



Ministério de Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARIELA MARTÍNEZ GÓMEZ

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS VP7,
VP4, VP6 E NSP4 DE ROTAVÍRUS-A GENÓTIPO G2P[4] DETECTADOS NO
BRASIL NO PERÍODO DE 1996 A 2009.**

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

Área de concentração: Virologia

Orientador:

Dr. José Paulo Gagliardi Leite

RIO DE JANEIRO

2009



Ministério de Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: *MARIELA MARTÍNEZ GÓMEZ*

ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS VP7, VP4, VP6 E NSP4 DE ROTAVÍRUS-A GENÓTIPO G2P[4] DETECTADOS NO BRASIL NO PERÍODO DE 1996 A 2009.

ORIENTADOR:

Dr. José Paulo Gagliardi Leite

EXAMINADORES:

Dr. Edson Elias da Silva – IOC – Fiocruz – Presidente

Dra. Flavia Barreto dos Santos – IOC – Fiocruz

Dr. Marcos Bryan Heinemann – UFMG

SUPLENTE:

Dra. Caroline Cordeiro Soares – IOC – Fiocruz

Dra. Márcia Terezinha Baroni – Biomanguinhos – Fiocruz.

Rio de Janeiro, 01 de outubro de 2009

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ sob orientação do Dr. José Paulo Gagliardi Leite.

AGRADECIMENTOS

Ficar longe da família e amigos não tem sido fácil. Porém, a vida se trata de escolher caminhos e toda escolha tem seus sacrifícios. Importante é ter certeza do que se quer, e aonde se quer chegar. Para chegar até este ponto do caminho foi indispensável o apoio e o carinho de muitas pessoas, por esse motivo quero agradecer.....

A meus pais e meu irmão, sem seu apoio não teria sido possível vir ao Rio para fazer meu mestrado. Vocês pais são o meu maior exemplo a seguir na vida, obrigada por ter me brindado todas as ferramentas necessárias para enfrentar a vida, e me apoiar sempre nas minhas decisões.

A Lucio, pelo apoio incondicional e a paciência, por me fazer sorrir nas horas de maior stress durante estes dois anos, e sob todas as coisas pelo teu amor que a cada dia me cheia de forças nesta vida.

A todos os meus familiares, pelo suporte e o carinho.

A toda família LVCA:

Ao meu orientador, Dr. José Paulo Gagliardi Leite por ter me brindado a oportunidade de fazer o mestrado no seu laboratório, pela confiança no meu trabalho, pela ajuda que tem me brindado desde que cheguei ao Brasil e por se preocupar tanto comigo.

À Marcelle Figueira, Fernando López, Matias Victoria, Alexandre Fialho, Gilmar Alcantara, Alexandre Pina, Ana Maria Pinto, Joeler Vargas, Marilda Almeida, Marize Miagostovich, Túlio Fumian, Carmen Baur, Flávia Guimarães, Mônica Ferreira, Maria da Penha Xavier, Rosane Maria Assis, Silvana, Edson Pereira, Filipe Aníbal Costa, Irene Araújo, Juliana Andrade, Suellen, Tatiana Rose, funcionários e alunos do Pavilhão Helio e Peggy Pereira, pelos bons momentos de convivência no laboratório, ajuda na bancada, suporte informático, coleta das amostras nos hospitais, e ajuda nas análises dos meus dados.

Ao Dr. Eduardo Volotão por seu carinho, amizade, incentivo e ajuda constante durante a minha dissertação. Você tem feito de mim uma melhor pessoa, tanto na minha vida cotidiana quanto na minha vida profissional, não tenho palavras suficientes para te expressar a minha gratidão.

Ao Dr. Marcos César (Lessa) pelo apoio a cada instante, me ensinando constantemente, pela sua incomparável companhia, tornando todos os momentos de stress em alegria, sempre com um sorriso na face.

A todos os integrantes da sala B201! Pelos momentos vividos juntos a cada dia.

À Ludi, Carol, Julia, pela “buena onda”, o carinho, a amizade, e a ajuda em todo momento.

À Juliana Bragazzi, pela sua amizade, seu carinho, seu apoio e principalmente pelo pensamento positivo! Obrigada por me apoiar sempre, você é uma pessoa muito especial.

À Thais pela sua incomparável companhia, amizade e carinho imenso que tem me brindado. Pelas conversas e risadas de todos os dias.

À Maru, foi tão bom que chegasse uma mulher que falasse minha língua!! Encontrei em você Maru uma amiga incomparável, muito obrigada pela amizade, o carinho, o apoio, as conversas no almoço, no ônibus, no bate papo.

À Tatiana Prado pela sua amizade, carinho e apoio.

À Chica por estar sempre se preocupando e cuidando a gente.

À Dra. Flavia Barreto, pelo brilhante trabalho de revisão desta dissertação e por ser sempre tão gentil comigo.

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

Ao Gonzalo Bello, pelo apoio e por sua grande ajuda nas análises filogenéticas.

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

À Aline por toda a boa vontade e ajuda na Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ.

Ao Instituto Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que me receberam de braços abertos e me brindaram um lugar na sua casa quando precisei, Derliane, Mariangela, Mariana e a família Kikuchi.

A Simone pela sua amizade incondicional, seu apoio gigantesco!, você que no começo quando cheguei e tinha saudade de tudo mundo estava sempre do meu lado me fazendo sentir bem. O apoio e o carinho que você e tua família tem me brindado só deus sabe quão importante tem sido para mim!

A Derliane, encontrei em você uma amiga maravilhosa, porém a gente quase nem consiga se ver, sei que sempre posso contar com você. Agradeço-te de coração todas as palavras e os momentos compartilhados. Adoro você!

Ao Daniel que desde o céu sempre tem me acompanhado, você que é meu angel da guarda.

A minhas amigas no Uruguai, Claudia, Ana, Lucia, Sabrina, Verónica, Carolina, Natalia, Vanessa, Virginia, Lorena, pelo apoio, compreensão, carinho, amizade, bons momentos, e principalmente porque não importa quanto tempo a gente não se encontre, sei

que sempre posso contar com vocês e que o carinho que a gente se tem nunca diminui, pelo contrario cada vez aumenta mais! e fiquem tranqüilas que algum dia vou regressar!!

Ao Dr. Juan Cristina pelo incentivo e o apoio constante. Você que tem me brindado as ferramentas necessárias para começar meu crescimento como virologista, e desde o começo tem sido a minha inspiração.

Ao Dr. Rodney Colina, a pesar de te conhecer faz pouco tempo, você tem me incentivado e me apoiado muito. Você que é um exemplo para todos nos, muito obrigada!

Ao Gonzalo Moratório e Álvaro Fajardo pela ajuda nas análises.

A todos os pais e crianças participantes deste estudo.

À Deus, por ter cruzado no meu caminho todas as pessoas anteriormente mencionadas e muitas que não mencionei.

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

Galileu Galilei

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE QUADROS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.2 HISTÓRICO.....	3
1.3 PARTÍCULA E PROTEÍNAS VIRAIS	4
1.3.1 Proteínas Estruturais	5
1.3.1.1 Proteína VP1	5
1.3.1.2 Proteína VP2.....	5
1.3.1.3 Proteína VP3.....	6
1.3.1.4 Proteína VP4.....	6
1.3.1.5 Proteína VP6.....	7
1.3.1.6 Proteína VP7.....	7
1.3.2 Proteínas não estruturais	9
1.3.2.1 Proteína NSP1	9
1.3.2.2 Proteína NSP2	9
1.3.2.3 Proteína NSP3	10
1.3.2.4 Proteína NSP4	10
1.3.2.5 Proteína NSP5	12
1.3.2.6 Proteína NSP6	12
1.4 GENOMA VIRAL	13
1.5 REPLICAÇÃO VIRAL.....	14
1.6 CLASSIFICAÇÃO DOS ROTAVÍRUS A	17
1.6.1 Classificação baseada nas proteínas estruturais.....	17
1.6.2 Classificação baseada na proteína não estrutural NSP4.....	18
1.6.3 Classificação baseada nos 11 segmentos gênicos de Rotavírus A	19
1.7 MECANISMO DE GERAÇÃO DE DIVERSIDADE.....	21
1.7.1 Mutação Pontual	21
1.7.2 Rearranjos.....	22
1.7.3 Reestruturações.....	23
1.7.4 Recombinação genética	25
1.8 TRANSMISSÃO ENTRE-ESPÉCIES.....	26
1.9 EPIDEMIOLOGIA.....	26
1.9.1 Distribuição mundial de genótipos de Rotavírus A.....	26
1.9.2 Distribuição de genótipos de Rotavírus A no Brasil	28
1.9.3 Re-emergência do genótipo G2P[4]	29
1.9.4 Genótipos não-usuais ou incomuns	30
1.10 PREVENÇÃO E CONTROLE	31
1.10.1 Vacinas contra Rotavírus A.....	31
1.10.1.1 Abordagem Jenneriana Monovalente	31
1.10.1.1.1 RIT 4237.....	31
1.10.1.1.2 WC3.....	32
1.10.1.1.3 RRV ou MMU18006.....	32
1.10.2 Abordagem Jenneriana modificada	32
1.10.2.1 Rhesus Rotavirus Vaccine- Tetravalent (RRV-TV) (Rotashield®).....	32

1.10.2.2 Rotateq®	33
1.10.2.3 Vacina contra rotavírus bovino-humana multivalente (Vacina UK).....	33
1.11.2.4 RIX 4414 (Rotarix®).....	34
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo Geral	36
3.2. Objetivos Específicos	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Amostras Clínicas	37
4.2 Suspensão Fecal.....	39
4.3 Extração de RNAs	39
4.4.1 Amplificação dos genes VP4, VP7 e NSP4 por RT-PCR	40
4.4.2 Amplificação dos genes VP6 e VP7 por RT-PCR	42
4.4.3 Oligonucleotídeos	43
4.4.4 Análise dos <i>amplicons</i> por eletroforese em gel de agarose a 1,5%	44
4.5 Purificação dos produtos da reação em cadeia pela polimerase	45
4.6 Sequenciamento viral	45
4.7 Análise das seqüências	46
5. RESULTADOS	47
5.1 Amplificação por RT-PCR	47
5.2 Genotipagem dos Rotavírus A brasileiros	50
5.3 Análise Filogenética	51
5.3.1 Análise do gene que codifica para a proteína VP7	51
5.3.2 Análise do gene que codifica para a proteína VP4	61
5.3.3 Análise do gene que codifica para a proteína VP6	70
5.3.4 Análise do gene que codifica para a proteína NSP4.....	77
5.4 Mecanismos de diversidade genética	83
6. DISCUSSÃO	85
6.1 Análise do gene que codifica para a proteína VP7	85
6.2 Análise do gene que codifica para a proteína VP4.....	87
6.3 Análise do gene que codifica para a proteína VP6.....	88
6.4 Análise do gene que codifica para a proteína NSP4.....	89
7. CONCLUSÕES.....	92
8. PERSPECTIVAS.....	93
9. BIBLIOGRAFIA	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A₂₆₀ – Absorbância a 260 nm

aa – Aminoácido

AcM – Anticorpos monoclonais

ADN – Ácido desoxirribonucléico

ADNc – ADN complementar

aLRT – Do inglês: *Approximate Likelihood Ratio Test*

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARN – Ácido ribonucléico

ARN (-) – ARN polaridade negativa

ARN (+) – ARN de polaridade positiva

ARNfd – ARN fita dupla

ARNmv – ARN mensageiro viral

AstV – Astrovírus

Bases: A – Adenina; C – Citosina; T – Timina; G – Guanina

BLAST – Do inglês: *Basic Local Alignment Search Tool*

Ca²⁺ – Íon cálcio

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CEP/ FIOCRUZ – Comissão de Ética em Pesquisa / Fundação Oswaldo Cruz

Cl²⁻ – Íon cloro

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CRRRV – Centro de Referência Regional para Rotavirose

dATP – Desoxiadenosina trifosfato

dCTP – Desoxicitidina trifosfato

DDA – Doenças Diarréicas Agudas

dGTP – Desoxiguanosina trifosfato

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

DMSO – Dimetil sulfoxido

dTTP – Desoxitimidina trifosfato

dXTP – Desoxiribonucleotídeos trifosfatados

EDTA – Ácido etilendiamino tetracético

EGPA – Eletroforese em gel de poliacrilamida

EGTA – Ácido etilenoglicol tetracético

EIE – Ensaio imunoenzimático

eIF4G1 – Do inglês: *Eukaryote initiation factor 4G1* – Fator de início da tradução eucariota.

ELISA – Do inglês: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – Ensaio imunoenzimático

EUA – Estados Unidos da América

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

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – Grama

GA – Gastroenterite Aguda

GE – Gastroenterite

GTR – Do inglês: *Generalised Time Reversible*

H₂O – Água

HCl – Ácido clorídrico

IME – Imunomicroscopia eletrônica

INF-a – Interferon alfa

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IRF – Do inglês: *Interferon regulatory factors* - Fatores reguladores do Interferon

LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

M – Molar

ME – Microscopia eletrônica

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MOI – Do inglês: *Multiplicity of infection* – Multiplicidade de infecção

N – Normal

NaOH – Hidróxido de sódio

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

nm – Nanômetros

NSPs – Proteínas não-estruturais

nt – Nucleotídeos

°C – Graus centígrados

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

PABP – Do inglês: *Poli-A Binding protein* - Proteína de união à cauda poli-A

pb – Pares de bases

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

RE – Retículo endoplasmático

RER – Retículo endoplasmático rugoso

RT – Do inglês: *Reverse transcription* – Transcrição reversa

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

RV – Rotavírus

RV-A – Rotavírus do grupo A

RV-B – Rotavírus do grupo B

RV-C – Rotavírus do grupo C

SG – Subgrupo

SG-I – Subgrupo um

SG-I+II – Subgrupo um mais dois

SG-II – Subgrupo dois

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

SH-like – Do inglês: *Shimodaira-Hasegawa-like procedure*

TBE – Tris-Borato-EDTA

Tris – Hidroximetil-tris-aminometano

U/ μ L – Unidades por microlitro

UTR – Do inglês: *Untranslated region* - Região não traduzida

VLS – Do inglês: *Viroplasm-like structures* - Partículas similares a viroplasmas

VP5* – Subunidade peptídica VP5 gerado por proteólise de VP4

VP8* – Subunidade peptídica VP8 gerada por proteólise de VP4

VPs – Proteínas estruturais

μ g/mL – Microgramas por mililitro

μ L – Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gráfico representando as principais causas de mortalidade de crianças menores de cinco anos de idade em nível global	1
Figura 2	Representações esquemática e tridimensional da partícula viral de rotavírus A símio (SA11)	4
Figura 3	Esquema representativo da organização do gene que codifica para a proteína VP4 de rotavírus A	8
Figura 4	Esquema representativo da organização do gene que codifica para a proteína VP6 de rotavírus A	8
Figura 5	Esquema representativo da organização do gene que codifica para a proteína VP7 de rotavírus A	9
Figura 6	Representação esquemática da proteína NSP4 de rotavírus A	10
Figura 7	Esquema representativo da organização do gene que codifica para a proteína NSP4 de rotavírus A	12
Figura 8	Representação em 3D do corte transversal do virion de rotavírus A	14
Figura 9	Modelo esquemático do ciclo de replicação dos rotavírus	16
Figura 10	Esquema representativo dos eletroferotipos dos diferentes grupos de rotavírus analisados em gel de poliacrilamida	18
Figura 11	Esquema representativo da ocorrência de mutações pontuais	21
Figura 12	Esquema representativo de um evento de rearranjo de segmentos de genoma de rotavírus contendo duplicação parcial da ORF	22
Figura 13	Esquema representativo de um evento de <i>reassortment</i> entre um rotavírus A de origem humana e outro de origem suína	24
Figura 14	Esquema representativo de um evento de recombinação genética	25
Figura 15	Distribuição continental/subcontinental de rotavírus A humano	27
Figura 16	Gráfico ilustrando os genótipos de rotavírus A no Brasil	28
Figura 17	Gráfico representando a taxa de detecção dos distintos genótipos G de rotavírus A no Brasil em diferentes períodos	29
Figura 18	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos da RT-PCR para os genes que codificam as proteínas NSP4 (A) e VP6 (B) de rotavírus A	49

Figura 19	Eletoforese em gel de agarose a 1,5% de produtos da RT-PCR para os genes que codificam as proteínas VP4 (A) e VP7 (B) de rotavírus A	50
Figura 20	Análise filogenética baseada na seqüência nucleotídica da região codificante do gene que codifica para a proteína VP7 (978pb) de amostras de rotavírus A brasileiras e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais	53
Figura 21	Alinhamento da seqüência de aminoácidos completa da proteína VP7 (326 aa) das amostras brasileiras representantes dos diferentes <i>clusters</i> observados na árvore filogenética e amostras protótipos	57
Figura 22	Análise filogenética baseada na seqüência parcial (790 pb) nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP7 de rotavírus A genótipo G2P[4]	59
Figura 23	Análise filogenética baseada na seqüência parcial (816pb) nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*)	62
Figura 24	Alinhamento da seqüência de aminoácidos parcial da proteína VP4 (VP8*) (271 aa) das amostras brasileiras representantes dos diferentes <i>clusters</i> observados e amostras protótipos	66
Figura 25	Análise filogenética baseada na seqüência parcial (655 pb) nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de rotavírus A genótipo G2P[4]	68
Figura 26	Análise filogenética baseada na seqüência completa (1191 pb) nucleotídica da região codificante do gene que codifica para a proteína VP6	71
Figura 27	Alinhamento da seqüência de aminoácidos completa (397 aa) da proteína VP6 das amostras brasileiras representantes dos diferentes <i>clusters</i> e amostras protótipos	75
Figura 28	Análise filogenética baseada na seqüência completa (525 pb) nucleotídica da região codificante do gene que codifica para a proteína NSP4	78
Figura 29	Alinhamento da seqüência completa (175 aa) de aminoácidos da proteína NSP4 das amostras brasileiras representantes dos diferentes <i>clusters</i> observados e amostras protótipos genogrupo A-KUN	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação genética dos rotavírus A baseada na análise da proteína não-estrutural NSP4	19
Quadro 2	Mistura de reagentes utilizados na reação de transcrição reversa (RT) dos RNAs	40
Quadro 3	Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a obtenção dos <i>amplicons</i> dos genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7	41
Quadro 4	Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a obtenção do <i>amplicon</i> do gene que codifica para a proteína NSP4	41
Quadro 5	Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a obtenção dos <i>amplicons</i> dos genes que codificam para as proteínas VP6 e VP7	42
Quadro 6	Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas NSP4, VP4, VP6 e VP7 de amostras de rotavírus A	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de <i>cut-off</i> de percentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus A considerando-se os 11 segmentos genômicos	20
Tabela 2	Amostras brasileiras analisadas neste estudo	38
Tabela 3	Amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4, VP6 e NSP4 das amostras brasileiras	48
Tabela 4	Identidade nucleotídica e de aminoácidos, baseada na seqüência codificante completa do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras brasileiras representantes dos diferentes <i>clusters</i>	55
Tabela 5	Identidade nucleotídica e de aminoácidos, baseada na seqüência codificante completa do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras brasileiras representantes dos diferentes <i>clusters</i> e amostras protótipos de rotavírus A humano	56
Tabela 6	Identidade nucleotídica e de aminoácidos, baseada na seqüência parcial do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras brasileiras representantes dos diferentes <i>clusters</i>	64
Tabela 7	Identidade nucleotídica e de aminoácidos, baseada na seqüência parcial do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras brasileiras representantes dos diferentes <i>cluster</i> e amostras protótipos de rotavírus A humano	65
Tabela 8	Identidade nucleotídica e de aminoácidos, baseada na seqüência codificante completa do gene que codifica para a proteína VP6 de amostras brasileiras representantes dos diferentes <i>clusters</i>	73
Tabela 9	Identidade nucleotídica e de aminoácidos, baseada na seqüência codificante completa do gene que codifica para a proteína VP6 de amostras brasileiras representantes dos diferentes <i>cluster</i> e amostras protótipos de rotavírus A de origem humano e animal	74
Tabela 10	Identidade nucleotídica e de aminoácido do gene que codifica para a proteína NSP4 entre amostras brasileiras representantes dos diferentes <i>cluster</i>	80
Tabela 11	Identidade nucleotídica e de aminoácidos, baseada na seqüência codificante completa do gene que codifica para a proteína NSP4 de amostras brasileiras representantes dos diferentes <i>cluster</i> e amostras protótipos de rotavírus A humano e bovino	81

Tabela 12	Perfil dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4, VP6 e NSP4 de amostras brasileiras analisadas neste estudo e que circularam no período de 1996 a 2006	83
Tabela 13	Perfil dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4, VP6 e NSP4 de amostras brasileiras analisadas neste estudo e que circularam no período de 2007 a 2009	84



Ministério de Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS VP7, VP4, VP6 E NSP4 DE ROTAVÍRUS-A GENÓTIPO G2P[4] DETECTADOS NO BRASIL NO PERÍODO DE 1996 A 2009.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariela Martínez Gómez

Segundo a OMS, as gastroenterites são, após as infecções respiratórias agudas, os mais importantes agravos à saúde em crianças ≤ 5 anos. Devido à complexidade da epidemiologia dos rotavírus do grupo A (RV-A), particularmente em países em desenvolvimento, torna-se fundamental o conhecimento dos genótipos das amostras circulantes, principalmente a partir da introdução da vacina monovalente Rotarix[®] (G1P[8]) pelo Programa Nacional de Imunizações no Brasil em março de 2006. Nos estudos de Fase III realizados com a Rotarix[®] a prevalência do RV-A genótipo G2P[4] foi extremamente baixa e a avaliação de imunização heterotípica contra este genótipo foi realizada através de estudos de metanálises estatísticas. Este genótipo, em geral, está associado às manifestações clínicas mais graves. Diferentes estudos evidenciaram a re-emergência do genótipo G2P[4] no Brasil a partir de 2005, e em outros países, sugerindo que seria um fenômeno continental relacionado à variabilidade temporal da distribuição de genótipos que ocorre naturalmente. Porém, uma mudança na epidemiologia e distribuição deste genótipo relacionada à introdução da vacina Rotarix[®] no Brasil não pode ser descartada e necessita ser investigada. Deve-se considerar que o genótipo G2P[4] não compartilha antígenos VP4 ou VP7 com a amostra vacinal Rotarix[®]. Os dados obtidos neste estudo revelaram a circulação de diferentes variantes de RV-A genótipo G2P[4] no período de 1996 a 2009 no Brasil. Além das variantes genotípicas, também foi possível identificar variantes genéticas dos genes VP7, VP4, VP6 e NSP4, mostrando a segregação independente dos mesmos. As análises filogenéticas baseadas nos genes que codificam para as proteínas VP7 e VP4, permitiram inferir a ocorrência de múltiplas introduções do genótipo G2P[4] no Brasil. Evidenciando o fluxo de variantes genéticas que ocorre em nível global para este genótipo. Também foi possível evidenciar a ocorrência de mutações pontuais e *reassortment* entre amostras humanas, para os quatro genes analisados; e entre amostras humanas e amostras bovinas para o gene que codifica para a proteína NSP4. Os resultados do presente estudo são fundamentais na tentativa de se ter um melhor entendimento da epidemiologia e a evolução dos RV-A genótipo G2P[4] e demonstra a importância do monitoramento contínuo e a caracterização molecular das amostras de RV-A circulantes, tanto em humanos quanto em animais.



Ministério de Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS VP7, VP4, VP6 E NSP4 DE ROTAVÍRUS-A GENÓTIPO G2P[4] DETECTADOS NO BRASIL NO PERÍODO DE 1996 A 2009.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariela Martínez Gómez

According to the World Health Organization (WHO), acute gastroenteritis are the major cause of gastroenteritis in children ≤ 5 years old, after acute respiratory infections. Due to the epidemiology complexity of rotavirus-A (RV-A), especially in developing countries, it is important to determinate which are the genotypes of the circulating strains, principally after the introduction of the monovalent vaccine Rotarix[®] (G1P[8]) in Brazil by the National Immunization Program. In Phase III trials with Rotarix[®], the prevalence of genotype G2P[4] was extremely low, and therefore, evaluation of heterotypic immunization against this genotype was performed by meta-analysis statistics tests. This genotype, in general, is associated with more severe clinical manifestations. Different studies have showed the re-emergence of genotype G2P[4] in Brazil, since 2005, and in other countries, suggesting that it would be a continental phenomenon related to the temporal variability in the genotypes distribution that occur naturally. However, changes in the epidemiology and distribution of this genotype related to the introduction of the vaccine Rotarix[®] in Brazil can not be excluded and needs to be investigated. Should be considered that genotype G2P[4] does not share VP4 or VP7 antigens with the Rotarix[®] vaccine strain. Data obtained in this study revealed the circulation of different variants of RV-A genotype G2P [4] in the period of 1996 to 2009 in Brazil. In addition to genotypic variants, was also possible to identify genetics variants of the genes: VP7, VP4, VP6 and NSP4, showing independent segregation. The phylogenetic analysis based on the genes that code proteins VP7 and VP4, allowed to infer the occurrence of multiple introductions of genotype G2P[4] in Brazil. It was possible to identify the occurrence of point mutations and reassortment events between human strains for the four genes studied, and between human and bovine strains for NSP4 gen. The results obtained in this study are fundamental in our attempt to gain a better understanding of epidemiology and evolution of RV-A genotype G2P[4] and demonstrates the importance of continuous monitoring and molecular characterization of RV-A strains circulating in human and animal populations.

1. INTRODUÇÃO

O termo gastroenterite refere-se à inflamação do trato gastrointestinal, resultando principalmente em diarreia, porém pode vir acompanhada por outros sintomas como náusea, vômito e dor abdominal.

As gastroenterites agudas (GA) são uma das doenças humanas mais comuns, sendo as Doenças Diarréicas Agudas (DDA), a segunda maior causa de óbitos em menores de cinco anos nos países em desenvolvimento, onde é responsável por, aproximadamente, 15% da mortalidade nesta faixa etária (Figura 1). Estima-se que as DDA ocasionem aproximadamente 1,8 milhões de óbitos por ano no mundo (WHO, 2005). No Brasil, as taxas de mortalidade por gastroenterite aguda em crianças menores de cinco anos de idade apresentam variações nas cinco regiões, sendo maiores nas regiões nordeste e norte do país (Ministério da Saúde, 2007).

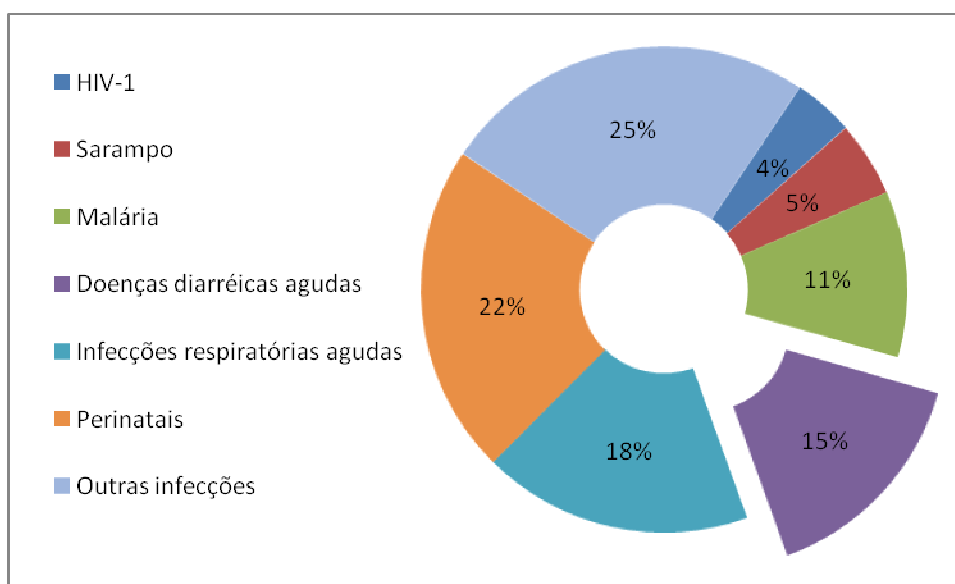


Figura 1. Principais causas de mortalidade de crianças menores de cinco anos de idade no mundo (Adaptado de WHO, 2005).

As GA são causadas por agentes infecciosos que podem aderir ou invadir a mucosa intestinal, assim como também podem produzir enterotoxinas.

Dentre os agentes infecciosos implicados na etiologia da doença diarréica, podemos destacar os vírus, as bactérias e os parasitos, sendo que a importância das infecções intestinais bacterianas e parasitárias está diretamente relacionada às condições socioeconômicas da população. Já entre os vírus não pode se fazer a mesma afirmação, visto que muitos deles permanecem como problemas da saúde pública mesmo em países desenvolvidos (Bern & Glass, 1994; Gentsch *et al.* 1996; Parashar *et al.* 2003; Santos & Hosino, 2005).

Dentre os diferentes vírus causadores de gastroenterites, os rotavírus do grupo A (RV-A) são os principais agentes etiológicos, seguidos dos calicivírus humanos, astrovírus (AstV) e adenovírus entéricos (Wilhelmi *et al.* 2003).

Os RV-A são os principais agentes etiológicos causadores de GA infantil em todo o mundo e são responsáveis por um quarto do número de mortes associadas à diarreia em crianças menores de 5 anos de idade, principalmente nos países em desenvolvimento (Parashar *et al.* 2006).

Nos países desenvolvidos os RV-A tem sido detectados em 30-50% das crianças hospitalizadas com diarreia aguda. Nos países em desenvolvimento os RV-A também são os patógenos com maior prevalência de DDA em crianças. Porém, os países em desenvolvimento apresentam uma maior taxa de mortalidade, com cerca de 500.000 a 600.000 mortes ocorrendo a cada ano (Parashar *et al.* 2003; Parashar *et al.* 2006).

Devido à importância epidemiológica dos RV-A apresentam no Brasil, em março de 2006 foi introduzida no Programa Nacional de Imunizações (PNI), a vacina monovalente Rotarix[®] (G1P[8]). O Brasil foi o primeiro país no mundo a introduzir esta vacina em âmbito de campanha nacional. Durante estudos de Fase III com esta vacina, a prevalência do genótipo G2P[4] de RV-A foi extremamente baixa. Este genótipo, em geral, está associado a manifestações clínicas mais severas (Timenetsky *et al.* 1996). No ano 2005, o genótipo G2P[4] emergiu no Brasil, tornando-se o genótipo de maior prevalência entre os anos de 2006 a 2008. Estudos demonstraram que G2P[4] apresentaria um comportamento sazonal naturalmente (Bishop *et al.* 1991; Santos & Hoshino, 2005). Porém, é importante determinar se a introdução da Rotarix estaria influenciando na prevalência deste genótipo.

Os RV-A são cosmopolitas e também podem causar infecção gastrointestinal em animais, incluindo mamíferos e aves e, normalmente, os animais jovens são aqueles acometidos. Portanto, é de grande interesse o estudo dos RV-A nas espécies de importância econômica. A infecção por RV-A em bezerros é uma das principais causas de prejuízos

econômicos atribuídos a morbidade, mortalidade, custo do tratamento e atraso no crescimento, tempo e peso inadequado ao abate e, em alguns casos, até a morte dos animais infectados (Lucchelli *et al.* 1992; Silva *et al.* 2001).

1.2 HISTÓRICO

Os RV humanos foram primeiramente descritos por Bishop e col. (1973) em biópsias de intestino delgado de crianças com gastroenterite aguda de origem não-bacteriana. A análise pela microscopia eletrônica (ME) mostrou a ocorrência de vesículas citoplasmáticas contendo um grande número de partículas virais semelhantes aos orbivírus. Partículas virais semelhantes foram também detectadas por Flewett e col. (1973) ao examinarem pela ME fezes de crianças com diarreia aguda. Algumas de suas primeiras denominações foram *Orbivirus-like* (Bishop *et al.* 1973), *Reovirus-like agent* (Kapikian *et al.* 1974) e Duovírus (Davidson *et al.* 1975), esta última relacionada às duas camadas protéicas observadas pela ME. Posteriormente, foi proposto que o vírus constituísse um novo gênero na família *Reoviridae*, diferente dos gêneros *Reovirus* e *Orbivirus*. Pelo aspecto da partícula semelhante a uma roda quando examinada por contrastação negativa pela ME (Flewett & Woode, 1978), sugeriu-se *Rotavirus* para este novo gênero (do latim *rota*).

A detecção dos RV-A no Brasil ocorreu em 1976 pela primeira vez (Linhares *et al.* 1977). Desde então, vários trabalhos têm demonstrado a relevância desse vírus na etiologia da diarreia aguda no país (Linhares *et al.* 1989; Pereira *et al.* 1993; Timenetsky *et al.* 1994; Leite *et al.* 1996; Mascarenhas *et al.* 1998; Leite *et al.* 2008).

