



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

YASMIN NASCIMENTO FARIAS

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES QUE CODIFICAM PARA PROTEÍNAS
ESTRUTURAIS E NÃO ESTRUTURAIS DE ROTAVÍRUS A DETECTADOS NA REGIÃO
NORTE DO BRASIL, ANTES E APÓS A INTRODUÇÃO DA VACINA ROTARIX®**

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

Orientador:

Dr. José Paulo Gagliardi Leite

RIO DE JANEIRO

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

F224 Farias, Yasmin Nascimento

Análise filogenética dos genes que codificam para proteínas estruturais e não estruturais de rotavírus detectados na região norte do Brasil, antes e após a introdução da vacina Rotarix®. / Yasmin Nascimento Farias. – Rio de Janeiro, 2013.

xix, 108 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2013.
Bibliografia: f. 91-107

1. Rotavírus. 2. Caracterização. 3. Região Norte. 4. Rotarix. I. Título.

CDD 616.33



Ministério de Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: *Yasmin Nascimento Farias*

ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES QUE CODIFICAM PARA PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E NÃO ESTRUTURAIS DE ROTAVÍRUS A DETECTADOS NA REGIÃO NORTE DO BRASIL, ANTES E APÓS A INTRODUÇÃO DA VACINA ROTARIX®

ORIENTADOR:

Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Aprovada em: 04/03/2013

EXAMINADORES: Dr. Caroline Cordeiro Soares (FIOCRUZ) - Presidente

Dra. Marcelo Alves Pinto (FIOCRUZ)

Dra. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas (IEC)

Dra. Vanessa Salete de Paula (FIOCRUZ)

Dra. Debora Regina Lopes dos Santos (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 04 de março de 2013

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

*“É impossível progredir sem
mudanças, e aqueles que não
conseguem mudar suas mentes
não podem mudar nada.”*
(George Bernard Shaw)

Dedico este trabalho aos meus pais,
irmão e avós, pelo amor e apoio
incondicionais nesta etapa e em todos os
momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A vida nos oferece escolhas em muitos momentos e graças a Deus, mesmo optando fazer o Mestrado longe de familiares e amigos, pude concluir este trabalho e devo isso a muitas pessoas:

Aos meus pais, pelo apoio nesta nova etapa da minha vida tão importante. A distância doeu muitas vezes, mas sempre superei com a ajuda de vocês (e da inovação tecnológica). Mãe, nem as palavras mais bonitas do mundo conseguiriam expressar o meu amor e gratidão por você!

Ao meu irmão, Igor Farias, que sempre se preocupou comigo e me incentiva a trilhar ainda mais esse caminho.

Aos meus avós, que formam a minha base, meus maiores exemplos e a torcida mais incentivadora. Minha gratidão será eterna! Muito obrigada por fazerem parte da concretização de tantos sonhos!

Ao Diego, pelo amor, paciência, carinho, cuidado e companheirismo em todas as fases dessa jornada. Você me ajudou a tornar tudo mais leve. Obrigada por me arrancar sorrisos mesmo naqueles momentos tensos, estressantes ou tristes. É muito bom saber o quanto posso contar com você.

Ao meu orientador, Dr. José Paulo Gagliardi Leite, por ter aceitado me orientar e confiar no meu trabalho; por sempre estar à disposição quando precisei e juntos buscarmos soluções para alguns dos obstáculos que surgiram no caminho. E também por se preocupar com todos que lhe rodeiam, inclusive eu.

A Dra. Joana D'Arc Mascarenhas e Dra. Luana Soares, pesquisadoras do IEC e fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigada por contar com vocês em todos os momentos que foram necessários.

A toda equipe e colegas do LVCA! Por terem me recebido e guiado tão bem no início no Laboratório. Pela convivência, companhia, conversas e ajuda, não tenho o que reclamar do suporte que recebi. Não citarei nomes para não esquecer ninguém...absolutamente, TODOS foram importantes para a realização deste trabalho, desde aquela pessoa que eu me comunicava pouco, mas sei que sem sua cooperação o laboratório não funcionaria...até aquelas que a amizade extrapola o ambiente de trabalho.

A todos os amigos que fiz e sempre recordarei da sala B201. Foram tantos momentos e tantas pessoas que passaram por esta sala, os dias se tornavam mais leves

pela presença e companhia de todos. Foram muitos momentos compartilhados: alegrias, tristezas, despedidas, estudos, conselhos, trocas de ideias, lanches, enfim, é muito bom lembrar que nesse período estive perto de pessoas do bem e que me fizeram muito bem.

A equipe da Seção de Virologia, em nome do Dr. Alexandre Linhares e ao grupo do Laboratório de Rotavírus do IEC, que cederam gentilmente as amostras utilizadas neste estudo. Além de terem participado de algumas fases dos experimentos, as quais foram fundamentais.

Aos meus colegas de turma do mestrado em Biologia Parasitária, em especial Yasmine e Juliana, que me apresentaram ao “ambiente do HPP” e com as quais pude contar sempre, tanto em disciplinas, estudos, experimentos, quanto nos muito bem aproveitados momentos de descontração.

Aos meus queridos amigos de Belém, que mesmo de longe, sempre me passaram boas energias e se preocupavam comigo. E aqueles amigos que vieram morar no Rio, cujas presenças se tornaram de extrema importância para mim, pois trouxeram mais alegria em minha estadia e passei a contar com mais pessoas.

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

À toda equipe da Plataforma de sequenciamento (PDTIS) da FIOCRUZ, em especial Aline, Renata e Vivian. Agradeço todo o trabalho e atenção dispensada meninas.

Aos professores das disciplinas do curso de mestrado em Biologia Parasitária.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma auxiliaram neste trabalho, mas que não foram aqui citados diretamente.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Gastroenterite aguda de etiologia viral	1
1.2. Os Rotavírus	3
1.2.1. Histórico	3
1.2.2. Estrutura e classificação dos rotavírus da espécie A	4
1.2.3. Nova classificação genômica dos rotavírus A da espécie A	6
1.2.4. Proteínas estruturais	8
1.2.4.1. Proteínas do core viral (VP1, VP2 e VP3)	8
1.2.4.2. Proteína da camada intermediária (VP6)	9
1.2.4.3. Proteínas da cama externa (VP4 e VP7)	10
1.2.5. Proteínas não estruturais	12
1.2.5.1. NSP1	12
1.2.5.2. NSP2 e NSP5	13
1.2.5.3. NSP3	13
1.2.5.4. NSP4	14
1.2.5.5. NSP6	15
1.2.6. Biossíntese viral	15
1.2.7. Dinâmica evolutiva dos rotavírus da espécie A	17
1.2.8. Epidemiologia dos rotavírus da espécie A	18
1.2.8.1. Distribuição dos genótipos de rotavírus da espécie A no mundo	20
1.2.8.2. Distribuição dos rotavírus da espécie A no Brasil	21
1.2.9. Prevenção e controle dos dos rotavírus da espécie A	23
1.2.10. Aspectos zoonóticos dos dos rotavírus da espécie A	24

2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Espécimes clínicos	27
4.2. Suspensão fecal	27
4.3. Extração do genoma viral	27
4.4. Síntese de DNA complementar (cDNA)	28
4.5. Amplificação dos genes que codificam para VPs e NSP4 (RT-PCR).....	29
4.6. Amplificação dos genes que codificam para NSPs e VP7 (<i>One Step</i> PCR)	30
4.7. Análise dos amplicons por eletroforese em gel	32
4.8. Purificação dos produtos de PCR	32
4.9. Sequenciamento dos genes amplificados	32
4.10. Análise das sequências	34
5. RESULTADOS	38
5.1. Amplificações dos genes estruturais e não estruturais pela PCR	38
5.2. Genotipagem dos 11 genes de rotavírus da espécie A.....	39
5.3. Análise filogenética	41
5.3.1. Análise do gene VP7	41
5.3.1.1. Genótipo G1	41
5.3.1.2. Genótipos G2, G3, G4, G9 e G12	45
5.3.2. Análise do gene VP4	48
5.3.2.1. Genótipo P[8]	48

5.3.2.2. Genótipos P[4], P[6], P[8] e P[9].....	52
5.3.3. Análise dos genes VP1, VP2 e VP3.....	55
5.3.4. Análise do gene VP6	60
5.3.5. Análise dos genes NSP1, NSP2 e NSP3	63
5.3.6. Análise dos genes NSP4 e NSP5	68
5.4. Constelação gênica baseada em código de cores	74
6. DISCUSSÃO	75
6.1. Variabilidade genética dos rotavírus da espécie A na Região Norte do Brasil	76
6.1.1. Estirpes G1P[8]	77
6.1.2. Estirpes G2P[4]	80
6.1.3. Estirpes G3P[8] e G3P[9]	82
6.1.4. Estirpes G4P[6] e G4P[8]	84
6.1.5. Estirpes G9P[8]	85
6.1.6. Estirpes G12P[6]	87
6.1.7. Mecanismos evolutivos observados nos RVA circulantes na região Norte	88
7. CONCLUSÃO	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A – Adenina, base nitrogenada.

aa – Aminoácido

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

C – Citosina, base nitrogenada.

Ca²⁺ – Íon cálcio

cDNA – DNA complementar

Cl²⁻ – Íon cloro

dATP – Desoxiadenosina trifosfato

dCTP – Desoxicitidina trifosfato

dGTP – Desoxiguanosina trifosfato

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

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dTTP – Desoxitimidina trifosfato

dXTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

EGPA – Eletroforese em gel de poliacrilamida

EIA – Ensaio imunoenzimático

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – Grama

G – Guanina, base nitrogenada.

GA – Gastroenterite Aguda

H₂O – Água

HCl – Ácido clorídrico

IME – Imunomicroscopia eletrônica

INF – Interferon

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IEC – Instituto Evandro Chagas

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

LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

M – Molar

MLP – Monofosforil lipídeo.

ME – Microscopia eletrônica

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

mM – Milimolar

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 Celsius

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

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

pb – Pares de bases

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

PNI – Programa Nacional de Imunização

RCWG – *Rotavirus Classification Work Group*

RE – Retículo endoplasmático

RER- Retículo endoplasmático rugoso

RNA – Ácido ribonucléico

RNA (-) – RNA de polaridade negativa

RNA (+) – RNA de polaridade positiva

RNA_{df} – RNA dupla fita

RNA_m – RNA mensageiro

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

RVA – rotavírus da espécie A

T – Timina, base nitrogenada

TBE – Tris-Borato-EDTA

TRO – Terapia de reidratação oral

Tris – Hidroximetil-tris-aminometano

U/μL – Unidades por microlitro

UNICEF – Fundo das Nações Unidas para Infância

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

μg/mL – Microgramas por mililitro

μL – Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Causas de mortalidade infantil no mundo	1
Figura 2. Reconstrução tridimensional da partícula de rotavírus e esquema estrutural do material genômico.	4
Figura 3. Eletroferotipos característicos das diferentes espécies de rotavírus.....	5
Figura 4. Constelação genotípica observada nos três principais genogrupos de RVA circulantes entre a espécie humana.....	7
Figura 5. Projeção em três dimensões da interação de VP6 com VP2 e VP1 associada a VP3.....	9
Figura 6. Aspectos estruturais da proteína VP4 de RVA.	10
Figura 7. Aspectos estruturais da proteína VP7 de RVA.....	11
Figura 8. Esquema da biossíntese dos rotavírus	16
Figura 9. Esquema representativo de um evento de recombinação e <i>reassortment</i>	18
Figura 10. Estimativa da incidência de mortes por rotavírus da espécie A em crianças ≤ 5 anos de idade.	20
Figura 11. Distribuição de genótipos de rotavírus espécie A reportados pela OMS em 2010	21
Figura 12. Distribuição dos genótipos de rotavírus da espécie A no Brasil.....	22
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para os genes VP1, VP6 e VP7	38
Figura 14. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética do gene VP7 de espécimes G1P[8]	43
Figura 15. Alinhamento das sequências aminoacídicas parciais da proteína VP7 de espécimes G1P[8]	44
Figura 16. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética do gene VP7.....	47
Figura 17. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética do gene VP4 de espécimes G1P[8]	50
Figura 18. Alinhamento das sequências aminoacídicas parciais da proteína VP4 de espécimes G1P[8]	51
Figura 19. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética do gene VP4.....	54
Figura 20. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética do gene VP1.....	57
Figura 21. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética do gene VP2.....	58
Figura 22. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética do gene VP3.....	59

Figura 23. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética do gene VP6.....	62
Figura 24. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética do gene NSP1	65
Figura 25. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética do gene NSP2	66
Figura 26. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética do gene NSP3.	67
Figura 27. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética do gene NSP4	70
Figura 28. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética do gene NSP5	71
Figura 29. Alinhamento das sequências aminoacídicas parciais da proteína NSP4	72
Figura 30. Alinhamento das sequências aminoacídicas parciais da proteína NSP5.....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Espécimes fecais oriundos da Região Norte analisadas no estudo.....	29
Quadro 2. Mistura de reagentes utilizados na RT-PCR.....	30
Quadro 3. Reagentes utilizados na amplificação dos genes VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 VP7 e NSP4.	31
Quadro 4. Descrição dos <i>primers</i> utilizados na PCR e sequenciamento.....	32
Quadro 5. Reagentes utilizados para amplificação dos genes VP7 e NSPs.....	33
Quadro 6. Números de acessos no <i>GenBank</i> das amostras utilizadas no estudo comparativo.....	36
Quadro 7. Classificação genotípica com nos 11 segmentos gênicos.	40
Quadro 8. Substituições aminoacídicas observadas no alinhamento das sequências do gene VP7.....	48
Quadro 9. Substituições aminoacídicas observadas no alinhamento das sequências do gene VP4(VP8*)	55
Quadro 10. Substituições aminoacídicas observadas no alinhamento das sequências nos genes VP1, VP2 e VP3.....	60
Quadro 11. Substituições aminoacídicas observadas no alinhamento das sequências dos genes genes NSP1, NSP2 e NSP3.....	68
Quadro 12. Constelações gênicas baseada em código de cores	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de corte de identidade nucleotídica para genotipagem	6
Tabela 2. Distribuição de genótipos G e P nos diferentes continentes em 2005	20
Tabela 3. Descrição dos 20 aminoácidos codificados naturalmente e suas abreviações....	37
Tabela 4. Identidade nucleotídica e aminoacídica para o gene VP7 dos espécimes G1P[8].....	43
Tabela 5. Identidade nucleotídica e aminoacídica para o gene VP4 dos espécimes G1P[8]	50
Tabela 6. Alinhamento dos resíduos das sequências aminoacídicas do gene VP6	61



