 104, p. 830 – 833, 1991.

ZHENG, B.J. et al. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. **J. Med. Virol.**, v.34, n.1, p.29-37, 1991.

ZHOU, Y. et al. Characterization of human rotavirus serotype G9 isolated in Japan and Thailand from 1995 to 1997. **J Med Virol**, v. 65, p. 619–628, 2001.

ZURIDAH, H. et al. Circulating Human Group A Rotavirus Genotypes in Malaysia. **J Med Virol**, v. 82, n. 707–711, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de ética em Pesquisa com Humanos.



Parecer de Aprovação nº 0022/2009
Protocolo CEP/IEC - N° 0032/2009
CAAE: 0036.0.072.000-09

Ananindeua/PA, 27 de novembro de 2009.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS

Projeto: **“Caracterização molecular dos genótipos G e P de rotavírus tipo G9 provenientes de crianças com gastroenterite aguda na região metropolitana de Belém, Pará, no período de 1999 a 2007”**

Pesquisador Responsável: JOANA D' ARC PEREIRA MASCARENHAS

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

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

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

Atenciosamente,


MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC

ANEXO B - Siglas e símbolos dos aminoácidos

Letra	Sigla	Nomes dos aminoácidos	Caráter
A	Ala	Alanina	Não Polar
C	Cis	Cisteína	Não Polar
D	Asp	ácido aspártico	Ácido
E	Glu	ácido glutâmico	Ácido
F	Fen	Fenilalanina	Não Polar
G	Gli	Glicina	Não Polar
H	His	Histidina	Básico
I	Ile	Isoleucina	Não Polar
K	Lis	Lisina	Básico
L	Leu	Leucina	Não Polar
M	Met	Metionina	Não Polar
N	Asn	Asparagina	Polar
P	Pro	Prolina	Não Polar
Q	Gln	Glutamine	Polar
R	Arg	Arginina	Básico
S	Ser	Serina	Polar
T	Tre	Treonina	Polar
V	Val	Valina	Não Polar
W	Trp	Triptofano	Não Polar
Y	Tir	Tirosina	Polar