1.3 PARTÍCULA E PROTEÍNAS VIRAIS

A partícula viral completa é não-envelopada, com simetria icosaédrica e apresenta um diâmetro de aproximadamente 100 nm. Estruturalmente os RV estão formados por três camadas protéicas: capsídeo externo, capsídeo intermediário e o capsídeo interno, onde se encontram os 11 segmentos de ARN fita dupla (ARNfd) (Figura 2). Associadas ao ARNfd no capsídeo interno, encontram-se três proteínas estruturais: VP1, VP2 e VP3, codificadas pelos segmentos 1, 2 e 3, respectivamente. Essas proteínas representam em conjunto aproximadamente 18% das proteínas virais. O capsídeo intermediário é constituído pela proteína VP6, codificada pelo segmento 6, sendo esta a mais abundante (51%). No capsídeo externo encontram-se as proteínas estruturais: VP4, codificada pelo gene 4 e responsável pelos sorotipos/genótipos P; e VP7, codificada pelos genes 7 (Rhesus sp.), 8 (rotavírus bovino UK) ou 9 (SA-11, rotavírus símio), determinante dos sorotipos/genótipos G. Outras cinco proteínas não-estruturais são codificadas pelos segmentos genômicos restantes, sendo assim denominadas: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5 (Kapikian *et al.* 2001).

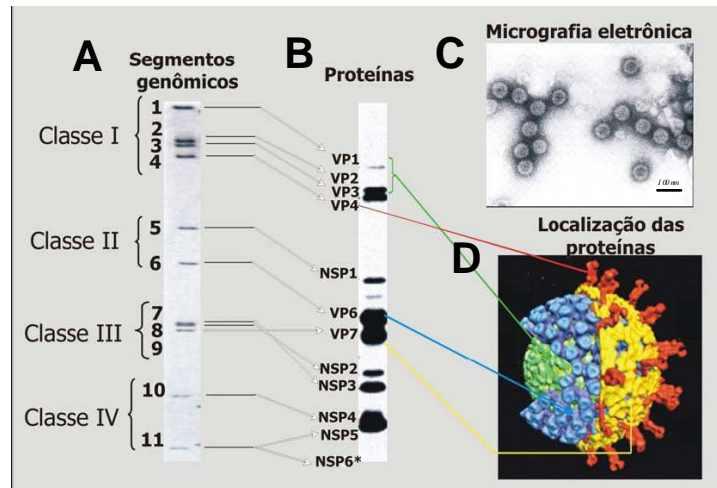


Figura 2. **A:** Eletroforese em gel de poliacrilamida dos 11 segmentos do genoma do rotavírus A símio (SA11). **B:** Gel de poliacrilamida mostrando a separação das proteínas estruturais (NSP1 – NSP6) e não estruturais (VP1 – VP4, VP6 – VP7) sintetizadas pelo rotavírus A SA-11. **C:** Micrografia eletrônica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

As proteínas estruturais são designadas VP (do inglês: *Viral Protein*) seguidas por número sequencial na ordem decrescente da massa molecular. No *core* estão presentes as proteínas VP1 (125kDa), VP2 (94kDa) e VP3 (88kDa) no capsídeo intermediário a VP6 (46kDa) e no capsídeo externo as proteínas VP4 (88kDa) e VP7 (38kDa) (Estes & Cohen, 1989). As proteínas não-estruturais, encontradas nas células infectadas por RV-A, recebem a denominação NSP (do inglês: *Non-Structural Protein*) seguido de o número sequencial (NSP1 – NSP7).

1.3.1 Proteínas Estruturais

1.3.1.1 Proteína VP1

Dentre as proteínas que constituem o capsídeo interno do vírus, a VP1 é a proteína menos abundante. Junto com as proteínas VP2 e VP3 participa do complexo de replicação e de transcrição do vírion (Arnoldi *et al.* 2007). Entre as proteínas do core é a única que possui uma sequência específica de reconhecimento ao ARN viral, através de regiões conservadas de quatro bases, UGUG, na extremidade nucleotídica 3' (Lu *et al.* 2008).

1.3.1.2 Proteína VP2

É a proteína mais abundante do core viral. Faz parte do complexo de replicação e liga-se tanto à VP1 quanto a VP3, através de um domínio na sua porção N-terminal. A interação protéica VP2/VP1/VP3 é crítica na replicação e transcrição do genoma viral (Heiman *et al.* 2008). Além disso, a superfície externa da proteína VP2 interage com a proteína VP6 nos estágios iniciais da morfogênese viral. A interação VP2/VP6 é importante para a formação das chamadas partículas incompletas, que possuem duplo capsídeo protéico (DLPs), também influenciando na atividade transcricional da partícula completa que será formada (Estes & Kapikian, 2007).

1.3.1.3 Proteína VP3

Esta proteína também é constituinte do capsídeo interno. Embora não se saiba com certeza o papel de VP3 na morfogênese dos RV, vários estudos têm demonstrado suas atividades guanidil e metiltransferase (Patton *et al.* 1995; Mertens *et al.* 2004). Dados da análise de seqüências do gene que codifica para VP3 ainda são limitados, porém recentemente foi demonstrado o elevado grau de conservação deste gene em humanos e uma baixa conservação quando comparado a amostras animais (Subodh *et al.* 2006).

1.3.1.4 Proteína VP4

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

1.3.1.5 Proteína VP6

É a proteína viral mais abundante dos RV (aproximadamente 51% da partícula viral) e possui na superfície, determinantes antigênicos que permitem a classificação dos RV em diferentes grupos (A-G) e subgrupos de RV-A (I, II, I+II, não-I e não-II). A VP6 está presente no capsídeo intermediário e é formada por dois domínios, um interagindo com as proteínas VP7 e VP4 e outro com a VP2. Desta maneira tem participação em duas funções importantes do vírus: a adsorção e penetração na célula e transcrição do ARNfd (Heiman *et al.* 2008). O domínio de trimerização da VP6 com VP7/VP4 e VP2 situa-se entre os aminoácidos (aa) 246 e 315 (Figura 4). Os resíduos 296 a 299 e 305, são importantes no reconhecimento pelos anticorpos monoclonais Mabs255/60 determinantes de subgrupo (Kapikian *et al.* 2001).

1.3.1.6 Proteína VP7

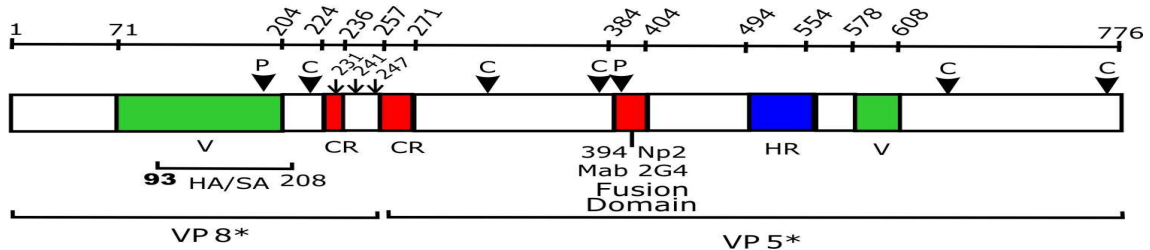
É a glicoproteína mais imunogênica do capsídeo externo, induzindo a síntese de anticorpos neutralizantes. A proteína VP7 pode modular a atividade da VP4 no processo de adsorção e entrada dos RV na célula, interagindo com moléculas da superfície celular, uma vez que a proteína VP4 tenha iniciado o processo de adsorção (Jayaram *et al.* 2004).

Estudos têm demonstrado que concentrações apropriadas de íons Ca^{2+} são necessárias para se manter a estabilidade da partícula, aparentemente pela estabilidade de VP7. A remoção dos íons livres de Ca^{2+} dissocia os trimeros de VP7 em monômeros, liberando a VP7 do vírion, e resulta no início da penetração induzida por mudanças conformacionais que ocorrem em VP4. Estudos recentes demonstraram que os anticorpos neutralizantes contra a proteína VP7 atuam estabilizando o trímero formado pela proteína, de tal forma a inibir as mudanças conformacionais da VP4 (Aoki *et al.* 2009).

A VP7 apresenta uma fase de leitura aberta (ORF) composta por uma seqüência nucleotídica que codifica para 326 aa (Figura 5). Em cada uma dessas regiões precede domínios hidrofóbicos designados de H1 (aa 6 a 23) e H2 (aa 33 a 44), que podem funcionar com uma seqüência sinalizadora para dirigir a VP7 para o retículo endoplasmático (RE). Um terceiro códon de iniciação também está presente antes do segundo domínio hidrofóbico. Algumas amostras de RV-A contêm até três sítios potenciais de glicosilação. Contudo, somente dois sítios são aparentemente glicosilados (Kapikian *et al.* 2001). Análises da

seqüência do gene que codifica para esta proteína, descrevem 9 regiões variáveis (VR1 – VR9), sendo 4 destas regiões variáveis consideradas sítios antigênicos importantes: região A (aa 87 – 101), região B (aa 143 – 152), região C (aa 208 – 223) e região F (aa 235 – 242) (Kirkwood *et al.* 1993).

VP 4



CR – Regiões conservadas

V – Regiões variáveis

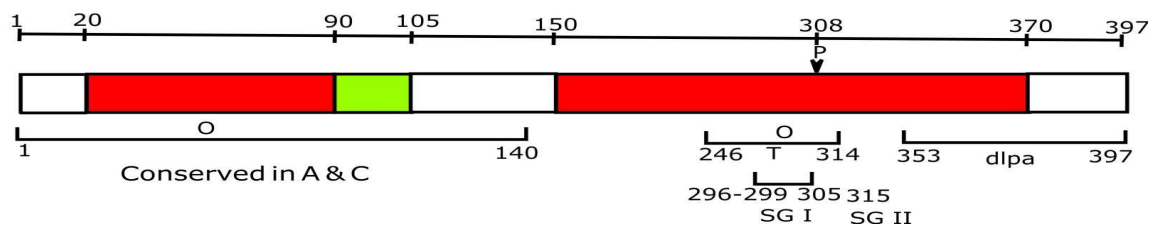
HR – Regiões repetitivas

C – Cisteínas conservadas

P – Prolinas conservadas

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

VP 6



O – Sítio hidrofóbico

T – Domínio de trimerização

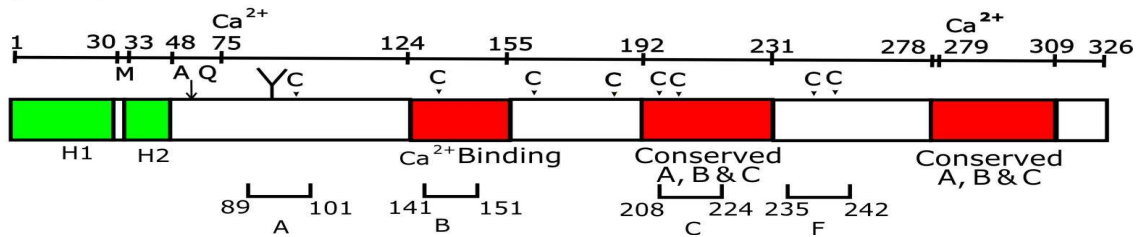
Dipa – Montagem da partícula de camada dupla

P – Prolinas conservadas

SGI e SGII – Sítio de ligação para MABs

Figura 4. Esquema representativo da organização do gene de VP6 de rotavírus A (Adaptada de Estes. 2001).

VP 7



H1 e H2 – Domínios hidrofóbicos

Grupos A, B e C – Domínios conservados

Ca²⁺ - Sítio de ligação com o cálcio

C – Cisteínas conservadas

P – Prolinas conservadas

↓ - Sítios de clivagem pela tripsina

A, B e C – Epítomos de neutralização

Figura 5. Esquema representativo da organização do gene de VP7 de rotavírus A (Adaptada de Estes. 2001).

1.3.2 Proteínas não estruturais

1.3.2.1 Proteína NSP1

A proteína NSP1 apresenta associações com o citoesqueleto celular favorecendo a ligação vírus-célula. É a proteína viral menos conservada, apresentando maior variabilidade de seqüências do que VP4 e VP7. Possui domínios relativamente conservados (*zinc finger*), porém tais domínios não se encontram presentes em todas as variantes de RV-A, mostrando não ser uma proteína essencial na replicação do vírus (Estes. 2001; Mertens. 2004).

1.3.2.2 Proteína NSP2

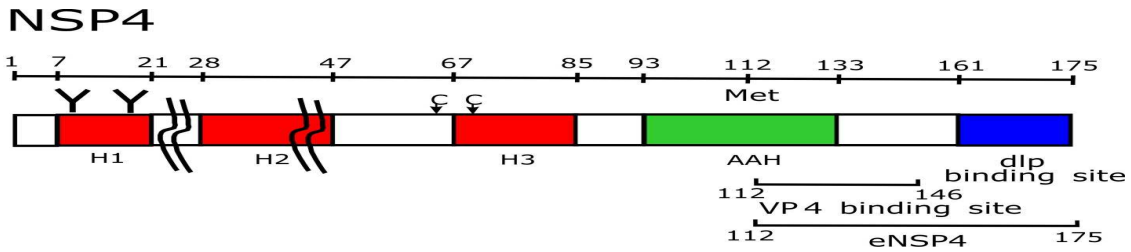
Esta proteína é altamente conservada e é expressa em altas concentrações nas células infectadas. Sua localização na célula está associada ao viroplasma, que é uma região eletrodensa do citoplasma, adjacente ao RE, onde ocorrem os processos de transcrição, tradução, de replicação e de empacotamento do ARNfd genômico. A associação de NSP2 com a NSP5 faz com que essas duas proteínas estejam envolvidas na replicação e

Browne e cols. (2000) descreveram que o peptídeo correspondente aos resíduos aa 48-91 da NSP4 é capaz de promover uma desestabilização da membrana do RE com conseqüente lise do mesmo, levando a um aumento do Ca^{2+} intracelular. Conseqüentemente ocasionando o aumento de secreção de íons cloro (Cl^-), provocando assim uma diarreia de natureza secretória (Tian *et al.* 1995; Estes. 2001; Huang *et al.* 2004). Na morfogênese do vírus, a NSP4 atua como receptor intracelular na membrana do RE para as DLPs durante o processo de maturação, além de ser um receptor para a VP4. Além disso, a NSP4 também participa do processo de transporte dessas partículas através do RE e na formação de partículas com envelope transitório, atuando como um desestabilizante de membrana que permite a remoção do envoltório transitório das DLPs durante a montagem de partículas maduras (Taylor & Bellamy. 2003). A NSP4 é capaz de ativar os canais dependentes de Ca^{2+} no intestino e é descrita como a primeira enterotoxina viral (Ball *et al.* 1996).

Alterações nos resíduos de aa nas posições 114 até 135 da NSP4 podem levar a mudanças na atividade toxigênica e virulência dos RV-A (Figura 7).

Quatro sítios antigênicos foram descritos para esta proteína: ASI (151 – 169), ASII (136 – 150), ASIII (112 – 133) e ASIV (Borgan *et al.* 2003).

Os anticorpos induzidos pela NSP4 reduzem a capacidade desta proteína em acarretar diarreia. Em um estudo com camundongos vacinados com esta proteína foi observada a indução de proteção homotípica e heterotípica contra diarreia por RV-A (Estes, 2001). Em humanos, a NSP4 foi descrita como sendo capaz de induzir repostas imune celular e humoral (Johansen *et al.* 1999). Alguns estudos demonstram diferenças entre seqüências de NSP4 de RV-A em casos de infecção sintomática e assintomática em humanos (Kirkwood *et al.* 1999; Pager *et al.* 2000), outros estudos demonstraram que não existiria tal correlação (Araújo *et al.* 2007; Masacarenhas *et al.* 2007). Estudos relacionados a esta proteína, podem fornecer informações relevantes quanto à eficácia de vacinas anti-RV-A.



H1, H2 e H3 – Domínios hidrofóbicos

Dip – Sítio de ligação com a VP4

Y – Sítios de glicosilação

C – Cisteínas conservadas

P – Prolinas conservadas

Figura 7. Esquema representativo da organização do gene para a proteína NSP4 de rotavírus A (Adaptada de Estes. 2001).

1.3.2.5 Proteína NSP5

Esta proteína possui atividade autoquinase e em células infectadas apresenta formas hipo e hiper fosforiladas (Taraporewala & Patton, 2004). Durante o processo de replicação NSP2, NSP5 e NSP6 estão associadas na formação de viroplasmas (Estes, 2001). A interação de NSP2 e NSP5 leva a formação de partículas defectivas semelhantes a viroplasmas (VLPs) *in vitro*, na ausência de outras proteínas virais. Ambos os domínios N- e C-Terminais, encontram-se implicados na formação das *virus like particles* (VLPs) (Fabbretti *et al.* 1999).

1.3.2.6 Proteína NSP6

A NSP6 é encontrada principalmente nos viroplasmas e interage com NSP5, evidenciando sua participação nos processos de replicação e encapsidação do vírus. Tem sido proposto que algumas variantes dos RV-A e RV-C não codifiquem esta proteína (Taraporewala *et al.* 2004; Estes & Kapikian. 2007).

1.4 GENOMA VIRAL

Os RV apresentam um genoma de ARNfd segmentado de 18.550 pares de base (pb), com os tamanhos dos segmentos variando entre 663 e 3.302 pb (Figura 8). Cada segmento de ARNfd, no sentido 5', inicia com uma guanosina (G), seguido de um conjunto de seqüências conservadas que são parte da região não-codificadora 5'. Possui uma fase aberta de leitura (ORF, do inglês: *Open Reading Frame*), que codifica para uma proteína, que termina com o códon de terminação, seguida por um conjunto de seqüências não-codificadoras contendo um subconjunto de seqüências conservadas terminadas com duas citidinas (C) na extremidade 3' (Estes. 2001). A maioria dos ARNs terminam com uma seqüência consenso 5'-UGUGACC-3', sendo que estas seqüências contêm sinais importantes para a expressão gênica e replicação (Wentz *et al.* 1996). Os tamanhos das regiões não-codificadoras, nas extremidades 5' e 3', são variáveis para os diferentes genes e todos os genes seqüenciados possuem pelo menos uma ORF longa depois do primeiro códon de iniciação (Estes. 2001). A grande conservação das seqüências terminais nos segmentos genômicos sugere que elas contêm importantes sinais para a transcrição, transporte de ARN, replicação, montagem ou empacotamento dos segmentos genômicos (Patton & Spencer, 2000).

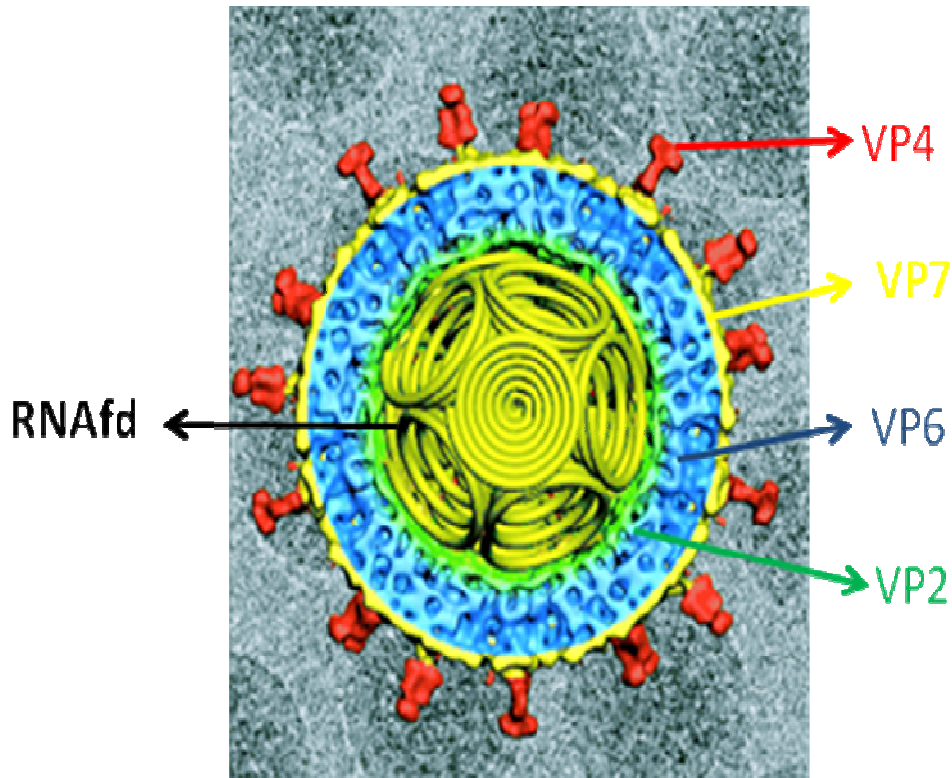


Figura 8. Representação em 3D de um corte transversal do virion de rotavírus A, mostrando a disposição dos ARNfd em forma de espiral cônica, representados em cor amarela. (Adaptado de: <http://www.pnas.org>)

1.5 REPLICAÇÃO VIRAL

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

A infecciosidade dos RV *in vitro* é aumentada pela presença da enzima proteolítica tripsina. A ação proteolítica desta enzima resulta na clivagem da proteína VP4, dando lugar a dois polipeptídios: VP5* e VP8*. Esta clivagem não interfere no processo de adsorção, mas é associada à internalização das partículas de RV nas células. Presume-se que esta clivagem

ocorra durante a infecção viral, no lúmen intestinal do hospedeiro, uma vez que os RV estão expostos às secreções pancreáticas (Zarate *et al.* 2000).

A entrada dos RV na célula se dá por meio de interações com receptores celulares contendo ácido siálico e integrinas, no início do processo de adsorção, com o domínio VP8* interagindo com o ácido siálico e VP5* com as integrinas. Diferentes estudos têm demonstrado recentemente que concentrações apropriadas de íons Ca^{2+} são necessárias para se manter a estabilidade da partícula viral, aparentemente pela estabilidade de VP7. A remoção dos íons Ca^{2+} dissocia os trímeros de VP7 em monômeros, liberando a VP7 do virion e iniciando a penetração induzida por câmbios conformacionais que ocorrem na proteína VP4 (Aoki *et al.* 2009).

Após a adsorção à célula hospedeira, ocorre a penetração do vírus no citoplasma celular (Figura 9). O mecanismo de penetração viral ainda não foi totalmente esclarecido. Ambos os mecanismos de penetração viral, endocitose mediada por receptor ou penetração direta através da membrana celular, tem sido sugeridos para RV-A. Possivelmente, mais de um mecanismo de penetração viral esteja atuando nos RV-A, como já foi descrito para os poliovírus e os reovírus (Estes & Kapikian, 2007).

No citoplasma ocorre a perda do capsídeo externo (desnudamento) liberando as *double layer particles* (DLPs) no citoplasma celular. Os ARNs são transcritos pela ARN-polimerase ARN-dependente (VP1). Ocorre a síntese de ARN(+) a partir da fita negativa do ARN viral. As fitas de ARN(+) servirão de ARNm para a tradução das proteínas virais (estruturais e não-estruturais) e de molde para a produção de novas fitas de ARN(-). As proteínas recém sintetizadas (VP1, VP2, VP3 e VP6; NSP2, NSP5 e NSP6, esta última quando presente) e o ARN fita simples (ARNfs) viral são reunidos no citoplasma da célula infectada, constituindo um material amorfo denominado viroplasma (Kapikian *et al.* 2001; Estes & Kapikian, 2007).

O capsídeo intermediário (VP6) envolve o cerne (ARNfd, VP1-VP3) formando a partícula viral incompleta, com aproximadamente 50 nm de diâmetro (DLPs). Esta deixa o viroplasma e passa para o interior do RE Rugoso (RER), onde adquire o capsídeo externo juntamente com um envoltório transitório. As proteínas do capsídeo externo são sintetizadas nos polirribossomas do RER. As proteínas glicosiladas VP7 e NSP4 são sintetizadas em associação com o RE. A VP7 forma o capsídeo externo e a NSP4 possui domínio citoplasmático que funciona como receptor das DLPs, interagindo diretamente com VP6 e VP4 e viabilizando o brotamento das DLPs para o interior do RE. Durante o brotamento, as partículas adquirem um envoltório lipídico transitório que se perde durante a passagem no RE. Em seguida, ocorre a montagem das partículas com capsídeo externo, o que resulta na

formação de partículas virais maduras com diâmetro aproximado de 100 nm (Patton & Gallegos, 1990). Finalmente, o ciclo infeccioso termina quando a progênie viral é liberada da célula hospedeira.

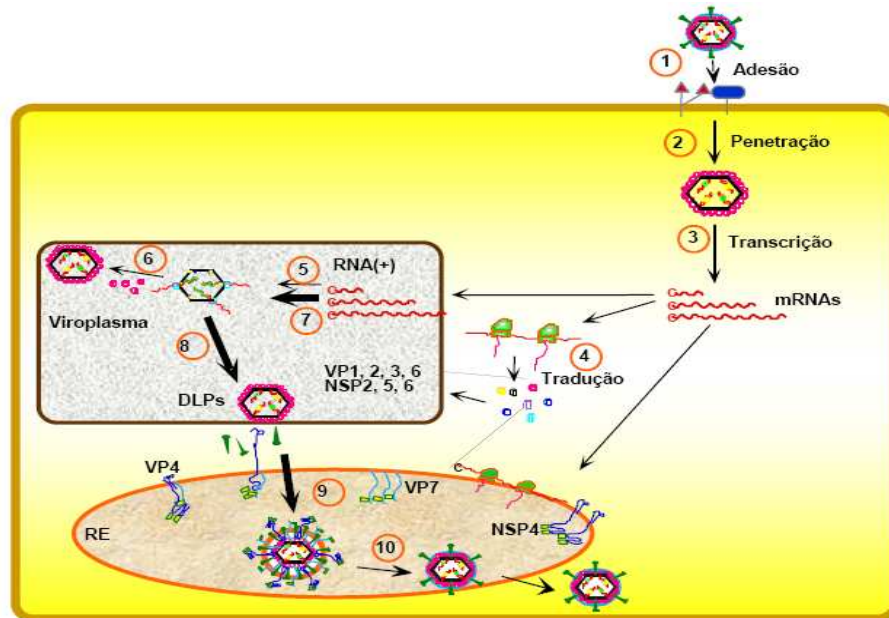


Figura 9. Modelo esquemático do ciclo de replicação dos rotavírus. As etapas de replicação estão indicadas nos números abaixo (Adaptada de Arias *et al.* 2004).

1) Adsorção do vírus à superfície celular, 2) Penetração e liberação da partícula viral produzindo DLPs (Partículas de duplo capsídeo), 3) Transcrição primária do ARNfd genômico, 4) Síntese das proteínas virais, 5) Síntese primária de fitas negativas de RNA, 6) Montagem da partícula viral, 7) Síntese secundária de fitas negativas de RNA, 8) Montagem das DLPs, 9) Aquisição das proteínas VP7 e VP4 no RE, 10) Perda do envoltório transitório e geração de vírions maduros com triplo capsídeo.

1.6 CLASSIFICAÇÃO DOS ROTAVÍRUS A

1.6.1 Classificação baseada nas proteínas estruturais

Os RV pertencem à família *Reoviridae*, a qual está organizada em 11 gêneros de vírus, entre eles o gênero *Rotavirus* (Mertens, 2004). Este gênero se classifica em sete sorogrupos distintos (A-G) dependendo dos diferentes epítomos presentes na proteína VP6. Os grupos A, B e C têm sido encontrados tanto em humanos quanto em animais, enquanto que os grupos D-G foram identificados, até o momento, somente em animais (Kapikian *et al.* 2001). Estes sorogrupos apresentam diferentes perfis eletroforéticos quando analisados mediante eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (Figura 10).

Os RV-A são epidemiologicamente mais importantes, sendo o principal responsável pelos episódios de diarreia aguda em crianças em todo o mundo (Kapikian *et al.* 2001). Os RV-A apresentam uma dupla especificidade para sorotipo, representada pelas proteínas VP4 e VP7, que levou à necessidade de um sistema de classificação binário que considere os genes que codificam para as proteínas VP4 (genótipos “P”) e VP7 (genótipos “G”) (Estes, 2001). Até o momento, foram descritos 23 genótipos G e 31 genótipos P (Matthijnssen *et al.* 2008a; 2008b; Abe *et al.* 2009; Solberg *et al.* 2009; Ursu *et al.* 2009). O número de possíveis combinações entre G e P é bem maior do que os genótipos descritos até agora.

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

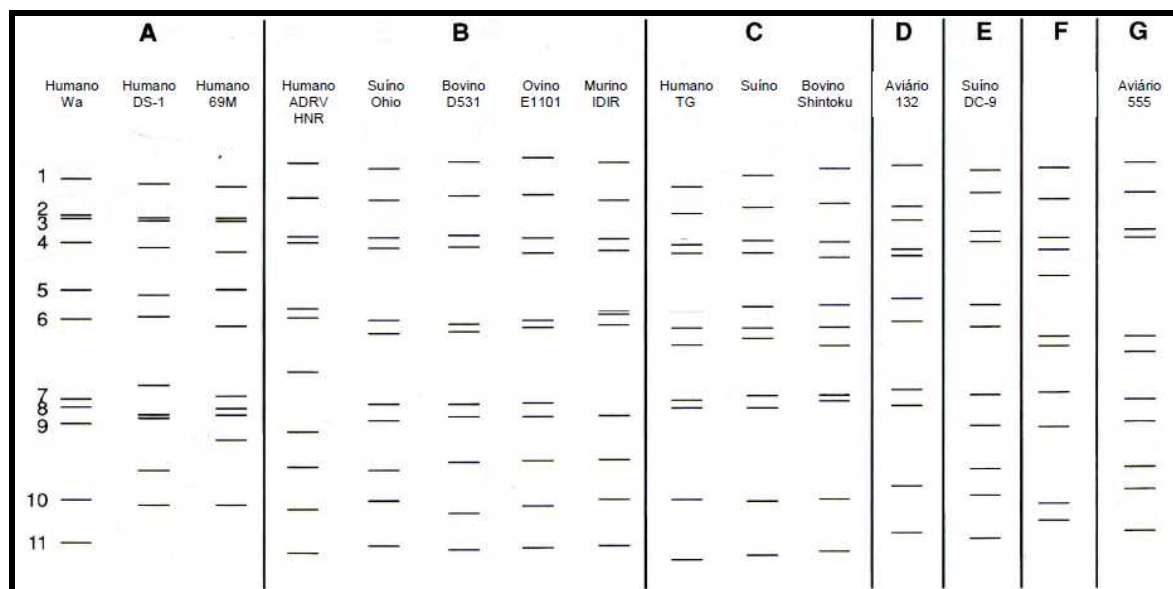


Figura 10. Esquema representativo dos eletroferotipos dos diferentes grupos de rotavírus analisados em gel de poliacrilamida. (Adaptada de Kapikian *et al.* 2001)

1.6.2 Classificação baseada na proteína não estrutural NSP4

Além da classificação baseada nos genes que codificam para as proteínas VP6, VP4 e VP7, análises de seqüências do gene que codifica para a proteína não estrutural NSP4 permitiram a classificação deste gene em 5 genogrupos: A-KUN, B-Wa, C-AU1, D-EW e E-Avian-like (Quadro 1). Observou-se que o genogrupo A está relacionado com o subgrupo I de RV-A, enquanto que o genogrupo B está relacionado ao subgrupo II (Mori *et al.* 2002; Lin & Tian, 2003).

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

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

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

1.6.3 Classificação baseada nos 11 segmentos gênicos de Rotavírus A

Recentemente, Matthijssens e col. (2008b) propuseram um novo sistema de classificação para os RV-A, tendo como base as propriedades moleculares dos 11 segmentos de ARNfd. Este novo sistema de classificação foi proposto baseado na caracterização molecular e análise filogenética do genoma completo de 53 protótipos. Os diferentes genótipos descritos para cada um dos segmentos são divididos segundo valores de *cut-off* específicos de identidade nucleotídica para cada um destes genes (Tabela 1). Análises filogenéticas sugerem que as características moleculares dos genes que codificam para as proteínas VP1 (*ARN-dependent ARN polymerase*), VP2 (*Core Potein*), VP3 (*Methyltransferase*), VP6 (*Inner Capsid*), NSP1 (*Interferon Antagonist*), NSP2 (*NTPase*), NSP3 (*Translation Enhancer*), NSP4 (*Enterotoxin*) e NSP5 (*pHosphoprotein*) resultam em 4, 5, 6, 11, 14, 5, 7, 11 e 6 diferentes genótipos, respectivamente. Os autores afirmam que este

novo sistema de classificação permitirá identificar distintos genótipos, que provavelmente seguiram caminhos evolutivos diferentes, além de transmissões entre-espécies e eventos de *reassortments* (Matthijnssens *et al.* 2008a; 2008b). Esse trabalho destaca a importância de se estudar todas as proteínas estruturais e não estruturais do vírus além das frequentemente estudadas até o momento.

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

Gene	Valores cut-off de identidade nucleotídica (%)	Genótipos	Designação dos nomes dos genótipos
VP7	80	19G	Glicoproteína
VP4	80	27P	Sensível a Protease
VP6	85	11I	Capsideo Interno
VP1	83	4R	RNA polimerasa – RNA dependente
VP2	84	5C	Proteína do Core
VP3	81	6M	Metiltransferase
NSP1	79	14A	Antagonista do Interferon
NSP2	85	5N	NTPase
NSP3	85	7T	Intensificador da Tradução
NSP4	85	11E	Enterotoxina
NSP5	91	6H	Fosfoproteína (<i>pHosphoprotein</i>)

1.7 MECANISMO DE GERAÇÃO DE DIVERSIDADE

A evolução dos RV-A acontece a através de dois processos: *genetic drift*, devido ao acúmulo de mutações pontuais como conseqüências de erros na ação da ARN polimerase ARN dependente, e *genetic shift*, mediante mudanças ocasionadas de forma repentina no genoma do vírus. Estas mudanças podem ser determinadas por um de três mecanismos: rearranjos genéticos, reestruturação de segmentos genômicos (*reassortment*) e recombinação genética (Ramig, 1997; Estes & Kapikian, 2007).