Ministério de Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Análise filogenética dos genes que codificam para proteínas estruturais e não estruturais de rotavírus A detectados na região Norte do Brasil, antes e após a introdução da vacina Rotarix®

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Yasmin Nascimento Farias

Os rotavírus da espécie A (RVA) são os principais responsáveis pela gastroenterite aguda (GA) em diversas espécies animais. Em humanos, as crianças ≤ 5 anos de idade são as mais afetadas. Cerca de 453.000 mortes infantis são causadas pela infecção por RVA, anualmente. Devido a este impacto na saúde pública algumas medidas de controle e prevenção foram estabelecidas: no Brasil, em março de 2006 foi introduzida uma vacina monovalente (G1P[8]) atenuada contra RVA, denominada Rotarix®. Segundo a Organização Mundial da Saúde, é necessário uma extensa e contínua monitorização dos genótipos circulantes de RVA, além de estudos de vigilância para que se possa avaliar os impactos da vacina, sua eficácia e o surgimento de novas variantes virais que possivelmente possam escapar do processo de imunização. Para uma melhor caracterização e entedimento da diversidade genética dos RVA, foi proposto um novo sistema de classificação baseada na análise dos 11 segmentos gênicos, no qual os genótipos de cada um dos segmentos devem ser caracterizados. Esta abordagem está fornecendo dados para apoiar a existência de três genogrupos dominantes entre humanos: *Wa-like* (I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1), *DS1-like* (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) e *AU1-like* ((G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3), sendo este último menor e compartilhado por estirpes de origem felina/canina. No Brasil, trabalhos envolvendo a caracterização de todos os segmentos gênicos são escassos. No presente estudo foram selecionadas 40 espécimes fecais entre 1994-2012 de crianças hospitalizadas devido a GA causada por RVA G1, G2, G3, G4, G9 e G12, na região Norte do Brasil. A principal finalidade do estudo foi avaliar a diversidade genética dos RVA circulantes antes e depois da introdução da vacina Rotarix®. Para tal, os genes de RVA foram amplificados, sequenciados e analisados por reconstrução filogenética. Através desta análise foi possível identificar pelo menos três alelos subgênicos distintos para cada gene, permitindo evidenciar constelações genotípicas diferentes, porém conservadas relacionadas aos três principais genogrupos: *Wa-like*, *DS1-like* e *AU-like*, sendo que neste último, uma amostra (PID084) se relacionou com estirpes de origem felina. Foram evidenciados mecanismos de variabilidade genética viral, como: *reassortment* inter-genogrupos ocorrendo em amostras de origem humana e entre humana-animal; *reassortment* intra-genogrupos ocorrendo em cepas G1P[8], G2P[4], G4P[8] e G9P[8] e com genes de origem animal; e ainda mutações pontuais ocorrendo na sequência de todos os genes das estirpes analisadas. O maior grau de variabilidade genética foi encontrado em cepas circulantes antes da introdução da vacina. Com relação aos genes que codificam para proteínas externas, foi possível identificar mudanças em resíduos localizados em regiões antigênicas de estirpes circulantes nos dois períodos, podendo refletir em modificações estruturais importantes na proteína. Os dados do presente estudo contribuem para uma melhor compreensão acerca da diversidade genética dos RVA e de seus mecanismos evolutivos, sendo um dos poucos trabalhos sobre a caracterização dos 11 segmentos gênicos de estirpes circulantes na Região Norte, contribuindo para esclarecer características que podem representar um desafio para o Programa Nacional de Imunização no Brasil.



Ministério de Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Análise filogenética dos genes que codificam para proteínas estruturais e não estruturais de rotavírus A detectados na região Norte do Brasil, antes e após a introdução da vacina Rotarix®

ABSTRACT
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Yasmin Nascimento Farias

Specie A Rotaviruses (RVA) are responsible for acute gastroenteritis (GA) in many animal species. In humans, children under five years old are the most affected. Each year, about 453,000 infant deaths are caused by RV infections. Due to this public health impact, prevention and control measures were established: in March 2006, the Brazilian Health Ministry made available an monovalent attenuated vaccine, called Rotarix®. According to World Health Organization, extensive and continuous monitoring of RVA strains and surveillance studies are necessary to evaluate the impact and efficacy vaccine and to investigate appearance of new viral variants that could possibly escape the immunization procedure. For a better characterization and understanding of the RVA genetic diversity, proposed a new classification system encompassing all 11 RVA gene segments. This approach has facilitated the exponential growth of complete RVA genome data during recent years. On the basis of complete RVA genome sequence comparisons, two major genotype constellations (genogroups): I1-R1-C1-M1- A1-N1-T1-E1-H1 (Wa-like) and I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 (DS1-like), have been shown to circulate worldwide among humans. A third (minor) human genotype constellation, referred to as AU1-like (I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3). In Brazil, studies involving the characterization of all genes segments are rare. In the current study, a total of 40 fecal specimens were selected between 1994 and 2011 from children hospitalized due to acute diarrhea caused by RVA G1, G2, G3, G4, G9 and G12 in Northern Brazil region, aiming to evaluate the RVA genetic diversity in the pre-vaccine period and post-vaccine. For this, the RVA genes were amplified, the amplicons were sequenced and analyzed for phylogenetic reconstruction. Based this analysis were identified three subgenotype alleles for each gene, allowing evidence conserved genotypic constellations, though related to three distinct genogroups: Wa-like, DS1-like e AU-like. AU1-like strain (PID084) revealed close relationship with genes feline origin. The results also show evidence some genetic variability mechanisms: intergenogroup reassortments events occurring between human-human and human-animal genes ; intragenogroup reassortment events in G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[6], G4P[8] RVA strains between human-human and human-animal gene, newly; and still occurring point mutations in the sequences of all genes of strains analyzed. A large degree of variability has been found in circulating strains before vaccine introduction. Regarding genes encoding foreign proteins, it was possible to identify changes in residues located in antigenic regions and may reflect significant changes in structural proteins. In conclusion, the current work help to increase the knowledge on the genomic diversity of RVA, aiming detect new variants and possible antigenic changes, whose potential effect on vaccine effectiveness should be studied. Additionally, our findings identified close relationships between human and animal RVA, contribute to clarify characteristics that can pose a challenge for the Brazilian National Immunization Program.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gastroenterite aguda de etiologia viral

A gastroenterite aguda (GA) compreende um grupo de manifestações clínicas, cujo sintoma comum é a presença de fezes em consistência diminuída associada ao aumento do número de evacuações e se caracteriza, no geral, por ser um quadro auto-limitado, com duração máxima de 15 dias. Pode vir acompanhada de outros sintomas, como: náusea, febre, vômito e dor abdominal. As formas variam desde as menos graves até as mais graves, com desidratação e distúrbios eletrolíticos, principalmente quando associada à desnutrição (UNICEF/WHO, 2009).

A GA na infância representa um problema significativo de saúde pública, particularmente em crianças na faixa etária de 0 a 5 anos de idade e que vivem em precárias condições sócio-econômicas (Parashar *et al*, 2006). Cerca de 85% das mortes por GA acontecem em crianças em seu primeiro ano de vida e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a GA representa a segunda maior causa de morbidade e mortalidade nesta faixa etária, anualmente (WHO, 2011) (**Figura 1**).

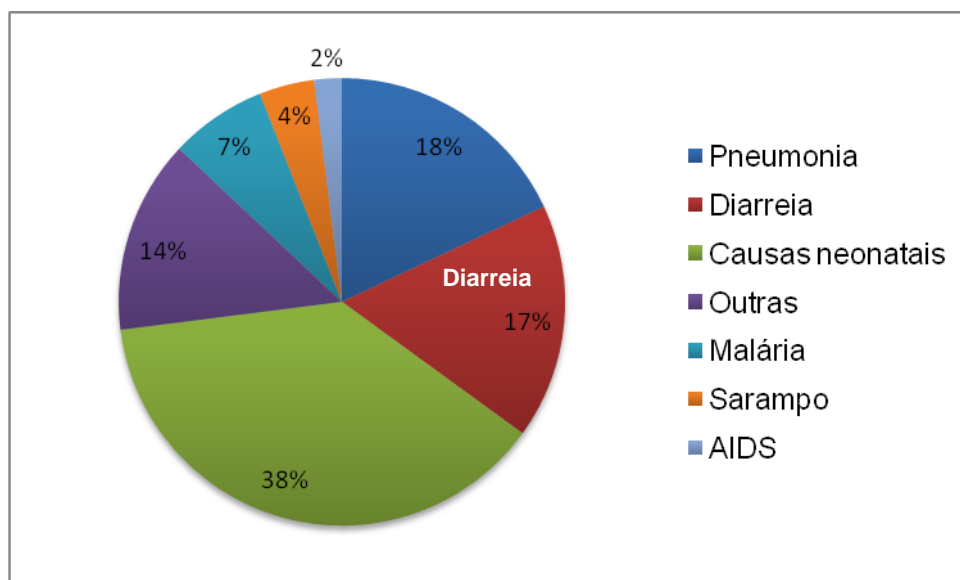


Figura 1. Causas de mortalidade infantil no mundo (Adaptada de WHO, 2011).

Na década de 1980, com o objetivo de reduzir o número de óbitos na infância, foram introduzidas em muitos países uma série de medidas, como: a Terapia de

Reidratação Oral (TRO), a implementação do uso de vitamina A, a melhoria das condições de saneamento e de acesso à água potável, assim como a implementação de programas de imunização. Tais medidas reduziram os casos de mortalidade associados à GA de 4,5 milhões para 1,3 milhão em 2008 (Black *et al*, 2010). Entretanto, este número é considerado inaceitável pela Organização das Nações Unidas (ONU), que estabeleceu como meta a redução de 2/3 dos casos de mortalidade associados à GA para o ano de 2015 (WHO, 2009). Com esta finalidade, a OMS juntamente com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) publicaram um guia, em 2009, visando a redução da morbidade e da mortalidade infantil por GA para que o objetivo da ONU seja alcançado (UNICEF/WHO, 2009).

A origem das GA pode ser infecciosa e não infecciosa. Para a saúde pública, a de maior importância é a infecciosa, devido a sua maior frequência. Dentre os agentes etiológicos associados à GA, destacam-se os vírus, que vêm contribuindo com elevadas taxas de hospitalizações e com altos índices de morbi-mortalidade. Os rotavírus (RV), os calicivírus humanos (norovírus e sapovírus), os adenovírus entéricos e os astrovírus são os principais agentes etiológicos desta patologia (UNICEF/OMS, 2009).

Os rotavírus da espécie A (RVA) são os principais agentes etiológicos da GA infantil e, anualmente, são responsáveis por aproximadamente 114 milhões de episódios de diarreia que resultam em cerca de 25 milhões de visitas ambulatoriais, dois milhões de hospitalizações e 453.000 mortes de crianças ≤ 5 anos de idade, principalmente na África, Ásia e América Latina (Chandran *et al*, 2010; Tate *et al*, 2012a). Isto reflete que, até os 5 anos de idade, virtualmente, todas as crianças experimentaram pelo menos um episódio de GA por RVA, uma a cada 5 foi atendida em ambulatórios e uma em 65 foi hospitalizada em decorrência de GA causada por RVA (Parashar *et al*, 2006).

Além de humanos, os RV podem infectar animais de várias espécies, incluindo mamíferos e aves (Estes & Kapikian, 2007; Müller & Johne, 2007). Embora possam infectar indivíduos de todas as faixas etárias, infecções sintomáticas, isto é, diarreias, geralmente ocorrem em indivíduos jovens, na faixa etária de seis meses a dois anos (Vranjac, 2004). O risco de morte por complicações da rotavirose aumenta

em casos de desnutrição e/ou em que o paciente encontra-se com o sistema imunológico debilitado (Palumbo *et al*, 2009).

A principal forma de transmissão da GA por RVA ocorre pela ingestão de alimentos e água contaminados, contato íntimo com pessoas infectadas ou com objetos que entraram em contato com o patógeno. O diagnóstico é feito pela análise clínica dos sintomas e exames laboratoriais. Em casos nos quais o vômito e/ou diarreia sejam persistentes é preconizada a reidratação intravenosa (UNICEF/WHO, 2009).

1.2 Os rotavírus

1.2.1 Histórico

Os primeiros achados associando os RV a processos de GA não bacteriana humana foram feitos em estudos utilizando microscopia eletrônica (ME), conduzidos por Bishop *et al* (1973) na cidade de Melbourne, Austrália. Inicialmente, estes vírus receberam a denominação de *Orbivirus-like agent* (Bishop *et al*, 1973), em seguida de *Reovirus-like agent* (Kapikian *et al*, 1974) e, considerando a visualização da dupla camada protéica (DLP), de Duovirus (Davidson *et al*, 1975).

Posteriormente, Flewett & Wood (1978) propuseram que estes constituíssem um novo gênero (*Rotavirus*), pertencente à família *Reoviridae*, devido ao aspecto semelhante a roda (do latim *rota*), quando a partícula viral é observada em contraste negativo pela ME.

No Brasil, os RV foram primeiramente identificados por Linhares *et al* (1977), ao associarem os achados do material fecal de crianças com GA a esses recém decritos vírus, na época. Desde então, vários estudos vêm demonstrando o impacto dos RV na etiologia da GA no país (Linhares *et al*, 1989; Pereira *et al*, 1993; Araújo *et al*, 2007a; Leite *et al*, 2008; Carvalho-Costa *et al*, 2011; Linhares *et al*, 2011).

1.2.2 Estrutura e classificação dos rotavírus

Os RV pertencem a família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, possuem a partícula viral íntegra (infecciosa) não envelopada, medindo aproximadamente 100 nm de diâmetro (espícula a espícula). É constituída por três camadas protéicas concêntricas, formada pelo core, que envolve o material genético, composto pelas proteínas VP1, VP2 e VP3; a proteína VP6 que compõe a camada intermediária e a camada externa constituída pelas proteínas VP4 e VP7 (Estes & Kapikian, 2007). **(Figura 2)**

O genoma viral é constituído por 11 segmentos de RNA dupla fita (RNA_{df}) com 18556 pares de bases (pb), os quais codificam para 12 proteínas, sendo seis estruturais (VP1-VP4, VP6 e VP7) e seis não estruturais (NSP1-NSP6) (Estes & Kapikian, 2007). Cada segmento genômico regula a síntese de uma proteína viral específica, com exceção das proteínas NSP5 e NSP6, que são codificadas pela região de sobreposição de um único segmento (Estes, 2001; Ramig, 2004) **(Figura 2)**.

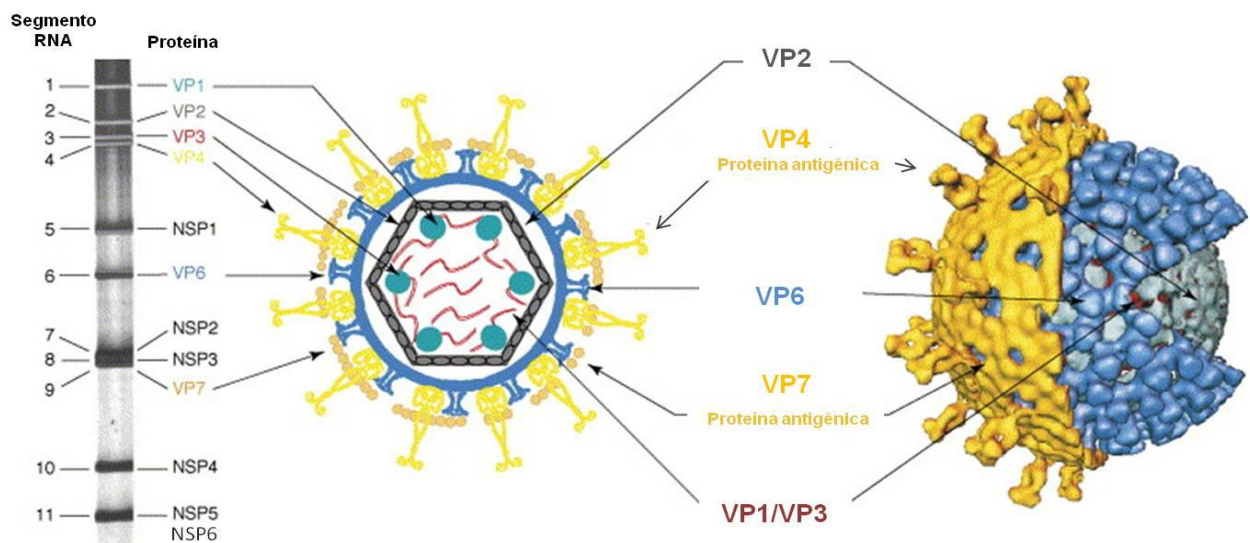


Figura 2. Reconstrução tridimensional da partícula de rotavírus e esquema estrutural do material genômico. Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) demonstrando a migração dos 11 segmentos de RNA_{df} (visualizados também na partícula central em vermelho) que codificam seis proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6-VP7) e seis não estruturais (NSP1-NSP6) de RV (Adaptada de Parashar *et al*, 2006).

Os RV apresentam três especificidades antigênicas: grupo ou espécie, subgrupo e sorotipo/genótipo. A proteína VP6 confere especificidade para sorogrupo e subgrupo, de acordo com a presença de diferentes epítomos. Existem sete espécies distintas de RV, denominadas de A-G. Os RVA são os que possuem maior

importância epidemiológica, por serem os responsáveis pelo maior número de episódios de GA em crianças de todo o mundo.

As proteínas VP4 e VP7 são as mais externas e induzem a formação de anticorpos neutralizantes e por isso são objeto de estudo para a elaboração de vacinas contra RVA e formam a base para a classificação binária em sorotipo/genótipos G e P (Estes & Kapikian, 2007). Até o momento, foram descritos 27 genótipos G e 35 genótipos P (Matthijnssens *et al*, 2011a), levando ao número de 945 possíveis combinações binárias G e P ($27 \times 35 = 945$), o que representa um número bem maior do que os genótipos descritos.

Os segmentos do genoma dos RVA variam em número de nucleotídeos (nt) de 667 a 3302, do menor para o maior respectivamente. Esta diferença permite que os segmentos sejam visualizados separadamente através da utilização da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), apresentando um padrão típico e único para os RV. Esta característica permitiu a determinação de um padrão eletroforético (eletroferotipos) dos RV (A-G) e, em particular, para os RVA, que apresentam o seguinte eletroferotipo: quatro segmentos de RNAdf de alta massa molecular (1-4), 2 de média massa molecular (5 e 6), seguidos de um grupo de três segmentos (7-9) e dois segmentos de baixa massa molecular (10 e 11). Os demais grupos de RV revelam padrões de migrações distintos (Estes, 2001) (**Figura 3**).

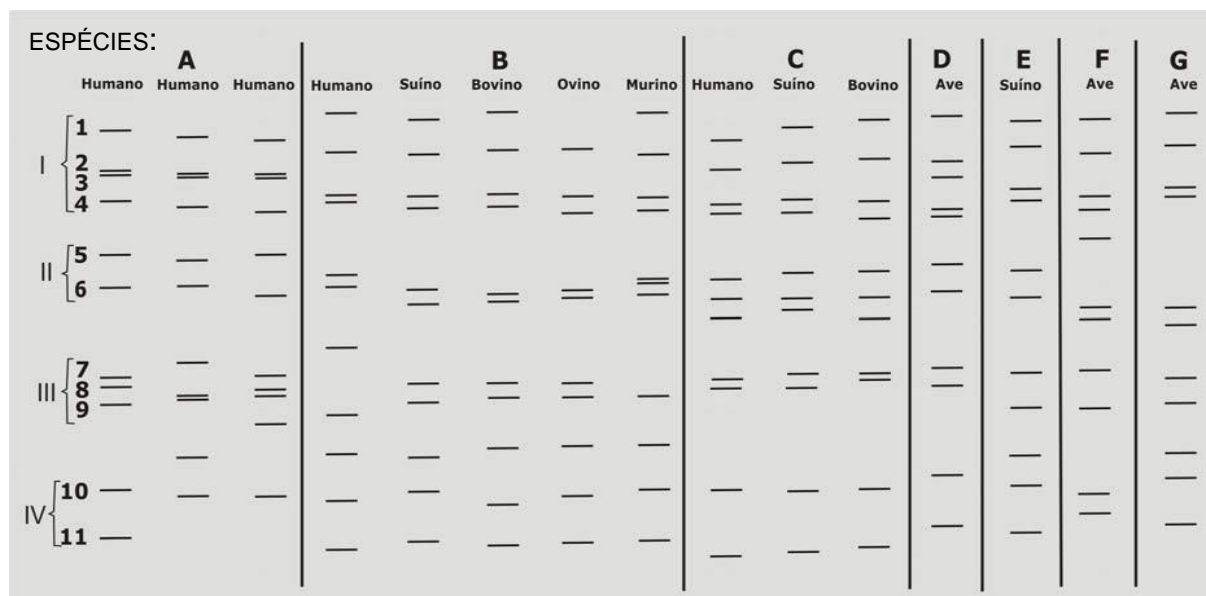


Figura 3. Eletroferotipos característicos das diferentes espécies de rotavírus. Esquema representativo dos eletroferotipos das diferentes espécies (A-G) de rotavírus analisados em gel de poliacrilamida (Adaptada de Kapikian *et al*, 2001).

Recentemente, Matthijnssens *et al* (2008b) propuseram uma nova classificação dos RVA, recomendando o sequenciamento de todo o genoma viral, 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 corte, de acordo com a similaridade nucleotídica (**Tabela 1**). Os autores desta proposta acreditam que ela proporcionará melhor compreensão da diversidade genética, tal como das estratégias evolutivas, dos perfis replicativos e de virulência, para o estudo da epidemiologia destes vírus (Matthijnssens *et al*, 2008b; 2011a).

Tabela 1. Valores de corte da porcentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus da espécie A, considerando-se os 11 segmentos genômicos (Adaptada de Matthijnssens *et al*, 2011a).

Gene	Valor de cut-off de identidade nucleotídica (%)	Genótipos	Designação dos nomes do genótipos
VP7	80	27G	Glicoproteína
VP4	80	35P	Sensível a Protease (Tripsina)
VP6	85	16I	Capsídeo Interno
VP1	83	R9	RNA polimerase dependente de RNA
VP2	84	C9	Proteína do Core
VP3	81	M8	Metiltransferase
NSP1	79	A16	Antagonista do Interferon
NSP2	85	N9	NTPase
NSP3	85	T12	Promotor Traducional
NSP4	85	E14	Enterotoxina
NSP5	91	H11	Fosfoproteína (pHosphoprotein)

Para obtenção das sequências nucleotídicas ficou estabelecido que o sequenciamento deveria abranger o gene completo (ou 50% deste) ou pelo menos 500nt do segmento (Matthijnssens *et al*, 2011a). Além disso, foi adotada uma

nomenclatura padrão para a descrição genotípica dos 11 segmentos: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, representando os genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5, respectivamente, onde x representa o número do genótipo. Até o presente, foram descritos 27 genótipos G, 35P, 16I, 9R, 9C, 9M, 16A, 9N, 12T, 14E e 11H (Matthijnssens *et al*, 2011a).

Baseado nesta nova forma de caracterização dos RVA e com a formação do *Rotavirus Classification Work Group* (RCWG), somado ao desenvolvimento de técnicas avançadas em sequenciamento, está sendo possível cada vez mais obter informações sobre a diversidade genômica dos RVA e evidenciar mais claramente os padrões evolutivos comuns entre as diferentes espécies de RVA. Isto tem permitido o entendimento mais conciso da classificação dos RVA em genogrupos (**Figura 4**) (Matthijnssens *et al*, 2011a; Matthijnssens & Van Ranst, 2012).

Constelação genotípica	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Human Wa-like	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	G3	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	G4	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	G8	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	G10	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
G11	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	
Human DS-1-like	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	G8	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	G6	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	G8	P[8]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	G8	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	G8	P[10]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
G9	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	
Human AU-1-like	G3	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H3
	G12	P[9]	I3	R3	C3	M3	A12	N3	T3	E3	H6

Figura 4. Constelação genotípica observada nos três principais genogrupos circulantes entre a espécie humana: (Adaptada de Matthijnssens & Vans Rast, 2012)

O termo genogrupo indica um grupo de vírus que pode ser classificado num mesmo grupo genético, com base na homologia de seus segmentos genômicos. Tais estudos possibilitaram a constatação de que, em geral, amostras da mesma espécie animal pertencem do mesmo genogrupo. Até o momento, entre as variantes humanas de RVA, há três genogrupos predominantes, cujas variantes protótipos são: Wa, DS-1, e AU-1 (**Figura 4**), sendo este último, formado por amostras de

humanos e felinos. Tal homologia, apresentada por RVA isolados de diferentes espécies animais, é interpretado como uma evidência molecular da ocorrência de transmissão inter-espécie (Matthijnssens *et al*, 2011b; Matthijnssens & Vans Ranst 2012) .

1.2.4 Proteínas estruturais dos Rotavírus da espécie A

1.2.4.1 Proteínas do core viral: VP1, VP2 e VP3

As proteínas do core (VP1, VP2 e VP3) funcionam como constituintes estruturais e cada uma tem afinidade com o RNA de fita simples (ssRNA). Porém, somente a VP1, com 125 quilodáltons (kDa) reconhece sequência específica para o RNA viral, composta por regiões conservadas com quatro bases (UGUG) na extremidade nucleotídica 3' (Lu *et al*, 2008). Esta proteína é conhecida pela função de RNA-polimerase RNA-dependente e por ser a menos abundante dentre as que compõem o capsídeo viral. Quando unida às proteínas VP2 e VP3, compõem o complexo de replicação, que tem papel fundamental na biossíntese viral (Arnoldi *et al*, 2007).

A proteína VP2 é a proteína mais abundante do core viral. Faz parte do complexo de replicação e liga-se tanto à VP1 quanto à VP3, através de um domínio na sua porção N-terminal. A interação protéica entre VP1-VP2-VP3 é um fator limitante na replicação e transcrição do genoma viral (McDonald *et al*, 2009a).

Além disso, a superfície externa da proteína VP2 interage com a proteína VP6 nos estágios iniciais da morfogênese viral. A interação entre VP2 e VP6 é fundamental para a formação de partículas consideradas imaturas ou incompletas, isto é, aquelas que possuem apenas duplo capsídeo protéico (DLPs). Esta interação também demonstra importância na atividade transcricional da partícula completa que será formada (Estes & Kapikian, 2007).

Recentemente foi demonstrado que a proteína VP3 possui atividades guanidil e metiltransferase e que a sua função na morfogênese dos RVA é de enzima de capeamento de RNA (Subodh, 2006; McDonald & Patton, 2011). Dessa forma, a

VP3 é responsável por modificar a extremidade 5' da molécula de RNA e gerar uma estrutura de capeamento similar a encontrada no RNA mensageiro (RNAm) de eucariotos (McDonald & Patton, 2011).

1.2.4.2 Proteína da camada intermediária: VP6

A VP6 é uma proteína dotada de caráter hidrofóbico com elevado potencial antigênico e imunogênico (Gorziglia *et al*, 1985). Está localizada na camada intermediária do vírus e circunda o core. Representa 51% desse vírion, tem uma massa molecular de 41 kDa, sendo codificada pelo sexto segmento genômico. Essa proteína exerce um papel importante na estrutura da partícula viral, devido à interação com as proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7) e a VP2, do core (Lawton *et al*, 1997). Canais aquosos permeiam as camadas de VP6 e VP2, possibilitando o acesso de íons cálcio (Ca^{2+}) e nucleotídeos ao interior da partícula viral, além da saída do RNAm (**Figura 5**) (McClain *et al*, 2010). A VP6 forma espontaneamente trimeros e é extremamente estável (Heiman *et al*, 2008). Estas características, aliadas à presença de epítomos conservados entre diferentes genótipos do vírus, sustentam ser tal proteína o antígeno de eleição para os ensaios diagnósticos.

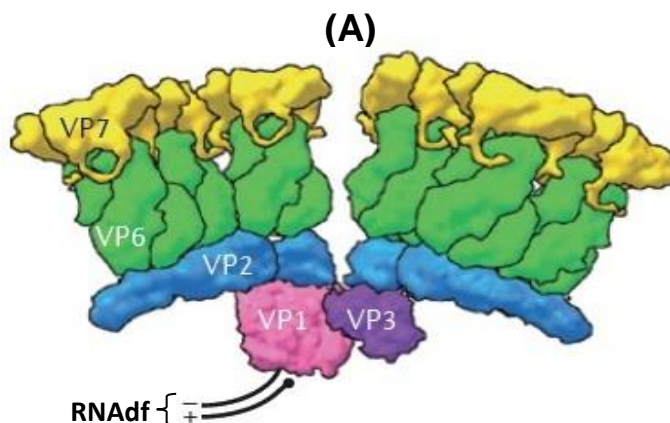


Figura 5. Representação da interação de VP6 com VP2 e VP1 associada a VP3. (A) Detalhe do canal existente entre VP6 e VP2 para a passagem do RNA mensageiro (RNAm) transcrito. A proteína VP1 está relacionada com a extremidade 3' do RNA (-), responsável pela transcrição da fita (+) de RNA (Adaptada de Trask *et al*, 2012).