1.7.1 Mutação Pontual

O acúmulo seqüencial de mutações pontuais tem sido observado em isolados obtidos em surtos, utilizando as técnicas de mapeamento de nucleotídeos e seqüenciamento (Flores *et al.* 1988; Palombo *et al.* 1993) (Figura 11). As mutações pontuais podem produzir mudanças detectáveis de fenótipo, o que torna necessária uma análise sistemática de seqüência dos isolados obtidos em casos de surtos epidêmicos ou por propagação experimental em animais ou culturas celulares, para se estimar a freqüência dessas mutações nos segmentos de RV-A (Taniguchi & Urasawa. 1995).

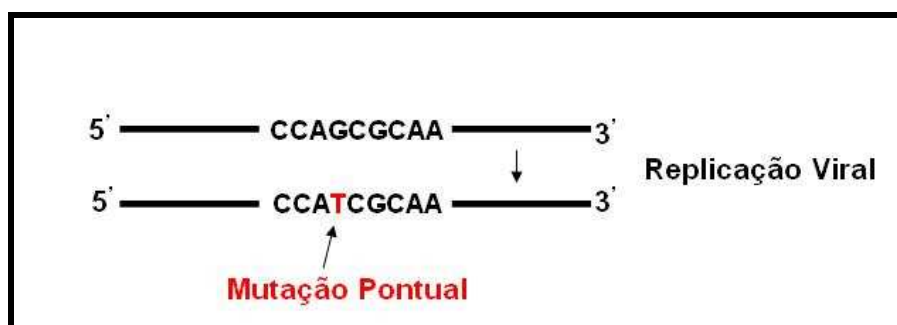


Figura 11. Esquema representativo da ocorrência das mutações pontuais (Adaptada de Taniguchi & Urasawa. 1995).

1.7.2 Rearranjos

Os rearranjos representam alterações na seqüência do segmento genômico, algumas vezes na forma de deleção ou mais freqüentemente como duplicação (Figura 12). A visualização deste tipo de mecanismo pela EGPA caracteriza-se pela ausência de alguns segmentos da sua posição usual e/ou o aparecimento de bandas adicionais com mobilidades diferentes (Taniguchi & Urasawa, 1995). Pedley e cols. (1984) investigaram RV isolados de crianças imunodeficientes e observaram variação na mobilidade dos segmentos do ARNfd pela EGPA. Com isso, vieram as primeiras descrições de que tais variações ocorriam não somente em crianças imunodeficientes mas também em animais e crianças saudáveis (Desselberger, 1996). Os rearranjos resultam de erros de transcrição de um único segmento e possuem nada mais do que a seqüência de um gene. Na maioria das vezes os genomas com rearranjos surgem como produtos de uma duplicação parcial da ORF do genoma dos RV-A, com variadas conseqüências relativas a sua expressão. Provavelmente, no momento da transcrição, por uma falha da ARN-polimerase ARN-dependente, ela retorne a sua fita molde (*template*), reiniciando a transcrição a partir de diferentes estágios. As regiões codificantes são mantidas em todos os rearranjos observados, apesar de alguns produzirem proteínas de tamanho anormal. Os vírus com segmentos de genoma rearranjados são geneticamente estáveis e reestruturam seus segmentos em infecções mistas (Desselberger, 1996).

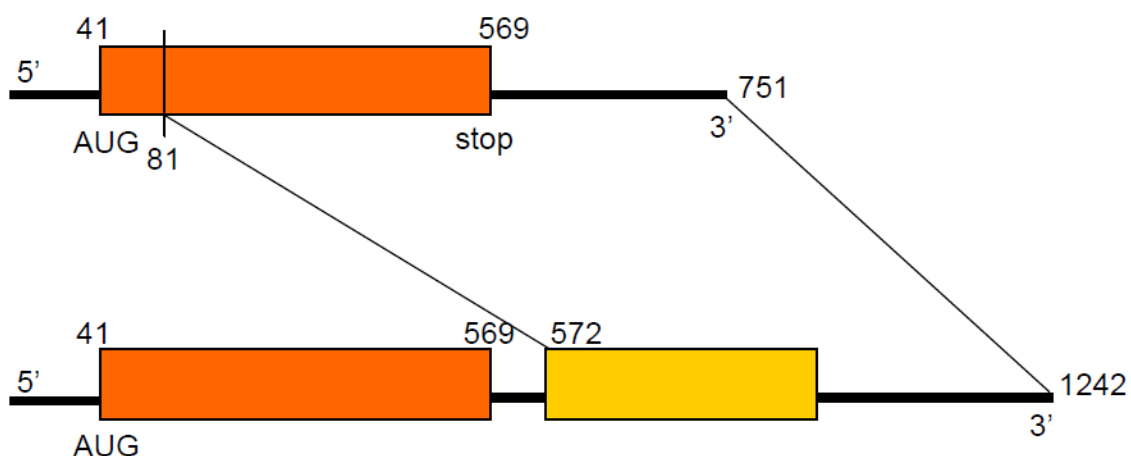


Figura 12. Estruturas rearranjadas de segmentos de genoma de rotavírus contendo duplicação parcial da ORF. (Adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).

1.7.3 Reestruturações

As reestruturações (*reassortments*) (Figura 13) foram observadas por Matsuno e col. (1980) quando obtiveram o primeiro clone reestruturado através da co-infecção em cultura celular de RV-A bovino (Lincoln) e RV símio (SA-11). A estreita associação entre eletroferotipos, subgrupo, G e P tipos, implica que, pelo menos na natureza, os segmentos ou as proteínas por eles codificadas sejam interdependentes. Isto resulta na seleção de certos grupos de segmentos durante a formação de um genoma reestruturado (Taniguchi & Urasawa. 1995). As reestruturações *in natura* contendo combinações genótípicas não usuais, têm sido descritas (Mascarenhas *et al.* 1989; Krishnam *et al.* 1994; Heiman *et al.* 2008). Isolados com especificidade para genótipos G e P normalmente originários de uma espécie animal, podem ser encontrados em outras espécies (Nakagomi & Nakagomi. 1991; Beards *et al.* 1992; Brussow *et al.* 1992; Taniguchi *et al.* 1994; Palombo & Bishop. 1995; Alfieri *et al.* 1996; Timenetsky *et al.* 1997). Todavia, esses isolamentos parecem ser mais frequentes nos países em desenvolvimento, provavelmente facilitados pelas precárias condições de saneamento básico e higiene, defesas imunológicas limitadas, co-infecções com parasitas, desnutrição, além do estreito relacionamento entre o homem, animais domésticos e outros animais, proporcionando, assim, infecções mistas e, conseqüentemente, maior possibilidade de ocorrer as reestruturações genéticas (Desselberger. 1996).

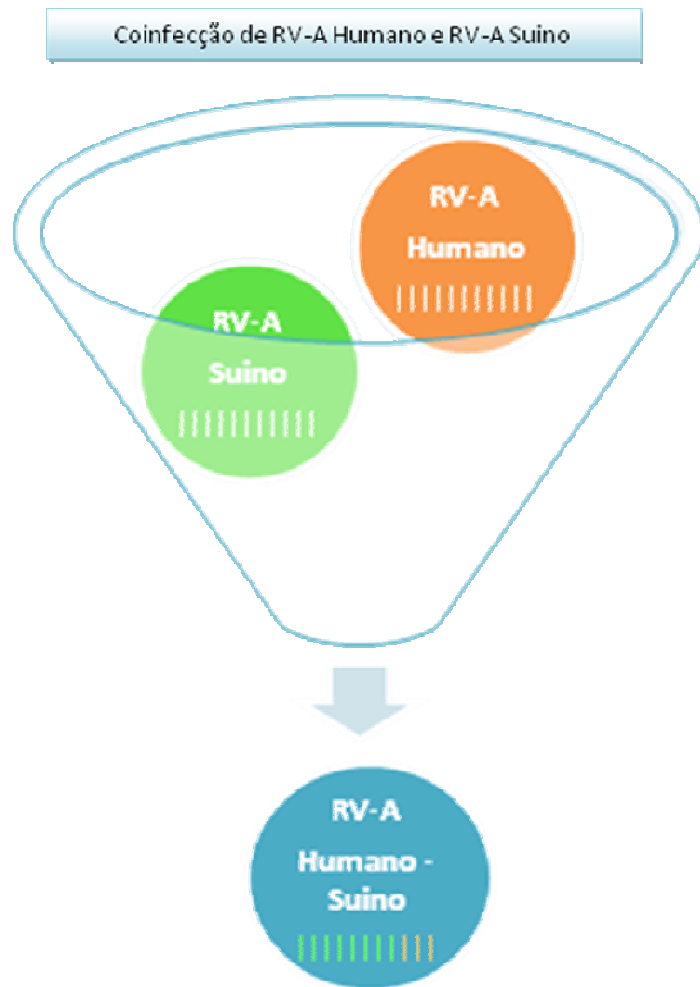


Figura 13. Esquema representativo de um evento de *reassortment* entre um rotavírus A de origem humana e origem suína.

1.7.4 Recombinação genética

A recombinação genética tem sido descrita como um importante mecanismo de geração de variabilidade genética e evolução dos vírus, ainda que sejam poucos os relatos registrando o acontecimento de eventos de recombinação genética em RV-A (Figura 14) (Worobey & Holmes. 1999). Além disto, vários estudos descrevem a ocorrência de infecções mistas com amostras de diferentes genótipos de RV-A ou com diferentes linhagens de um mesmo genótipo, ocorrendo em um mesmo indivíduo, aumentando, desta forma, as probabilidades de ocorrência de eventos de *reassortment* e/ou recombinação genética (Gouvea & Brantly. 1995; Jain *et al.* 2001). Porém, o evento de recombinação genética em RV-A ainda é pouco conhecido e mais estudos deverão ser realizados para que melhor se entenda a dinâmica da recombinação genética e sua atuação sobre o hospedeiro (Phan *et al.* 2007).

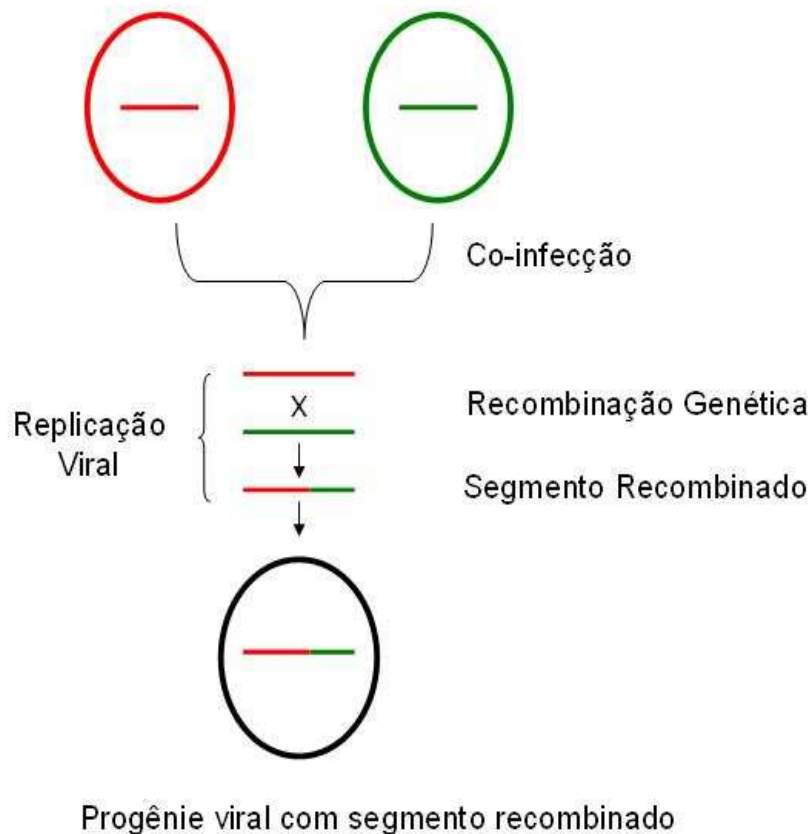


Figura 14. Esquema representativo de um evento de recombinação genética.

1.8 TRANSMISSÃO ENTRE-ESPÉCIES

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

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

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

1.9 EPIDEMIOLOGIA

1.9.1 Distribuição mundial de genótipos de Rotavírus A

Os RV-A são os principais agentes etiológicos da GA de origem viral, em crianças menores de cinco anos em todo o mundo, sendo responsáveis por 40% das hospitalizações (Estes & Kapikian, 2007, CDC, 2008).

A distribuição universal dos RV-A tem sido amplamente descrita e caracterizada em estudos desenvolvidos em todo o mundo. O seu caráter enteropatogênico é ressaltado determinando tanto quadros de GA infantil epidêmica, nas regiões de clima temperado, quanto sob caráter endêmico nas áreas tropicais. Considerando-se esta ampla distribuição mundial dos RV-A, o padrão de sazonalidade observado varia de acordo com a região. Nas regiões de clima temperado observa-se um padrão tipicamente sazonal, caracterizado pela

ocorrência de surtos e epidemias durante os meses mais frios e secos do ano, sendo que nas regiões de clima tropical as infecções por RV-A ocorrem ao longo de todo o ano (Kapikian *et al.* 2001).

Diversos estudos epidemiológicos demonstraram que diferentes genótipos P e G podem co-circular dentro de uma mesma região e que o genótipo prevalente em uma determinada região pode mudar anualmente. Outra observação é que os genótipos prevalentes em diferentes regiões de um país podem ser diferentes dentro do mesmo período epidêmico (Perez-Vargas *et al.* 2006). O genótipo prevalente (50% ou mais dos casos registrados) pode variar em intervalos de 1-3 anos, provavelmente como resultado do acúmulo progressivo dos indivíduos imunes (Castello *et al.* 2004). Estudos de epidemiologia molecular de RV-A têm demonstrado que são cinco os genótipos mais comumente detectados no mundo: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] (Santos & Hoshino, 2005) (Figura 15).

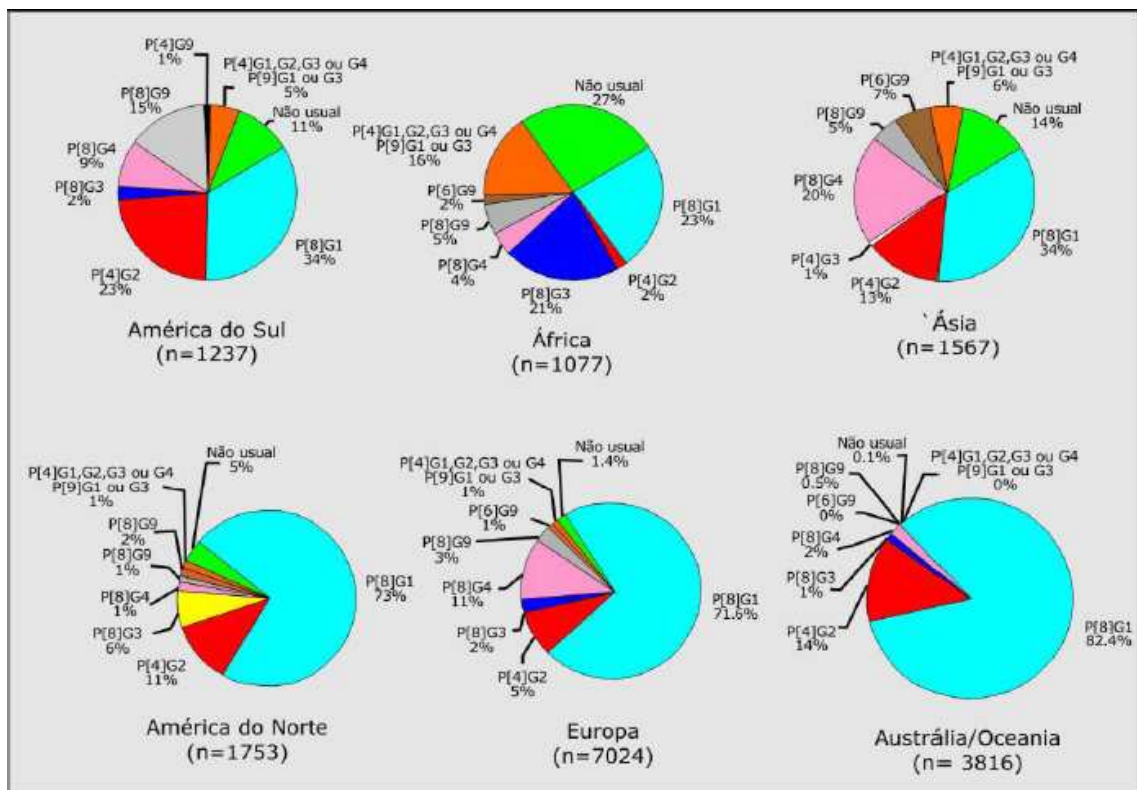


Figura 15. Distribuição continental/subcontinental de rotavírus A humano com as combinações binárias G e P (Adaptada de Santos & Hoshino, 2005).

1.9.2 Distribuição de genótipos de Rotavírus A no Brasil

No Brasil, a circulação de RV-A tem sido dividida em dois períodos pré-vacinais compreendidos entre 1982-1995 e 1996-2005. Leite e cols (2008) demonstraram que as combinações mais frequentemente encontradas foram: G1P[8]/G1P[?] (43%), G9P[8]/ G9P[?] (20%), G2P[4]/ G2P[?] (9%), G3P[8]/ G3P[?] (6%), G4P[8]/ G4P[?] (4%) e G5P[8]/ G5P[?] (4%) (Figuras 16 e 17). Este estudo demonstrou que a detecção de G2P[4] diminuiu de 26% no período 1982 – 1995 para 2% no período 1996 – 2005. Porém, no ano 2005 a prevalência deste genótipo aumentou, tornando-se o genótipo mais prevalente entre 2006 – 2008.

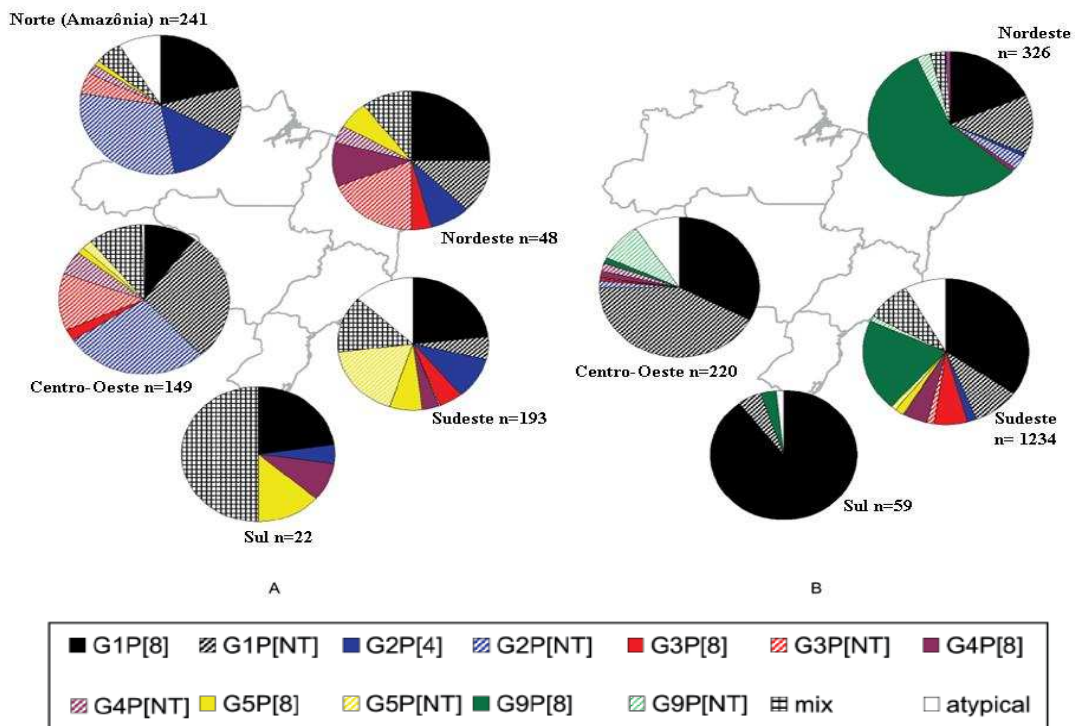


Figura 16. Distribuição dos genótipos de rotavírus A no Brasil, por região. A: de 1982 a 1995, e B: de 1996 a 2005 (Adaptada de Leite *et al.* 2008).

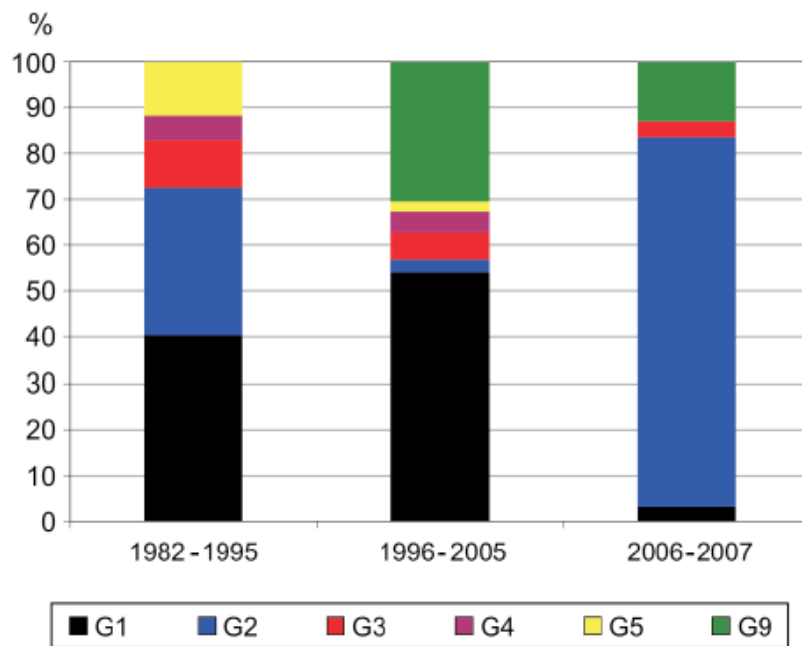


Figura 17. Taxa de detecção dos diferentes genótipos G de rotavírus A no Brasil em diferentes períodos (Adaptada de Leite *et al.* 2008)

1.9.3 Re-emergência do genótipo G2P[4]

Após a introdução da vacina Rotarix[®] em 2006, foi observado um aumento significativo na ocorrência do genótipo G2P[4], sendo o genótipo mais prevalente seguido de G1, G3 e G9 (Leite *et al.* 2008). Em Uberaba, Minas Gerais, no período 2005 – 2006, o genótipo G2P[4] foi detectado em 64% dos casos (Domingues *et al.* 2008). No período de 2006 a 2007, G2 de RV-A foi detectado nos estados do Rio de Janeiro, Sergipe, Pernambuco, Piauí e Minas Gerais (Leite *et al.* 2008). No Nordeste do Brasil, diferentes estudos mostraram uma prevalência de 100% para o genótipo G2P[4] no ano de 2007 (Gurgel *et al.* 2007, Nakagomi *et al.* 2008). Estudos recentes mostram que no Norte do Brasil a re-emergência de G2 alcançou taxas de até 90% (de Oliveira *et al.* 2008).

A re-emergência do genótipo G2P[4] de RV-A nestes últimos anos parece estar refletindo um fenômeno continental. Tem sido reportado um aumento na prevalência deste genótipo em diferentes países: Honduras (Ferrera *et al.* 2007), Argentina, Paraguai (Amarilla

et al. 2007), El Salvador e Guatemala (Patel *et al.* 2008). Porém, deve ser ressaltado que estes países ainda não tinham introduzido uma vacina contra o RV-A no setor público.

Em Bangladesh foi reportada uma taxa de detecção de 43% no período de 2005 a 2006 (Rahman *et al.* 2007). Num estudo realizado em Salento, Itália, G2 apresentou uma taxa de detecção de 44.9% no período de 2006 a 2007 (de Donno *et al.* 2009). Em Portugal um estudo mostrou uma taxa de detecção de 68,6% no ano 2007 para o genótipo G2P[4] (Antunes *et al.* 2009).

Foi relatado por Bishop e cols. (1991), em um estudo realizado na Austrália, a existência de um ciclo de 10 anos para a re-emergência do genótipo G2. Esses dados têm sido parcialmente corroborados por Leite e cols., 2008, onde se observou um intervalo de 10 anos entre a diminuição do genótipo G2 em 1996, com o aumento 10 anos depois. Porém, uma extensa e contínua vigilância epidemiológica é de grande importância para se confirmar este padrão temporal no Brasil.

1.9.4 Genótipos não-usuais ou incomuns

A partir da detecção dos genótipos designados usuais ou comuns, outras combinações de genótipos G ou P emergiram, sendo designadas de não-usuais ou incomuns. Algumas destas passaram a assumir importância epidemiológica, como G5, G6, G8, G10 e, recentemente G12 e P[9]. Esses genótipos foram inicialmente detectados nos países em desenvolvimento e, posteriormente, nos países desenvolvidos.

Genótipos não-usuais têm sido descritos em todo o mundo e representam 4,9% do total, com os mais elevados percentuais registrados na África (27%), na Ásia (14%) e América do Sul (11%). Na América do Norte, Europa e Austrália, a frequência com que essas combinações ocorreram foi de 5%, 1,4% e 0,1%, respectivamente (Santos e Hoshino. 2005). Diversos estudos demonstraram que os genótipos G incomuns circulam no mundo: G5, G8 e G10 no Brasil (Gouvea *et al.* 1994; Santos *et al.* 1998; Volotao *et al.* 2006; Montenegro *et al.* 2007; Martini *et al.* 2008), G8 na Malásia (Cunliffe *et al.* 1999) e recentemente o genótipo G12 em diversos países no mundo (Pongsuwanna *et al.* 2002; Banyai *et al.* 2007; Rahman *et al.* 2007; Steyer *et al.* 2007; Sharma *et al.* 2008) incluindo Argentina (Castello *et al.* 2006) e Brasil (Pietruchinski *et al.* 2006).

1.10 PREVENÇÃO E CONTROLE

As taxas de prevalência da doença causada por estes vírus são similares nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. O fato dos RV-A acometerem crianças de todas as classes sociais sugere que, ao contrário de outros enteropatógenos de transmissão fecal-oral, não seria possível controlar a infecção de RV-A somente através de melhorias na infraestrutura sanitária das populações. Conseqüentemente, acredita-se na possibilidade de que uma vacina possa ser a única forma de prevenção possível (Glass *et al.* 2006).

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

Vários grupos de pesquisa têm trabalhado neste projeto, levando-se em conta o cenário epidemiológico apresentado pelas diarreias agudas causadas pelo RV-A. Neste contexto, diferentes abordagens têm sido utilizadas no desenvolvimento de vacinas contra o RV-A.

1.10.1 Vacinas contra Rotavírus A

1.10.1.1 Abordagem Jenneriana Monovalente

Esta estratégia de desenvolvimento de vacinas teve como base o fato das amostras animais de RV-A serem naturalmente atenuadas para seres humanos e que, administradas por via oral, poderiam mimetizar a infecção natural pelo patógeno e desencadear uma resposta imune protetora.

1.10.1.1.1 RIT 4237

Derivada do isolamento de rotavírus bovino NCDV de genótipo G6 P[1]. Apresentou eficácia na Finlândia, conferindo até 80-90% de proteção contra casos graves de diarreia por

RV-A (Vesikasri *et al.* 1985). Contudo, na África a eficácia dessa vacina, após 3 doses, foi de 33% (Hanlon *et al.* 1987). A fabricação dessa vacina foi descontinuada devido à sua imunogenicidade e eficácia insuficientes.

1.10.1.1.2 WC3

Isolada de fezes diarreicas de bezerro recém-nascido, genótipo G6P[2]. Em um ensaio conduzido na Filadélfia, após uma única dose, induziu 76% de proteção (Clark *et al.* 1996). Contudo, em avaliações posteriores em Ohio, Estados Unidos (EUA), a vacina mostrou somente 20% de eficácia. Sua produção e aplicação também foi descontinuada.

1.10.1.1.3 RRV ou MMU18006

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

1.10.2 Abordagem Jenneriana modificada

1.10.2.1 Rhesus Rotavirus Vaccine- Tetravalent (RRV-TV) (Rotashield®)

Seguindo o princípio da imunidade sorotipo-específica o Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH) desenvolveu a vacina oral RRV-TV, obtida através da incorporação de material genético codificante de VP7 de RV-A humano em RV-A símio. Esta vacina contempla as especificidades genotípicas G1, G2 e G4, adicionadas ao já representado G3 da amostra original de macaco. Desta forma, a RRV-TV representa uma mistura de três vírus reestruturados símio-humanos (G1, G2 e G4) com a amostra de macaco *Rhesus* G3 original. Esta vacina (Rotashield®) foi licenciada pelo órgão norte-americano *Food and Drug Administration* (FDA) em 1998, sendo recomendada para uso em três doses, aos dois, quatro e seis meses de idade, tendo a distribuição se iniciado em outubro daquele ano nos EUA.

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

1.10.2.2 Rotateq[®]

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

Os estudos em fase III incluíram 4.512 crianças, sendo 2.207 vacinadas e 2.305 no grupo controle. A eficácia da vacina contra estes sorotipos, analisados em conjunto foi de 74% para gastroenterite aguda de qualquer gravidade e de 98% para gastroenterite aguda grave (Vesikari *et al.* 2006).

1.10.2.3 Vacina contra rotavírus bovino-humana multivalente (Vacina UK)

Esta vacina foi desenvolvida também pelo NIH e consiste em uma amostra de RV-A bovino (UK) reestruturada por possuir o gene codificante de VP7 de RV-A humanos com especificidades genóticas G1, G2, G3 e G4 e 10 genes da amostra de RV-A bovino UK (P[7]G6). Desta forma, visou-se desenvolver uma vacina para regiões específicas, com alta

prevalência de genótipos ditos emergentes. Em 2004, o NIH transferiram a patente de produção da vacina para Índia, Brasil e China (Dennehy, 2008). No Brasil, a licença para produção foi dada ao Instituto Butantan, em São Paulo (Ferguson, 2004).

1.11.2.4 RIX 4414 (Rotarix®)

A vacina Rotarix® foi introduzida no calendário brasileiro de imunizações em março de 2006, porém já estava disponível desde 2005 em clínicas e consultórios particulares. Esta vacina, desenvolvida pela *GlaxoSmithKline Biologicals*, contém $10^{6,5}$ unidades formadoras de foco da amostra de RV-A humano RIX 4414, de especificidade genotípica G1P[8] (Vesikari *et al.* 2004)

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

A vacina foi especialmente eficaz na prevenção de gastroenterite por RV-A de genótipo G1, porém, estudos descrevem a ocorrência de proteção cruzada para gastroenterite e gastroenterite grave causada por outros genótipos (G3, G4 e G9), normalmente associados ao genótipo P[8]. Esta eficácia variou entre 65% e 100%. Em relação ao genótipo G2 foi observada uma eficácia de 41% (a menor proteção cruzada verificada), visto que o mesmo, geralmente está associado ao genótipo P[4] (Ruiz-Palacios *et al.* 2006).

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Devido a complexidade da epidemiologia dos RV-A, particularmente em países em desenvolvimento, torna-se fundamental o conhecimento dos genótipos das amostras circulantes, principalmente a partir da introdução da vacina monovalente Rotarix[®] (G1P[8]) pelo PNI no Brasil.

Estudos anteriores, em diferentes continentes, demonstraram flutuações temporais e geográficas na distribuição das combinações G-P de RV-A (Gentsch *et al.* 2005; Santos & Hoshino, 2005). Se a primo-infecção contra RV-A confere proteção principalmente genótipo-específica, a eficácia protetora pela vacina poderá variar dependendo dos genótipos circulantes entre as diferentes populações e em uma determinada estação (Offit & Blavat. 1986; Bernstein *et al.* 1995; Santosham *et al.* 1997). Entretanto, os estudos de fase III realizados com as vacinas Rotateq e Rotarix mostraram resultados satisfatórios de eficácia (Nakagomi & Nakagomi, 2009; Phua *et al.* 2009).

Diferentes estudos evidenciaram a re-emergência do genótipo G2P[4] no Brasil (Carvalho-Costa *et al.* 2006; Gurgel *et al.* 2007; Nakagomi *et al.* 2008; Leite *et al.* 2008; de Oliveira *et al.* 2008) e em diferentes países das Américas (Amarilla *et al.* 2007; Ferrera *et al.* 2007; Patel *et al.* 2008). Porém, à exceção do Brasil, estes países ainda não introduziram uma vacina contra o RV-A no setor público. A re-emergência deste genótipo parece estar refletindo um fenômeno continental (Leite *et al.* 2008). Contudo, uma mudança na epidemiologia e distribuição deste genótipo relacionada à introdução da vacina Rotarix[®] no Brasil não pode ser descartada e necessita ser investigada.

Por outro lado, a complexidade e diversidade genética que os RV-A apresentam, representam um desafio à eficácia das diferentes vacinas anti RV-A. Deve-se considerar que o genótipo G2P[4] não compartilha antígenos VP4 ou VP7 com a amostra vacinal Rotarix[®].

Neste contexto, análises filogenéticas e estudos de caracterização molecular do genótipo G2P[4] de RV-A no Brasil tornam-se fundamentais para se determinar a variabilidade genética e a frequência com que os diferentes mecanismos de evolução descritos anteriormente podem estar ocorrendo para este genótipo.

3. OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1. Objetivo Geral

Determinar a variabilidade genética de amostras de RV-A genótipo G2P[4] isoladas no período de 1996 a 2009, antes e após a introdução da vacina monovalente Rotarix[®] (G1P[8]) no calendário nacional de imunizações do Brasil, através da análise dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4, VP6 e NSP4.

3.2. Objetivos Específicos

- Amplificar, por RT-PCR, os genes que codificam para as proteínas VP7, VP4, VP6 e NSP4 de amostras de RV-A genótipo G2P[4].
- Realizar a genotipagem a partir das seqüências gênicas obtidas.
- Realizar estudos filogenéticos baseados na análise dos genes VP7, VP4, VP6 e NSP4 em relação aos protótipos disponíveis no *GenBank*.
- Determinar a origem e a variação temporal dos genes em estudo para se avaliar o impacto da introdução da vacina Rotarix[®].
- Determinar a ocorrência de mutações pontuais, *reassortments*, rearranjos e recombinação genética nos genes das amostras analisadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras Clínicas

Foram utilizadas amostras fecais (n=88) de crianças menores de 5 anos de idade com quadro de GA obtidas da coleção do LVCA, IOC – FIOCRUZ entre 1996 e 2009. As amostras foram previamente positivas por EGPA (referencia) , apresentando perfil eletroforético curto e positivas para EIARA (REFERENCIA). Todas foram previamente genotipadas como G2P[4] utilizando RT-PCR, de acordo com o protocolo de..... As amostras fecais foram recebidas no LVCA acompanhadas da ficha clinica e epidemiológica sempre que possível. As amostras utilizadas neste estudo, distribuídas de acordo com o ano de coleta e Estado de origem estão na Tabela 2.

Foram analisadas amostras provenientes dos seguintes Estados federativos: Acre (AC); Alagoas (AL), Bahia (BA), Espírito Santo (ES), Maranhão (MA), Minas Gerais (MG), Mato Grosso do Sul (MS), Pernambuco (PE), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Sul (RS), Sergipe (SE).

Tabela 2. Amostras fecais analisadas neste estudo, de acordo com o ano de coleta e Estado de origem.

NÚMERO DE AMSOTRA	ANO	ESTADO
493_96RJ	1996	Rio de Janeiro
680_96ES	1996	Espírito Santo
685_96ES	1996	Espírito Santo
957_97RJ	1997	Rio de Janeiro
5323_02RJ	2002	Rio de Janeiro
5619_02RJ	2002	Rio de Janeiro
11143_05MS	2005	Mato Grosso do Sul
11257_05MS	2005	Mato Grosso do Sul
11531_05AC	2005	Acre
11580_05AC	2005	Acre
11581_05AC	2005	Acre
11782_05RJ	2005	Rio de Janeiro
11830_06AC	2006	Acre
11837_06AC	2006	Acre
11860_06RJ	2006	Rio de Janeiro
12220_06RJ	2006	Rio de Janeiro
12224_06RJ	2006	Rio de Janeiro
12287_06BA	2006	Bahia
12301_06BA	2006	Bahia
12343_06RJ	2006	Rio de Janeiro
12389_06RJ	2006	Rio de Janeiro
12482_06BA	2006	Bahia
12522_06BA	2006	Bahia
12540_06RJ	2006	Rio de Janeiro
12549_06RJ	2006	Rio de Janeiro
12585_06ES	2006	Espírito Santo
12589_06RJ	2006	Rio de Janeiro
12647_06RJ	2006	Rio de Janeiro
12684_06RJ	2006	Rio de Janeiro
12774_06RJ	2006	Rio de Janeiro
12775_06RJ	2006	Rio de Janeiro
12777_06BA	2006	Bahia
12840_06ES	2006	Espírito Santo
12842_06ES	2006	Espírito Santo
12916_06BA	2006	Bahia
13039_06RS	2006	Rio Grande do Sul
13079_06RJ	2006	Rio de Janeiro
13081_06RJ	2006	Rio de Janeiro
13151_06RJ	2006	Rio de Janeiro
13158_06ES	2006	Espírito Santo
13438_07RJ	2007	Rio de Janeiro
13514_07ES	2007	Espírito Santo
13663_07AL	2007	Alagoas
13668_07AL	2007	Alagoas
13780_07RJ	2007	Rio de Janeiro
13788_07SE	2007	Sergipe
13793_07SE	2007	Sergipe
13891_07RJ	2007	Rio de Janeiro
14157_07ES	2007	Rio Grande do Sul
14255_07RJ	2007	Rio de Janeiro
14263_07RS	2007	Rio Grande do Sul
14303_07MG	2007	Minas Gerais
14322_07MG	2007	Minas Gerais
14344_07RS	2007	Rio Grande do Sul
14397_07MA	2007	Maranhão
14422_07RS	2007	Rio Grande do Sul
14426_07ES	2007	Espírito Santo
14919_08RS	2008	Rio Grande do Sul
15311_08RJ	2008	Rio de Janeiro
15382_08BA	2008	Bahia
15385_08BA	2008	Bahia
15593_08AL	2008	Alagoas
15771_08PE	2008	Pernambuco
15774_08PE	2008	Pernambuco
15777_08PE	2008	Pernambuco
15782_08MG	2008	Minas Gerais
15786_08ES	2008	Espírito Santo
15811_08SE	2008	Sergipe
15830_08RS	2008	Rio Grande do Sul
15836_08RS	2008	Rio Grande do Sul
15840_08RS	2008	Rio Grande do Sul
15859_08MG	2008	Minas Gerais
15860_08RJ	2008	Rio de Janeiro
15863_08MA	2008	Maranhão
15894_08ES	2008	Espírito Santo
15898_08MG	2008	Minas Gerais
15900_08MG	2008	Minas Gerais
15953_08RS	2008	Rio Grande do Sul
15958_08RS	2008	Rio Grande do Sul
15983_08BA	2008	Bahia
15988_08BA	2008	Bahia
15990_08BA	2008	Bahia
16054_09MA	2009	Maranhão
16056_09MA	2009	Maranhão
16064_09MA	2009	Maranhão
16099_09ES	2009	Espírito Santo
16100_09ES	2009	Espírito Santo
16101_09ES	2009	Espírito Santo

4.2 Suspensão Fecal

Foram preparadas suspensões fecais a 10% em tampão Tris-HCl Ca²⁺ 0,01M pH 7,2 em cabine de segurança biológica NB2, Holten Lamin Air MS 2010 Modelo 0.9. As suspensões foram homogeneizadas, clarificadas a 3000 x g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes estocados a -20°C.

4.3 Extração de RNAs

A extração dos RNAs foi realizada a partir de sobrenadantes homogeneizados e clarificados de suspensões fecais pelo método descrito por Boom e cols. (1990), incluindo modificações de Araújo e cols. (2001). Resumidamente: em tubo plástico tipo Eppendorf[®] de 1,5mL foram adicionados 1 mL de tampão L6 e 400µL de suspensão fecal a 10%, previamente preparada seguido de 15µL de sílica. Após agitação orbital por 20 minutos, as suspensões foram posteriormente centrifugadas a 16.000 x g por 60 segundos, descartando-se o sobrenadante em solução de NaOH 10N. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de tampão L2, seguido de agitação em vórtex para ressuspensão do sedimento formado. Nova centrifugação foi realizada a 16.000 x g por 60 segundos e o sobrenadante foi descartado em solução de NaOH 10N. A seguir foram realizadas duas etapas de lavagens, a primeira, adicionando-se 1 mL de etanol a 70% gelado e a segunda 1 mL de acetona P.A (Merck[®]) gelada, utilizando-se os mesmos procedimentos de homogeneização e sedimentação anteriormente descritos, desprezando-se o sobrenadante em solução de hipoclorito de sódio a 5%. Após a última lavagem, os tubos foram incubados a 56° C por 15 minutos com as tampas abertas para completa evaporação da acetona. Após esse período, foram adicionados 60µL de água livre de endo e exonucleases (Invitrogen[®]) em cada tubo. Os tubos foram novamente homogeneizados em vórtex por 10 segundos, incubados a 56° C por 15 minutos com as tampas fechadas. Após a centrifugação a 16.000 x g por 3 minutos, 50µL do sobrenadante contendo os RNAs foram coletados cuidadosamente e transferidos para outro tubo, sendo armazenados a -70 °C.

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

Os RNAs, extraídos das suspensões fecais, foram submetidos a RT-PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes que codificam as proteínas VP4 e NSP4. A PCR é precedida de transcrição reversa com o iniciador randômico pd(N)6 (Amersham Biosciences, USA), seguida da amplificação com iniciadores específicos. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando a mistura de reagentes descrita no Quadro 2.

Quadro 2. Mistura de reagentes utilizados na reação de transcrição reversa (RT):

Reagente	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O livre de DNAase / RNAase (Invitrogen [®])	-	22,5µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen [®])	10X	5,0µL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen [®])	2,5mM	5,0µL
MgCl ₂ (Invitrogen [®])	50mM	2,5µL
RT Superscript III™ (Invitrogen [®])	200U/µL	1,0µL
pd(N)6 [®] (Amersham Biosciences [®])	50 unidades (A260)	2,0µL

A mistura de reagentes utilizada para a amplificação dos genes que codificam as proteínas VP4, VP7 e NSP4 estão descritas nos Quadros 3 e 4.

Quadro 3. Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7.

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (Invitrogen [®])	-	31,25 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen [®])	10x	5 µL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen [®])	2,5mM	4 µL
MgCl ₂ (Invitrogen [®])	50mM	2,5 µL
Taq DNA polimerase Platinum II (Invitrogen [®])	5U/MI	0,25 µL
Oligonucleotídeos específicos para VP4: (F4P4D ¹ - 4con2 ²)/(4con3 ² - 4con2); para VP7: 9con1 ³ - 9con2 ³	20µM (cada)	2 µL
Total		45 µL

¹Modificado de Cunliffe *et al.* 1997. ² Gentsch *et al.* 1992. ³Das *et al.* 1994.

As condições de termociclagem consistiram de: uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 50°C por 30 segundos para o anelamento dos iniciadores e 72°C por 1 minuto para a fase de extensão das fitas de DNA. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos.

Quadro 4. Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação do gene que codifica para a proteína NSP4.

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (Invitrogen [®])	-	15,625 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen [®])	10x	2,5 µL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen [®])	2,5mM	2 µL
MgCl ₂ (Invitrogen [®])	50mM	1,25 µL
Taq DNA polimerase Platinum II (Invitrogen [®])	5U/MI	0,125 µL
Oligonucleotídeos específicos: FN4D ¹ - RN4D ¹	20µM (cada)	1 µL
Total		22,5 µL

¹Modificado de Cunliffe *et al.* 1997

As condições de termociclagem consistiram de: uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 50°C por 30 segundos para o anelamento dos iniciadores e 72°C por 30 segundos para extensão das fitas de DNA. A extensão final da fita de DNA foi a 72°C por 10 minutos.

4.4.2 Amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP6 e VP7 por RT-PCR

A amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP6 e VP7 foi realizada utilizando o Kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®), de acordo com as instruções descritas pelo fabricante. A mistura de reagentes utilizada está descrita no Quadro 5.

Quadro 5. Reagentes utilizados na RT-PCR para amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP6 e VP7.

Reagentes	Concentração	Volume
Reaction Mix (Invitrogen®)	2X	25 µL
MgSO ₄ (Invitrogen®)	5mM	8 µL
Enzyme Mix (Invitrogen®)	2000 U/µL	1 µL
Oligonucleotídeos específicos VP7(9Beg ¹ - 9End ¹) e VP6 (FVP6 - RVP6*)	20 Mm (cada)	1 µL
Total		25 µL

¹Gouvea *et al.* 1990

Em tubo plástico tipo Eppendorf® de 200µL foram adicionados 3µL de dimetil sulfóxido (DMSO) e 12µL do RNA extraído. Após incubação a 97°C por 7 minutos para desnaturação e rompimento de estruturas secundárias do RNAfd, o tubo foi mantido em banho de gelo por 2 minutos. A seguir foram adicionados aos 15µL da mistura de RNA com DMSO, 35µL da mistura para amplificação (Quadro 5).

As condições de termociclagem consistiram de: uma etapa de RT a 55°C por 55 minutos, a etapa de desnaturação inicial da PCR a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação de 94°C por 1 minuto na etapa de desnaturação, 55°C por 1 minuto para o

anelamento dos iniciadores e 72°C por 2 minutos para a fase de extensão das fitas de DNA. A extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos.

As condições de termociclagem consistiram de: uma etapa de RT a 55°C por 55 minutos, a etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 55°C por 1 minuto para o anelamento dos iniciadores e 72°C por 3 minutos para a extensão das fitas de DNA. A extensão final foi a 72°C por 7 minutos.

4.4.3 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados nas diferentes reações de PCR para a amplificação dos genes em estudo se mostram no Quadro 6. Para amplificação do gene que codifica para a proteína NSP4 foram utilizados os oligonucleotídeos FN4D e RN4D obtendo-se um *amplicon* de 673 pb. Para o gene que codifica para a proteína VP4 foram utilizados os oligonucleotídeos: 1) F4P4D e 4con2, obtendo-se um *amplicon* de 887pb, 2) 4con3 e 4con2, obtendo-se um *amplicon* de 876pb. Para o gene que codifica para a proteína VP6, foram utilizados os oligonucleotídeos FVP6 e RVP6, obtendo-se um *amplicon* de 1356pb. Para o gene que codifica para a proteína VP7 foram utilizados os oligonucleotídeos: 1) 9con1 e 9con2, obtendo-se um *amplicon* de 904pb, 2) Beg9 e End9, obtendo-se um *amplicon* de 1062pb. Os mesmos oligonucleotídeos foram utilizados no seqüenciamento.

Quadro 6. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes NSP4, VP4, VP6 e VP7 de amostras de RV-A, genótipo G2P[4].

Gene	Nome do oligonucleotídeo	Seqüência sentido 5' - 3'	Posição do oligonucleotídeo (nt)
NSP4	FN4D (+)	CGG AAA AGA TGG AAA AGC	1 - 18
NSP4	RN4D (-)	GGA TTG GTT AAA CGG GA T	673-656
VP4	F4P4D (+)	GCATGGCTTCACTCATTATAGAC	1 - 22
VP4	4 con 2 (-)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	887 – 868
VP4	4con3 (+)	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11-32
VP6	FVP6 DS-1 (+)	GGC TTT TAA ACG AAG TCT TC	1 - 20
VP6	RVP6 DS-1 (-)	GGT CAC ATC CTC TCA CTA CA	1356-1337
VP6	FVP6i (+)	GCG CCA GCT AAT ACA CAA C	624-642
VP7	9con1 (+)	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	37-56
VP7	9con2 (-)	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	941-922
VP7	Beg9 (+)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	1 - 28
VP7	End9 (-)	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	1062-1036

4.4.4 Análise dos *amplicons* por eletroforese em gel de agarose a 1,5%

Para análise dos *amplicons* obtidos nos itens 4.4.1 e 4.4.2, 2µL de corante azul de bromofenol (Invitrogen®) foram adicionados a 10µL dos produtos da PCR e os mesmos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (GIBCO-BRL®) a 1,5% em tampão TBE 0,5% (GIBCO-BRL®) por 1 hora a 100 volts. Após a impregnação de 20 minutos com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), os *amplicons* foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Labnet®) e as imagens registradas em sistema de captura de imagem (BioImaging Systems®) utilizando o programa Labworks 4.0.

Controles negativos foram utilizados durante todos os procedimentos desde a extração dos RNAs.

4.5 Purificação dos produtos da reação em cadeia pela polimerase

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

4.6 Seqüenciamento viral

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

Os oligonucleotídeos utilizados no seqüenciamento foram os mesmos utilizados nas reações de PCR. No caso de VP6 foi necessária a utilização de um oligonucleotídeo interno, FVP6i (Quadro 6).

4.7 Análise das seqüências

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

As seqüências protótipos representantes dos diferentes genótipos de RV-A de origem humana e animal, descritas em diferentes países, foram obtidas no *GenBank* (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através dos seus números de acesso ou mediante a utilização da ferramenta *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>).

A análise filogenética das seqüências foi realizada utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Tamura *et al.* 2007). Os métodos utilizados na construção das árvores foram: *Neighbor Joining* e *Maximum Likelihood*.

As relações filogenéticas entre as diferentes seqüências foram determinadas mediante a utilização do programa MEGA v. 4.0 (Tamura *et al.* 2007) através do método de reconstrução filogenética *Neighbor-joining*. As distâncias genéticas entre as diferentes amostras foram calculadas mediante o modelo *Kimura two-parameter* como modelo de substituição nucleotídica e o modelo *Poisson Correction* como modelo de substituição de aminoácidos. Além foram construídas árvores filogenéticas por diferentes modelos de determinação de distância genética entre as seqüências nucleotídicas, entre os quais os modelos de *Tajima-Nei* e *Maximum Composite Likelihood*, disponíveis no programa MEGA v. 4.0 (dados não mostrados). A significância estatística das diferentes árvores filogenéticas obtidas (*Robustness*) foi estimada através de 1.000 réplicas de *Bootstrap*.

O mapeamento das diferentes mutações sinônimas e não-sinônimas foi realizado através da análise direta dos diferentes alinhamentos de nucleotídeos (dados não mostrados) e de aminoácidos obtidos para os 4 genes (VP7, VP4, VP6 e NSP4) de todas as amostras analisadas em comparação aos protótipos disponíveis no *GenBank*.

5. RESULTADOS

5.1 Amplificação por RT-PCR

Foram analisadas 88 amostras fecais de RV-A genótipo G2P[4] provenientes de diferentes estados brasileiros no LVCA, IOC/FIOCRUZ no período de 1996 a 2009. Um total de 253 seqüências nucleotídicas foram obtidas a partir da amplificação por RT-PCR dos genes que codificam para as proteínas VP7 (n=62) , VP4 (n=58), VP6 (n=62) e NSP4 (n=71) (Tabela 3).

A Figura 18 apresenta a análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação por RT-PCR dos genes que codificam as proteínas NSP4 e VP6.

A Figura 19 apresenta a análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7.

Tabela 3. Amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4, VP6 e NSP4 das amostras brasileiras.

NÚMERO DE AMOSTRA	ANO	ESTADO	VP 7	VP 4	VP 6	NSP 4
493_96RJ	1996	RJ	+	+		+
680_96ES	1996	ES			+	+
685_96ES	1996	ES		+	+	+
957_97RJ	1997	RJ		+		+
5323_02RJ	2002	RJ	+	+		
5619_02RJ	2002	RJ	+	+		
11143_05MS	2005	MS	+	+		+
11257_05MS	2005	MS	+	+	+	+
11531_05AC	2005	AC	+		+	+
11580_05AC	2005	AC	+	+	+	+
11581_05AC	2005	AC			+	
11782_05RJ	2005	RJ			+	+
11830_06AC	2006	AC			+	+
11837_06AC	2006	AC	+		+	+
11860_06RJ	2006	RJ	+	+	+	+
12220_06RJ	2006	RJ	+	+	+	+
12224_06RJ	2006	RJ	+			+
12287_06BA	2006	BA	+	+	+	+
12301_06BA	2006	BA	+		+	
12343_06RJ	2006	RJ	+		+	+
12389_06RJ	2006	RJ	+		+	+
12482_06BA	2006	BA	+	+	+	+
12522_06BA	2006	BA			+	+
12540_06RJ	2006	RJ	+			+
12549_06RJ	2006	RJ	+	+	+	+
12585_06ES	2006	ES			+	+
12589_06RJ	2006	RJ	+	+	+	+
12647_06RJ	2006	RJ		+		+
12684_06RJ	2006	RJ		+		
12774_06RJ	2006	RJ	+		+	+
12775_06RJ	2006	RJ				+
12777_06BA	2006	BA		+		
12840_06ES	2006	ES		+	+	+
12842_06ES	2006	ES	+	+		+
12916_06BA	2006	BA				+
13039_06RS	2006	RS	+	+	+	
13079_06RJ	2006	RJ		+		
13081_06RJ	2006	RJ		+		
13151_06RJ	2006	RJ	+		+	+
13158_06ES	2006	ES	+	+	+	+
13438_07RJ	2007	RJ				+
13514_07ES	2007	ES				+
13663_07AL	2007	AL			+	+
13668_07AL	2007	AL	+	+	+	+
13780_07RJ	2007	RJ	+		+	+
13788_07SE	2007	SE	+	+	+	
13793_07SE	2007	SE	+	+	+	
13891_07RJ	2007	RJ	+		+	+
14157_07ES	2007	RS				
14255_07RJ	2007	RJ				+
14263_07RS	2007	RS			+	
14303_07MG	2007	MG	+	+	+	+
14322_07MG	2007	MG	+		+	+
14344_07RS	2007	RS			+	
14397_07MA	2007	MA			+	+
14422_07RS	2007	RS	+	+		+
14426_07ES	2007	ES		+		+
14919_08RS	2008	RS	+	+	+	+
15311_08RJ	2008	RJ	+	+	+	+
15382_08BA	2008	BA	+	+		+
15385_08BA	2008	BA	+	+	+	+
15593_08AL	2008	AL	+	+		+
15771_08PE	2008	PE	+	+	+	+
15774_08PE	2008	PE	+	+	+	+
15777_08PE	2008	PE	+	+	+	+
15782_08MG	2008	MG	+	+	+	+
15786_08ES	2008	ES	+	+	+	+
15811_08SE	2008	SE	+	+	+	+
15830_08RS	2008	RS		+	+	
15836_08RS	2008	RS	+	+	+	+
15840_08RS	2008	RS	+	+	+	+
15859_08MG	2008	MG	+	+	+	+
15860_08RJ	2008	RJ	+	+	+	+
15863_08MA	2008	MA	+	+	+	+
15894_08ES	2008	ES	+	+	+	+
15898_08MG	2008	MG	+	+	+	+
15900_08MG	2008	MG	+		+	+
15953_08RS	2008	RS	+	+	+	+
15958_08RS	2008	RS	+	+	+	+
15983_08BA	2008	BA	+	+	+	+
15988_08BA	2008	BA	+	+	+	+
15990_08BA	2008	BA	+		+	
16054_09MA	2009	MA	+	+		
16056_09MA	2009	MA	+	+		+
16064_09MA	2009	MA	+	+	+	+
16099_09ES	2009	ES	+	+	+	+
16100_09ES	2009	ES	+	+	+	+
16101_09ES	2009	ES	+	+	+	+
TOTAL			62	58	62	71

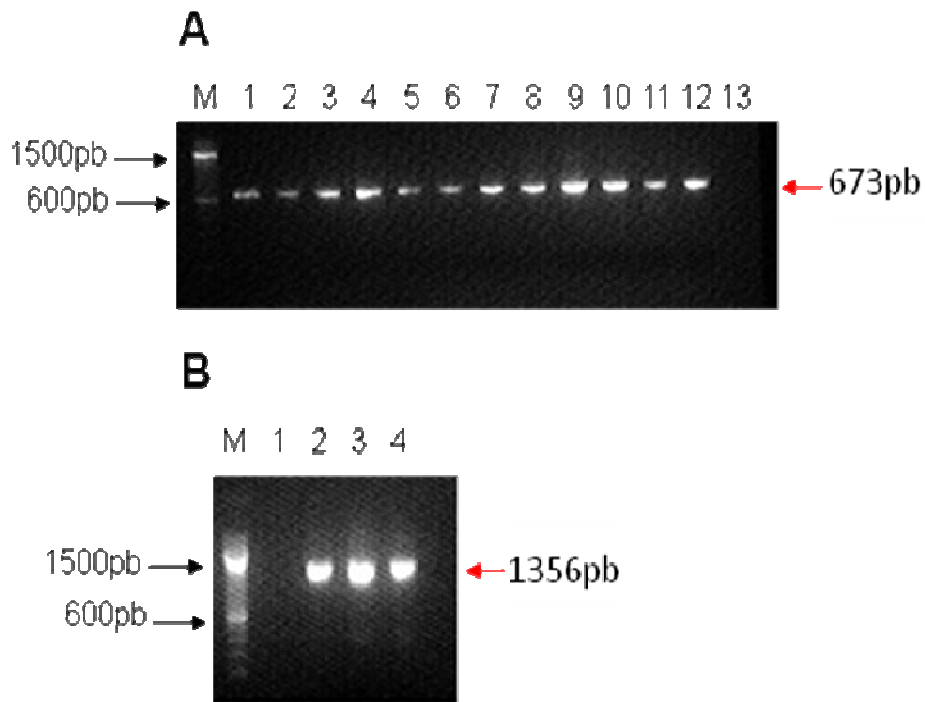


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos da RT-PCR para os genes que codificam as proteínas NSP4 (A) e VP6 (B) de rotavírus A. M: marcador de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen Corporation). **A:** Linhas 1 a 12: amostras positivas para NSP4, linha 13: controle negativo; **B:** Linha 1: controle negativo; linhas 2 a 4: amostras positivas para VP6.

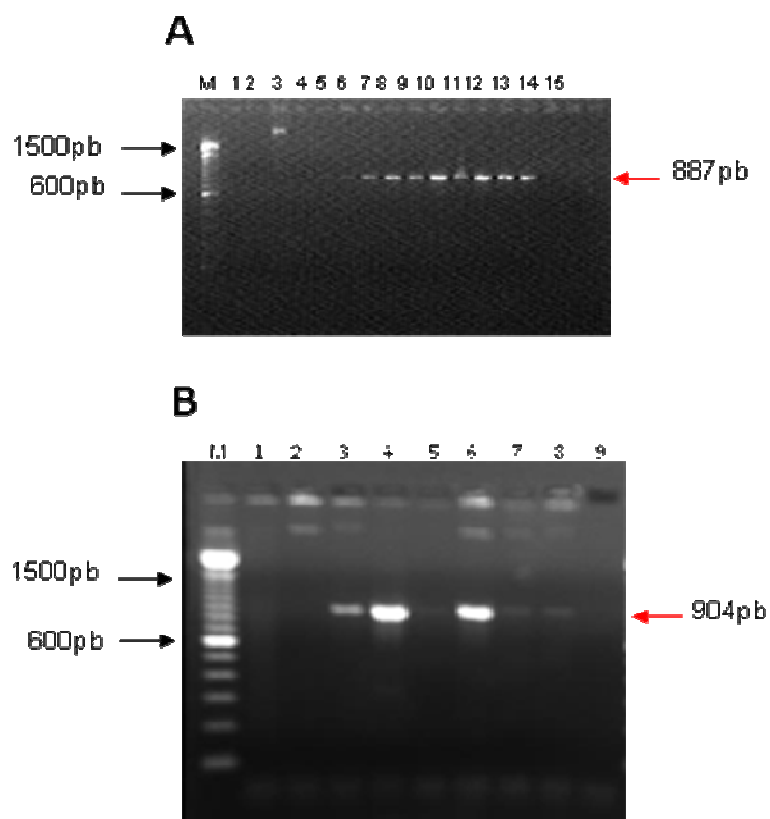


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos da RT-PCR para os genes que codificam as proteínas VP4 (A) e VP7 (B) de rotavírus A. M: marcador de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen Corporation). **A:** Linhas 1 a 4: amostras negativas para VP4; linhas 5 a 14: amostras positivas para VP4, linha 15: controle negativo. **B:** Linhas 1-2, 3 a 8: amostras positivas para VP7; linha 2: amostra negativa para VP7; linha 9: controle negativo.

5.2 Genotipagem dos Rotavírus A brasileiros

De acordo com a classificação proposta por Matthijnssens e cols. (2008b), as amostras brasileiras foram caracterizadas como pertencentes ao genótipo G2 para VP7 (n=62), P[4] para VP4 (n=58), I 2 para VP6 (n=62) e E 2 para NSP4 (n=71).

5.3 Análise Filogenética

Foram obtidas árvores filogenéticas com base na seqüências nucleotídicas para os quatro genes: VP7, VP4, VP6 e NSP4. Estudos comparativos foram analisados com seqüências de protótipos disponíveis no *GenBank*. Para a análise dos genes VP7 e VP4 foram incluídas amostras genótipo G2P[4] detectadas em diferentes regiões do mundo. Foi observada a mesma topologia e valores de suporte estatístico similar (*bootstrap*), nas árvores filogenéticas construídas por diferentes métodos de inferência filogenética e modelos evolutivos de determinação de distância genética entre as seqüências nucleotídicas (dados não mostrados).

5.3.1 Análise do gene que codifica para a proteína VP7

A Figura 20 apresenta a análise filogenética baseada na seqüência nucleotídica completa da região codificante (978 pb) do gene que codifica para a proteína VP7 obtida a partir das amostras brasileiras isoladas neste estudo.

Nas Tabelas 4 e 5 estão descritas as identidades nucleotídica e de aa entre as amostras brasileiras e, entre as mesmas em relação aos protótipos. Em ambos os casos foram utilizadas amostras brasileiras representantes dos diferentes grupos monofiléticos descritos na árvore filogenética. Os valores obtidos revelaram que todas as amostras brasileiras isoladas neste estudo apresentaram maior identidade tanto nucleotídica quanto em aa, com as amostras protótipos TB-Chen e S2, com exceção da amostra 493_96RJ detectada no Rio de Janeiro em 1996.

Na análise filogenética, a amostra 493_96RJ isolada no Rio de Janeiro em 1996, indicada na árvore com a letra **A**, agrupou com uma amostra proveniente da China (T79China), próximo ao protótipo DS-1 (Figura 20).

As amostras do Acre, 11531_05AC e 11837_06AC, detectadas nos anos 2005 e 2006, respectivamente, formaram um grupo monofilético, denominado de *cluster Acre* na árvore filogenética (Figura 20). A identidade nucleotídica e de aa entre estas amostras foi de 100% (Tabela 4).

Amostras detectadas no Rio de Janeiro e Minas Gerais em 2008, e no Espírito Santo em 2009, formaram um grupo monofilético único denominados de *cluster Sudeste* (Figura 20). Estas amostras apresentaram 100% de identidade tanto em nível nucleotídico quanto de aa (Tabela 4).

As amostras isoladas no Maranhão nos anos 2008 e 2009 formaram outro grupo monofilético, *cluster* **Maranhão** (Figura 20). As mesmas apresentaram uma identidade nucleotídica e de aa de 100% entre elas (Tabela 4).

Amostras isoladas no Brasil no período de 2006 a 2008 nos estados da: Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Sergipe, agruparam formando um grupo monofilético denominado de *cluster* **C** (Figura 20).

A amostra 12842_06ES isolada no Espírito Santo (2006) indicada na árvore com as letras **ES** agrupou em um ramo separado das demais amostras brasileiras (Figura 20). Esta amostra apresentou maior identidade nucleotídica (98%) com amostras pertencentes ao *cluster* **C** e maior identidade de aa (99,3%) com as amostras do Maranhão (Tabela 4).

O alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras brasileiras analisadas neste estudo, representantes dos diferentes grupos monofiléticos descritos na árvore filogenética, com amostras protótipos G2P[4] permitiu evidenciar a ocorrência de várias substituições de aa (em diferentes posições da proteína quando comparada com o protótipo DS-1) (Figura 21). Destas substituições, 8 (posições 87 A[→]T, 94 S[→]L, 96 D[→]N, 213 N[→]D e N[→]S, 220 S[→]L, 241 I[→]V e 242 N[→]S) situaram-se nos sítios antigênicos da proteína.

Em uma análise parcial do gene (790pb) foram estudadas amostras brasileiras analisadas e amostras pertencentes ao mesmo genótipo (G2P[4]) e representantes de diferentes regiões do mundo, disponíveis no *GenBank* (Figura 22). Nesta análise foram incluídas duas amostras isoladas no Rio de Janeiro em 2002 (5619_02RJ; DQ857954 e 5323_02RJ; DQ857953) previamente caracterizadas (Araújo *et al.* 2007). Estas amostras agruparam junto com a amostra 493_96RJ detectada no Rio de Janeiro em 1996 e duas amostras provenientes da Itália que circularam em 1996 (H93-96 e H105-96) (Figura 22).

As amostras no *cluster* **B** agruparam junto com amostras circulantes no Japão, Rússia, China e Vietnã no período entre 2001 e 2003. As amostras do *cluster* **Acre**, formaram um grupo monofilético com amostras isoladas em Montevidéu, Uruguai, em 1997. Amostras no *cluster* **Sudeste** apresentaram uma relação genética próxima com uma amostra detectada na Rússia em 2007. A amostra 12842_06ES isolada no Espírito Santo em 2006 agrupou junto com outra amostra isolada na Rússia em 2007 e com amostras detectadas na Índia em 2005. As amostras no *cluster* **C** e **Maranhão** apresentaram uma relação genética próxima com amostras circulantes em Bangladesh no período de 2004 e 2006 (Figura 22).