O domínio de trimerização se situa entre os aminoácidos (aa) 246 e 315 e o domínio necessário para a formação das DLPs está localizado entre os aa 281 e 397

(Estes & Kapikian, 2007). Os resíduos 296 a 259 e 305 são importantes no reconhecimento pelos anticorpos monoclonais (Mabs) 255/260 de subgrupo I, mais comumente encontrado em animais. Aminoácidos específicos nas posições 305 (N), 310 (Q), 315 (Q), 339 (N) e 342 (L), são indicativos de especificidade com o sorogrupo II (SGII) humano (Iturriza-Gómara *et al*, 2002).

1.2.4.3 Proteínas da camada externa: VP4 e VP7

A proteína VP4 é não glicosilada e forma protuberâncias espiculares a partir do capsídeo externo nas partículas virais maduras. Possui papel essencial no ciclo replicativo, não só pela adesão e internalização à célula, mas também hemaglutinação, neutralização e virulência (Dunn *et al*, 1995; Ludert *et al*, 1996). A VP4 é susceptível à proteólise, o que resulta na exposição de sítios ativos que proporcionam a adsorção e penetração do vírus na célula. O gene que codifica para VP4 dispõe de uma fase de leitura aberta (ORF) composta por uma sequência nucleotídica que codifica para 776 aa (**Figura 6**) (Arias *et al*, 1996; Estes & Kapikian, 2007).

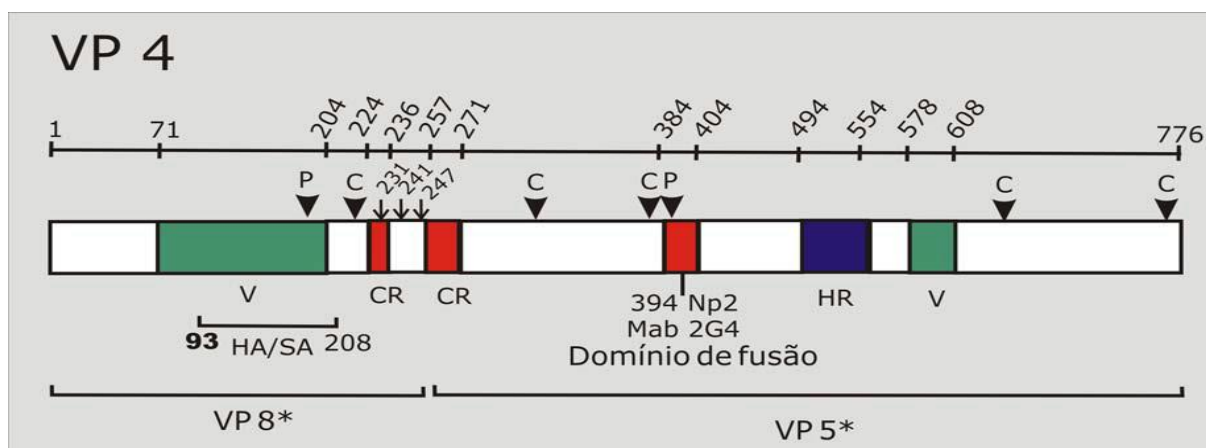


Figura 6. Esquema representativo dos aspectos estruturais da proteína VP4 de Rotavirus Rhesus (RRV) com 776 aminoácidos e vários domínios estruturais importantes. As três setas (aa231-247) indicam o sítio de clivagem proteolítica. CR e HR indicam as regiões conservadas e repetitivas, respectivamente. Em VP8*, HA representa o domínio de hemaglutinação e SA o domínio de integração com o ácido siálico; P e C indicam os epitopos de neutralização mapeados, correspondentes a cisteínas e prolínas. Em VP5* a região hidrofóbica (HR) foi demonstrada como importante domínio de fusão; Mab corresponde ao anticorpo monoclonal e V = região variável (adaptada de Estes, 2001).

Na presença de tripsina, a VP4 é clivada nos polipeptídeos VP5* e VP8* (**Figura 6**), permanecendo associados ao vírion. A VP5* tem atividade de

neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4 e, possivelmente, possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula (Kirkwood *et al*, 1996). Além disso, foi demonstrado que algumas estirpes de RVA interagem com integrinas ou proteínas do choque térmico (HSPs) antes ou após a ligação à célula hospedeira (Guerrero *et al*, 2000; Zárate *et al*, 2003). A VP8* contém a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas, dependentes da ligação deste polipetídeo com ácido siálico (Isa *et al*, 1997). Quatro epítomos de neutralização foram mapeados em VP8* e um epítomo em VP5* (Kovacs-Nolan *et al*, 2003) (**Figura 6**).

A glicoproteína VP7 é a mais imunogênica dentre as constituintes do capsídeo externo e é responsável pela síntese de anticorpos neutralizantes (Estes & Kapikian, 2007). A VP7 modula a atividade da VP4 no processo de adsorção e entrada dos RVA na célula, interagindo com proteínas da família das integrinas, na superfície celular, após o processo de adsorção mediado por VP4 (Guerrero *et al*, 2000).

O gene que codifica para VP7 dispõe de uma fase de leitura aberta (ORF) composta por uma sequência nucleotídica que codifica para 326 aa (**Figura 7**). Cada região é precedida por domínios hidrofóbicos designados de H1 (aa 6 a 23) e H2 (aa 33 a 44), que sinalizam a migração da proteína imatura para o retículo endoplasmático (RE). Um terceiro códon de iniciação também está presente anteriormente ao segundo domínio hidrofóbico. Algumas estirpes de RVA apresentam até três sítios potenciais de glicosilação. Contudo, somente dois destes são de fato glicosilados (Estes & Kapikian, 2007).

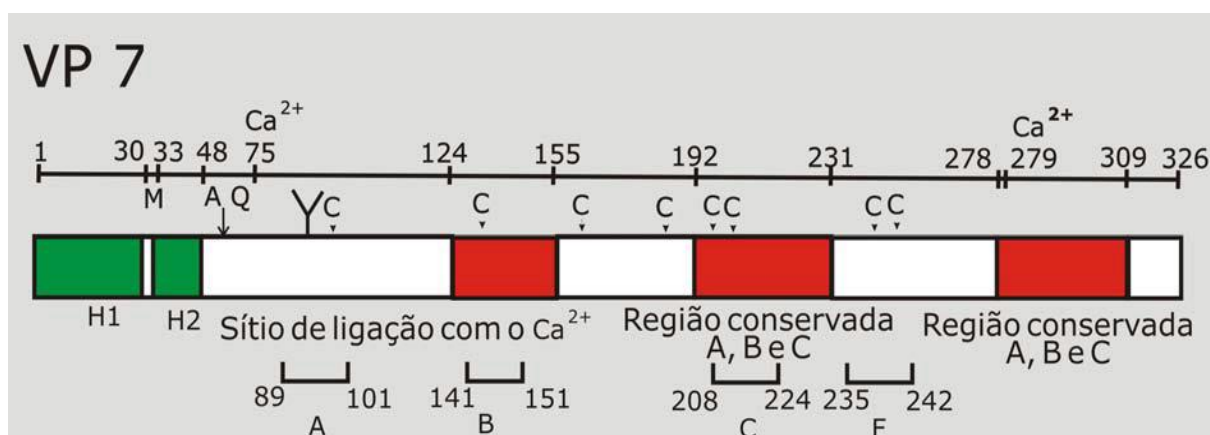


Figura 7. Esquema representativo dos aspectos estruturais da proteína VP7 de Rhesus Rotavirus (RRV) com 326 aminoácidos e vários domínios estruturais relevantes. A cor verde indica as duas regiões hidrofóbicas N-terminais da proteína (H1 e H2); o sítio de glicosilação está indicado por uma seta na porção seguinte (em branco); os sítios de ligação com íons Ca^{2+} correspondem aos aa75 e 279; a cor vermelha demonstra os domínios de ligação a integrinas, responsáveis pela entrada do vírus na célula; A, B, C e F indicam os epítomos de neutralização mapeados; entre os aminoácidos descritos estão: C=cisteína, M=metionina; A=alanina e Q=glutamina (adaptada de Estes, 2001).

Os íons Ca^{2+} , em concentrações apropriadas, são necessários para a estabilidade da VP7. Na sua ausência, os trímeros da proteína encontram-se dissociados, promovendo a liberação da VP7 do vírion. Essa mudança conformacional da VP7 reflete em um arranjo distinto em VP4, que possibilita a entrada do vírion na célula. Aoki *et al* (2009) demonstraram que anticorpos neutralizantes contra a proteína VP7 estabilizam o trímero formado pela proteína, inibindo as alterações em VP4, necessárias para permitir a entrada do vírus na célula hospedeira.

1.2.5 Proteínas não estruturais dos rotavírus da espécie A

1.2.5.1 NSP1

É uma proteína codificada pelo 5º segmento genômico, possui cerca de 35kDa e é considerada a menos conservada entre as estirpes circulantes de RVA (Suguna & Rao, 2010). Possui domínios ricos em complexos cisteína-histidina e ligantes de Zn^{2+} . Recentemente, foi demonstrada sua função como ubiquitina ligase (E3) através de sua ação moduladora de supressão de respostas imunes celulares inatas (ativação de interferon tipo I [IFN I]) (Qin *et al*, 2010). A NSP1 induz a degradação de um ou mais componentes necessários para expressão do IFN I, via fatores regulatórios do IFN (IFRs) ou via fatores nucleares $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$) (Suguna & Rao, 2010). A função demonstrada por esta proteína varia de acordo com estirpes diferentes e isso pode influenciar na eficiência da replicação viral nas células infectadas. Estudos demonstraram que mutantes NSP1 são viáveis, mas possuem baixa taxa de replicação (Suguna & Rao, 2010; Arnold & Patton, 2011).

1.2.5.2 NSP2 e NSP5

Estas duas proteínas encontram-se essencialmente associadas e formando estruturas denominadas viroplasmas que, por sua vez, compreendem sítios de

ligação ao mRNA, localizados em regiões eletrodensas do citoplasma e que auxiliam na replicação viral, transcrição, tradução, empacotamento do RNAdf e montagem da partícula viral. A NSP2 é altamente conservada e expressa em altas concentrações nas células infectadas (Estes & Kapikian, 2007), possuindo também atividades helicase e NTPase, dependentes de íons Mg^{2+} (Suguna & Rao, 2010).

A proteína NSP5 possui uma atividade autoquinase e em células infectadas apresenta formas hipo e hiper fosforiladas (Taraporewala & Patton, 2004). Martin *et al* (2011) realizando estudos a nível estrutural da NSP5, revelaram que os principais domínios de oligomerização protéica ficam localizados entre os aa103-146 e aa189-198, sendo estes essenciais para a formação dos viroplasmas e ligação com a NSP2. Na ausência de outras proteínas virais, a interação entre NSP2 e NSP5 resulta em partículas defectivas semelhantes a *Virus-like Particles* (VLPs) *in vitro*. Ambos os domínios N- e C-Terminais, encontram-se implicados na formação das VLPs (Fabbretti *et al*, 1999).

1.2.5.3 NSP3

A NSP3 é uma proteína codificada pelo sétimo segmento e possui cerca de 36kDa. Ocorre como um dímero, que consiste em dois domínios: i) ligante-RNA, na porção N-terminal; ii) porção C-Terminal, que interage com o fator de iniciação de tradução eIF4G. A NSP3 está diretamente vinculada ao processo de tradução do RNAdf viral. Quando em conformação de homodímero, reconhece a sequência consenso 3' do RNAm, formando um complexo estável que favorece a tradução dos transcritos de RNAm pelos ribossomos. Esta forte ligação de NSP3 com o RNAm proporciona também a sua proteção contra nucleases celulares (Wentz *et al*, 1996; Suguna & Rao, 2010). A ligação da NSP3 ao RNAm também vem sendo descrito como um possível mecanismo de transporte de fitas recém sintetizadas de RNAm até os viroplasmas para replicação subsequente (Pesavento *et al*, 2006).

1.2.5.4 NSP4

Estudos demonstraram a multifuncionalidade desta proteína que foi a primeira enterotoxina viral descrita como diretamente responsável pelas manifestações clínicas (diarreia secretória) mais recorrentes aos RVA (Ball *et al*, 1996). O peptídeo correspondente aos resíduos de aa de 48 a 91 de NSP4 é capaz de promover uma desestabilização da membrana do RE, provocando sua lise e resultando em um aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Conseqüentemente, há um aumento de secreção de íons cloro (Cl^-), ocasionando diarreia de natureza secretória. Adicionalmente, alterações nos resíduos de aa nas posições 114 até 135 da NSP4 podem levar à mudanças na atividade toxigênica dos RVA (Bowman *et al*, 2000; Huang *et al*, 2004).

A proteína NSP4 mimetiza substâncias estimulantes de secreções intestinais (secretagogos) e, dessa forma, ativa o reflexo secretor do Sistema Nervoso Entérico (SNE), pela correlação do influxo de Ca^{2+} na membrana plasmática, que é regulado por canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes. A ativação de SNE ocorre pela liberação de prostaglandinas, peptídeos sinalizadores, citocinas e da enterotoxina viral NSP4 ocasionando o aumento da motilidade intestinal (Boshuizen *et al*, 2004).

Outra funcionalidade descrita para NSP4 é o desarranjo das zonas de oclusão; isto é, a região entre duas células que apresenta membrana impermeável. Na situação de infecção por RVA, a NSP4 aumenta a permeabilidade paracelular, permitindo a passagem de macromoléculas de até 20kDa (Tafazoli *et al*, 2001).

Na morfogênese viral, a extremidade C-terminal de NSP4 atua na membrana do RE como receptor intracelular e liga-se a VP6, que reveste as DLPs, possibilitando o revestimento destas partículas com a camada mais externa, formada por VP4 e VP7. Além disso, a NSP4 também participa do processo de transporte destas partículas através das membranas do RE durante a montagem de partículas maduras (Taylor & Bellamy, 2003).