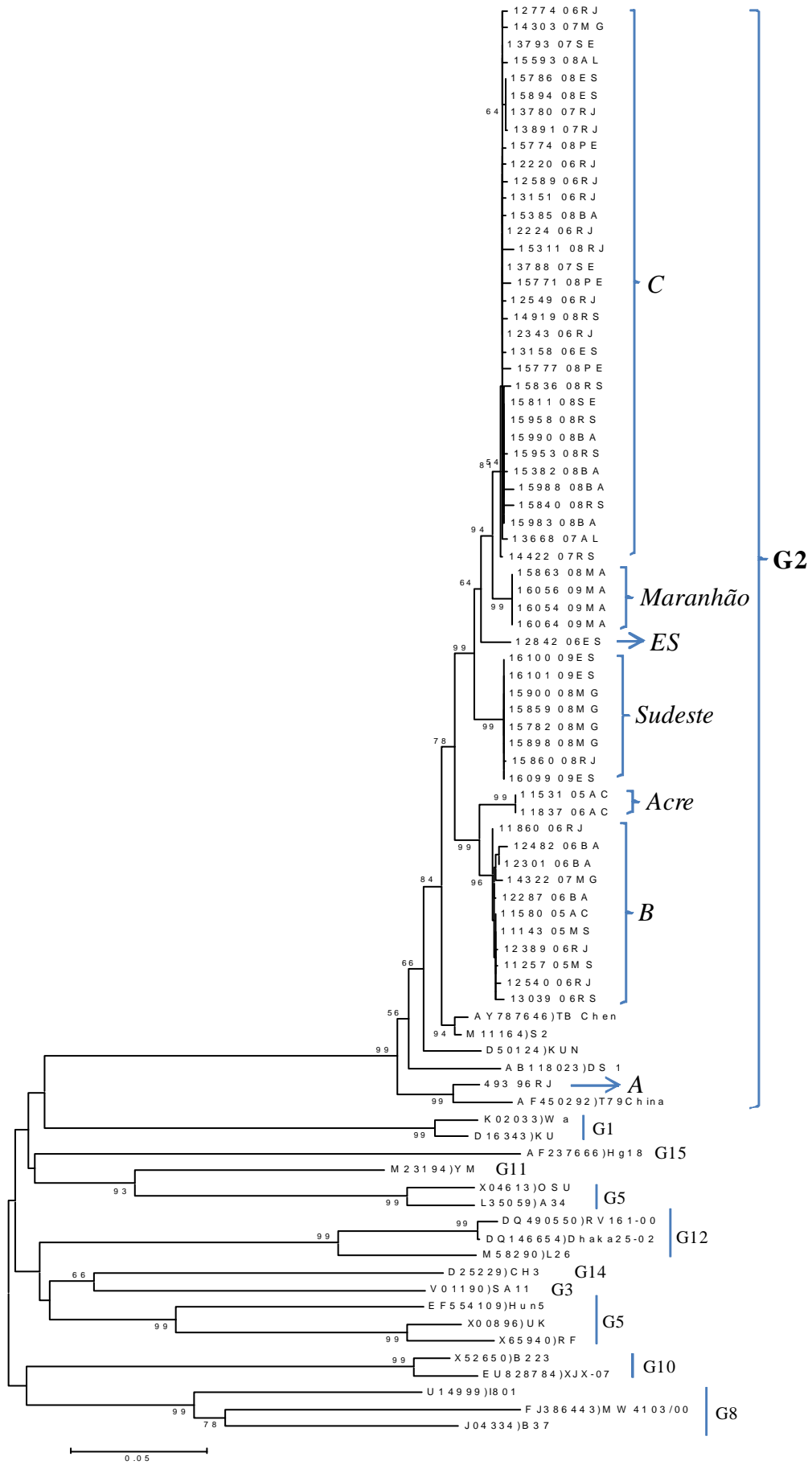


Figura 20. Análise filogenética baseada na seqüência completa (978pb) nucleotídica da região codificante do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras de rotavírus A brasileiras e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (1.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 50% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Tabela 4. Identidade nucleotídica^a e de aminoácidos, baseada na seqüência codificante completa do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras brasileiras representantes dos diferentes *clusters* observados.

VP7	493_96RJ	15836_08RS	15953_08RS	15983_08BA	12220_06RJ	13793_07SE	15385_08BA	13780_07RJ	13891_07RJ	15786_08ES	15894_08ES	12842_06ES	14157_07RS	15863_08MA	16054_09MA	16056_09MA	16064_09MA	15782_08MG	15900_08MG	16099_09ES	11143_05MS	12389_06RJ	12482_06BA	12287_06BA	12301_06BA	11531_05AC	11837_06AC
493_96RJ		0,933	0,934	0,935	0,935	0,936	0,935	0,935	0,934	0,935	0,935	0,930	0,932	0,929	0,929	0,929	0,929	0,934	0,934	0,934	0,938	0,938	0,934	0,936	0,937	0,931	0,931
15836_08RS	0,947		0,996	0,997	0,995	0,996	0,995	0,995	0,994	0,995	0,995	0,980	0,980	0,985	0,985	0,985	0,985	0,978	0,978	0,978	0,968	0,967	0,964	0,968	0,967	0,961	0,961
15953_08RS	0,944	0,996		0,998	0,996	0,997	0,996	0,996	0,995	0,996	0,996	0,979	0,979	0,986	0,986	0,986	0,986	0,977	0,977	0,977	0,967	0,966	0,963	0,967	0,966	0,960	0,960
15983_08BA	0,947	1,000	0,996		0,997	0,998	0,997	0,997	0,996	0,997	0,997	0,980	0,980	0,987	0,987	0,987	0,987	0,978	0,978	0,978	0,968	0,967	0,964	0,968	0,967	0,961	0,961
12220_06RJ	0,947	0,993	0,990	0,993		0,998	0,997	0,997	0,996	0,997	0,997	0,980	0,980	0,987	0,987	0,987	0,987	0,978	0,978	0,978	0,968	0,967	0,964	0,968	0,967	0,961	0,961
13793_07SE	0,950	0,996	0,993	0,996	0,996		0,998	0,998	0,997	0,998	0,998	0,981	0,981	0,988	0,988	0,988	0,988	0,979	0,979	0,979	0,969	0,968	0,965	0,969	0,968	0,962	0,962
15385_08BA	0,947	0,993	0,990	0,993	0,993	0,996		0,997	0,996	0,997	0,997	0,980	0,980	0,987	0,987	0,987	0,987	0,978	0,978	0,978	0,968	0,967	0,964	0,968	0,967	0,961	0,961
13780_07RJ	0,947	0,993	0,990	0,993	0,993	0,996	0,993		0,998	1,000	1,000	0,980	0,980	0,987	0,987	0,987	0,987	0,978	0,978	0,978	0,968	0,967	0,964	0,968	0,967	0,961	0,961
13891_07RJ	0,944	0,990	0,987	0,990	0,990	0,993	0,990	0,996		0,998	0,998	0,979	0,979	0,986	0,986	0,986	0,986	0,977	0,977	0,977	0,967	0,966	0,963	0,967	0,966	0,960	0,960
15786_08ES	0,947	0,993	0,990	0,993	0,993	0,996	0,993	1,000	0,996		1,000	0,980	0,980	0,987	0,987	0,987	0,987	0,978	0,978	0,978	0,968	0,967	0,964	0,968	0,967	0,961	0,961
15894_08ES	0,947	0,993	0,990	0,993	0,993	0,996	0,993	1,000	0,996	1,000		0,980	0,980	0,987	0,987	0,987	0,987	0,978	0,978	0,978	0,968	0,967	0,964	0,968	0,967	0,961	0,961
12842_06ES	0,941	0,984	0,981	0,984	0,984	0,987	0,984	0,984	0,981	0,984	0,984		0,989	0,978	0,978	0,978	0,978	0,979	0,979	0,979	0,963	0,962	0,959	0,963	0,962	0,958	0,958
14157_07RS	0,938	0,984	0,981	0,984	0,984	0,987	0,984	0,984	0,981	0,984	0,984	0,987		0,978	0,978	0,978	0,978	0,979	0,979	0,979	0,964	0,963	0,960	0,964	0,963	0,959	0,959
15863_08MA	0,944	0,990	0,987	0,990	0,990	0,993	0,990	0,990	0,987	0,990	0,990	0,993	0,993		1,000	1,000	1,000	0,974	0,974	0,974	0,964	0,963	0,960	0,964	0,963	0,957	0,957
16054_09MA	0,944	0,990	0,987	0,990	0,990	0,993	0,990	0,990	0,987	0,990	0,990	0,993	0,993	1,000		1,000	1,000	0,974	0,974	0,974	0,964	0,963	0,960	0,964	0,963	0,957	0,957
16056_09MA	0,944	0,990	0,987	0,990	0,990	0,993	0,990	0,990	0,987	0,990	0,990	0,993	0,993	1,000	1,000		1,000	0,974	0,974	0,974	0,964	0,963	0,960	0,964	0,963	0,957	0,957
16064_09MA	0,944	0,990	0,987	0,990	0,990	0,993	0,990	0,990	0,987	0,990	0,990	0,993	0,993	1,000	1,000	1,000		0,974	0,974	0,974	0,964	0,963	0,960	0,964	0,963	0,957	0,957
15782_08MG	0,953	0,987	0,984	0,987	0,987	0,990	0,987	0,987	0,984	0,987	0,987	0,984	0,984	0,990	0,990	0,990	0,990		1,000	1,000	0,967	0,966	0,963	0,967	0,966	0,962	0,962
15900_08MG	0,953	0,987	0,984	0,987	0,987	0,990	0,987	0,987	0,984	0,987	0,987	0,984	0,984	0,990	0,990	0,990	0,990	1,000		1,000	0,967	0,966	0,963	0,967	0,966	0,962	0,962
16099_09ES	0,953	0,987	0,984	0,987	0,987	0,990	0,987	0,987	0,984	0,987	0,987	0,984	0,984	0,990	0,990	0,990	0,990	1,000	1,000		0,967	0,966	0,963	0,967	0,966	0,962	0,962
11143_05MS	0,947	0,981	0,978	0,981	0,981	0,984	0,981	0,981	0,978	0,981	0,981	0,978	0,978	0,984	0,984	0,984	0,984	0,987	0,987	0,987		0,998	0,995	0,997	0,998	0,982	0,982
12389_06RJ	0,944	0,978	0,975	0,978	0,978	0,981	0,978	0,978	0,975	0,978	0,978	0,975	0,975	0,981	0,981	0,981	0,981	0,984	0,984	0,984	0,996		0,994	0,996	0,997	0,981	0,981
12482_06BA	0,941	0,972	0,969	0,972	0,972	0,975	0,972	0,972	0,969	0,972	0,972	0,969	0,969	0,975	0,975	0,975	0,975	0,978	0,978	0,978	0,990	0,987		0,995	0,996	0,978	0,978
12287_06BA	0,944	0,978	0,975	0,978	0,978	0,981	0,978	0,978	0,975	0,978	0,978	0,975	0,975	0,981	0,981	0,981	0,981	0,984	0,984	0,984	0,996	0,993	0,993		0,998	0,982	0,982
12301_06BA	0,944	0,978	0,975	0,978	0,978	0,981	0,978	0,978	0,975	0,978	0,978	0,975	0,975	0,981	0,981	0,981	0,981	0,984	0,984	0,984	0,996	0,993	0,993	1,000		0,981	0,981
11531_05AC	0,950	0,975	0,972	0,975	0,975	0,978	0,975	0,975	0,972	0,975	0,975	0,975	0,972	0,978	0,978	0,978	0,978	0,981	0,981	0,981	0,987	0,984	0,978	0,984	0,984		1,000
11837_06AC	0,950	0,975	0,972	0,975	0,975	0,978	0,975	0,975	0,972	0,975	0,975	0,975	0,972	0,978	0,978	0,978	0,978	0,981	0,981	0,981	0,987	0,984	0,978	0,984	0,984	0,984	1,000

^a A percentagem de identidade nucleotídica e de aa estão indicadas acima e debaixo da diagonal, respectivamente.

Tabela 5. Identidade nucleotídica e de aminoácidos, baseada na sequência codificante completa do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras brasileiras representantes dos diferentes *clusters* observados e amostras protótipos de rotavírus A humano.

VP7	DS_1		TB_Chen		KUN		S2		T79China	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
493_96RJ	0,935	0,950	0,945	0,957	0,943	0,953	0,943	0,953	0,969	0,975
15836_08RS	0,934	0,953	0,968	0,978	0,951	0,957	0,971	0,975	0,923	0,932
15953_08RS	0,933	0,950	0,967	0,975	0,950	0,953	0,970	0,972	0,922	0,929
15983_08BA	0,934	0,953	0,968	0,978	0,951	0,957	0,971	0,975	0,923	0,932
12220_06RJ	0,934	0,953	0,968	0,978	0,951	0,957	0,971	0,975	0,923	0,932
13793_07SE	0,935	0,957	0,969	0,981	0,952	0,960	0,972	0,978	0,924	0,935
15385_08BA	0,934	0,953	0,968	0,978	0,951	0,957	0,971	0,975	0,923	0,932
13780_07RJ	0,934	0,953	0,968	0,978	0,951	0,957	0,971	0,975	0,923	0,932
13891_07RJ	0,933	0,950	0,967	0,975	0,950	0,953	0,970	0,972	0,922	0,929
15786_08ES	0,934	0,953	0,968	0,978	0,951	0,957	0,971	0,975	0,923	0,932
15894_08ES	0,934	0,953	0,968	0,978	0,951	0,957	0,971	0,975	0,923	0,932
12842_06ES	0,930	0,953	0,965	0,978	0,948	0,957	0,966	0,975	0,918	0,929
14157_07RS	0,930	0,950	0,965	0,975	0,948	0,953	0,966	0,972	0,920	0,926
15863_08MA	0,928	0,957	0,964	0,981	0,944	0,960	0,967	0,978	0,915	0,932
16054_09MA	0,928	0,957	0,964	0,981	0,944	0,960	0,967	0,978	0,915	0,932
16056_09MA	0,928	0,957	0,964	0,981	0,944	0,960	0,967	0,978	0,915	0,932
16064_09MA	0,928	0,957	0,964	0,981	0,944	0,960	0,967	0,978	0,915	0,932
15782_08MG	0,938	0,966	0,969	0,984	0,954	0,969	0,970	0,981	0,926	0,938
15900_08MG	0,938	0,966	0,969	0,984	0,954	0,969	0,970	0,981	0,926	0,938
16099_09ES	0,938	0,966	0,969	0,984	0,954	0,969	0,970	0,981	0,926	0,938
11143_05MS	0,938	0,953	0,973	0,984	0,954	0,963	0,974	0,981	0,927	0,932
12389_06RJ	0,938	0,950	0,972	0,981	0,953	0,960	0,973	0,978	0,927	0,929
12482_06BA	0,934	0,944	0,969	0,975	0,950	0,953	0,970	0,972	0,923	0,926
12287_06BA	0,938	0,950	0,973	0,981	0,954	0,960	0,974	0,978	0,926	0,929
12301_06BA	0,937	0,950	0,972	0,981	0,953	0,960	0,973	0,978	0,926	0,929
11531_05AC	0,931	0,960	0,964	0,984	0,946	0,969	0,967	0,981	0,923	0,935
11837_06AC	0,931	0,960	0,964	0,984	0,946	0,969	0,967	0,981	0,923	0,935

Números de acesso: DS_1, AB118023; TB_Chen, AY787646; KUN, D50124; S2, M11164; T79China, AF450292.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
AB118023)DS_1	MYGIEYTTILITLISIIILLNYILKTIITNTMDYIIIFRLLLIALLISPFVRTQNYGMYLPITGSLDAVYINTSTSGEPPLTSTLCLLYP	PAKNEISDDEWENT	SQFLFTKQWPIGSVYFKDYNDINTFSPVNPOLYCDYVNLVLMRYDNTSELDASELADLLINENWLCNPMDISLYYQSSSENKWI	SMGTDCTVKVCP	PLNT																
AY787646)TB_Chen																					
D50124)KUN	GN				P																H
M11164)S2																					
AF450292)T79China			Y	V	V		I		T	IS											
493_96RJ			Y	V	V		I		TL												
15836_08RS			M	K					S												
15953_08RS			M	K					S												
15983_08BA			M	K					S												
12220_06RJ			M	K					S												
13793_07SE			M	K					S												
15385_08BA			M	K				L	S												
13780_07RJ			M	K					S												
13891_07RJ			M	K					S												
15786_08ES			M	K				A	S												
15894_08ES			M	K					S												
12842_06ES			M	K					S												
15863_08MA			M	K					S	A											
16054_09MA			M	K					S	A											
16056_09MA			M	K					S	A											
16064_09MA			M	K					S	A											
15782_08MG			M	K					S	A											
15900_08MG			M	K					S	A											
16099_09ES			M	K					S	A											
11143_05MS		F	L	M					S												
12389_06RJ		F	L	M					S												
12482_06BA		F	L	T	M				S												
12287_06BA		F	L	M					S												
12301_06BA		F	L	M					S												
11531_05AC		F			K				S												
11837_06AC		F			K				S												

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320
AB118023)DS_1	QTLGIGC	TTDVNTPEIVASSEK	LVITDVVNGVNV	SKINISIN	CTIRNCKNLGPRENVAI	IQVGGPNALDITADPTTVPQVR	IMRINWKKWQV	FYFTVVVDYINQV	IQVMSKRSLDAAAF	PYRI		
AY787646)TB_Chen		D			S			V		I		T
D50124)KUN					MS					I		T
M11164)S2		D			S			V		I		T
AF450292)T79China		S			MS			I		IV		V
493_96RJ		S			VS			I		IV		
15836_08RS		D						I	V		V	I
15953_08RS		D						I	V		V	I
12220_06RJ		D						I	V			
13793_07SE		D						I	V			
15385_08BA		D						I	V			
13780_07RJ		D	L					I	V			
13891_07RJ		D	L					I	V			
15786_08ES		D	L					I	V			
15894_08ES		D	L					I	V			
12842_06ES		D	L					I	V			
15863_08MA		D						I	V			
16054_09MA		D						I	V			
16056_09MA		D						I	V			
16064_09MA		D						I	V			
15782_08MG		D						I	V			
15900_08MG		D						I	V			
16099_09ES		D						I	V			
11143_05MS		D						I	V			
12389_06RJ		D						H	V			
12482_06BA		D				S	M		V			
12287_06BA		D				S			V			
12301_06BA		D				S			V			
11531_05AC		D				S			V			
11837_06AC		D				S			V			

Figura 21. Alinhamento das seqüência completas (326 aa) de aminoácidos da proteína VP7 das amostras brasileiras representantes dos diferentes *clusters* observados na árvore filogenética e amostras protótipos. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com a amostra protótipo DS-1. Os retângulos indicam as regiões antigênicas A, C e F, nessa ordem.

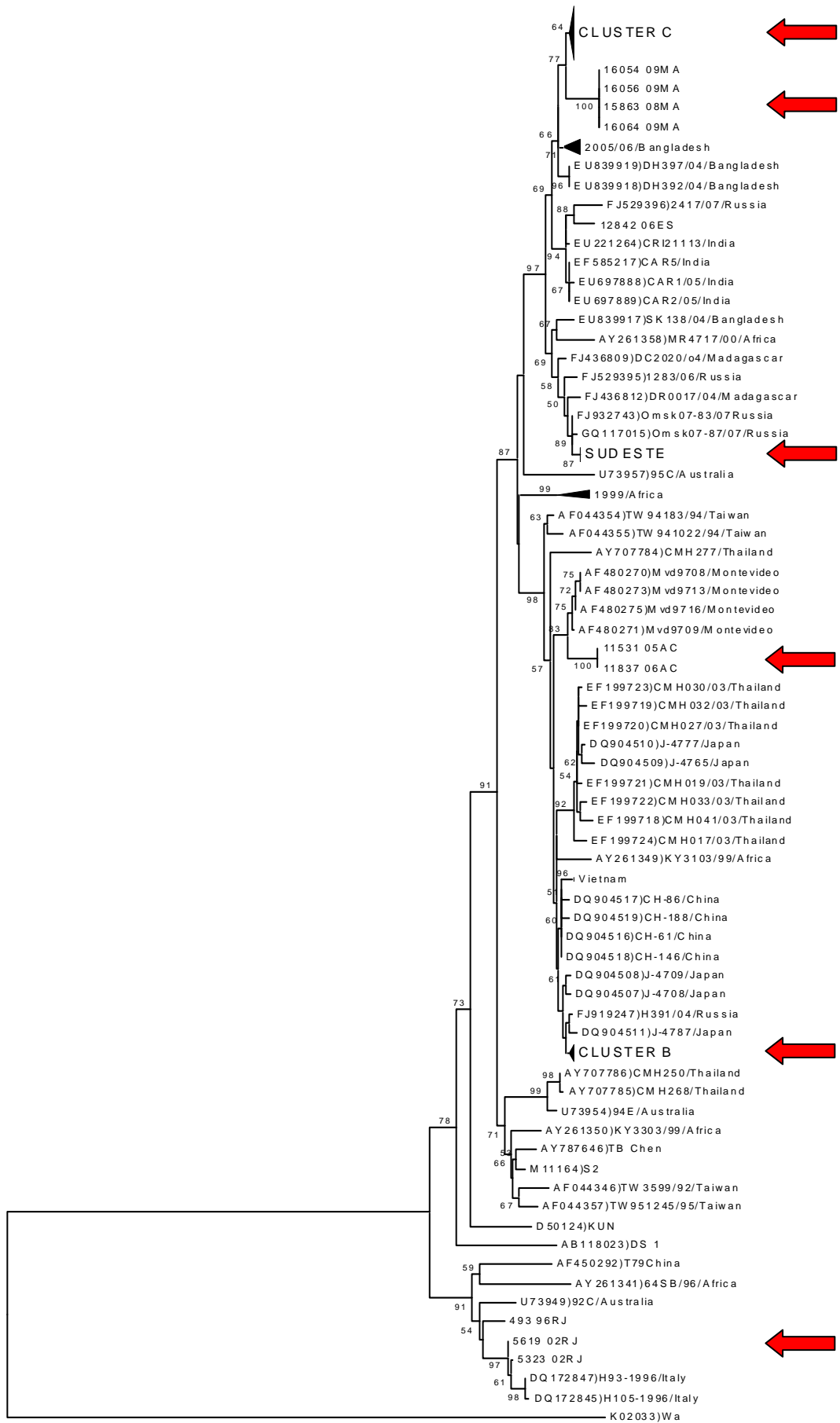


Figura 22. Análise filogenética baseada na seqüência parcial (790 pb) nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP7 das amostras brasileiras, amostras pertencentes ao genótipo G2P[4] de diferentes regiões do mundo e amostras protótipos. Os valores de *Bootstrap* (1.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 50% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

5.3.2 Análise do gene que codifica para a proteína VP4

A Figura 23 corresponde à análise filogenética obtida a partir da seqüência nucleotídica parcial do gene que codifica para a proteína VP4 (816 pb), compreendendo 96% da seqüência nucleotídica que corresponde a proteína VP8* (aa 8 - 247).

As amostras isoladas durante os anos 1996 e 1997 agruparam separadamente com relação às demais amostras brasileiras, *cluster A*, porém junto com amostras que circularam na Itália no mesmo período 1996 (H93-96) e 1997 (I200-97).

As amostras 12840_06ES e 12842_06ES, isoladas no Espírito Santo em 2006 agruparam num *cluster* independente apresentando um percentual de identidade nucleotídica de 99,7% entre elas (*cluster ES*) (Tabela 6).

Amostras isoladas no Sudeste do Brasil no período 2008 e 2009 agruparam formando um *cluster* denominado de **Sudeste**. As demais amostras brasileiras isoladas no período de 2006 a 2009 formaram um *cluster* único (*cluster P*) na árvore filogenética (Figura 23).

Todas as amostras brasileiras detectadas no período de 2005 a 2009 apresentaram maior valor de identidade nucleotídica e de aa com a amostra protótipo NR1 (Tabela 7).

A Figura 24 corresponde ao alinhamento da seqüência de aa parcial da proteína VP4 de amostras brasileiras representantes dos diferentes *clusters* descritos, com amostras protótipo G2P[4].

Na análise parcial de aa de VP4 (272 aa), que compreende a seqüência parcial da VP8* (aa 8 a 247), foi identificada a presença de várias substituições de aa, em diferentes posições da proteína das amostras brasileiras deste estudo (Figura 24). Destas, quatro (posições 35^{V→I}; 55^{I→V}; 64^{V→I} e 120^{I→V}) estão localizadas nos sítios antigênicos da proteína VP8* (Figura 24).

A análise filogenética das amostras brasileiras isoladas e de amostras pertencentes ao mesmo genótipo (G2P[4]) disponíveis no *GenBank* demonstraram que as amostras do *cluster A* agruparam junto com amostras isoladas na Itália nos anos 1996 e 1997 (Figura 25).

As amostras dos *cluster Sudeste* e *ES* apresentaram uma relação genética próxima com as amostras isoladas na Rússia em anos anteriores (2004 – 2007) (Figura 25).

As amostras no *cluster P* apresentaram uma relação filogenética próxima com uma amostra isolada na Coreia do Sul no período de 2000 a 2001, amostras isoladas no Paraguai em 2005 e amostras detectadas na Rússia nos anos 2004 e 2005 (Figura 25).

A indisponibilidade de seqüências no *GenBank* não permitiu que as mesmas amostras fossem utilizadas tanto para VP7 quanto para VP4.

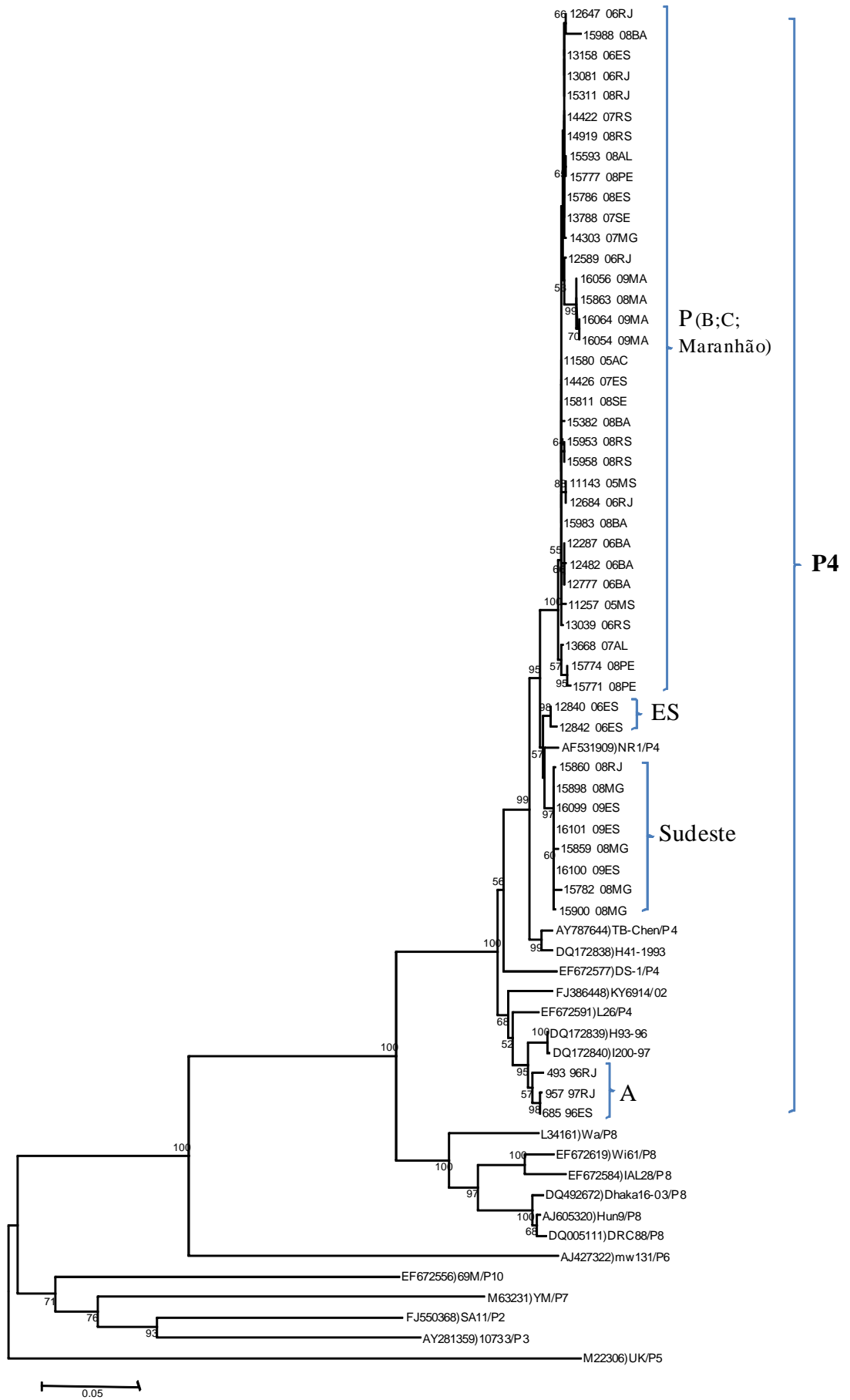


Figura 23. Análise filogenética baseada na sequência parcial (816pb) nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras de rotavírus A brasileiras e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (1.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 50% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Tabela 6. Identidade^a nucleotídica e de aminoácidos, baseada na seqüência parcial do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras brasileiras representantes dos diferentes *clusters* observados.

VP4	493_96RJ	685_96ES	957_97RJ	12647_06RJ	15988_08BA	12840_06ES	12842_06ES	16100_09ES	16101_09ES	15860_08RJ	15774_08PE	15771_08PE	13668_07AL	15953_08RS	15958_08RS	15863_08MA	16056_09MA	16054_09MA	16064_09MA	12589_06RJ	12684_06RJ	11143_05MS	12287_06BA	12777_06BA	15382_08BA	
493_96RJ		0,990	0,988	0,947	0,946	0,949	0,949	0,948	0,948	0,947	0,943	0,942	0,946	0,946	0,946	0,942	0,942	0,941	0,941	0,944	0,946	0,946	0,946	0,946	0,946	0,946
685_96ES	0,985		0,998	0,949	0,948	0,952	0,952	0,951	0,951	0,949	0,946	0,944	0,948	0,948	0,948	0,944	0,944	0,943	0,943	0,947	0,948	0,948	0,948	0,948	0,948	0,948
957_97RJ	0,985	1,000		0,948	0,947	0,951	0,951	0,949	0,949	0,948	0,944	0,943	0,947	0,947	0,947	0,943	0,943	0,942	0,942	0,946	0,947	0,947	0,947	0,947	0,947	0,947
12647_06RJ	0,974	0,981	0,981		0,992	0,980	0,977	0,979	0,979	0,977	0,991	0,990	0,993	0,996	0,996	0,990	0,990	0,988	0,988	0,997	0,995	0,995	0,996	0,996	0,996	0,996
15988_08BA	0,974	0,981	0,981	1,000		0,973	0,970	0,971	0,971	0,970	0,984	0,982	0,986	0,988	0,988	0,982	0,982	0,981	0,981	0,990	0,987	0,987	0,988	0,988	0,988	0,988
12840_06ES	0,970	0,977	0,977	0,996	0,996		0,997	0,991	0,991	0,990	0,979	0,977	0,981	0,981	0,981	0,975	0,975	0,974	0,974	0,980	0,980	0,980	0,981	0,981	0,981	0,981
12842_06ES	0,966	0,974	0,974	0,992	0,992	0,996		0,988	0,988	0,987	0,976	0,975	0,979	0,979	0,979	0,973	0,973	0,971	0,971	0,977	0,977	0,977	0,979	0,979	0,979	0,979
16100_09ES	0,966	0,977	0,977	0,992	0,992	0,996	0,992		1,000	0,998	0,977	0,976	0,980	0,980	0,980	0,974	0,974	0,973	0,973	0,979	0,979	0,979	0,980	0,980	0,980	0,980
16101_09ES	0,966	0,977	0,977	0,992	0,992	0,996	0,992	1,000		0,998	0,977	0,976	0,980	0,980	0,980	0,974	0,974	0,973	0,973	0,979	0,979	0,979	0,980	0,980	0,980	0,980
15860_08RJ	0,966	0,977	0,977	0,992	0,992	0,996	0,992	1,000	1,000		0,979	0,977	0,979	0,979	0,979	0,973	0,973	0,971	0,971	0,977	0,977	0,977	0,979	0,979	0,979	0,979
15774_08PE	0,970	0,977	0,977	0,996	0,996	0,992	0,988	0,988	0,988	0,988		0,998	0,995	0,992	0,992	0,986	0,986	0,985	0,985	0,991	0,991	0,991	0,992	0,992	0,992	0,992
15771_08PE	0,966	0,974	0,974	0,992	0,992	0,988	0,985	0,985	0,985	0,985	0,996		0,993	0,991	0,991	0,985	0,985	0,984	0,984	0,990	0,990	0,990	0,991	0,991	0,991	0,991
13668_07AL	0,970	0,977	0,977	0,996	0,996	0,992	0,988	0,988	0,988	0,988	1,000	0,996		0,995	0,995	0,988	0,988	0,987	0,987	0,993	0,993	0,993	0,995	0,995	0,995	0,995
15953_08RS	0,970	0,977	0,977	0,996	0,996	0,992	0,988	0,988	0,988	0,988	0,992	0,988	0,992		1,000	0,991	0,991	0,990	0,990	0,996	0,996	0,996	0,997	0,997	0,997	0,997
15958_08RS	0,970	0,977	0,977	0,996	0,996	0,992	0,988	0,988	0,988	0,988	0,992	0,988	0,992	1,000		0,991	0,991	0,990	0,990	0,996	0,996	0,996	0,997	0,997	0,997	0,997
15863_08MA	0,966	0,974	0,974	0,992	0,992	0,988	0,985	0,985	0,985	0,985	0,988	0,985	0,988	0,988	0,988		1,000	0,998	0,998	0,992	0,990	0,990	0,991	0,991	0,991	0,991
16056_09MA	0,966	0,974	0,974	0,992	0,992	0,988	0,985	0,985	0,985	0,985	0,988	0,985	0,988	0,988	0,988	1,000		0,998	0,998	0,992	0,990	0,990	0,991	0,991	0,991	0,991
16054_09MA	0,963	0,970	0,970	0,988	0,988	0,985	0,981	0,981	0,981	0,981	0,985	0,981	0,985	0,985	0,985	0,996	0,996		1,000	0,991	0,988	0,988	0,990	0,990	0,990	0,990
16064_09MA	0,963	0,970	0,970	0,988	0,988	0,985	0,981	0,981	0,981	0,981	0,985	0,981	0,985	0,985	0,985	0,996	0,996	1,000		0,991	0,988	0,988	0,990	0,990	0,990	0,990
12589_06RJ	0,974	0,981	0,981	1,000	1,000	0,996	0,992	0,992	0,992	0,992	0,996	0,992	0,996	0,996	0,996	0,992	0,992	0,988	0,988		0,995	0,995	0,996	0,996	0,996	0,996
12684_06RJ	0,970	0,977	0,977	0,992	0,992	0,988	0,985	0,985	0,985	0,985	0,988	0,985	0,988	0,988	0,988	0,985	0,985	0,981	0,981	0,992		1,000	0,996	0,996	0,996	0,996
11143_05MS	0,970	0,977	0,977	0,992	0,992	0,988	0,985	0,985	0,985	0,985	0,988	0,985	0,988	0,988	0,988	0,985	0,985	0,981	0,981	0,992	1,000		0,996	0,996	0,996	0,996
12287_06BA	0,974	0,981	0,981	1,000	1,000	0,996	0,992	0,992	0,992	0,992	0,996	0,992	0,996	0,996	0,996	0,992	0,992	0,988	0,988	1,000	0,992	0,992		1,000	0,997	0,997
12777_06BA	0,974	0,981	0,981	1,000	1,000	0,996	0,992	0,992	0,992	0,992	0,996	0,992	0,996	0,996	0,996	0,992	0,992	0,988	0,988	1,000	0,992	0,992	1,000		0,997	0,997
15382_08BA	0,974	0,981	0,981	1,000	1,000	0,996	0,992	0,992	0,992	0,992	0,996	0,992	0,996	0,996	0,996	0,992	0,992	0,988	0,988	1,000	0,992	0,992	1,000	1,000		0,997

^a A percentagem de identidade nucleotídica e de aa estão indicadas acima e debaixo da diagonal, respectivamente.