Os anticorpos neutralizantes dirigidos contra a NSP4 reduzem a capacidade desta proteína em induzir a diarreia. Em um estudo com camundongos vacinados com esta proteína, foi observada a indução de proteção homotípica e heterotípica

contra diarreia por RVA. Em humanos, a NSP4 foi descrita como sendo capaz de induzir repostas imune celular e humoral (Johansen *et al*, 1999).

Devido a este envolvimento da NSP4 no processo patogênico dos RVA, estudos tentaram encontrar alguma diferença na seqüência da proteína entre as crianças sintomáticas e assintomáticas (Kirkwood *et al*, 1999; Pager *et al*, 2000). Entretanto, as diferenças descritas não caracterizaram de forma específica a cepa virulenta da avirulenta, tornando estes achados não reproduzíveis em estudos posteriores (Oka *et al*, 2001; Araújo *et al*, 2007a; Mascarenhas *et al*, 2007)

1.2.5.5 NSP6

A NSP6 é encontrada principalmente no viroplasma e interage com a NSP5 (Estes & Kapikian, 2007). Algumas variantes de RVA não codificam esta proteína e outras apresentam baixos níveis de expressão, o que indica que a NSP6 apresenta papel regulatório não essencial na replicação viral (Taraporewala & Patton, 2004; López *et al*, 2005).

1.2.6 Biossíntese viral

Os RVA possuem tropismo celular *in vivo* por enterócitos maduros das vilosidades intestinais. A replicação ocorre essencialmente no citoplasma das células absortivas diferenciadas (maduras), localizadas na porção apical das vilosidades do intestino delgado. Entretanto, estudos vêm revelando a presença de viremia por RVA e, conseqüentemente, infecções extraintestinais, incluindo encefalites (Crawford *et al*, 2006; Blutt *et al*, 2007a; Blutt *et al*, 2007b; Liu *et al*, 2009; Medici *et al*, 2011; Thompsom *et al*, 2012)

O ciclo replicativo viral está demonstrado na **Figura 8** e ocorre com uma íntima dependência de concentração de íons Ca^{2+} , que atuam como mensageiro na cadeia de eventos que conduz à doença (Chami *et al*, 2006; Ruiz *et al*, 2009). A entrada dos RVA nas células se dá por meio de interações com receptores celulares contendo ácido siálico (SA) e integrinas no início do processo de adsorção, com o

recém-formadas no RE rugoso (RER) e montagem da camada exterior de modo a formar TLPs maduros (**Figura 8**).

Esta etapa final de montagem ainda não está bem compreendida, o modelo mais aceito sugere que ocorra uma interação entre a NSP4 e a VP4, na face citosólica do RE (Trask *et al*, 2012). O final do ciclo ocorre após a libertação do virion da célula infectada, o qual é exposto à proteases como a tripsina do trato gastrointestinal, o que resulta na proteólise específica de VP4 em VP5* e VP8*.

Em relação ao genoma dos RVA, os RNAs são transcritos de forma conservativa pela RNA polimerase RNA dependente (proteína VP1). Há a produção de RNA (+) a partir do RNA (-) virais. As fitas de RNA (+) servirão de RNAm para a tradução das proteínas virais (VPs e NSPs), bem como assumem o papel de molde para a produção de novas fitas de RNA (-), daí resultando RNA de dupla fita da progênie viral. As proteínas recém-sintetizadas e o RNA viral são reunidos no citoplasma da célula infectada, constituindo a estrutura denominada viroplasma (Kapikian *et al*, 2001).

1.2.7 A Dinâmica Evolutiva dos rotavírus da espécie A

O genoma naturalmente segmentado dos RVA possibilita uma grande diversidade genética destes vírus, a qual é mediada por diferentes mecanismos, como: mutações pontuais, rearranjo genômico (recombinação intramolecular) e reestruturação (*reassortment*) (Taniguchi & Urasawa, 1995; Desselberger, 1996).

O acúmulo de mutações pontuais pode ser evidenciado por técnicas de sequenciamento nucleotídico. Estas mutações definem novas linhagens e sublinhagens de um genótipo. Dessa forma, torna-se fundamental a análise sistemática de sequências dos vírus circulantes na população com a finalidade de identificar a frequência dessas mutações no genoma dos RVA (Iturriza-Gómara *et al*, 2001).

Os rearranjos ou recombinações são alterações na sequência do segmento genômico, algumas vezes na forma de deleção ou mais frequentemente como duplicação (**Figura 9A**). 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 (Taniguchi & Urasawa, 1995).

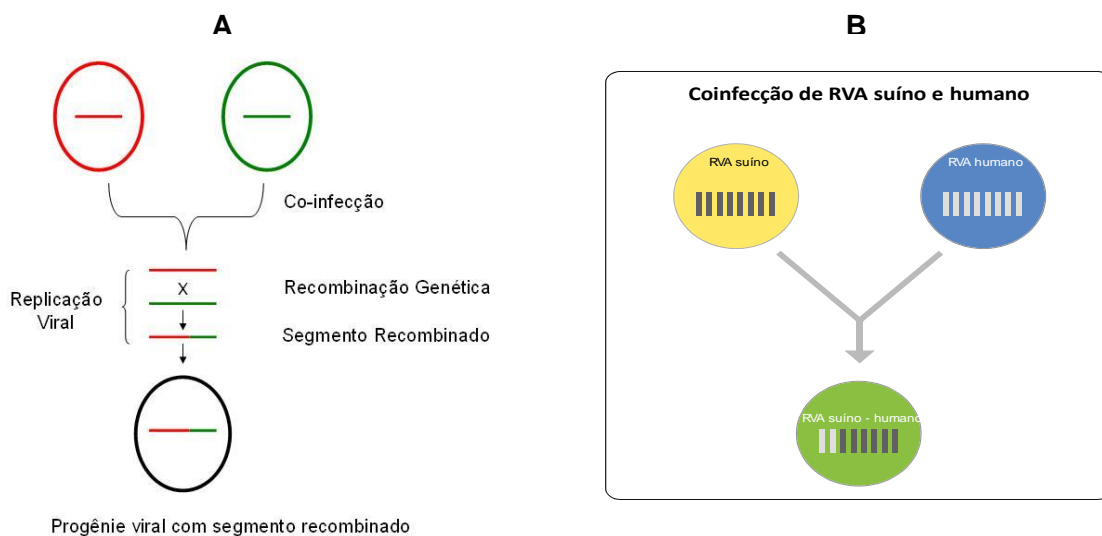


Figura 9. Esquema representativo de um evento de: **A)** Recombinação genética (adaptada de Gómez, 2009 e; **B)** Evento de *reassortment* entre rotavírus da espécie A de origem humana e origem suína.

Nas reestruturações (*reassortments*) ocorre a permuta de material genético entre dois vírus similares, incluindo aqueles da mesma espécie, durante infecções mistas *in natura* ou por meio de co-cultivo (**Figura 9B**). Este mecanismo foi primeiramente descrito por Matsuno *et al* (1980), que realizou co-infecção de cultura celular de RV bovino (Lincoln) com RV símio (SA-11) e obtiveram o primeiro clone reestruturado. Por meio de comparações dos segmentos de RNAdf do clone com os parentais, observou-se que o genoma reestruturado apresentava os segmentos 4, 5, e 10 de SA-11 e segmentos 1, 2, 3, 6 e 11 de bovino. Porém não foi possível determinar a origem dos outros segmentos. Estudos descrevendo esse mecanismo evolutivo vêm aumentando consideravelmente a cada ano (Matthijssens *et al*, 2006, 2011b; Mukherjee *et al*, 2011).

1.2.8 Epidemiologia dos rotavirus da espécie A

Os RVA são os principais agentes da GA infantil e sua prevalência é semelhante em todos os países, entretanto, nos países em desenvolvimento, representa uma importante causa de mortalidade em crianças ≤ 5 anos de idade. Segundo Tate *et al*, (2012b), baseados nos dados da OMS, dos 453.000 óbitos que

são estimados ocorrer anualmente por RVA nesta faixa etária, cerca de 90% estão localizados na Ásia e África (**Figura 10**).

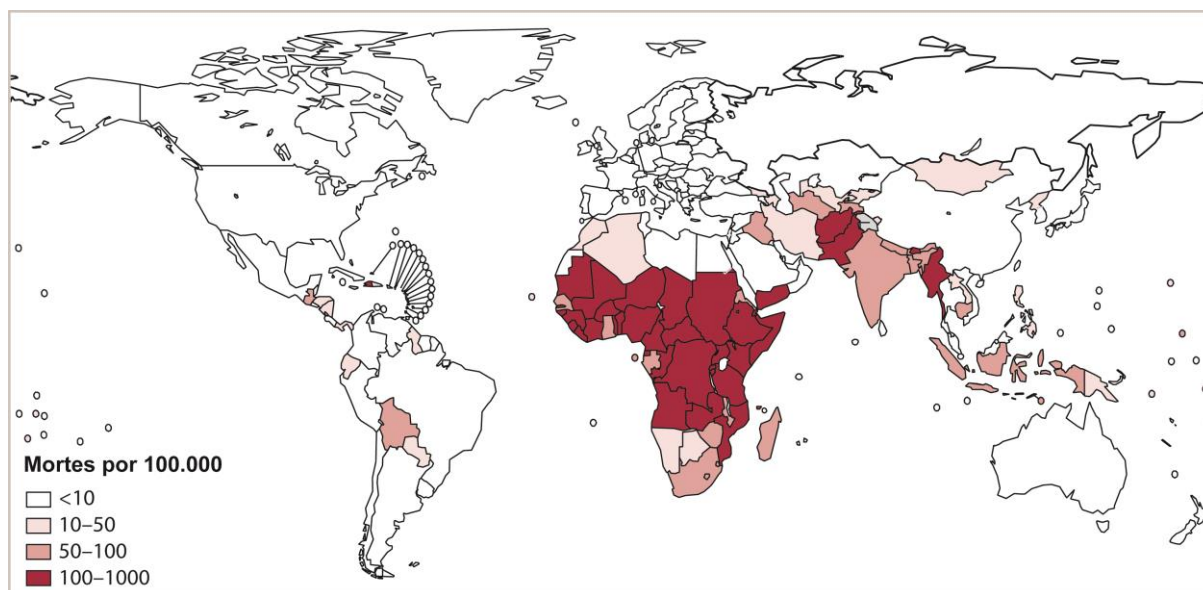


Figura 10. Estimativa da incidência de mortes por rotavírus da espécie A em crianças ≤ 5 anos de idade, anualmente nos diferentes continentes (adaptada de Tate *et al*, 2012b).

A distribuição universal dos RVA tem sido amplamente caracterizada nos estudos realizados em diversos países. 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 (Kapikian *et al*, 2001). Estudos conduzidos na América Latina, África e Ásia, indicaram nitidamente a magnitude que assumem os RVA na etiologia das GAs moderadas e graves, associando-as a até 71% dessas situações (Steele *et al*, 2003; Bresee *et al*, 2004).

Estudos epidemiológicos realizados demonstraram que diversos genótipos de RVA 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 epidemiológico (Bányai *et al*, 2012).

1.2.8.1 Distribuição dos genótipos de rotavírus da espécie A no mundo

Santos & Hoshino (2005) em uma revisão bibliográfica acerca dos genótipos circulantes de RVA no mundo, observaram que as combinações binárias entre os genótipos G e P mais prevalentes eram: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8]. Sendo que o genótipo G1P[8] apresentava, naquele período, o maior percentual de detecção nos seis continentes (**Tabela 2**). Também ficou evidenciada a elevada percentagem, em comparação com países da Europa e América do Norte, de amostras genotipadas como não usuais, circulantes na África e Ásia.

Tabela 2. Distribuição de genótipos G e P nos diferentes continentes em 2005 (Adaptada de Santos & Hoshino, 2005)

Combinação G e P	África (%)	Ásia (%)	Europa (%)	América do Norte (%)	Oceania (%)	América do Sul (%)
P[8]G1	23	34	72	73	82	34
P[4]G2	2	13	9	11	13	23
P[8]G3	21	1	2	6	1	2
P[8]G4	4	20	11	1	2	9
P[8]G9	5	5	3	1	1	15
P[6]G9	2	7	1	2	0	1
Outros	16	6	1	1	0	5
Não usuais	26	14	1	5	0	11

Neste sentido, em estudo sobre a diversidade evolutiva dos RVA, Patton *et al* (2012) destacaram a importância desses genótipos considerados não usuais e emergentes como o G5, G8, G10 e G12 na distribuição universal dos RVA. Tais estirpes representam uma grande parcela dos RVA que circulam em regiões da África, Sudeste Asiático e Leste do Mediterrâneo. .

A **Figura 11** representa os dados referentes a Rede de Vigilância reportados pela OMS no ano de 2010. Entre as Américas, os genótipos mais prevalentes são: G1P[8] e G2P[4]. Em contrapartida, no Sudeste Asiático e na África esse dois genótipos apresentam baixa frequência, prevalendo os genótipos G8, G10 e G12 (Patton 2012).

Globalmente, estes achados representam um grande impacto na diversidade dos RVA circulantes nos períodos atuais, demonstrando que a vigilância

epidemiológica é de extrema importância para o planejamento de medidas de controle e prevenção eficazes entre a população mundial (Bányai *et al*, 2012).

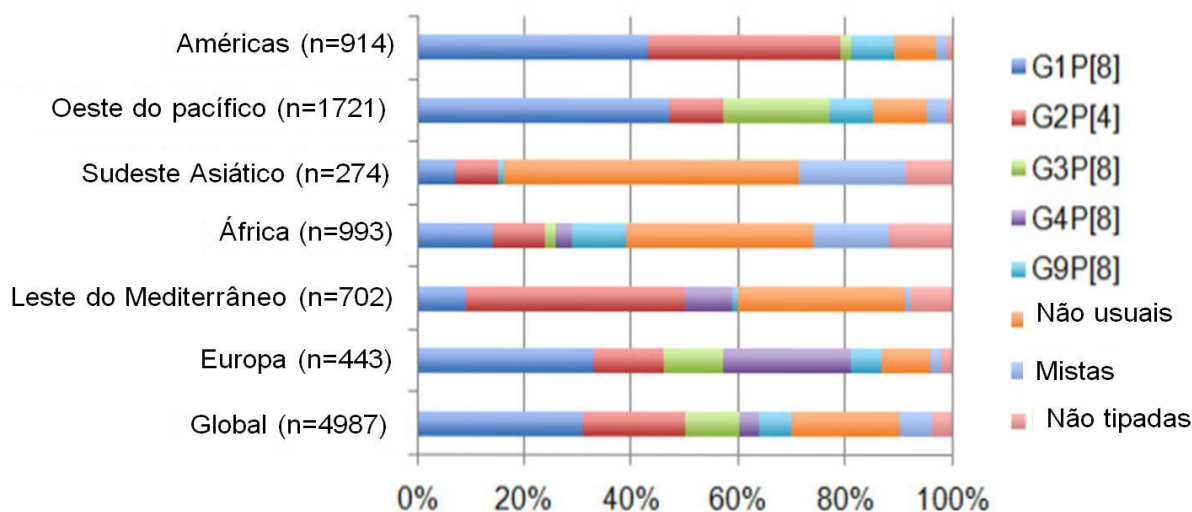


Figura 11. Distribuição de genótipos de rotavírus espécie A reportados pela Rede de Vigilância da Organização Mundial da Saúde em 2010. n = nº de amostras (Adaptado de Patton, 2012).

1.2.8.2 Distribuição dos genótipos de rotavírus da espécie A no Brasil, antes e após a introdução da vacina monovalente Rotarix®

A exemplo do que ocorre em outros países, no Brasil os genótipos de RVA têm sido registrados com frequências que variam de acordo com o ano e o local da amostra isolada. Leite *et al* (2008) realizaram um estudo de revisão relatando a detecção de genótipos de RVA no período compreendido entre 1982 e 2007. Assim, propuseram a existência de três períodos epidemiológicos: i) de 1982-1995, em que os genótipos G1 a G4 foram os mais prevalentes, com a circulação do genótipo G5 em aproximadamente 10% das amostras; ii) de 1996-2005, em que houve a emergência do genótipo G9, a reduzida detecção do G5 e a pouca ocorrência de G2P[4]; iii) de 2006-2007, em que o genótipo G2P[4] reemergiu e tornou-se o genótipo predominante sendo detectado em 74% das amostras.

A **Figura 12** está representando que nos dois períodos pré-vacinais compreendidos entre 1982-1995 e 1996-2005 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%). Neste estudo Leite *et al* (2008) demonstraram que a detecção de G2P[4] diminuiu de 26%

no período de 1982 – 1995 para 2% no período de 1996 – 2005. Porém, no ano de 2005 e naqueles subsequentes, a prevalência deste genótipo aumentou, principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste.

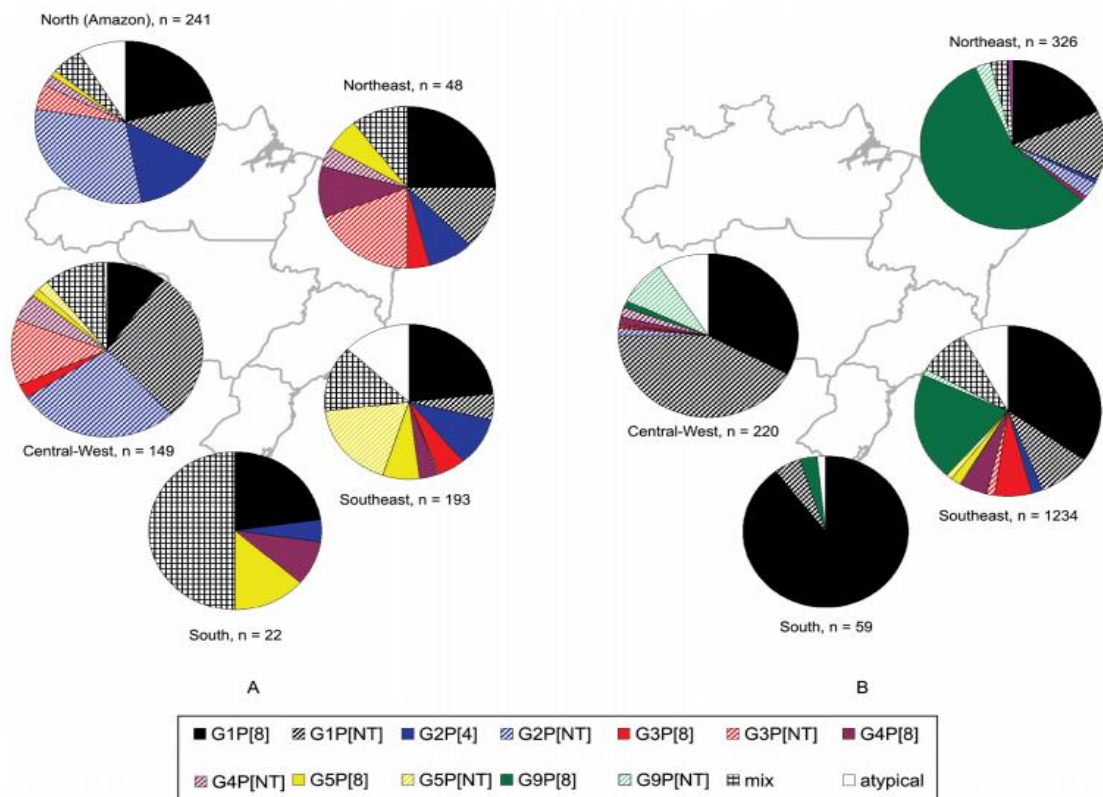


Figura 12. Distribuição dos genótipos de rotavírus da espécie A no Brasil, por região geográfica. A: de 1982 a 1995; B: de 1996 a 2005 (Leite *et al*, 2008).

Oliveira *et al* (2012) em um estudo retrospectivo de 27 anos com amostras positivas para RVA circulantes na Região Norte do Brasil, evidenciaram que também houve um aumento significativo do genótipo G2P[4] no período após a introdução da vacina Rotarix[®], em especial no período mais recente estudado (2006-2008) e também evidenciaram que alguns estudos realizados em períodos anteriores à vacina (2001-2003 e 2005), o genótipo G9 destacou-se no percentual de detecção em amostras do estado do Pará, sendo em 2005 o genótipo mais prevalente detectado. Amostras de RVA G9P[8] detectados no estado do Acre nos anos de 2005 e 2006, após estudos filogenéticos, revelaram a circulação de uma nova variante genética na região, possivelmente em virtude de reestruturação gênica entre amostras humanas nos cinco genes analisados (Tórt *et al*, 2010)

1.2.9. Prevenção e controle dos rotavírus espécie A

Estudos demonstraram que a melhoria do saneamento básico e das condições higiênico-sanitárias são capazes apenas de minimizar as infecções por RVA, visto que a morbidade é semelhante nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Anderson, 2010).

A infecção natural não confere proteção completa contra reinfecção e a prevenção da GA durante os dois primeiros anos de vida é fundamental, pois é neste período que a mesma é mais grave. Assim, o desenvolvimento e a imunização com vacinas seguras e eficazes representam uma boa estratégia para diminuir as formas mais graves da doença (Anderson, 2010).

Duas vacinas contra RVA encontram-se disponíveis no Brasil e em diversos países: i) RotaTeq[®] (Merck, North Wales, PE, EUA); ii) Rotarix[®] (GlaxoSmithKline [GSK], Rixensart, Bélgica). A Rotateq[®] é uma vacina oral, pentavalente (G1, G2, G3, G4 e P[8]) de vírus reestruturado (WC3 – humano/bovino) (Vesikari *et al*, 2006). A vacina Rotarix[®] é monovalente (G1P[8]), atenuada, e de origem humana (O’Ryan & Linhares, 2009). Nos estudos de fase III as duas vacinas mostraram-se protetoras contra os 5 genótipos mais comuns de RVA que circulam mundialmente e o impacto positivo da introdução destas vacinas já foi demonstrado em alguns países europeus, africanos e americanos, inclusive o Brasil (Chandran *et al*, 2010; do Carmo *et al*, 2011; O’Ryan *et al*, 2011; WHO, 2011)

Desde 2006, no continente americano, 14 países introduziram uma vacina contra RVA em seus Programas Nacionais de Imunização (PNI), sendo a Rotarix[®]: no Brasil (primeiro país em âmbito de campanha nacional, em março de 2006), El Salvador (2006), Panamá (2006), México (2006), Venezuela (2006), Equador (2007), Honduras (2009), Peru (2009), Bolívia (2008), Colômbia (2009), Paraguai (2010) e Guatemala (2009); e a Rotateq[®]: na Nicarágua (2006), Guiana (2010) e Ilhas Cayman (2009) (WHO, 2011).

Para o tratamento da infecção por RVA não existem terapias anti-virais específicas disponíveis comercialmente. Recentemente foi demonstrado que alguns medicamentos usado contra parasitas, como a Nitazoxanida têm reduzido os sintomas clínicos provocados pela doença (Rossignol *et al*, 2006)

1.2.10. Aspectos zoonóticos dos rotavírus espécie A

Recentemente, Martella *et al* (2010) destacaram a importância de se ter conhecimento sobre os aspectos zoonóticos das rotavirose, uma vez que, os RV possuem um amplo espectro de hospedeiros e diversos mecanismos de evolução molecular. Nos países em desenvolvimento, onde em geral as pessoas vivem sob precárias condições de higiene e têm maior contato com animais, principalmente bovinos, suínos e aves, a transmissão de RV de origem animal para humanos é mais provável de acontecer (Jain *et al*, 2001).

Entre os relatos zoonóticos da doença no mundo, Nakagomi *et al* (1992) diagnosticaram uma amostra humana (Ro1845, genótipo G3) de provável origem animal em Israel. Banerjee *et al* (2007) encontraram na Índia, a partir de amostras de crianças assintomáticas, um rotavírus G11P[25] no qual, os autores relatam a possibilidade de uma interação zoonótica, ao considerarem que este tipo é frequentemente encontrado em bovinos e suínos. No Brasil, Gabbay *et al* (2008) detectaram por RT-PCR, rotavírus do grupo C com características suínas em fezes de crianças na cidade de Belém, Pará. Mascarenhas *et al* (2007) encontraram RV em fezes de crianças e neonatos de Belém com sequências nucleotídicas dos genes VP4 e NSP4 semelhantes às de origem suína. Recentemente, dois estudos detectaram genes de possíveis origem canina-felina em amostras com genótipo G3 circulantes nas Regiões Sudeste e Norte do Brasil (Luchs *et al*, 2012; Maestri *et al*, 2012).

A maioria desses relatos, assim como os dados disponíveis na literatura são referentes aos genes que codificam para as proteínas VP4, VP7, NSP4 e eventuais trabalhos para VP6. Entretanto, a investigação dos outros genes faz-se essencial para que se possa compreender de forma mais evidente eventos de *reassortement*, mutações pontuais, ou qualquer outro mecanismo gerador de variabilidade genética entre amostras de RVA, devido a suas participações significativas na patogênese, replicação, regulação da tradução, morfogênese viral e epidemiologia, particularmente na era pós-vacinal.

2. JUSTIFICATIVA

A OMS recomenda a vigilância epidemiológica e laboratorial dos genótipos de RVA circulantes nos diferentes continentes e, em particular, nos países onde vacinas anti RVA foram implementadas nos PNI (WHO, 2008). Com isto objetiva definir o impacto da doença, avaliar a efetividade da vacina e monitorar as mudanças nos padrões epidemiológicos dos genótipos circulantes, assim como o surgimento de variantes genéticas que possam escapar do processo de imunização (WHO, 2008; Gentsch *et al*, 2009).

Estudos evidenciaram após análise filogenética do genoma completo de RVA, um consistente padrão evolutivo entre RVA de origem humana e animal, destacando-se a conservação de várias porções gênicas (Matthijnssens *et al*, 2008a; Mukherjee *et al*, 2009). Essa possibilidade de transmissão entre-espécies é maior e mais freqüente nos países em desenvolvimento, onde podem ocorrer contatos mais estreitos entre humanos e animais, além das condições higiênico-sanitárias inadequadas (Jain *et al*, 2001).

No Brasil, a maioria dos relatos na literatura se refere à caracterização molecular das proteínas de superfície VP4 e VP7 e eventuais trabalhos à NSP4 e VP6 (Mascarenhas *et al*, 2006; Araújo *et al*, 2007a e b; Tavares *et al*, 2008a e b; Benati *et al*, 2010). Recentemente, foram descritos estudos envolvendo a caracterização molecular dos genes que codificam para outras proteínas estruturais e não estruturais (Tort *et al*, 2010; Silva *et al*, 2011; Maestri *et al*, 2012). Tais dados estão ampliando o conhecimento acerca da diversidade genética entre os genótipos circulantes entre as regiões brasileiras. Na região Norte, apesar de existirem dados relevantes sobre genótipos G e P (Mascarenhas *et al*, 2002a; Mascarenhas *et al*, 2002b; Mascarenhas *et al*, 2010), estudos envolvendo a caracterização dos genes que codificam para as demais proteínas são raros (Tort *et al*, 2010; Maestri *et al*, 2012).

Neste sentido, o seqüenciamento parcial ou completo do genoma das amostras de RVA circulantes na Região Norte, antes e após a introdução da vacina Rotarix® contribuirá para o entendimento do processo de evolução dos diferentes genótipos de RVA, particularmente os híbridos humano-animal, visto que a grande diversidade de genótipos pode representar um desafio para o PNI.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar filogeneticamente os genes que codificam para as proteínas estruturais (VPs) e não-estruturais (NSPs) de RVA genótipos G1, G2, G3, G4 e G9 da Região Norte do Brasil, antes e após a introdução da vacina monovalente Rotarix® no calendário do PNI.

3.2 Específicos

- Amplificar, através da RT-PCR, os genes que codificam para as proteínas estruturais VP1-VP4, VP6 e VP7 e não estruturais NPS1-NSP3, NSP4 e NSP5;
- Realizar estudos filogenéticos baseados na análise destes genes amplificados em relação aos protótipos disponíveis no *GenBank*;
- Identificar possíveis mecanismos evolutivos e de variabilidade genética entre as amostras analisadas antes e após a introdução da vacina Rotarix® na Região Norte do Brasil.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Espécimes clínicos

Os espécimes clínicos analisados no presente estudo são oriundos de quatro projetos de pesquisa em GA virais conduzidos pelo Laboratório de Rotavírus do Instituto Evandro Chagas (IEC) (**Tabela 1**), resumidamente descritos a seguir:

A) **Projeto Hospital-Sentinela** - Estudo que objetivou caracterizar a diversidade antigênica das amostras circulantes de RV e o impacto da doença causada por esses agentes em Belém, Pará. Foi conduzido no período de maio de 1998 a maio de 2000, quando se coletaram espécimes fecais de crianças com 0 a 3 anos, atendidas a nível ambulatorial ou internadas em um hospital público de Belém, Pará;

B) **Teste com a vacina RIX4414** - Estudo que objetivou avaliar a inocuidade, imunogenicidade e eficácia de três doses da vacina monovalente RIX4414 (posteriormente denominada de Rotarix) em crianças saudáveis em Belém, Pará, Brasil;

C) **Projeto Salobo** - Estudo realizado na cidade de Parauapebas, sul do Pará, com o objetivo de estimar o impacto e a epidemiologia dos RV nesta região, que constitui um local de grande fluxo migratório, uma vez que, sedia grandes projetos de mineração da região;

D) **Rede de Vigilância** - Estudo de vigilância pertencente a Rede Nacional de Vigilância para Rotavírus, que visa estimar o impacto da doença e a epidemiologia dos rotavírus em crianças da Região Norte do Brasil.