Tabela 7. Identidade nucleotídica (nt) e de aminoácidos (aa), baseada na sequência parcial do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras brasileiras representantes dos diferentes *clusters* e amostras protótipos de rotavírus A humano.

VP4	DS_1		TB_Chen		NR1		L26		H93-96		I200-97	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
493_96RJ	0,948	0,948	0,953	0,966	0,943	0,959	0,968	0,966	0,985	0,988	0,984	0,988
685_96ES	0,947	0,955	0,953	0,974	0,946	0,966	0,968	0,974	0,980	0,988	0,979	0,988
957_97RJ	0,946	0,955	0,952	0,974	0,944	0,966	0,969	0,974	0,981	0,988	0,980	0,988
12647_06RJ	0,943	0,966	0,969	0,977	0,976	0,985	0,947	0,977	0,942	0,977	0,941	0,977
15988_08BA	0,938	0,966	0,962	0,977	0,969	0,985	0,942	0,977	0,940	0,977	0,938	0,977
12840_06ES	0,953	0,970	0,974	0,981	0,986	0,988	0,954	0,974	0,947	0,974	0,946	0,974
12842_06ES	0,951	0,966	0,974	0,977	0,984	0,985	0,954	0,970	0,947	0,970	0,946	0,970
16100_09ES	0,952	0,966	0,975	0,977	0,987	0,985	0,951	0,970	0,951	0,970	0,949	0,970
16101_09ES	0,952	0,966	0,975	0,977	0,987	0,985	0,951	0,970	0,951	0,970	0,949	0,970
15860_08RJ	0,951	0,966	0,974	0,977	0,986	0,985	0,949	0,970	0,949	0,970	0,948	0,970
15774_08PE	0,944	0,963	0,970	0,981	0,975	0,981	0,948	0,974	0,941	0,974	0,940	0,974
15771_08PE	0,943	0,959	0,969	0,977	0,974	0,977	0,947	0,970	0,940	0,970	0,938	0,970
13668_07AL	0,944	0,963	0,973	0,981	0,977	0,981	0,948	0,974	0,943	0,974	0,942	0,974
15953_08RS	0,944	0,963	0,970	0,974	0,977	0,981	0,948	0,974	0,943	0,974	0,942	0,974
15958_08RS	0,944	0,963	0,970	0,974	0,977	0,981	0,948	0,974	0,943	0,974	0,942	0,974
15863_08MA	0,938	0,959	0,964	0,970	0,971	0,977	0,944	0,970	0,941	0,970	0,940	0,970
16056_09MA	0,938	0,959	0,964	0,970	0,971	0,977	0,944	0,970	0,941	0,970	0,940	0,970
16054_09MA	0,937	0,955	0,963	0,966	0,970	0,974	0,943	0,966	0,940	0,966	0,938	0,966
16064_09MA	0,937	0,955	0,963	0,966	0,970	0,974	0,943	0,966	0,940	0,966	0,938	0,966
12589_06RJ	0,943	0,966	0,969	0,977	0,976	0,985	0,947	0,977	0,942	0,977	0,941	0,977
12684_06RJ	0,943	0,959	0,969	0,970	0,976	0,977	0,947	0,970	0,943	0,974	0,942	0,974
11143_05MS	0,943	0,959	0,969	0,970	0,976	0,977	0,947	0,970	0,943	0,974	0,942	0,974
12287_06BA	0,944	0,966	0,970	0,977	0,977	0,985	0,948	0,977	0,943	0,977	0,942	0,977
12777_06BA	0,944	0,966	0,970	0,977	0,977	0,985	0,948	0,977	0,943	0,977	0,942	0,977
15382_08BA	0,944	0,966	0,970	0,977	0,977	0,985	0,948	0,977	0,943	0,977	0,942	0,977

Números de acesso: DS_1, EF672577; TB_Chen, AY787644; NR1, AF531909;

L26, EF672591; H93-96, DQ172839; I200-97, DQ172840.

Figura 24. Alinhamento das seqüências parciais (271 aa) de aminoácidos da proteína VP4 (VP8*) de amostras brasileiras representantes dos diferentes *clusters* e amostras protótipos. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com a amostra protótipo DS-1. Em vermelho se indicam os sítios antigênicos para a proteína VP8*. Os retângulos indicam os sítios antigênicos em que foram encontradas substituições de aminoácidos nas amostras brasileiras.

Figura 25. Análise filogenética baseada na seqüência parcial (655 pb) nucleotídica do gene que codifica a proteína VP4 (VP8*) das amostras brasileiras, amostras pertencentes ao genótipo G2P[4] de diferentes regiões do mundo e amostras protótipos. Os valores de *Bootstrap* (1.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 50% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

5.3.3 Análise do gene que codifica para a proteína VP6

A análise filogenética baseada na seqüência nucleotídica da região codificante completa do gene que codifica para a proteína VP6 está apresentada na Figura 26.

As amostras brasileiras agruparam formando dois *clusters*, denominados de **X1** e **X2** na árvore filogenética. No primeiro agruparam juntas amostras isoladas no período de 2005 a 2006 e 2008. No segundo, amostras isoladas no período de 2006 a 2009, incluindo os *clusters* Maranhão e Sudeste.

Na Tabela 8 se apresentam os valores de identidade nucleotídica e de aa entre as amostras brasileiras representantes dos *clusters* observados na árvore filogenética (Figura 26).

Todas as amostras brasileiras apresentaram maior identidade nucleotídica e de aa com as amostras protótipos NR1 (G2P[4]) e RV161-00 (G12P[6]) (Tabela 9).

A Figura 27 corresponde ao alinhamento das seqüências de aa completa da proteína VP6 de amostras brasileiras isoladas neste estudo, representantes dos diferentes *clusters* observados na árvore filogenética em comparação com protótipos de RV-A de origem humana e animal. As amostras que agruparam no *cluster* X1 apresentaram uma mudança de aminoácido na posição 97^{M→I}. Entretanto, as que agruparam no *cluster* C2 apresentaram uma mudança de aminoácido na posição 396^{V→I} (Figura 27).

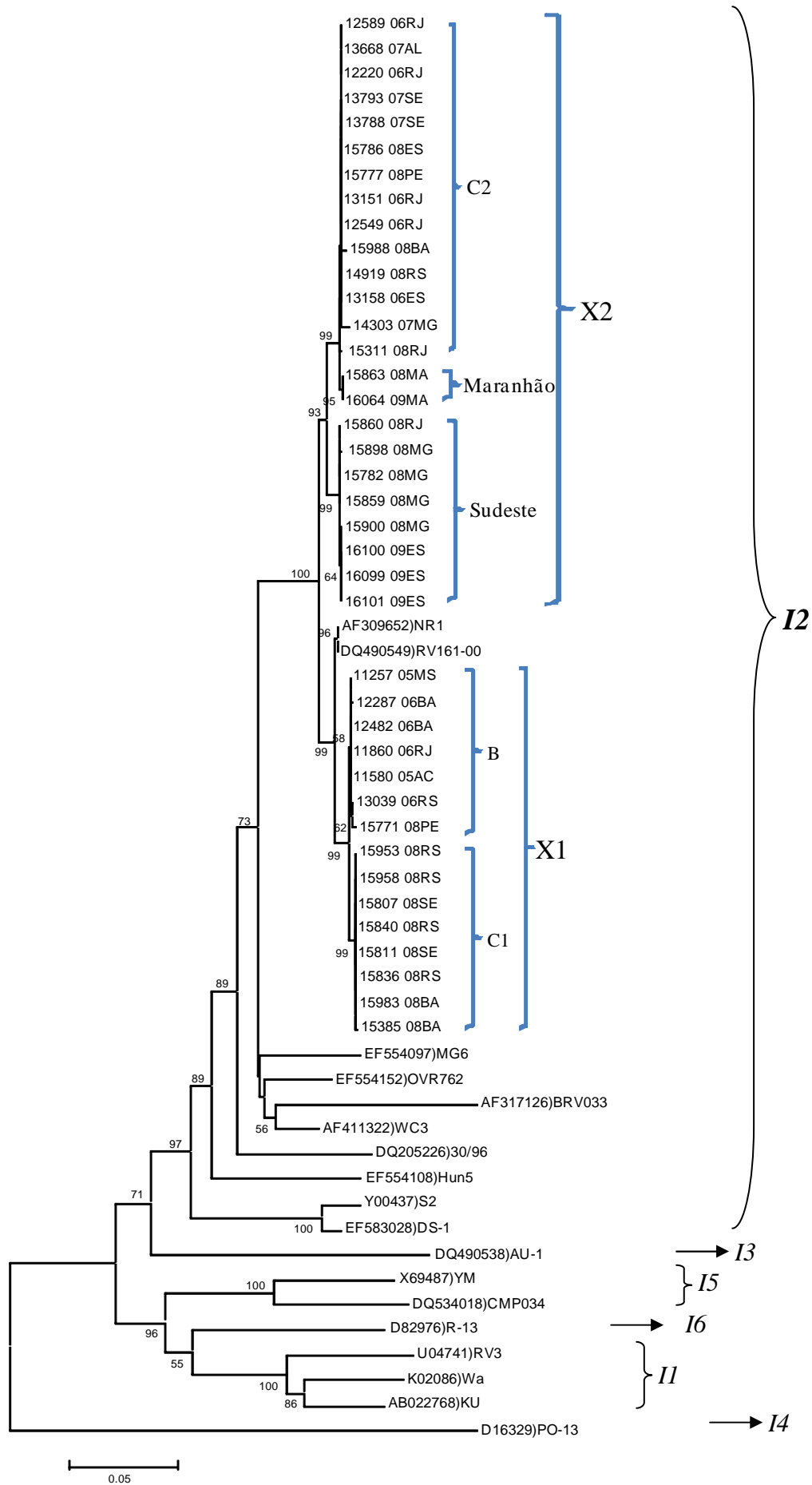


Figura 26. Análise filogenética baseada na seqüência completa (1191 pb) nucleotídica da região codificante do gene que codifica para a proteína VP6 das amostras brasileiras e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (1.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 50% não estão representados. A classificação proposta por Matthijnsens e cols. 2008b está apresentada em itálico. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Tabela 8. Identidade nucleotídica^a e de aminoácidos, baseada na sequência codificante completa do gene que codifica para a proteína VP6 de amostras brasileiras representantes dos diferentes *clusters* observados.

VP6	11257_05MS	11580_05AC	11860_06RJ	12220_06RJ	12287_06BA	12482_06BA	12589_06RJ	13039_06RS	13793_07SE	14919_08RS	15311_08RJ	15771_08PE	15786_08ES	15807_08SE	15860_08RJ	15900_08MG	15958_08RS	15385_08BA	15863_08MA	16064_09MA	16101_09ES
11257_05MS		1,000	1,000	0,974	0,998	1,000	0,974	0,998	0,974	0,974	0,973	0,996	0,974	0,994	0,976	0,977	0,994	0,993	0,974	0,974	0,977
11580_05AC	1,000		1,000	0,974	0,998	1,000	0,974	0,998	0,974	0,974	0,973	0,996	0,974	0,994	0,976	0,977	0,994	0,993	0,974	0,974	0,977
11860_06RJ	1,000	1,000		0,974	0,998	1,000	0,974	0,998	0,974	0,974	0,973	0,996	0,974	0,994	0,976	0,977	0,994	0,993	0,974	0,974	0,977
12220_06RJ	0,994	0,994	0,994		0,973	0,974	0,999	0,973	1,000	0,999	0,998	0,971	1,000	0,973	0,988	0,987	0,972	0,971	0,997	0,997	0,987
12287_06BA	1,000	1,000	1,000	0,994		0,998	0,972	0,996	0,973	0,972	0,971	0,994	0,973	0,993	0,974	0,975	0,992	0,991	0,972	0,972	0,975
12482_06BA	1,000	1,000	1,000	0,994	1,000		0,974	0,998	0,974	0,974	0,973	0,996	0,974	0,994	0,976	0,977	0,994	0,993	0,974	0,974	0,977
12589_06RJ	0,994	0,994	0,994	1,000	0,994	0,994		0,972	0,999	0,998	0,997	0,970	0,999	0,972	0,987	0,986	0,971	0,970	0,996	0,996	0,986
13039_06RS	0,997	0,997	0,997	0,992	0,997	0,997	0,992		0,973	0,972	0,971	0,996	0,973	0,994	0,974	0,975	0,994	0,993	0,972	0,972	0,975
13793_07SE	0,994	0,994	0,994	1,000	0,994	0,994	1,000	0,992		0,999	0,998	0,971	1,000	0,973	0,988	0,987	0,972	0,971	0,997	0,997	0,987
14919_08RS	0,994	0,994	0,994	1,000	0,994	0,994	1,000	0,992	1,000		0,997	0,970	0,999	0,972	0,987	0,986	0,971	0,970	0,996	0,996	0,986
15311_08RJ	0,994	0,994	0,994	1,000	0,994	0,994	1,000	0,992	1,000	1,000		0,969	0,998	0,971	0,988	0,987	0,970	0,969	0,995	0,995	0,987
15771_08PE	1,000	1,000	1,000	0,994	1,000	1,000	0,994	0,997	0,994	0,994	0,994		0,971	0,993	0,973	0,974	0,992	0,991	0,970	0,970	0,974
15786_08ES	0,994	0,994	0,994	1,000	0,994	0,994	1,000	0,992	1,000	1,000	1,000	0,994		0,973	0,988	0,987	0,972	0,971	0,997	0,997	0,987
15807_08SE	0,997	0,997	0,997	0,992	0,997	0,997	0,992	0,994	0,992	0,992	0,992	0,997	0,992		0,973	0,974	0,999	0,998	0,972	0,972	0,974
15860_08RJ	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994		0,999	0,972	0,971	0,987	0,987	0,999
15900_08MG	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	1,000		0,973	0,972	0,986	0,986	1,000
15958_08RS	0,997	0,997	0,997	0,992	0,997	0,997	0,992	0,994	0,992	0,992	0,992	0,997	0,992	1,000	0,994	0,994		0,997	0,971	0,971	0,973
15385_08BA	0,997	0,997	0,997	0,992	0,997	0,997	0,992	0,994	0,992	0,992	0,992	0,997	0,992	1,000	0,994	0,994	1,000		0,970	0,970	0,972
15863_08MA	0,994	0,994	0,994	1,000	0,994	0,994	1,000	0,992	1,000	1,000	1,000	0,994	1,000	0,992	0,997	0,997	0,992	0,992		1,000	0,986
16064_09MA	0,994	0,994	0,994	1,000	0,994	0,994	1,000	0,992	1,000	1,000	1,000	0,994	1,000	0,992	0,997	0,997	0,992	0,992	1,000		0,986
16101_09ES	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	1,000	1,000	0,994	0,994	0,997	0,997	

^a A percentagem de identidade nucleotídica e de aa estão indicadas acima e debaixo da diagonal, respectivamente.

Tabela 9. Identidade nucleotídica (nt) e de aminoácidos (aa) da seqüência completa da proteína VP6 de amostras brasileiras, representantes dos diferentes *clusters* e amostras protótipos de rotavírus A de origem humano e animal.

VP6	DS-1		NR1		RV161-00		MG6		BRV033		WC3		OVR762		S2	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
11257_05MS	0,869	0,984	0,991	0,994	0,992	0,997	0,920	0,994	0,872	0,964	0,936	0,992	0,927	0,987	0,863	0,982
11580_05AC	0,869	0,984	0,991	0,994	0,992	0,997	0,920	0,994	0,872	0,964	0,936	0,992	0,927	0,987	0,863	0,982
11860_06RJ	0,869	0,984	0,991	0,994	0,992	0,997	0,920	0,994	0,872	0,964	0,936	0,992	0,927	0,987	0,863	0,982
12220_06RJ	0,878	0,984	0,979	0,994	0,980	0,997	0,917	0,994	0,873	0,964	0,934	0,992	0,932	0,987	0,869	0,982
12287_06BA	0,867	0,984	0,989	0,994	0,990	0,997	0,918	0,994	0,872	0,964	0,936	0,992	0,926	0,987	0,863	0,982
12482_06BA	0,869	0,984	0,991	0,994	0,992	0,997	0,920	0,994	0,872	0,964	0,936	0,992	0,927	0,987	0,863	0,982
12589_06RJ	0,877	0,984	0,979	0,994	0,979	0,997	0,917	0,994	0,872	0,964	0,933	0,992	0,932	0,987	0,868	0,982
13039_06RS	0,867	0,982	0,989	0,992	0,990	0,994	0,918	0,992	0,871	0,962	0,934	0,989	0,926	0,984	0,861	0,979
13793_07SE	0,878	0,984	0,979	0,994	0,980	0,997	0,917	0,994	0,873	0,964	0,934	0,992	0,932	0,987	0,869	0,982
14919_08RS	0,877	0,984	0,979	0,994	0,979	0,997	0,918	0,994	0,874	0,964	0,935	0,992	0,933	0,987	0,868	0,982
15311_08RJ	0,880	0,984	0,978	0,994	0,979	0,997	0,919	0,994	0,873	0,964	0,936	0,992	0,931	0,987	0,871	0,982
15771_08PE	0,868	0,984	0,988	0,994	0,989	0,997	0,918	0,994	0,869	0,964	0,932	0,992	0,926	0,987	0,862	0,982
15786_08ES	0,878	0,984	0,979	0,994	0,980	0,997	0,917	0,994	0,873	0,964	0,934	0,992	0,932	0,987	0,869	0,982
15807_08SE	0,871	0,987	0,986	0,992	0,987	0,994	0,920	0,992	0,868	0,962	0,932	0,989	0,926	0,984	0,865	0,984
15860_08RJ	0,874	0,987	0,981	0,997	0,982	1,000	0,920	0,997	0,876	0,967	0,939	0,994	0,933	0,989	0,866	0,984
15900_08MG	0,875	0,987	0,982	0,997	0,983	1,000	0,919	0,997	0,876	0,967	0,938	0,994	0,932	0,989	0,867	0,984
15958_08RS	0,870	0,987	0,985	0,992	0,986	0,994	0,921	0,992	0,867	0,962	0,932	0,989	0,925	0,984	0,865	0,984
15385_08BA	0,869	0,987	0,984	0,992	0,985	0,994	0,918	0,992	0,867	0,962	0,931	0,989	0,924	0,984	0,863	0,984
16101_09ES	0,875	0,987	0,982	0,997	0,983	1,000	0,919	0,997	0,876	0,967	0,938	0,994	0,932	0,989	0,867	0,984
15863_08MA	0,879	0,984	0,979	0,994	0,979	0,997	0,918	0,994	0,874	0,964	0,935	0,992	0,933	0,987	0,870	0,982
16064_09MA	0,879	0,984	0,979	0,994	0,979	0,997	0,918	0,994	0,874	0,964	0,935	0,992	0,933	0,987	0,870	0,982

Números de acesso: DS_1, EF583028; NR1, AF309652; RV161-00, DQ490549; MG6, EF554097; BRV033(bovino), AF317126; WC3 (bovino), AF411322, OVR762(ovino), EF554152; S2, Y00437.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
DQ870507)DS-1	MDVLSLSKTLKDARDKIVEGTLYSNVSDLIQQFNQMIITMNGNEFQTGGIGNLPTRNNSPDPGLLGTLLNLDANYVETARNTIDYVDFVDNVCMDMWRBSQRNGIAPQSESLRKLKSGIKPKRINFDMNSSEYIENNLQRRQRTGTFTPHKPNIPFYSASPTLNRSQPAHDNLMGTWMLNAGSEIQVAGFDYSCAIN																				
AF309652)NR1																					
DQ490549)RV161-00																					
EP554097)MG6																					
AF317126)BRV033										A		DT	I								T
AF411322)WC3																					
EP554152)OVR762			G																		
Y00437)S2																					
11257_05MS																					
11580_05AC																					
11860_06RJ																					
12220_06RJ																					
12287_06BA																					
12482_06BA																					
12589_06RJ																					
13039_06RS																					
13793_07SE																					
14919_08RS																					
15311_08RJ																					
15771_08PE																					
15786_08ES																					
15807_08SE																					
15860_08RJ																					
15900_08MG																					
15958_08RS																					
15385_08BA																					
16101_09ES																					
15863_08MA																					
16064_09MA																					

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	
DQ870507)DS-1	APANIQQFEHIVQLRRVLTATITLLPDAERFSFPRVINSADGATTWYFNPVILRPNNVEVEFLNGQIINTYQARFGTIVARNFDTIRLSFQLMRPNMTPSVAALFPNAQPFPHATVGLTLRIESAVCESVLADASETMLANVTSVRQEYAIIPVGPVFPFGMNNWDLITNYSPSREDNLQRFVTVASIRSMLVK																			
AF309652)NR1																				
DQ490549)RV161-00																				
EP554097)MG6																				
AF317126)BRV033					A															
AF411322)WC3																				
EP554152)OVR762																				
Y00437)S2																				
11257_05MS																				
11580_05AC																				
11860_06RJ																				
12220_06RJ																				
12287_06BA																				
12482_06BA																				
12589_06RJ																				
13039_06RS																				
13793_07SE																				
14919_08RS																				
15311_08RJ																				
15771_08PE																				
15786_08ES																				
15807_08SE																				
15860_08RJ																				
15900_08MG																				
15958_08RS																				
15385_08BA																				
16101_09ES																				
15863_08MA																				
16064_09MA																				

Figura 27. Alinhamento das seqüências completas (397 aa) de aminoácidos da proteína VP6 das amostras brasileiras representantes dos diferentes *clusters* e amostras protótipos. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com o protótipo DS-1.

5.3.4 Análise do gene que codifica para a proteína NSP4

A Figura 28 corresponde à análise filogenética gerada a partir das seqüências nucleotídicas completas da região codificante do gene que codifica para a proteína NSP4. Todas as amostras brasileiras caracterizadas neste estudo agruparam no mesmo *cluster* que as amostras protótipos correspondentes ao genogrupo A-KUN.

A amostra isolada em 1996 no Rio de Janeiro mostrou-se distante das demais amostras circulantes no Brasil (Tabela 10), mostrando uma maior identidade com a amostra protótipo KUN, tanto em nível de nucleotídeos quanto de aa (Tabela 11). Nesta amostra foram encontradas 3 substituições de aa localizadas no domínio variável inter-espécie, nas posições 136^{V→M}, 139^{T→I} e 140^{D→G} (Figura 29). Esta região também corresponde ao sitio antigênico ASII.

As amostras que compõem o *cluster* Sudeste mostraram maior identidade com a amostra 10733 (G6P[3]) de origem bovina, isolada na Itália no ano 2001, apresentando uma identidade nucleotídica e de aa de aproximadamente 95 e 98,8%, respectivamente (Tabela 11).

As amostra 13158_06ES isolada no Espírito Santo no ano 2006, agrupou com uma amostra de origem bovina, XJX-07 (G10P[11]) detectada na China em julho de 2007. A identidade nucleotídica e de aa entre estas amostras em relação a XJX-07 foi de 92,8 e 97,7%, respectivamente (Tabela 11). Esta amostra brasileira apresentou uma mudança de aa na posição 141^{E→K} (Figura 29).

A amostra 12842_06ES detectada no Espírito Santo em 2006 agrupou com a amostra 12287_06BA que circulou na Bahia no ano 2006. A amostra 12842_06ES apresentou uma mudança de aa na posição 154^{R→K} (Figura 29). Esta mudança na posição 154 também foi observada nas amostras do *cluster* Sudeste e na amostra 13158_06ES. A amostra da Bahia (12287_06BA) mostrou mudanças de aa nas posições 55^{K→R}, 153^{V→I} e 174^{A→S} (Figura 29).

As demais amostras analisadas neste estudo agruparam junto com as amostras do Maranhão no *cluster* N. No alinhamento de aa pode-se observar que as amostras do Maranhão apresentaram uma mudança de aa no sitio antigênico ASIII, posição 129^{R→C} (Figura 29).

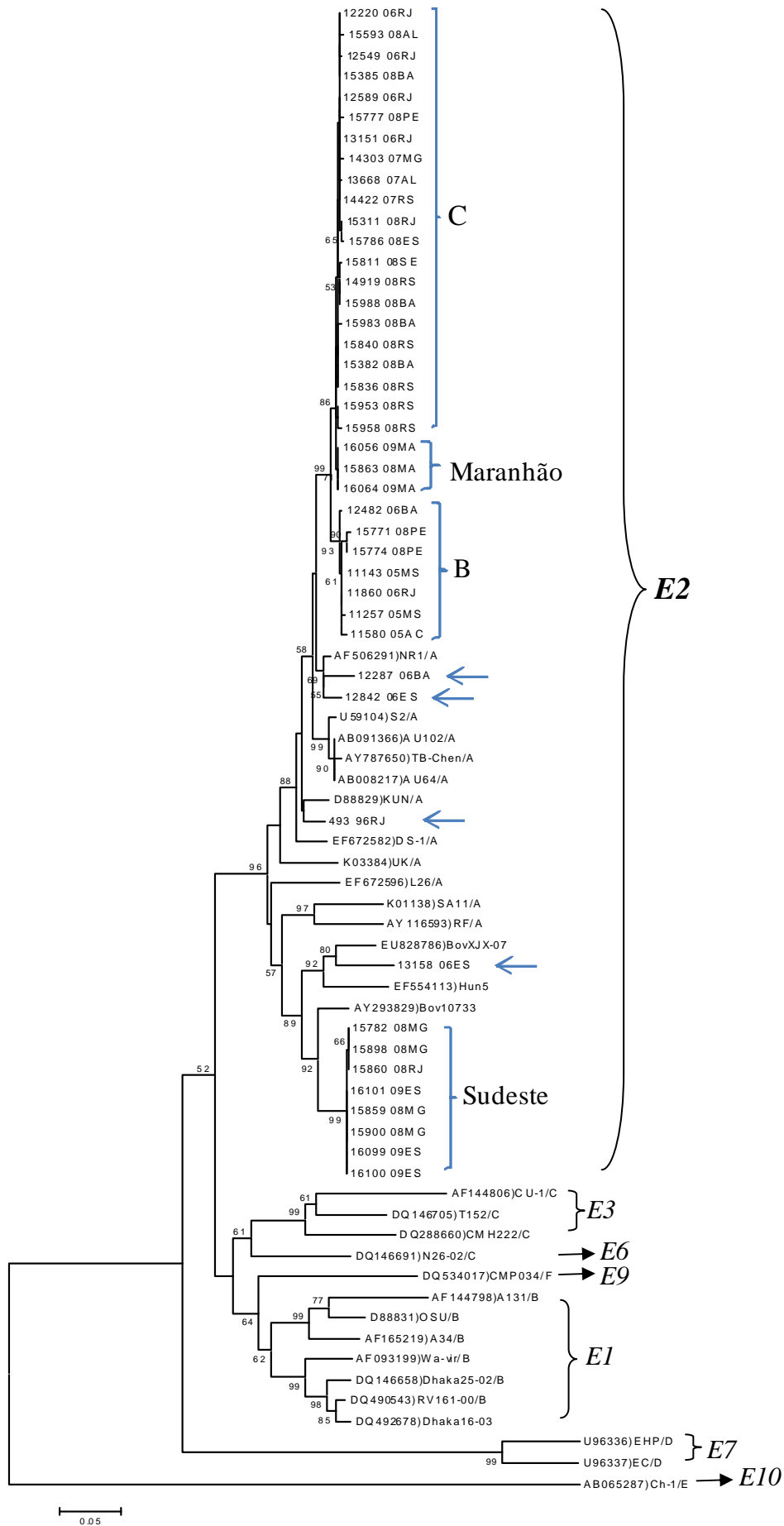


Figura 28. Análise filogenética baseada na seqüência completa (525pb) nucleotídica da região codificante do gene que codifica para a proteína NSP4 das amostras brasileiras e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (1.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 50% não estão representado. A classificação de acordo com Matthijnsens e cols. (2008b) está apresentada em itálico. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Tabela 10. Identidade nucleotídica^a e de aa do gene que codifica para a proteína NSP4 entre amostras brasileiras de rotavírus A representantes dos diferentes *clusters* observados.

NSP4	493_96RJ	1580_05AC	1143_05MS	12287_06BA	12842_06ES	1860_06RJ	13158_06ES	14422_07RS	15771_08PE	15811_08SE	15988_08BA	15863_08MA	16056_09MA	16064_09MA	15777_08PE	15860_08RJ	15900_08MG	16101_09ES
493_96RJ		0,950	0,954	0,950	0,948	0,954	0,857	0,954	0,946	0,950	0,952	0,954	0,954	0,954	0,950	0,907	0,909	0,909
1580_05AC	0,971		0,996	0,954	0,956	0,996	0,861	0,981	0,988	0,977	0,979	0,981	0,981	0,981	0,977	0,884	0,886	0,886
1143_05MS	0,971	1,000		0,954	0,960	1,000	0,861	0,984	0,992	0,981	0,982	0,984	0,984	0,984	0,981	0,888	0,890	0,890
12287_06BA	0,960	0,977	0,977		0,960	0,954	0,861	0,954	0,950	0,950	0,952	0,954	0,954	0,954	0,950	0,880	0,882	0,882
12842_06ES	0,965	0,982	0,982	0,971		0,960	0,867	0,964	0,952	0,960	0,962	0,964	0,964	0,964	0,964	0,893	0,895	0,895
1860_06RJ	0,971	1,000	1,000	0,977	0,982		0,861	0,984	0,992	0,981	0,982	0,984	0,984	0,984	0,981	0,888	0,890	0,890
13158_06ES	0,948	0,954	0,954	0,942	0,960	0,954		0,861	0,857	0,857	0,859	0,857	0,857	0,857	0,861	0,895	0,893	0,893
14422_07RS	0,971	0,988	0,988	0,977	0,982	0,988	0,954		0,977	0,996	0,998	0,996	0,996	0,996	0,996	0,888	0,890	0,890
15771_08PE	0,960	0,988	0,988	0,977	0,971	0,988	0,942	0,977		0,973	0,975	0,977	0,977	0,977	0,973	0,884	0,882	0,882
15811_08SE	0,965	0,982	0,982	0,971	0,977	0,982	0,948	0,994	0,971		0,998	0,992	0,992	0,992	0,992	0,884	0,886	0,886
15988_08BA	0,965	0,982	0,982	0,971	0,977	0,982	0,948	0,994	0,971	1,000		0,994	0,994	0,994	0,994	0,886	0,888	0,888
15863_08MA	0,965	0,982	0,982	0,971	0,977	0,982	0,948	0,994	0,971	0,988	0,988		1,000	1,000	0,992	0,888	0,890	0,890
16056_09MA	0,965	0,982	0,982	0,971	0,977	0,982	0,948	0,994	0,971	0,988	0,988	1,000		1,000	0,992	0,888	0,890	0,890
16064_09MA	0,965	0,982	0,982	0,971	0,977	0,982	0,948	0,994	0,971	0,988	0,988	1,000	1,000		0,992	0,888	0,890	0,890
15777_08PE	0,960	0,977	0,977	0,965	0,982	0,977	0,954	0,988	0,965	0,982	0,982	0,982	0,982	0,982		0,888	0,890	0,890
15860_08RJ	0,965	0,977	0,977	0,965	0,982	0,977	0,971	0,977	0,965	0,971	0,971	0,971	0,971	0,971	0,977		0,998	0,998
15900_08MG	0,965	0,977	0,977	0,965	0,982	0,977	0,971	0,977	0,965	0,971	0,971	0,971	0,971	0,971	0,977	1,000		1,000
16101_09ES	0,965	0,977	0,977	0,965	0,982	0,977	0,971	0,977	0,965	0,971	0,971	0,971	0,971	0,971	0,977	1,000	1,000	

^a A percentagem de identidade nucleotídica e de aa estão indicadas acima e debaixo da diagonal, respectivamente.

Tabela 11. Identidade nucleotídica (nt) e de aminoácidos (aa) entre a sequência codificante completa do gene que codifica para a proteína NSP4 de amostras brasileiras representantes dos diferentes *clusters* e amostras protótipos de rotavírus A humano e animal.

NSP4	DS-1/A		TB-Chen/A		NR1/A		KUN/A		S2/A		Bov10733		BovXJX-07	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
493_96RJ	0,954	0,960	0,948	0,965	0,958	0,971	0,964	0,977	0,948	0,971	0,901	0,960	0,867	0,937
11580_05AC	0,943	0,965	0,956	0,971	0,965	0,988	0,946	0,982	0,960	0,977	0,882	0,971	0,865	0,942
11143_05MS	0,943	0,965	0,956	0,971	0,969	0,988	0,950	0,982	0,960	0,977	0,886	0,971	0,869	0,942
12287_06BA	0,931	0,954	0,950	0,965	0,969	0,977	0,941	0,971	0,948	0,965	0,886	0,960	0,859	0,931
12842_06ES	0,941	0,960	0,954	0,965	0,979	0,982	0,945	0,977	0,958	0,971	0,893	0,977	0,871	0,948
11860_06RJ	0,943	0,965	0,956	0,971	0,969	0,988	0,950	0,982	0,960	0,977	0,886	0,971	0,869	0,942
13158_06ES	0,857	0,954	0,840	0,937	0,861	0,954	0,852	0,948	0,848	0,942	0,899	0,965	0,928	0,977
14422_07RS	0,943	0,965	0,960	0,971	0,973	0,988	0,950	0,982	0,964	0,977	0,886	0,971	0,869	0,942
15771_08PE	0,935	0,960	0,948	0,960	0,965	0,977	0,943	0,971	0,952	0,965	0,882	0,960	0,865	0,931
15811_08SE	0,939	0,960	0,960	0,977	0,973	0,994	0,950	0,988	0,964	0,982	0,882	0,965	0,869	0,937
15988_08BA	0,941	0,960	0,962	0,977	0,975	0,994	0,952	0,988	0,965	0,982	0,884	0,965	0,867	0,937
15863_08MA	0,943	0,960	0,960	0,965	0,973	0,982	0,950	0,977	0,964	0,971	0,886	0,965	0,869	0,937
16056_09MA	0,943	0,960	0,960	0,965	0,973	0,982	0,950	0,977	0,964	0,971	0,886	0,965	0,869	0,937
16064_09MA	0,943	0,960	0,960	0,965	0,973	0,982	0,950	0,977	0,964	0,971	0,886	0,965	0,869	0,937
15777_08PE	0,939	0,954	0,956	0,960	0,969	0,977	0,946	0,971	0,960	0,965	0,886	0,971	0,869	0,942
15860_08RJ	0,903	0,971	0,875	0,960	0,892	0,977	0,905	0,971	0,882	0,965	0,952	0,988	0,899	0,960
15900_08MG	0,905	0,971	0,876	0,960	0,890	0,977	0,907	0,971	0,884	0,965	0,950	0,988	0,897	0,960
16101_09ES	0,905	0,971	0,876	0,960	0,890	0,977	0,907	0,971	0,884	0,965	0,950	0,988	0,897	0,960

Números de acesso: DS_1, EF672582; TB_Chén, AY787650; NR1, AF506291; KUN, D88829; S2, U59104; 10733(bovino), AY293829; XJX-07(bovino), EU828786).

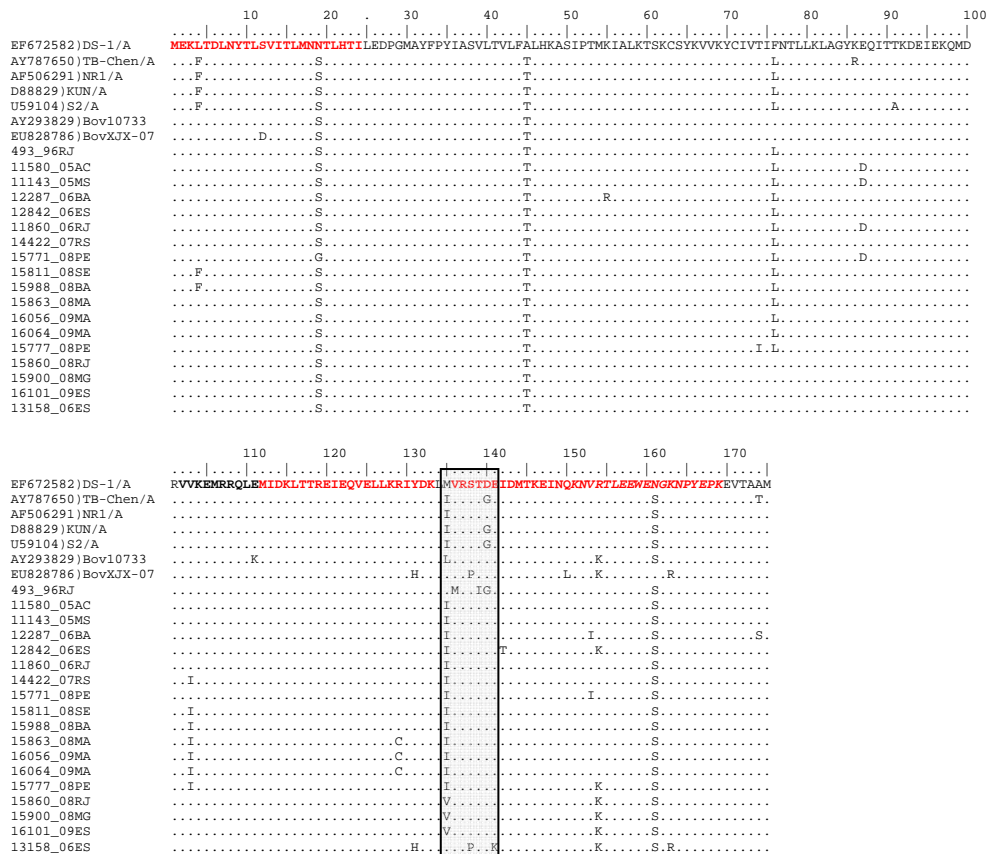


Figura 29. Alinhamento das seqüências completas (175 aa) de aminoácidos da proteína NSP4 de amostras brasileiras representantes dos diferentes *clusters* e protótipos genogrupo A-KUN de origem humana e animal. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com a amostra protótipo DS-1. Em vermelho estão indicados os sítios antigênicos da proteína. O retângulo indica o domínio variável inter-espécie (aa 135 – 141).

5.4 Mecanismos de diversidade genética

Através da análise dos alinhamentos baseados nas seqüências nucleotídicas foi observado a ocorrência de mutações pontuais, sinônimas e não sinônimas (dados não mostrados).

Foram observados eventos de *reassortment* tanto entre amostras de origem humana, quanto entre amostras de origem humana e amostras de origem bovina (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12. Perfil dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4, VP6 e NSP4 de amostras brasileiras analisadas neste estudo e que circularam no período de 1996 a 2006.

NÚMERO DE AMSOTRA	ANO	ESTADO	VP7	VP4	VP6	NSP4
493_96RJ	1996	RJ			x	
680_96ES	1996	ES	x	x		
685_96ES	1996	ES	x			
957_97RJ	1997	RJ	x		x	
5323_02RJ	2002	RJ			x	x
5619_02RJ	2002	RJ			x	x
11143_05MS	2005	MS			x	
11257_05MS	2005	MS				
11531_05AC	2005	AC		x		
11580_05AC	2005	AC				
11581_05AC	2005	AC	x	x		x
11782_05RJ	2005	RJ	x	x		
11830_06AC	2006	AC	x	x		
11837_06AC	2006	AC		x		
11860_06RJ	2006	RJ				
12220_06RJ	2006	RJ				
12224_06RJ	2006	RJ		x	x	
12287_06BA	2006	BA				
12301_06BA	2006	BA		x		x
12343_06RJ	2006	RJ		x		
12389_06RJ	2006	RJ		x		
12482_06BA	2006	BA				
12522_06BA	2006	BA	x	x		
12540_06RJ	2006	RJ		x	x	
12549_06RJ	2006	RJ				
12585_06ES	2006	ES	x	x		
12589_06RJ	2006	RJ				
12647_06RJ	2006	RJ	x		x	
12684_06RJ	2006	RJ	x		x	x
12774_06RJ	2006	RJ		x		
12775_06RJ	2006	RJ	x	x	x	
12777_06BA	2006	BA	x		x	x
12840_06ES	2006	ES	x			
12842_06ES	2006	ES			x	
12916_06BA	2006	BA	x	x	x	
13039_06RS	2006	RS				x
13079_06RJ	2006	RJ	x		x	x
13081_06RJ	2006	RJ	x		x	x
13151_06RJ	2006	RJ				
13158_06ES	2006	ES				

Diferentes cores indicam origem do gene. As cores vermelha, amarela, verde, azul e marrom indicam genes de origem humana, e a cor roxo gene de origem bovina.

Tabela 13. Perfil dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4, VP6 e NSP4 de amostras brasileiras analisadas neste estudo e que circularam no período de 2007 a 2009.

NÚMERO DE AMSOTRA	ANO	ESTADO	VP7	VP4	VP6	NSP4
13438_07RJ	2007	RJ	x	x	x	
13514_07ES	2007	ES	x	x	x	
13663_07AL	2007	AL	x	x		
13668_07AL	2007	AL				
13780_07RJ	2007	RJ		x		
13788_07SE	2007	SE				x
13793_07SE	2007	SE				x
13891_07RJ	2007	RJ		x		
14157_07ES	2007	RS	x	x	x	x
14255_07RJ	2007	RJ	x	x	x	
14263_07RS	2007	RS	x	x		x
14303_07MG	2007	MG				
14322_07MG	2007	MG		x		
14344_07RS	2007	RS	x	x		x
14397_07MA	2007	MA	x	x		
14422_07RS	2007	RS			x	
14426_07ES	2007	ES	x		x	
14919_08RS	2008	RS				
15311_08RJ	2008	RJ				
15382_08BA	2008	BA			x	
15385_08BA	2008	BA				
15593_08AL	2008	AL			x	
15771_08PE	2008	PE				
15774_08PE	2008	PE			x	
15777_08PE	2008	PE				
15782_08MG	2008	MG				
15786_08ES	2008	ES				
15811_08SE	2008	SE				
15830_08RS	2008	RS	x			x
15836_08RS	2008	RS				
15840_08RS	2008	RS				
15859_08MG	2008	MG				
15860_08RJ	2008	RJ				
15863_08MA	2008	MA				
15894_08ES	2008	ES		x		
15898_08MG	2008	MG				
15900_08MG	2008	MG		x		
15953_08RS	2008	RS				
15958_08RS	2008	RS				
15983_08BA	2008	BA				
15988_08BA	2008	BA				
15990_08BA	2008	BA		x		x
16054_09MA	2009	MA			x	x
16056_09MA	2009	MA			x	
16064_09MA	2009	MA				
16099_09ES	2009	ES				
16100_09ES	2009	ES				
16101_09ES	2009	ES				

Diferentes cores indicam origem do gene. As cores amarela, azul, cinza, verde e laranja indicam genes de origem humana.

6. DISCUSSÃO

A variabilidade genômica que os RV-A apresentam é o resultado do efeito acumulativo de quatro mecanismos diferentes: mutações pontuais, rearranjos, recombinação e *reassortment*. A estes mecanismos se soma o fato de estes vírus infectarem uma variedade de hospedeiros, mamíferos e aves, aumentando a variação genômica existente através de transmissão entre-espécies. Neste estudo foi possível evidenciar mecanismos como mutação pontual e *reassortment* acontecendo, este último, tanto entre amostras humanas quanto entre amostras humanas e de origem bovina.

6.1 Análise do gene que codifica para a proteína VP7

As análises filogenéticas obtidas a partir da seqüência nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP7 revelaram uma relação temporal das variantes gênicas encontradas para o genótipo G2P[4] no Brasil entre os anos de 1996 e 2009, mostrando que diferentes variantes de RV-A circularam no Brasil neste período. Sugere-se que este genótipo tenha sido introduzido no Brasil em várias oportunidades.

No período 1996 a 2002 circulou uma variante de VP7 que mostrou uma relação filogenética distante de outras amostras brasileiras. Ficou demonstrado que estas amostras mostraram maior identidade nucleotídica com amostras que circularam no mesmo período na Austrália, China, África, Taiwan e Itália (Piec & Palombo, 1998; Zao *et al.* 1999; Page & Steele, 2004; Ahmed *et al.* 2005; Arista *et al.* 2005) (dados não mostrados) (Figura 22).

No período de 2005 a 2006 co-circularam no Brasil diferentes variantes de VP7. Uma variante circulou nos estados de Acre, Bahia, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (Figura 20, **cluster B**). Esta variante apresentou maior identidade de nucleotídeos com amostras isoladas no Japão e na Rússia em anos anteriores (dados não publicados), sugerindo a introdução desta variante através destes países. No Acre, co-circulou outra variante durante 2005 e 2006 (Figura 20, **cluster AC**), que mostrou uma relação genética muito próxima com amostras isoladas em Montevidéu, Uruguai, em 1997 (Berois *et al.* 2003) (Figura 22). Os dados obtidos sugerem que esta variante só circulou no estado do Acre. Porém, deve se ressaltar que a coleção de amostras do LVCA, não contemplava amostras da região Norte do Brasil. Outra variante de VP7 circulou no Espírito Santo em 2006 (Figura 20, amostra 12842_06ES) e mostrou maior identidade nucleotídica com amostras detectadas na Índia em 2005 e na Rússia em 2007 (Samajdar *et al.* 2008). Foi

observado que uma variante que começou a circular no Brasil em 2006 nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, disseminando-se pelo Brasil, atingindo um número maior de estados: Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Sergipe, mantendo-se em circulação no Brasil até o ano 2008 (Figura 20, **cluster C**). Estes dados indicam que teria ocorrido uma seleção positiva desta variante quando foi introduzida no Brasil, passando a ser a de maior prevalência durante os anos 2006 a 2008. A seleção desta variante pode estar relacionada a muitos fatores entre os quais: antigenicidade, *fitness* da progênie viral, infecciosidade e virulência, etc. Serão necessários outros estudos para poder se determinar o motivo desta seleção.

No ano 2008 duas novas variantes de VP7 começaram a circular em diferentes regiões do Brasil e se mantiveram até 2009 (Figura 20, **clusters Maranhão e Sudeste**). Uma destas variantes manteve sua circulação restrita ao estado do Maranhão apresentando maior identidade nucleotídica com a variante genética que circulou no Brasil no período 2006 a 2008. Este resultado sugere que a variante detectada no Maranhão teria evoluído a partir desta variante (2006 - 2008). Em conjunto, estas duas variantes mostraram maior identidade nucleotídica com amostras que circularam em Bangladesh no período 2004 a 2006 (Paul *et al.* 2008). Por outro lado, no Sudeste do Brasil ocorreu a circulação de outra variante nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (2008 - 2009). Esta variante apresentou uma relação filogenética próxima com amostras que circularam na Rússia em anos anteriores (dados não publicados) (Figura 22).

Os dados obtidos para esta proteína revelaram a ocorrência de mudanças de aa em várias posições da proteína (Figura 21). Destas, algumas ocorreram nos sítios antigênicos denominados de A, C e F. Estudos deverão ser realizados para avaliar a importância destas mudanças de aa em nível biológico. A mudança de aa observada na posição 96^{D→N}, foi associada anteriormente a um surto de G2P[4] ocorrido em Taiwan em 1993 (Zao *et al.* 1999). Porém, neste estudo foi observado que em todas as amostras brasileiras e na maioria das amostras genótipo G2P[4] depositadas no *GenBank*, esta substituição é observada, sugerindo que esta mudança teria sido selecionada no decorrer do tempo, mantendo-se nas diferentes variantes de G2P[4]. Isto sugere que a mesma não estaria associada à ocorrência de surtos.

6.2 Análise do gene que codifica para a proteína VP4

Os dados obtidos para o gene que codifica para a proteína VP4 revelaram a circulação no Brasil de pelo menos cinco variantes para este gene no período de 1996 a 2009. Como discutido para o gene VP7, uma variante circulou no período de 1996 a 2002 (Figura 23, **cluster A**), demonstrando maior identidade com amostras isoladas na Itália no período de 1996 e 1997 (Arista *et al.* 2005). As variantes ES (12840_06ES e 12842_06ES), Maranhão e Sudeste também foram observadas para este gene (Figura 23, **clusters ES, Maranhão e Sudeste**). Foi demonstrado que a variante ES apresentou maior identidade com amostras que circularam na Índia em 2005 e na Rússia em 2008 (Banerjee *et al.* 2008) (Figura 25). A variante Sudeste apresentou maior identidade com amostras da Rússia isoladas no período 2004 a 2008 (dados não publicados) e, em ambos os casos ficou demonstrada uma relação com os dados obtidos para o gene da VP7.

As análises filogenéticas deste gene revelaram que duas das variantes observadas para o gene da VP7 (Figura 20, **clusters B e C**), compartilharam a mesma variante de VP4(P[4]) (Figura 23, **cluster P**), sugerindo a ocorrência de um evento de *reassortment* entre amostras genótipo G2P[4] de RV-A humanas. O fato de esta variante ter se associado a uma das variantes de P[4] que já circulava em vários estados do Brasil, talvez esteja relacionado com um mecanismo de adaptação à população brasileira. Esta variante de VP4 mostrou maior identidade nucleotídica com amostras que circularam na Coreia do Sul em 2000 e 2001, Paraguai em 2005 e Rússia em 2004 e 2005 (Min *et al.* 2004; Espinola *et al.* 2008), mostrando a circulação desta variante em outros países. Diferentes estudos têm demonstrado uma tendência dentro do genogrupo DS-1 *like* (G2P[4], G6, G8) em manter o perfil de genes DS-1 *like* e adquirir a VP4 de uma variante que esteja previamente circulando (Matthijnsens *et al.* 2006; Montenegro *et al.* 2007). Foi observado para amostras Wa-*like* (G1P[8], G3, G4, G5, G9, G12) tem se observado que a tendência é a aquisição da VP7 de uma amostra que esteja circulando, mantendo o gene VP4 e os demais genes Wa-*like* (Freeman *et al.* 2009). Neste estudo, foi possível observar que em amostras DS-1 *like*, pode ocorrer tanto a aquisição do gene VP4 quanto do gene VP7. Duas amostras isoladas em Pernambuco em 2008 (15771_08PE e 15774_08PE) mostraram ter os genes VP4, VP6 (15771_08PE) e NSP4 pertencentes à variante genética que circulou no período 2005 e 2006 (Figuras 23; 26, 28, **cluster B**); e o gene VP7 pertencente à variante que circulou no período de 2006 a 2008 (Figura 20, **cluster C**). Estes dados sugerem que esta variante que circulou em 2008 em Pernambuco originou-se de um evento de *reassortment* entre amostras humanas, onde uma

variante adquiriu a VP7 de outra amostra que circulava anteriormente, porém mantendo os genes VP4, VP6 e NSP4 originais.

O alinhamento de aa revelou substituições destes em diferentes regiões da proteína VP4 (Figura 24). Três destas ocorreram nos sítios antigênicos. Porém, como descrito para VP7, serão necessários estudos para demonstrar a importância biológica destas mudanças de aa na proteína VP4.

6.3 Análise do gene que codifica para a proteína VP6

Nas análises do gene que codifica para esta proteína não foram incluídas amostras isoladas em diferentes regiões do mundo, devido à indisponibilidade destas no *GenBank*.

Na árvore filogenética correspondente a este gene, as variantes Maranhão e Sudeste agruparam junto com amostras pertencentes ao *cluster* C quando o gene da VP7 foi analisado (Figura 26, **cluster X2**). Foi demonstrado que as amostras neste *cluster* apresentaram maior valor de identidade nucleotídica com uma amostra de Bangladesh de 2005 (Paul *et al.* 2008) (dados não mostrados).

Entretanto, as amostras que formaram o *cluster* denominado “B” na árvore filogenética de VP7, mostraram uma relação genética próxima com amostras que circularam em 2008 nos estados da Bahia, Rio Grande do Sul e Sergipe, quando analisado o gene que codifica para a proteína VP6 (Figura 26, **cluster X1**). Estes dados sugerem que ocorreu um evento de *reassortment* onde estas amostras que circularam em 2008 adquiriram tanto o gene que codifica para a proteína VP4, quanto o gene que codifica para a proteína VP6 da variante de RV-A genótipo G2P[4] que circulou no período 2005 a 2006 no Brasil. As amostras no *cluster* X1 apresentaram maior identidade com amostras isoladas na Tailândia em 2001 e na Índia em anos anteriores (Thongprachum *et al.* 2009) (dados não mostrados).

Como observado para VP7, amostras detectadas no Acre em 2005 e 2006, e a amostra 12840_06ES do Espírito Santo (2006), agruparam separadamente das demais amostras brasileiras, porém como não foi possível seqüenciar ambos os genes, VP4 e VP7, estas amostras não foram incluídas nas análises filogenéticas. Para as amostras do Acre a análise por *blast* revelou uma identidade nucleotídica maior com amostras isoladas nos Estados Unidos no período 1996 a 2002 (Kerin *et al.* 2007).

6.4 Análise do gene que codifica para a proteína NSP4

A análise do gene que codifica para a proteína NSP4 demonstrou que a amostra 493_96RJ agrupou-se distante das demais amostras brasileiras (Figura 28) como observado anteriormente e próximo aos protótipos, e constatou-se que apresentava maior identidade com uma amostra que circulou no Brasil em 1999 e uma amostra da Índia isolada em 2002 (Mascarenhas *et al.* 2007).

Duas amostras detectadas no Espírito Santo em 2006 (12840_06ES e 12842_06ES) mostraram uma relação genética próxima com duas amostras que circularam na Bahia no mesmo ano (12287_06BA e 12916_06BA), distante das demais amostras brasileiras (Figura 28). (As amostras 12840_06ES e 12916_06BA não foram incluídas na árvore pelo fato de não terem sido obtidas as seqüências dos genes VP7 e VP4). A amostra 12287_06BA agrupou no *cluster* B, correspondente à variante que circulou no Brasil no período de 2005 a 2006 para os genes VP7, VP4 e VP6 (Figuras 20; 23; 26, **cluster B**), indicando a ocorrência de um evento de *reassortment* entre amostras genótipo G2P[4] humanas.

As amostras do Maranhão apresentaram uma substituição de aa na posição 129^{R→C}, dentro do domínio de enterotoxina (aa 114 – 135), que somente foi associada a estas amostras. A relevância desta substituição deverá ser determinada.

Na análise filogenética baseada na região codificante completa (nt) do gene, a variante Sudeste agrupou com uma amostra de origem bovina (Figura 28), 10733 (G6P[3]), detectada na Itália em 2001 (Martella *et al.* 2003). Por outro lado, quando realizada a análise parcial da região codificante, as amostras em estudo mostraram uma relação genética próxima com uma amostra da Hungria (G6P[14]) isolada em 2003 (Banyai *et al.* 2009), mostrando uma identidade nucleotídica de 98,7%. Sugere-se, portanto, que o gene que codifica para a proteína NSP4 das amostras no *cluster* Sudeste foi incorporado através de um evento de *reassortment* ocorrido entre amostras humanas. Entretanto, com base nos resultados deste estudo, pode-se sugerir que um *reassortment* bovino-humano teria ocorrido anteriormente. Estas análises mostram inequivocadamente que a qualidade e o número de nucleotídeos, entre outros fatores, são fundamentais nas análises com base nos dados depositados no *GenBank*. As amostras no *cluster* Sudeste apresentaram uma mudança de aa dentro do domínio de enterotoxina na posição 135^{M→V}, (Figura 29) substituição esta compartilhada com a amostra da Hungria. Dentro dos protótipos descritos até o momento, esta substituição somente havia sido descrita em amostras de origem murino (Horie *et al.* 1997).

Amostras isoladas no Espírito Santo e no Rio de Janeiro em 2006 agruparam junto com a amostra bovina XJX-07 (G10P[11]) isolada na China no ano 2007 (Figura 28)

(Mulherin *et al.* 2008), evidenciando a ocorrência de *reassortment* entre amostras humanas e bovinas.

O alinhamento de aa desta proteína revelou a ocorrência de substituições de aa nos três sítios antigênicos descritos para a NSP4 (Borgan *et al.* 2003), e na região variável interespécie (aa 135 – 141) (Mohan & Atreya. 2000) (Figura 29). Algumas destas substituições se localizaram no domínio citoplasmático da proteína, onde se encontram os sítios de união a VP4 e VP6.

Estes dados mostram a importância de se monitorar os genótipos de RV-A que circulam tanto nas populações humanas, quanto nos animais. Principalmente aqueles animais com os quais os humanos tem um contato mais próximo.

Os dados obtidos neste estudo mostram o grau de variabilidade genética existente nos RV-A genótipo G2P[4]. Os RV-A, como a imensa maioria dos vírus RNA, apresentam uma taxa de variação genética elevada, o que pode nos levar a prever que, no decorrer do tempo, cada vez mais as amostras vão se distanciar dos padrões estabelecidos. Uma vez que o novo sistema de classificação proposto por Matthinjssens e cols. (2008b) baseia-se nos diferentes protótipos, espera-se novos genótipos e/ou novas linhagens e sub-linhagens sejam descritos com maior frequência. Esta análise deverá ser estendida a todos os genes que foram analisados neste trabalho. Porém, em alguns casos pode-se observar que uma variante que circulou em anos anteriores retorne a circular. Ainda não são evidentes os motivos que levam à ocorrência destes eventos, sugere-se que: a) por um mecanismo de convergência evolutiva, diferentes vírus podem estar encontrando a mesma solução biológica para um determinado problema em diferentes momentos; b) após algumas mutações o vírus poderia reverter à mesma sequência de seu ancestral, pois a maioria das mutações são silenciosas e por um mecanismo de deriva gênica esses nucleotídeos mudam sem alterar a sequência da proteína; c) o vírus de alguma forma poderia se manter no ambiente, onde não sofreria replicações e após um longo período de inatividade conseguisse infectar um novo hospedeiro, voltando a circular na população. Já foi observado que os RV-A conseguem se manter no ambiente, onde são estáveis por 60 dias (Sattar *et al.* 1986).

Como observado em diferentes estudos, este trabalho mostrou a segregação independente dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4, VP6 e NSP4. Os dados obtidos revelaram que a variabilidade do genótipo G2P[4] no Brasil esta altamente influenciada pela ocorrência de mutações pontuais e *reassortment*, tanto entre amostras humanas quanto entre amostras humanas e amostras bovinas. Como pode ser observado nas árvores de VP4 e VP7, as amostras que circularam no Brasil no período de 1996 a 2009 não formaram um grupo monofilético, e sim se agruparam em separado, mostrando relações

filogenéticas próximas com amostras que circularam em diferentes regiões do mundo e que foram detectadas em diferentes anos. Este padrão filogenético indica o fluxo de variantes virais que ocorre em nível global, mostrando a entrada e saída de variantes de RV-A genótipo G2P[4] no Brasil. No caso do genótipo G2P[4] a estimativa destas “introduções” ou “exportações” estaria melhor evidenciada pelo estudo da VP7, devido à tendência de DS-1 *like* de trocar a VP4.

Sabe-se que VP4 e VP7 são as proteínas de superfície e alvos para o desenvolvimento de diferentes vacinas para RV-A. Os dados deste estudo revelaram que em comparação com a proteína VP7, a proteína VP4 apresenta menor variação genética entre os RV-A genótipo G2P[4] que circulam no Brasil e no mundo. Desta forma, sugere-se que a VP4 represente um importante alvo para as vacinas contra RV-A que incluam este genótipo. Porém, deve-se destacar que tanto a vacina Rotarix[®] (G1P[8]), quanto a vacina RotaTeq[®] (pentavalente G1-G4, P[8]), que constituem as vacinas que se encontram amplamente distribuídas no mundo, não apresentam na sua fórmula a proteína VP4 genótipo P[4], apresentando apenas o genótipo P[8]. Contudo, foi demonstrado em estudos de Fase III que estas vacinas apresentam imunização heterotípica contra o genótipo G2P[4] (Nakagomi & Nakagomi, 2009; Phua *et al.* 2009). O aumento na prevalência do genótipo G2P[4] reportado em diversos continentes a partir do ano 2005, tanto em países onde a vacina Rotarix[®] e RotaTeq[®] já estão sendo administradas, quanto em países onde nenhuma vacina foi distribuída, sugere a importância de se adicionar nas novas vacinas a serem desenvolvidas o genótipo P[4].

Ainda não é possível afirmar se o aumento na prevalência deste genótipo está relacionado à introdução da vacina Rotarix[®] no Brasil, resultando na diminuição da ocorrência dos demais genótipos.

Recentemente, tem sido observado um aumento na detecção de outros genótipos, além de G2P[4] no nosso laboratório, e uma diminuição deste em algumas regiões do Brasil (dados não mostrados).

Portanto, é de grande importância que os estudos de vigilância epidemiológica continuem a ser realizados para se determinar efetivamente a prevalência deste genótipo no país.

7. CONCLUSÕES

Mediante a análise filogenética dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4, VP6 e NSP4 as amostras analisadas foram classificadas dentro dos genótipo G2, P[4], I 2, E 2, respectivamente.

As análises filogenéticas baseadas nos genes que codificam para as proteínas VP7 e VP4, permitiram inferir a ocorrência de múltiplas introduções do genótipo G2P[4] no Brasil.

Foi demonstrada a circulação de diferentes variantes de RV-A genótipo G2P[4] no período de 1996 a 2009 no Brasil. Uma variante circulou no período de 1996 a 2002, e entre 2005 e 2006 duas variantes circularam, uma delas apenas no estado de Acre.

Em 2006, uma nova variante foi detectada e se dispersou por vários estados do Brasil, substituindo as variantes anteriores.

Em 2008 duas novas variantes foram identificadas no Brasil, uma que circulou no estado de Maranhão e a outra na região sudeste do país.

As análises filogenéticas permitiram identificar 7 variantes do gene que codifica para a proteína VP7, 5 variantes do gene que codifica a proteína VP4, 7 variantes do gene que codifica a proteína VP6, e 8 variantes do gene que codifica a proteína NSP4, demonstrando a segregação independente dos genes de RV-A analisados.

Dos mecanismos de geração de diversidade em RV-A, foi possível evidenciar a ocorrência de: a) mutações pontuais nos quatro genes analisados; b) *reassortment* entre amostras humanas para os quatro genes analisados; c) *reassortment* entre amostras humanas e amostras bovinas para o gene que codifica para a proteína NSP4.

8. PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos neste estudo e visando contribuir para os avanços nos estudos do genótipo G2P[4] de RV-A, constituirão objetivos futuros:

Seqüenciar e realizar análise filogenéticas de todos os genes de RV-A das amostras genótipo G2P[4] analisadas neste estudo.

Ampliar o estudo para analisar amostras de RV-A genótipo G2P[4] de outras regiões do Brasil, principalmente a região Norte.

Analisar amostras de RV-A genótipo G2P[4] de países vizinhos, para um maior conhecimento da epidemiologia deste genótipo em outros países de América do Sul.

Realizar estudos de coalescência baseados nos genes que codificam para as proteínas VP7 e VP4.

9. BIBLIOGRAFIA

Abe M., Ito N., Morikawa S., Takasu M., Murase T., Kawashima T., Kawai Y., Kohara J., Sugiyama M. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. (2009). *Virus Res.* Sep;144(1-2):250-7.

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. (2005). *J. Med. Virol.* 77 (2), 323-330.

Alfieri A. A., Leite J. P., Nakagomi O., Kaga E., Woods P. A., Glass R. I., Gentsch J. R. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. (1996). *Arch Virol* 141, 2353-2364.

Amarilla A., Espínola E.E., Galeano M.E., Fariña N., Russomando G., Parra G.I. Rotavirus infection in the Paraguayan population from 2004 to 2005: high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults. (2007). *Med Sci Monit* 13: CR333-337.

Antunes H., Afonso A., Iturriza M., Martinho I., Ribeiro C., Rocha S., Magalhães C., Carvalho L., Branca F., Gray J. G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. (2009). *J Clin Virol.* May;45(1):76-8.

Araujo I. T., Ferreira M. S., Fialho A. M., Assis R. M., Cruz C. M., Rocha M., Leite J. P. Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. (2001). *J Clin Microbiol.* 39, 1999-2001.