O **Quadro 1** descreve os espécimes utilizados, tal como o período de coleta, Estado de procedência e estado vacinal. Todos possuíam genótipos para VP7 previamente estabelecidos (G1, G2, G3, G4 ou G9) através da técnica de reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas (CEP/IEC) sob nº 0012/2010. (**ANEXO A**)

Tabela 3 – Descrição resumida dos Projetos em gastroenterites conduzidos pelo IEC e número de amostras utilizadas.

Estudo	Características	Período	Idade	Nº amostras selecionadas
Hospital-Sentinela	Comunitário e hospitalar	Maio de 1998 a maio de 2000	0 - 3 anos	11
Teste com a vacina RIX 4414	Teste duplo-cego controlado com placebo	Maio de 2001 a abril de 2003	0 - 3 anos	9
Projeto Salobo	Comunitário e hospitalar	Desde de dez./2005	0 - 5 anos	3
Rede de Vigilância	Comunitário	Desde fevereiro de 2006	0 - 5 anos	17

Quadro 1. Amostras fecais oriundas da Região Norte analisadas neste estudo, de acordo com o ano de coleta ; Estado de origem e estado vacinal.

ID Amostra	Ano	Estado	Vacinado
HST294	1994	Pará	-
HSE002	1998	Pará	-
HSE005	1998	Pará	-
HST025	1998	Pará	-
HSP196	1999	Pará	-
HST309	1999	Pará	-
HST352	1999	Pará	-
HST374	1999	Pará	-
HST357	2000	Pará	-
HST393	2000	Pará	-
HST385	2000	Pará	-
PID366	2001	Pará	-
PID385	2001	Pará	-
PID132	2001	Pará	-
PID084	2002	Pará	-
PID90	2002	Pará	-
PID1527	2002	Pará	-
PID92	2002	Pará	-
PID177	2002	Pará	-
PID59021	2003	Pará	-
PSAL-1655C	2006	Pará	-
PSAL-906D	2006	Pará	não
RV98325	2007	Amazonas	não
RV99873	2008	Pará	não
PSAL-3115C	2008	Pará	não
RV100669	2008	Amazonas	não
RV101107	2008	Amazonas	sim
RV101253	2009	Amazonas	não
RV102322	2009	Pará	sim
RV102866	2009	Pará	sim
RV106909	2009	Pará	não
RV109713	2010	Amazonas	NI
RV109720	2010	Amazonas	sim
RV112015	2010	Amazonas	não
RV117230	2012	Acre	não
PA21771	2011	Pará	não
PA21772	2011	Pará	não
PA21773	2011	Pará	não
PA21774	2011	Pará	NI
RV117270	2012	Amazonas	não

ID = código de identificação da amostra/ NI = não informado

4.1 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.

4.2 Extração de ácidos nucleicos

O genoma viral foi extraído a partir das suspensões pelo “PureLink® RNA/DNA Minikit” (Invitrogen™, USA). Nesta etapa foram seguidas todas as recomendações do fabricante. Controles negativos e positivos foram incluídos em todas as fases do processo.

4.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA a partir do RNA extraído foi realizada utilizando-se o iniciador randômico contido no Kit High Capacity® (Applied Biosystems, USA), seguida de amplificação com iniciadores específicos. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando a mistura de reagentes descrita no **Quadro 2**.

Foram adicionados 2 µL de dimetil sulfoxido (DMSO) a 10 µL de RNA extraído e incubado a 97°C por 7 minutos. Após esse procedimento, os tubos foram incubados por 2 minutos em banho de gelo e foram adicionados 38µL da mistura de reagentes (RT) (**Quadro 2**). No termociclador, os tubos foram submetidos à temperatura de 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas e 85°C por 5 minutos. O produto foi estocado a 4°C até o momento da PCR.

Quadro 2. Mistura de reagentes utilizados na reação de transcrição reversa

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O livre de DNAase / RNAase (Invitrogen®)	-	14,8 µL
Tampão RT (Applied Biosystems®)	10X	8 µL
DNTP Mix: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Applied Biosystems®)	25X	3,2 µL
RT Iniciador randômico (Applied Biosystems®)	10X	8 µL
RT Multiscribe (Applied Biosystems®)	50U	4 µL
RNA Desnaturado (RNA + DMSO)	-	12 µL
Total	-	50µL

4.4 Amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7 e NSP4

A mistura de reagentes utilizada para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP1-VP4, VP6, VP7 e NSP4 está descrita no **Quadro 3**. 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 a hibridização dos iniciadores para o gene que codifica para VP4, 42°C para VP7, 49°C para VP1/VP2/VP3 e 55°C para NSP4/VP6 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. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos no **Quadro 4**.

Quadro 3. Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7 e NSP4.

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 (Invitrogen®)	5U/mL	0,25 µL
Oligonucleotídeos (Foward/Reverse) específicos para os genes	20µM (cada)	2 µL
cDNA	-	5 µL
Total	-	50µL

4.5 Amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP7, NSP1, NSP2, NSP3 e NSP5 por One-Step RT-PCR®

As amplificações dos genes que codificam para as proteínas NSP1, NSP2, NSP3 e NSP5 foram realizadas utilizando o Kit “SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase” (Invitrogen®), de acordo com as instruções descritas pelo fabricante. Ocasionalmente, as amostras que não

amplificaram para o gene VP7 pela PCR anteriormente descrita foram amplificadas com este kit. Os oligonucleotídeos e a mistura de reagentes utilizados na reação estão descritos nos **Quadros 4 e 5**, respectivamente.

Em tubo de poliestireno de 200µL, foram adicionados 3µL de DMSO e 12µL do RNA extraído. Após incubação a 97°C por 7 minutos para desnaturação, o tubo foi mantido em banho de gelo por 2 minutos. A seguir foram adicionados 35µL da mistura de reação de amplificação (**Quadro 4**). As condições de termociclagem consistiram de: uma etapa de RT a 55°C por 55 minutos; a etapa de desnaturação 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 hibridização 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.

Quadro 4. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação e sequenciamento genômico no presente estudo.

Gene	Nome do Iniciador	Sequência sentido (5' - 3')	Posição (nt) no genoma viral	Referência
VP1	VP1-F	GGC TAT TAA AGC TGT ACA ATG GG	1-23	Varghese <i>et al</i> , 2006
VP1	VP1-R	TAA TCC TCA TGA GAA AAC ACT GAC	702-677	Varghese <i>et al</i> , 2006
VP2	VP2-F	GGC TAT TAA AGG CTC AAT GGC G	1-22	Varghese <i>et al</i> , 2006
VP2	VP2-R	CTT CAT CTT GAA ATA TAG CAT CAC	686-663	Varghese <i>et al</i> , 2006
VP3	VP3-F	GGC TAT TAA AGC AGT ACC AGT AG	1-23	Varghese <i>et al</i> , 2006
VP3	VP3-R	GTA AAC ATA GAT TCA TTA CGC GGA CC	702-677	Varghese <i>et al</i> , 2006
VP4	4con3	CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC	11-32	Gentsch <i>et al</i> , 1992
VP4	4con2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	887-868	Gentsch <i>et al</i> , 1992
VP6	FVP6	GGC TTTT AAA CGA AGT CTT C	1-20	Both <i>et al</i> , 1984
VP6	RVP6	GGT CAC ATC CTC TCA CTA CA	1337-1356	Both <i>et al</i> , 1984
VP7	Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28	Gouvea <i>et al</i> , 1990
VP7	End9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1036-1062	Gouvea <i>et al</i> , 1990
NSP1	NSP1-F	GGC TTT TTT TCT GAA AAG TCT	1-20	Nakagomi and Kaga, 1995
NSP1	NSP1-R	GGT CAC ACT TTT TTA TGC TGC	1546-1566	Nakagomi and Kaga, 1995
NSP2	K-NSP2F	GGC TTT TAA AGC GTC TCA GTC	1-21	Matthijnsens <i>et al</i> , 2008
NSP2	K-NSP2R	GGTCACA TAAGCGCTTTCTAT	1038-1058	Matthijnsens <i>et al</i> , 2006
NSP3	GENSP3-F	GGC WTT TAA TGC TTT TCA GTG G	1-21	Matthijnsens <i>et al</i> , 2006
NSP3	GENSP3-R	GGT CAC ATA ACG CCC CTA TAG	1052-1069	Matthijnsens <i>et al</i> , 2006
NSP4	FN4D	CGG AAA AGAT GGA AAA GC	35-52	Gómez <i>et al</i> , 2011
NSP4	RN4D	GGATTGGTTAAACGGGAT	690-707	Gómez <i>et al</i> , 2011
NSP5	GENSP5-F	GGC TTT TAA AGC GCT ACA G	1-19	Matthijnsens <i>et al</i> , 2006
NSP5	GENSP5-R	GGT CAC AAA ACG GGA GT	684-700	Matthijnsens <i>et al</i> , 2006

Quadro 5. Reagentes utilizados para amplificação dos genes que codificam para a proteína VP7.

Reagentes	Concentração	Volume
Reaction mix (Invitrogen®)	2X	25 µL
MgSO ₄ (Invitrogen®)	5mM	8 µL
Enzyme mix (Invitrogen®)	2000U/µL	1 µL
Oligonucleotídeos (Forward/Reverse) específicos para os genes	20µM (cada)	1 µL
RNA desnaturado (RNA + DMSO)	-	15 µL
Total	-	50µL

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

Para análise dos *amplicons* obtidos como descrito anteriormente, 2µL de corante azul de bromofenol (Invitrogen®) foram adicionados a 10µL dos produtos da RT-PCR e os mesmos foram submetidos à 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.

4.7 Purificação dos produtos amplificados para sequenciamento

A purificação dos produtos amplificados foi realizada utilizando-se o *kit* comercial “QIAquick® PCR Purification Kit” (QIAGEN™, Valencia, CA, USA), quando apenas o amplicon esperado foi obtido.

Quando observada a presença de amplicons inespecíficos, a purificação do produto foi realizada pela extração em gel de agarose utilizando o “QIAquick® Gel Extraction Kit” (QIAGEN™, Valencia, CA, USA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

4.8 Sequenciamento dos genes amplificados

O sequenciamento foi realizado pela Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/Fiocruz e pela Seção de Virologia/IEC, utilizando os sequenciadores automáticos ABI PRISM[®] 3130 Genetic Analyzer e ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems[™], USA), respectivamente. A reação foi realizada utilizando o Kit “Big Dye Terminator[®] v 3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems[™], CA, USA), conforme recomendações do fabricante. Os iniciadores utilizados no sequenciamento foram os mesmos das reações de amplificação, porém individualmente (**Quadro 4**).

4.9 Análise das sequências

As sequências nucleotídicas obtidas foram editadas e alinhadas no software de livre acesso *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.1.3.0). O alinhamento de nt e aa foi realizado utilizando o aplicativo *CLUSTAL W* (Thompson *et al*, 1994), e as matrizes de identidade foram obtidas com o *BioEdit*[®].

As amostras de referência e protótipos utilizadas nos estudos comparativos, representantes dos diferentes genótipos de RVA (humano e animal), foram obtidas a partir do *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) com o uso da ferramenta *Blast*. Os números de acesso das sequências nucleotídicas dos principais protótipos e cepas de referências encontram-se descritos no **Quadro 6**. Foram incluídas sequências de diferentes regiões brasileiras e de outros continentes, descritas em diversos períodos.

As relações filogenéticas entre as diferentes sequências foram determinadas e dendogramas foram reconstruídos mediante a utilização do pacote de programas MEGA v 5.0 (Tamura *et al*, 2011), através do método de reconstrução filogenética *Neighbor-Joining*. As distâncias genéticas entre as diferentes amostras foram calculadas mediante o modelo *Kimura-2-parameter* para substituição nucleotídica e o modelo *Poisson Correction* para substituição aminoacídica. Outros modelos para determinação de distância foram avaliados, entre os quais *Tajima-Nei* e *Maximum*

Composite Likelihood, disponíveis no MEGA v. 5.0 (dados não mostrados). A significância estatística das diferentes filogenias obtidas foram estimadas através de re-amostragem (*bootstrap*) aplicada em 2.000 repetições.

A partir das sequências nucleotídicas, foram deduzidas sequências de aminoácidos com a utilização do programa *Bioedit*. A **Tabela 3** lista os 20 aminoácidos codificados naturalmente, e suas respectivas abreviações. O mapeamento de diferentes mutações foi realizado através da análise direta dos alinhamentos aminoacídicos obtidos para os 11 segmentos gênicos dos espécimes em estudo, em comparação com sequências de cepas de referência, disponíveis dos bancos de dados do NCBI.

Quadro 6. Quadro com o resumo das amostras protótipos utilizadas nas análises filogenéticas obtidas no *GenBank* com seus respectivos números de acesso para cada um dos genes estudados. A marcação (X) corresponde a Dados indisponíveis no *GenBank*.