Araujo I. T., Assis R. M., Fialho A. M., Mascarenhas J. D., Heinemann M. B., Leite J. P. Brazilian P[8],G1, P[8],G5, P[8],G9, and P[4],G2 rotavirus strains: nucleotide sequence and phylogenetic analysis. (2007). *J Med Virol.* 79, 995-1001.

Arias C.F., Romero P., Alvarez V., Lopez S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. (1996). *J Virol.* 70(9):5832-9.

Arias C. F., Dector M. A., Segovia L., Lopez T., Camacho M., Isa P., Espinosa R., Lopez S. RNA silencing of rotavirus gene expression. (2004). *Virus Res.* 102(1), 43-51.

Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C, Martella V, Cascio A, Iturriza-Gòmara M. G2 rotavirus infections in an infantile population of the South of Italy: variability of viral strains over time. (2005). *J Med Virol*. Dec;77(4):587-94

Arnoldi F., Campagna M., Eichwald C., Desselberger U., Burrone O.R. Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. (2007). *J Virol*. 81(5):2128-37.

Aoki S.T., Settembre E.C., Trask S.D., Greenberg H.B., Harrison S.C., Dormitzer P.R. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. (2009). *Science*. Jun 12;324(5933):1444-7.

Ball J.M., Tian P., Zeng C.Q.Y. Age-dependent diarrhea induced by rotaviral nonstructural glycoprotein. (1996). *Science* 272: 101- 104.

Banerjee I., Primrose Gladstone B., Iturriza-Gomara M., Gray J.J., Brown D.W., Kang,G. Evidence of intrafamilial transmission of rotavirus in a birth cohort in South India. (2008). *J. Med. Virol*. 80 (10), 1858-1863.

Bányai K., Bogdán A., Kisfali P., Molnár P., Mihály I., Melegh B., Martella V., Gentsch J.R., Szücs G. Emergence of serotype G12 rotaviruses, Hungary. (2007). *Emerg Infect Dis*. Jun;13(6):916-9.

Bányai K., Bogdan,A., Domonkos,G., Kisfali,P., Molnar,P., Toth,A., Melegh,B., Martella,V., Gentsch,J.R., Szucs G. Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. (2009). *J. Med. Virol*. 81 (2), 362-370.

Beards G., Xu L., Ballard A., Desselberger U., McCrae M. A. A serotype 10 human rotavirus. (1992). *J Clin Microbiol* 30(6), 1432-5.

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

Bernstein D.I., Glass R.I., Rodgers G., Davidson B.L., Sack D.A. Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in US children. (1995). US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *JAMA*. 273(15):1191-6.

Berois M., Libersou S., Russi J., Arbiza J., Cohen J. Genetic variation in the VP7 gene of

human rotavirus isolated in Montevideo-Uruguay from 1996-1999. (2003). *J. Med. Virol.* 71 (3), 456-462.

Bhan M. K., Lew J. F., Sazawal S., Das B. K., Gentsch J. R., Glass R. I. Protection conferred by neonatal rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhea. (1993). *J Infect Dis* 168(2), 282-7.

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

Bishop, R. F., Barnes, G. L., Cipriani, E., and Lund, J. S. (1983). Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N Engl J Med* 309(2), 72-6.

Bishop R.F., Unicomb L.E., Barnes G.L. Epidemiology of rotavirus serotypes in Melbourne, Australia, from 1973 to 1989. (1991). *J Clin Microbiol.* May;29(5):862-8.

Boom R., Sol C. J., Salimans M. M., Jansen C. L., Wertheim-van Dillen P. M., Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. (1990). *J Clin Microbiol.* 28, 495-503.

Borgan M.A., Mori Y., Ito N., Sugiyama M., Minamoto N. Antigenic analysis of nonstructural protein (NSP) 4 of group A avian rotavirus strain PO-13. (2003). *Microbiol Immunol.* 47(9):661-8.

Bowman G. D., Nodelman I. M., Levy O., Lin S. L., Tian P., Zamb T. J., Udem S. A., Venkataraghavan B., Schutt C. E. Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site. (2000). *J Mol Biol.* 304, 861-871.

Browne E. P., Bellamy A. R., Taylor J. A. Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipathic domain. (2000). *J Gen Virol* 81, 1955-1959.

Brussow H., Nakagomi O., Gerna G., Eichhorn W. Isolation of an avianlike group A rotavirus from a calf with diarrhea. (1992) *J. Clin. Microbiol.* 30(1):67-73.

Carvalho-Costa F.A., Assis R.M., Fialho A.M., Bóia M.N., Alves D.P.D., Martins C.M.M.A.,

- Leite J.P.G. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. (2006). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 291-294.
- Castello A. A., Arvay M. L., Glass R. I., Gentsch J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. (2004). *Pediatr Infect Dis J* 23, S168-172.
- Castello A.A., Argüelles M.H., Rota R.P., Olthoff A., Jiang B., Glass R.I., Gentsch J.R., Glikmann G. Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12. (2006). *J Clin Microbiol.* Jun;44(6):2046-50.
- CDC (2008). Rotavirus surveillance worldwide, 2001-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 57, 1255-1257.
- Clark H. F., Offit P. A., Ellis R. W., Eiden J. J., Krah D., Shaw A. R., Pichichero M., Treanor J. J., Borian F. E., Bell L. M., Plotkin, S. A. The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. (1996). *J Infect Dis* 174 Suppl 1, S73-80.
- Conner M.E. & Ramig, R.F. (1997). Viral Enteric Diseases. In: Viral Pathogenesis, ed. by Neal Nathanson *et al.*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 713-743.
- Cunliffe N.A., Woods P.A., Leite J.P.G., Das B.K., Ramachandran M., Bhan M.K., *et al.* Sequence analysis of NSP4 gene of human rotavirus allows classification into two main genetic groups. (1997) *J Med Virol.* 53(1): 41-50.
- Cunliffe N. A., Gondwe J. S., Broadhead R. L., Molyneux M. E., Woods P. A., Bresee J. S., Glass R. I., Gentsch J. R., Hart C. A. Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: predominance of novel P[6]G8 strains. (1999) *J. Med. Virol.* 57:308–312.
- Das B. K., Gentsch J. R., Cicirello H. G., Woods P. A., Gupta A., Ramachandran M., Kumar R., Bhan M. K., Glass R. I. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. (1994). *J Clin Microbiol* 32, 1820-1822.
- Davidson G.P., Bishop R.F., Townley R.R., Holmes I.H. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. (1975) *Lancet.* 1(7901):242-6.
- De Donno A., Grassi T., Bagordo F., Idolo A., Cavallaro A., Gabutti G. Collaborative Group

for the surveillance of Rotavirus Infection. Emergence of unusual human rotavirus strains in Salento, Italy, during 2006-2007. (2009) *BMC Infect Dis.* Apr 15;9:43.

de Oliveira A.S.L., Mascarenhas J.D.P., Soares L.S., Guerra S.F.S., Gabbay Y.B., Sanchez N.O., Linhares A.C. Reemergence of G2 rotavirus serotypes in Northern Brazil reflects a natural changing pattern over time. (2008). *The 8th Rotavirus International Symposium, Istanbul, Turkey, Abstracts* p. 60-61.

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

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

Domingues A.L., Morais A.T., Cruz R.L., Moreira L.P., Gouvêa V.S. Rotavirus-associated infantile diarrhea in Uberaba, Minas Gerais, on the wake of the Brazilian vaccination program. (2008). *J Clin Virol.* Nov;43(3):298-301.

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

Dunn S. J., Fiore L., Werner R. L., Cross T. L., Broome R. L., Ruggeri F. M., Greenberg H. B. Immunogenicity, antigenicity, and protection efficacy of baculovirus expressed VP4 trypsin cleavage products, VP5(1)* and VP8* from rhesus rotavirus. (1995). *Arch Virol.* 140, 1969-1978.

Espinola E.E., Amarilla A., Arbiza J., Parra G.I. Sequence and phylogenetic analysis of the VP4 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. (2008). *Arch. Virol.* 153 (6), 1067-1073.

Estes M. K., & Cohen J. Rotavirus gene structure and function. (1989). *Microbiol Rev.* 53(4), 410-49.

Estes M. Rotaviruses and their replication. (2001). *Fields Virology* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Estes M.K. & Kapikian A.Z. Rotaviruses. (2007). In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE,

editors. *Fields Virology. 5th*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.1917-1975.

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

Ferguson S. M. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. Prospective Grant of Partially-Exclusive Licenses: Human-Bovine Reassortant Rotavirus Vaccine. (2004). *Federal Register.* 69: 57335-57336.

Ferrera A., Quan D., Espinoza F. (2007). Increased prevalence of genotype G2P(4) among children with rotavirus-associated gastroenteritis in Honduras. The 17th *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC*, Munich, Germany.

Fischer T. K., Bresee J. S., Glass R. I. Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. (2004). *Vaccine.* 22 Suppl 1, S49-54.

Flewett T.H., Bryden A.S., Davies H. Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 1973;2(7844):1497.

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

Flores J., Sears J., Green K.Y., Perez-Schael I., Morantes A., Daoud G., *et al.* Genetic stability of rotaviruses recovered from asymptomatic neonatal infections. (1988). *J Virol.* 62(12):4778-81.

Freeman M.M., Kerin T., Hull J., Teel E., Esona M., Parashar U., Glass R.I., Gentsch J.R. Phylogenetic analysis of novel G12 rotaviruses in the United States: A molecular search for the origin of a new strain. (2009). *J Med Virol.* Apr;81(4):736-46.

Gentsch J. R., Glass R. I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., Das B. K., Bhan M. K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. (1992). *J Clin Microbiol.* 30, 1365-1373.

Gentsch J.R., Woods P.A., Ramachandran M., Das B.K., Leite J.P., Alfieri A., Kumar R.,

Bhan M.K., Glass R.I. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. (1996). *J Infect Dis.* Sep;174 Suppl 1:S30-6. Review.

Gentsch J.R., Laird A.R., Bielfelt B., Griffin D.D., Banyai K., Ramachandran M., *et al.* Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. (2005). *J Infect Dis.* 192(Suppl.1):S146-59.

Glass R.I., Parashar U.D., Bresee J.S., Turcios R., Fischer T.K., Widdowson M.A., Jiang B., Gentsch J.R. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. (2006). *Lancet.* 368, 323-332.

Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark F.H., Forrester B., *et al.* Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. (1990). *J Clin Microbiol.* 28(2):276-82.

Gouvea V., Castro L., Timenetsck M.C., Greenberg H., Santos N. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. (1994). *J Clin Microbiol.* 32(7):1408-9.

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

Gouvea V. & Santos N. Rotavirus serotype G5: an emerging cause of epidemic childhood diarrhea. (1999). *Vaccine.* 17, 1291-1292.

Gurgel R.Q., Cuevas L.E., Vieira S.C., Barros V.C., Fontes P.B., Salustino E.F., Nakagomi O., Nakagomi T., Dove W., Cunliffe N., Hart C.A. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. (2007). *Emerg Infect Dis.* Oct;13(10):1571-3.

Haber P., Chen R. T., Zanardi L. R., Mootrey G. T., English R. & Braun M. M. An analysis of rotavirus vaccine reports to the vaccine adverse event reporting system: more than intussusception alone? (2004). *Pediatrics.* 113, e353-359.

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

Hanlon P., Hanlon L., Marsh V., Byass P., Shenton F., Hassan-King M., Jobe O., Sillah H., Hayes R., M'Boge B. H., *et al.* Trial of an attenuated bovine rotavirus vaccine (RIT 4237) in Gambian infants. (1987). *Lancet*. 1, 1342-1345.

Heiman E.M., McDonald S.M., Barro M., Taraporewala Z.F., Bar-Magen T., Patton J.T. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. (2008). *J Virol*. 82(22):11106-16.

Horie Y., Masamune O., Nakagomi O. Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins identified by sequence analysis. (1997). *J. Gen. Virol.* 78 (PT 9), 2341-2346.

Hoshino Y., Wagner M., Yan X. Y., Perez-Schael I., Kapikian A. Z. Horizontal transmission of rhesus monkey rotavirus-based quadrivalent vaccine during a phase 3 clinical trial in Caracas, Venezuela. (2003). *J Infect Dis*. 187, 791-800.

Huang H., Schroeder F., Estes M. K., McPherson T., Ball J. M. Interaction(s) of rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) C-terminal peptides with model membranes. (2004). *Biochem J*. 380, 723-733.

Jain V., Das B. K., Bhan M. K., Glass R. I., Gentsch J. R. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. (2001). *J Clin Microbiol*. 39, 3524-3529.

Jayaram H., Estes M. K., Prasad B. V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. (2004). *Virus Res*. 101, 67-81.

Johansen K., Hinkula J., Espinoza F., Levi M., Zeng C., Ruden U., Vesikari T., Estes M., Svensson L. Humoral and cell-mediated immune responses in humans to the NSP4 enterotoxin of rotavirus. (1999). *J Med Virol*. 59(3), 369-77.

Kapikian A.Z., Kim H.W., Wyatt R.G., Rodriguez W.J., Ross S., Cline W.L., *et al.* Reovirus like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests.

(1974). *Science*. 185(156):1049-53.

Kapikian A.Z., Hoshino Y., Chanock R.M. Rotaviruses. (2001). Fields Virology 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Kerin T.K., Kane E.M., Glass R.I., Gentsch J.R. Characterization of VP6 genes from rotavirus strains collected in the United States from 1996-2002. (2007). *Virus Genes*. 35 (3), 489-495.

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

Kirkwood C.D., Gentsch J.R., Glass R.I. Sequence analysis of the NSP4 gene from human rotavirus strains isolated in the United States. (1999). *Virus Genes*. 19(2):113-22.

Kovacs-Nolan J., Yoo D., Mine, Y. Fine mapping of sequential neutralization epitopes on the subunit protein VP8 of human rotavirus. (2003). *Biochem J*. 376(Pt 1), 269-75.

Kraschnefski M.J., Scott S.A., Holloway G., Coulson B.S., Von Itzstein M., Blanchard H. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the VP8* carbohydrate-binding protein of the human rotavirus strain Wa. (2005). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. Nov 1;61(Pt 11):989-93.

Krishnan T., Burke B., Shen S., Naik T. N., Desselberger U. Molecular epidemiology of human rotaviruses in Manipur: genome analysis of rotaviruses of long electropherotype and subgroup I. (1994). *Arch Virol*. 134, 279-292.

Leite J.P.G., Alfieri A.A., Woods P.A., Glass R.I., Gentsch J.R. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. (1996). *Arch Virol*. 141, 2365-2374.

Leite J. P., Carvalho-Costa F. A., Linhares A. C. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. (2008). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103, 745-753.

Lin S. L. & Tian P. Detailed computational analysis of a comprehensive set of group A

rotavirus NSP4 proteins. (2003). *Virus Genes*. 26(3), 271-82.

Linhares A.C., Pinheiro F.P., Schmetz C., Muller G., Peters D. Duovirus (Rotavirus) in Belem, State of Para, Brazil (preliminary report). (1977). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 19(4):278-9.

Linhares A.C., Gabbay Y.B., Freitas R.B., Travassos Da Rosa E.S., Mascarenhas J.D.P., Loureiro E.C.B. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. (1989). *Epidemiol Infect*. 102(1):129-45.

Lu X., McDonald S.M., Tortorici M.A., Tao Y.J., Vasquez-Del Carpio R., Nibert M.L., *et al*. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. (2008). *Structure*. 16(11):1678-88.

Lucchelli A.; Lance S.E.; Bartlett P.B., *et al*. Prevalence of bovine group A bovine rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. (1992). *Am. J. Vet. Res.*, v.53, p.169-179.

Ludert J. E., Feng N., Yu J. H., Broome R. L., Hoshino Y., Greenberg H. B. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. (1996). *J Virol*. 70, 487-493.

Martella V., Ciarlet M., Pratelli A., Arista S., Terio V., Elia G., Cavalli A., Gentile M., Decaro N., Greco G., Cafiero M.A., Tempesta M., Buonavoglia C. Molecular analysis of the VP7, VP4, VP6, NSP4, and NSP5/6 genes of a buffalo rotavirus strain: identification of the rare P[3] rhesus rotavirus-like VP4 gene allele. (2003). *J. Clin. Microbiol*. 41 (12), 5665-5675.

Martini I.J., Gennari G.M., Martins S.S., Gouvêa V.S., Gatti M.S. Changing distribution of human rotavirus serotypes during two epidemic outbreaks of gastroenteritis in Campinas, São Paulo, Brazil, 2003-2004: detection of G6 strains. (2008). *J Clin Virol*. Oct; 43(2): 244-6.

Mascarenhas J.D.P., Linhares A.C., Gabbay Y.B., Freitas R.B., Mendez E., López S., *et al*. Naturally occurring serotype 2/ subgroup II rotavirus reassortants in Northern Brazil. (1989). *Virus Res*. 14(3):235-40.

Mascarenhas J.D.P., Paiva F.L., Barardi C.R.M., Gabbay Y.B., Simões C.O., Linhares A.C. Rotavirus G and P types in children from Belém, Northern Brasil, as determined by RT-PCR: Occurrence of mixed P type infections. (1998). *J Diarrhoeal Dis Res.* 16(1):8-14.

Mascarenhas J.D.P., Leite J.P., Gabbay Y.B., Freitas R.B., Oliveira C.S., Monteiro T.A., *et al.* Rotavirus G serotypes and P[G] genotypes identified in cases of reinfection among children participating in a trial with rhesus-human reassortant tetravalent vaccine (RRV-TV) in Belem, Brazil. (2002). *J Trop Pediatr.* 48(2):93-7.

Mascarenhas J. D., Linhares A. C., Gabbay Y. B., Lima C. S., Guerra Sde F., Soares L. S., Oliveira D. S., Lima J. C., Macedo O., Leite J. P. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belem, Brazil. (2007). *Virus Res.* 126(1-2), 149-58.

Matsuno, S., Hasegawa, A., Kalica, A. R. & Kono, R. Isolation of a recombinant between simian and bovine rotaviruses. (1980). *J Gen Virol* 48, 253-256.

Matthijnssens J, Rahman M, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Kabue JP, Muyembe JJ, Van Ranst M. G8 rotavirus strains isolated in the Democratic Republic of Congo belong to the DS-1-like genogroup. (2006). *J Clin Microbiol.* May;44(5):1801-9.

Matthijnssens J., Ciarlet M., Heiman E., Arijs I., Delbeke T., McDonald S. M., Palombo E. A., Iturriza-Gomara M., Maes P., Patton J. T., Rahman M., Van Ranst M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. (2008a). *J Virol.* 82, 3204-3219.

Matthijnssens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Banyai K., Estes M. K., Gentsch J. R., Iturriza-Gomara M., Kirkwood C. D., Martella V., Mertens P. P., Nakagomi O., Patton J. T., Ruggeri F. M., Saif L. J., Santos N., Steyer A., Taniguchi K., Desselberger U., Van Ranst M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. (2008b). *Arch Virol.* 153, 1621-1629.

McNulty M.S. Rotaviruses. (1978). *J Gen Virol.* Jul;40(1):1-18. Review.

Mertens P. The dsRNA viruses. (2004). *Virus Res.* 101, 3-13.

Min B.S., Noh Y.J., Shin J.H., Baek S.Y., Kim J.O., Min K.I., Ryu S.R., Kim B.G., Kim D.K., Lee S.H., Min H.K., Ahn B.Y., Park S.N. Surveillance study (2000 to 2001) of G- and P-type human rotaviruses circulating in South Korea. (2004). *J. Clin. Microbiol.* 42 (9), 4297-4299.

Ministerio da Saúde. [on line]. Brasil. [capturado 10 set. 2007]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defctohtm.exe?idb2006/c07.def>.

Mohan K. V. K. & Atreya C. D. Comparative sequence analysis identified mutations outside the NSP4 cytotoxic domain of tissue culture-adapted ATCC-Wa strain of human rotavirus and a novel inter-species variable domain in its C-terminus. (2000). *Arch Virol.* 145, 1789–1799.

Monnier N., Higo-Moriguchi K., Sun Z.Y., Prasad B.V., Taniguchi K., Dormitzer P.R. High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. Harvard College, Cambridge, MA 02138, USA.

Montenegro F.M., Correia J.B., Rodrigues Falbo A., Dove W., Nakagomi T., Nakagomi O., Cuevas L.E., Cunliffe N.A., Hart C.A. Anticipating rotavirus vaccines in Brazil: detection and molecular characterization of emerging rotavirus serotypes G8 and G9 among children with diarrhoea in Recife, Brazil. (2007). *J Med Virol.* Mar;79(3):335-40.

Mori Y., Borgan M. A., Ito N., Sugiyama M., Minamoto N. Diarrhea-inducing activity of avian rotavirus NSP4 glycoproteins, which differ greatly from mammalian rotavirus NSP4 glycoproteins in deduced amino acid sequence in suckling mice. (2002). *J Virol* 76(11), 5829-34.

Moulton L. H., Staat M. A., Santosham M., Ward R. L. The protective effectiveness of natural rotavirus infection in an American Indian population. (1998). *J Infect Dis* 178(6), 1562-6.

Mulherin E., Bryan J., Beltman M., O'Grady L., Pidgeon E., Garon L., Lloyd A., Bainbridge J., O'Shea H., Whyte P., Fanning S. Molecular characterisation of a bovine-like rotavirus detected from a giraffe. (2008). *BMC Veterinary Research.* 4:46doi:10.1186/1746-6148-4-46.

Murphy T. V., Gargiullo P. M., Massoudi M. S., Nelson D. B., Jumaan A. O., Okoro C. A., Zanardi L. R., Setia S., Fair E., LeBaron C. W., Wharton M., Livengood J. R. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. (2001). *N Engl J Med.* 344, 564-572.

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

Nakagomi T., Cuevas L.E., Gurgel R.G., Elrokhsi S.H., Belkhir Y.A., Abugalia M., Dove W., Montenegro F.M., Correia J.B., Nakagomi O., Cunliffe N.A., Hart C.A. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. (2008). *Arch Virol.* 153(3):591-3.

Nakagomi T. & Nakagomi O. A critical review on a globally-licensed, live, orally-administrable, monovalent human rotavirus vaccine: Rotarix. (2009). *Expert Opin Biol Ther.* Aug;9(8):1073-86.

Offit P.A. & Blavat G. Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. (1986). *J Virol.* 57(1):376-8.

Otto T.D., Vasconcellos E.A., Gomes L.H., Moreira A.S., Degraeve W.M., Mendonca-Lima L., *et al.* ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. (2008). *Genet Mol Res.* 7(3):861-71.

Page N.A. & Steele A.D. Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains from the African continent. (2004). *J. Clin. Microbiol.* 42 (2), 595-600.

Pager C.T., Alexander J.J., Steele A.D. South African G4P[6] asymptomatic and symptomatic neonatal rotavirus strains differ in their NSP4, VP8*, and VP7 genes. (2000). *J Med Virol.* 62(2):208-16.

Palombo E.A., Bishop R.F., Cotton R.G. Intra- and inter-season genetic variability in the VP7 gene of serotype 1 (monotype 1 a) rotavirus clinical isolates. (1993). *Arch Virol.* 130(1-2):57-69.

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

Parashar U.D., Hummelman E.G., Bresee J.S., Miller M.A., Glass R.I., Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. (2003). *Emerg. Infect. Dis.* 9, 565–572.

Parashar U. D., Gibson C. J., Bresse J. S., Glass R. I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. (2006). *Emerg Infect Dis.* 12, 304-306.

Patel M.M., de Oliveira L.H., Bispo A.M., Gentsch J., Parashar U.D. Rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. (2008). *Emerg Infect Dis* 14: 863-865.

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

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

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

Paul S.K., Kobayashi N., Nagashima S., Ishino M., Watanabe S., Alam M.M., Ahmed M.U., Hossain M.A., Naik T.N. Phylogenetic analysis of rotaviruses with genotypes G1, G2, G9 and G12 in Bangladesh: evidence for a close relationship between rotaviruses from children and adults. (2008). *Arch. Virol.* 153 (11), 1999-2012.

Pedley S., Hundley F., Chrystie I., McCrae M. A., Desselberger U. The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. (1984). *J Gen Virol* 65 (Pt 7), 1141-1150.

Pereira H.G., Azeredo R.S., Leite J.P.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. (1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 78(4): 483-490.

Pereira H.G., Azeredo R.S., Leite J.P., Andrade Z.P., de Castro L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). (1985). *J Virol Methods*. 10(1):21-28.

Pereira H.G., Linhares A.C., Candeias J.A., Glass R.I. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. (1993). *Bull Pan Am Health Organ*. 27(3):224-233.

Perez-Vargas J., Isa P., Lopez S., Arias C. F. Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits. (2006). *Arch Med Res* 37, 1-10.

Phan T. G., Okitsu S., Maneekarn N., Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. (2007). *Infect Genet Evol* 7, 656-663.

Phua K.B., Lim F.S., Lau Y.L., Nelson E.A., Huang L.M., Quak S.H., Lee B.W., Teoh Y.L., Tang H., Boudville I., Oostvogels L.C., Suryakiran P.V., Smolenov I.V., Han H.H., Bock H.L. Safety and efficacy of human rotavirus vaccine during the first 2 years of life in Asian infants: Randomised, double-blind, controlled study. (2009). *Vaccine*. Aug 10.

Piec T.L. & Palombo E.A. Sequence comparison of the VP7 of serotype G2 rotaviruses from diverse geographical locations. (1998). *DNA Seq*. 9 (5-6), 369-373.

Pietruchinski E., Benati F., Lauretti F., Kisielius J., Ueda M., Volotão E.M., Soares C.C., Hoshino Y., Linhares R.E., Nozawa C., Santos N. 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. (2006). *J Med Virol*. Sep;78(9):1241-9.

Pongsuwanna Y., Guntapong R., Chiwakul M., Tacharoenmuang R., Onvimala N., Wakuda M., Kobayashi N., Taniguchi K. Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. (2002). *J Clin Microbiol*. Apr;40(4):1390-4.

Proceedings of the National Academy of Sciences. [online] www.pnas.org [capturado 24 agosto. 2009]. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/98/4.cover-expansion>

Rahman M., Sultana R., Ahmed G., Nahar S., Hassan Z.M., Saiada F., Podder G., Faruque A.S., Siddique A.K., Sack D.A., Matthijnssens J., Van Ranst M., Azim T. Prevalence of G2P[4] and G12P[6] rotavirus, Bangladesh. (2007). *Emerg Infect Dis*. 13: 18-24.

- Ramig R.F. Genetics of the rotaviruses. (1997). *Annu Rev Microbiol.* 51:225-55.
- Ruiz-Palacios G. M., Perez-Schael I., Velazquez F. R., Abate H., Breuer T., Clemens S. C., Cheuvart B., Espinoza F., Gillard P., Innis B. L., Cervantes Y., Linhares A. C., *et al.* Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. (2006). *N Engl J Med.* 354, 11-22.
- Salinas B., Perez Schael I., Linhares A. C., Ruiz Palacios G. M., Guerrero M. L., Yarzabal J. P., Cervantes Y., Costa Clemens S., Damaso S., Hardt K., De Vos B. Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. (2005). *Pediatr Infect Dis. J* 24, 807-816.
- Samajdar S., Ghosh S., Naik T.N., Roy S., Sugunan A.P. The post-tsunami outbreak of diarrhoeal diseases in Car Nicobar Island, India, was caused by human group A rotavirus G2 strains. (2008). *J. Infect.* 57 (4), 357-359.
- Santos N., Lima R.C., Pereira C.F., Gouvea V. Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. (1998). *J Clin Microbiol.* 36:2727–2729.
- Santos N. & Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. (2005). *Rev Med Virol* 15, 29-56.
- Santos N., Volotao E. M., Soares C. C., Campos G. S., Sardi S. I., Hoshino Y. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. (2005). *J Clin Microbiol.* 43, 4064-4069.
- Santosham M., Moulton L.H., Reid R., Croll J., Weatherholt R., Ward R., Forro J., Zito E., Mack M., Brennen G., Davidson B.L. Efficacy and safety of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccine in Native American populations. (1997). *J Pediatr.* Oct;131(4):632-8.

- Sattar S.A., Lloyd-Evans N., Springthorpe V.S., Nair R.C. Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. (1986). *J Hyg (Lond)*. Apr;96(2):277-89.
- Scott S.A., Holloway G., Coulson B.S., Szyzew A.J., Kiefel M.J., von Itzstein M., Blanchard H. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the sialic acid-binding domain (VP8*) of porcine rotavirus strain CRW-8. (2005). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. Jun 1;61(Pt 6):617-20.
- Sharma S., Ray P., Gentsch J.R., Glass R.I., Kalra V., Bhan M.K. Emergence of G12 rotavirus strains in Delhi, India, in 2000 to 2007. (2008). *J Clin Microbiol*. Apr;46(4):1343-8.
- Silva R.R.; Barros D.M.; Souza R.K.A., *et al.* Pesquisa de rotavírus em bezerros bovinos no município de Igarapé- açu (PA). (2001). *Rev. Cienc. Agrar*. 36, p.121-129.
- Solberg O.D., Hasing M.E., Trueba G., Eisenberg J.N. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. (2009) *Virology*. Mar 1;385(1):58-67.
- Steyer A., Poljsak-Prijatelj M., Bufon T.L., Marcun-Varda N., Marin J. Rotavirus genotypes in Slovenia: unexpected detection of G8P[8] and G12P[8] genotypes. (2007). *J Med Virol*. May;79(5):626-32.
- Subodh S., Bhan M. K., Ray P. Genetic characterization of VP3 gene of group A rotaviruses. (2006). *Virus Genes*. 33(2), 143-5.
- Tamura K., Dudley J., NeiM., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. (2007). *Mol Biol Evol*. 24, 1596-1599.
- Taniguchi K., Urasawa T., Urasawa S. Species specificity and interspecies relatedness in VP4 genotypes demonstrated by VP4 sequence analysis of equine, feline, and canine rotavirus strains. (1994). *Virology*. 200(2), 390-400.
- Taniguchi K. & Urasawa S. Diversity in rotavirus genomes. (1995). *Seminars in Virology* 6, 123 - 131.

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

Taylor J. A. & Bellamy A. R. *Interaction of the rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 with the viral and cellular components.* (2003). Amsterdam: Elsevier Science.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. (1994). *Nucleic Acids Res.* Nov 11;22(22):4673-80.

Thongprachum A., Khamrin P., Saekhow P., Pantip C., Peerakome S., Ushijima H., Maneekarn N. Analysis of the VP6 gene of human and porcine group A rotavirus strains with unusual subgroup specificities. (2009). *J. Med. Virol.* 81 (1), 183-191.

Tian P., Estes M. K., Hu Y., Ball J. M., Zeng C. Q., Schilling W. P. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum. (1995). *J Virol* 69, 5763-5772.

Timenetsky M.C., Santos N., Gouvea V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. (1994). *J Clin Microbiol.* 32(10):2622-4.

Timenetsky M.C., Gouvea V., Santos N., Alge M.E., Kisiellius J.J., Carmona R.C. Outbreak of severe gastroenteritis in adults and children associated with type G2 rotavirus. Study Group on Diarrhea of the Instituto Adolfo Lutz. (1996). *J Diarrhoeal Dis Res.* Jun;14(2):71-4.

Timenetsky M.C., Gouvea V., Santos N., Carmona R. C., Hoshino Y. A novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. (1997). *J Gen Virol.* 78 (Pt 6), 1373-1378.

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

Ursu K., Kisfali P., Rigó D., Ivanics E., Erdélyi K., Dán A., Melegh B., Martella V., Bányai

K. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. (2009). *Arch Virol.* 154(8):1365-9.

Velazquez F. R., Matson D. O., Calva J. J., Guerrero L., Morrow A. L., Carter-Campbell S., Glass R. I., Estes M. K., Pickering, L. K., Ruiz-Palacios, G. M. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. (1996). *N Engl J Med.* 335(14), 1022-8.

Vesikari T., Isolauri E., Delem A., D'hondt E., Andre F.E., Beards G.M., *et al.* Clinical efficacy of the RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine in infants vaccinated before a rotavirus epidemic. (1985). *J Pediatr.* 107(2):189-94.

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

Vesikari T., Karvonen A., Puustinen L., Zeng S.Q., Szakal E.D., Delem A., *et al.* Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in Finnish infants. (2004). *Pediatr Infect Dis J.* 23(10):937-43.

Vesikari T., Clark H. F., Offit P. A., Dallas M. J., DiStefano D. J., Goveia M. G., Ward R. L., Schodel F., Karvonen A., Drummond J. E., DiNubile M. J., Heaton P. M. Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants. (2006). *Vaccine.* 24(22), 4821-9.

Volotão E.M., Soares C.C., Maranhão A.G., Rocha L.N., Hoshino Y., Santos N. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro- Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. (2006.). *J Med Virol.* 78: 263-272.

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

Wentz M. J., Patton J. T., Ramig R. F. The 3' terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. (1996). *Journal of Virology*, v.70, p.7833-7841.

Wilhelmi I., Roman E., Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. (2003). *Clin Microbiol Infect.* 9(4):247-62.

World Health Organization [online]. 2005. World Health Report 2005. [capturado 20 agosto. 2009]. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2005/en/>.

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

Zao C.L., Yu W.N., Kao C.L., Taniguchi K., Lee C.Y., Lee C.N. Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. (1999). *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 6), 1407-1415.

Zarate S., Espinosa R., Romero P., Mendez E., Arias C. F., Lopez S. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. (2000). *J Virol.* 74, 593-599.