Protótipo	País	Origem	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Rotarix-A41CB052A	EUA	humana	JN849114	JN849113	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Wa	EUA	humana	GU723327	L34161	K02086	DQ490539	X14942	AY267335	L18943	L04534	X81434	AF200224	AB091726
Dhaka16-03	EUA	humana	DQ492674	DQ492672	DQ492673	DQ492669	DQ492670	DQ492671	DQ492675	DQ492676	DQ492677	DQ492678	DQ492679
DS-1	EUA	humana	AB118023	AB118025	DQ870507	DQ870505	DQ870506	DQ870507	L18945	EF672580	EF672579	HQ650125	HQ650126
TB-Chen	China	humana	AY787646	AY787644	AY787645	AY787653	AY787652	AY787654	AY787647	AY787648	AY787649	AY787650	AY787651
AU-1	Japão	humana	D86271	D10970	DQ490538	DQ490533	DQ490536	DQ490537	D45244	DQ490534	DQ490535	D89873	AB008656
B3458	Bélgica	humana	EF990708	EF990707	DQ870504	DQ870501	DQ870502	EF990712	EF990710	EF990711	DQ870504	EF990713	EF990709
VU08-09-20	EUA	humana	JF790331	JF790327	JF790325	JF790326	JF790330	JF790328	JF790329	JF790321	JF790324	JF790323	JF790322
VU08-09-22	EUA	humana	JF491055	JF491058	JF491057	JF491060	JF491061	JF491059	JF491052	JF491051	JF491056	JF491054	JF491053
BE00055	Bélgica	humana	JN25879	JN258798	JN258792	JN258795	JN258800	JN258799	JN258801	JN258794	JN258793	JN25897	JN258796
BE00040	Bélgica	humana	HQ392360	HQ392362	HQ392361	HQ392355	HQ392364	HQ392363	HQ392357	HQ392356	HQ392365	HQ392359	HQ392358
BE00061	Bélgica	humana	X	KC193626	KC193627	KC193623	KC193624	KC193625	KC193618	KC193619	KC193620	KC193621	KC193622
CK00078	Austrália	humana	JX027796	JX027799	JX027798	JX027791	JX027801	JX027800	JX027793	JX027792	JX027797	JX027795	JX027794
RV176	Bangladesh	humana	DQ490556	DQ490554	DQ490555	DQ490551	DQ490552	DQ490553	DQ490557	DQ490558	DQ490559	DQ490560	DQ490561
12585_06ES	Brasil	humana	X	X	HM123824	X	X	X	X	X	X	HM123853	X
15863_08MA	Brasil	humana	HM066111	HM066046	HM066156	X	X	X	X	X	X	HM066189	X
rj1609/98	Brasil	humana	FJ793995	FN179467	X	X	X	X	FJ793948	X	FJ793972	X	FJ794019
Rj11149/05	Brasil	humana	FJ794008	FN179469	X	X	X	X	FJ793951	X	FJ793974	X	FJ794021
Ba12537/06	Brasil	humana	FJ794012	FN179485	X	X	X	X	FJ793964	X	FJ793990	X	FJ794037
Rj12077/06	Brasil	humana	FJ794009	FN179474	X	X	X	X	FJ793962	X	FJ793986	X	FJ794033
IAL28	Brasil	humana	EF672588	EF672584	EF583032	EF583029	EF583030	EF583031	EF672585	EF672587	EF672586	EF672589	EF672590
NSC209	Brasil	humana	JQ715625	JQ715631	X	JQ715636	JQ715642	JQ715649	JQ715656	JQ715661	JQ715666	X	JQ715674
HSP180	Brasil	humana	JQ715628	DQ525197	JQ715634	JQ715639	JQ715645	JQ715652	JQ898158	JQ715663	JQ715670	JQ898160	JQ715678
HST327	Brasil	humana	JQ715629	DQ525198	X	JQ715640	JQ715646	JQ715653	JQ715658	JQ898159	JQ715671	DQ525188	JQ715679
HSP034	Brasil	humana	JQ715627	X	X	JQ715638	JQ715644	JQ715651	JQ715657	X	JQ715669	X	JQ715677
HST369	Brasil	humana	X	DQ525200	X	X	X	X	X	X	X	DQ525190	X
LB2772	USA	humana	HM467956	HM467945	HM467951	HM467927	HM467933	HM467934	HM467963	HM467969	HM467975	HM467981	HM467921
KUN	Japão	humana	X	AB733131	AB733132	AB733133	AB733134	AB733135	AB733136	AB733137	X	X	X
MMC88	Bangladesh	humana	EU839925	HQ641373	HQ641367	HQ641364	HQ641365	HQ641366	HQ641368	HQ641369	HQ641370	HQ641371	HQ641372
CMH049/07	Tailândia	humana	JQ043271	JQ043284	JQ043296	X	X	X	X	X	X	JQ043305	JQ043317
PAH136	Itália	humana	GU296430	GU296426	GU296428	GU296420	GU296422	GU296424	GU296410	GU296412	GU296415	GU296416	GU296418
SA11-H96	China	humana	X	X	JF791806	X	X	X	JF791801	JF791802	JF791803	JF791804	JF791805
PO-13	Japão	aviária	D82979	AB009632	D16329	AB009629	AB009630	AB009631	AB009633	AB009625	AB009626	AB009627	AB009628
OSU	EUA	suína	X06722	Z12107	AF317123	GU199514	GU199515	AY277921	U08432	X	X81431	D88831	X
10733	Itália	bovina	AY281360	AY281359	X	X	X	X	X	X	X	AY293829	EU659853
DQ-75	China	bovina	GU144587	GU181281	GU384194	GU384192	GU384191	GU384193	GU384195	GU384196	GU384197	GU181282	GU384198
UKD	Índia	bovina	HM235505	HM235506	HM235508	X	X	X	HM363560	HM363561	HM363562	HM363563	HM363564
WC3	EUA	bovina	AY050272	AY050271	EF560615	EF560616	EF560617	AY050273	EF990700	EF990701	AF411322	EF990702	EF990699
Cat97	Austrália	felina	EU708950	EU708948	EU708949	EU708945	EU708946	EU708947	EU708951	EU708952	EU708953	EU708954	EU708955
Gottfried	EUA	suína	X06386	M33516	M32805	GU199487	GU199488	GU199490	GU199489	X81430	D00326	GU199491	U08431

Tabela 4. Descrição dos 20 aminoácidos codificados naturalmente e suas respectivas abreviações com três e uma letra (Adaptado de Lemey, Salemi & Vandamme, 2009).

Aminoácido	Abreviação três letras	Abreviação letra única
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

5. RESULTADOS

5.1 Amplificação dos genes estruturais (VPs) e não estruturais (NSPs)

Todas as 40 amostras já haviam sido previamente caracterizadas quanto ao genótipo G (VP7) no Laboratório de Rotavírus/IEC. Entretanto, foi realizada nova PCR para este gene, além de reações de amplificação para os 10 genes que codificam as demais VPs e NSPs de RVA. Com a utilização de dois métodos de RT-PCR (*Random primer* e *OneStep*) foi possível amplificar todos os genes das amostras em estudo. A **figura 13** representa os padrões de amplificação visualizados em gel de agarose a 1,5% submetido a eletroforese, de alguns genes pela RT-PCR e *OneStep* RT-PCR.

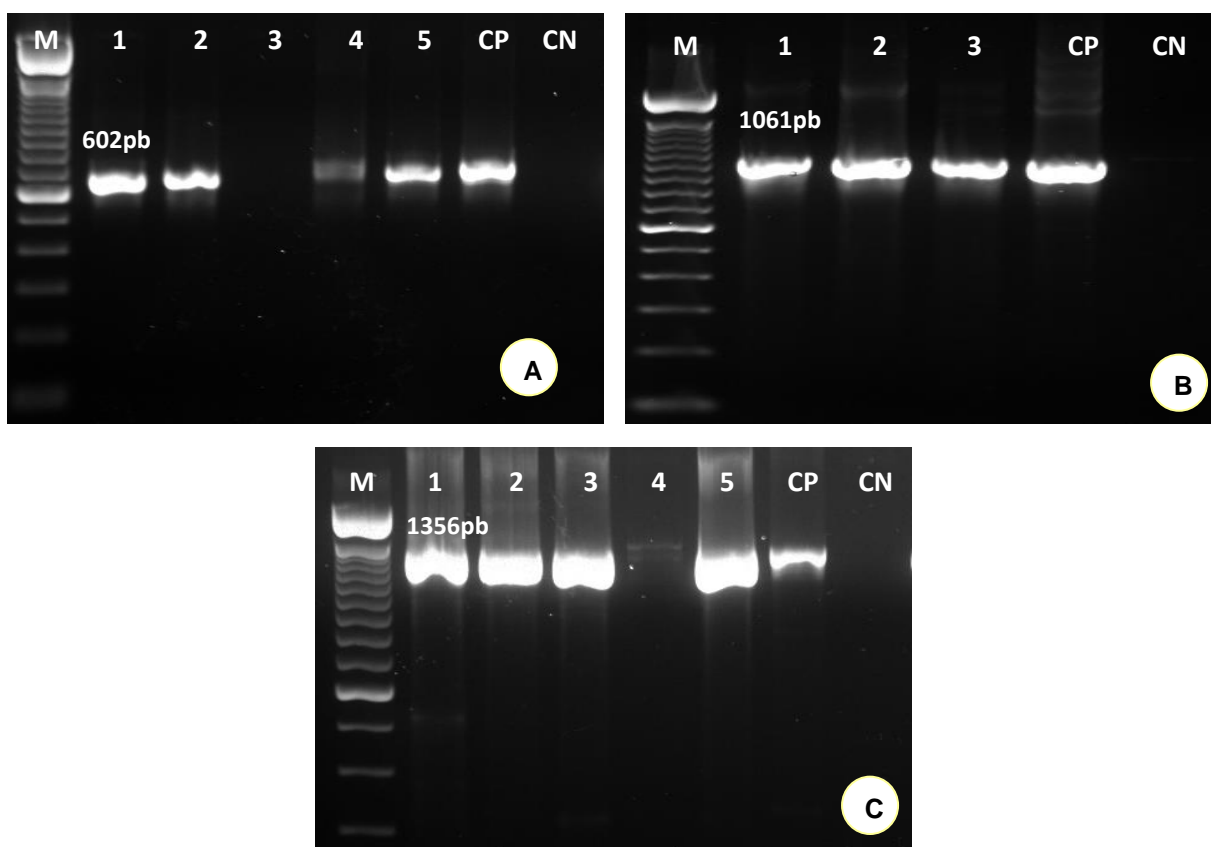


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos de RT-PCR específica para os genes que codificam para as proteínas VP1 (A), VP7 (B) e VP6 (C) de rotavírus da espécie A (RVA), sendo este último amplificado por *One-Step RT PCR* Invitrogen®. **M:** marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®). **CP:** controle positivo. **CN:** controle negativo. **A:** Linhas 1,2,4,5: amostras positivas para VP1; linha 3: amostra não amplificada. **B:** Linhas 1 a 3: amostras positivas para VP7. **C:** linhas 1-3 e 5: amostras positivas para V67; linha 4: amostra positiva fraca.

5.2 Genotipagem dos 11 genes de rotavírus da espécie A

A genotipagem baseada no novo sistema de classificação dos RVA das amostras em estudo foi realizada através do sequenciamento dos produtos de PCR purificados, seguido de comparação genética entre sequências nucleotídicas através do aplicativo *Blast* (**Quadro 7**). Foram analisadas 40 amostras, compreendendo 22 espécimes circulantes no período pré-introdução da vacina Rotarix® (1994-mar/2006) e 18 espécimes pertencentes ao período pós-vacina (mar/2006-2011). Quatro amostras amplificadas para os genes VP1, VP3, VP6 e/ou NSP5 não apresentaram um bom padrão de suas sequências e tais genes foram descartados para análise.

No **Quadro 7** encontram-se detalhados todos os genótipos detectados e as constelações genotípicas formadas pela caracterização dos 11 segmentos gênicos. A amostra RV117230 apresentou seu resultado discordante daquele obtido pela *Nested-PCR* realizada no IEC, uma vez que o resultado da genotipagem apresentava-se como G3 e, foi posteriormente caracterizada como G12, pelo sequenciamento.

Foram observadas constelações genotípicas conservadas em 85% (34/40) das amostras analisadas, o que forneceu base para relacioná-las com os três principais genogrupos circulantes na espécie humana. Cerca de 65% (26/40) dos espécimes apresentaram uma constelação *Wa-like* (G1/G3/G4/G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1); seis espécimes evidenciaram constelação *DS1-like* (G2-[P4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2); uma amostra G2P[4] (apresentou uma variante alélica para o gene NSP3 (T1), revelando a constelação genotípica G2-[P4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T1-E2-H2 e a amostra PID084 relacionou-se com o genogrupo *AU1-like* (G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A1-N3-T3-E3-H3). Duas amostras revelaram constelações genotípicas incomuns, uma vez que compartilharam mais de uma característica inter-genogrupos (*Wa-like* e *DS1-like*): a amostra HSE005 revelou a constelação G4-P[6]-I1-R1-C2-M1-A1-N1-T7-E1-H2 e a amostra RV117230 caracterizou-se como G12-P[6]-I1-R1-C1-M1-A2-N1-T2-E1-H1.

Deve-se ressaltar que a amostra RV117230 (G12P[6]) foi a única que circulou com uma constelação considerada atípica após a introdução da Rotarix®. Quatro amostras (PID132, PID177, PSAL3115C e RV101253) possuem constelações inconclusivas devido a baixa qualidade do sequenciamento obtido para alguns genes.

Quadro 7. Resumo dos genótipos detectados nas amostras em estudo correspondentes aos 11 segmentos gênicos.

ID amostra	Ano	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
HST294	1994	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
HSE002	1998	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
HST309	1999	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
HST352	1999	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
HSP196	1999	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
PID132	2001	G1	P8	I1	X	C1	X	A1	N1	T1	E1	X
PID385	2001	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
PID92	2002	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
PID177	2002	G1	P8	X	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
PID59021	2003	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RV102322	2009	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RV102866	2009	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RV106099	2009	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RV109713	2010	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
PA21772	2011	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
PA21773	2011	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
PA21774	2011	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
HST025	1998	G2	P4	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T1	E2	H2
PSAL-906D	2006	G2	P4	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
PSAL-1655C	2006	G2	P4	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RV98325	2007	G2	P4	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RV99873	2008	G2	P4	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
PSAL-3115C	2008	G2	P4	I2	R2	C2	X	A2	N2	T2	E2	H2
RV112015	2010	G2	P4	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
PA21771	2011	G2	P4	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RV117270	2012	G3	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
PID084	2002	G3	P9	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H3
HSE005	1998	G4	P6	I1	R1	C2	M1	A1	N1	T7	E1	H1
HST357	2000	G4	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
HST374	1999	G9	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
HST393	2000	G9	P8	I2	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E2	H1
HST385	2000	G9	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
PID366	2001	G9	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
PID90	2002	G9	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
PID1527	2002	G9	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RV101107	2008	G9	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RV100669	2008	G9	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RV101253	2009	G9	P8	X	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RV109720	2010	G9	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RV117230	2012	G12	P6	I1	R1	C1	M1	A2	N1	T2	E1	H1

Período pré-vacina

Período pós-vacina

5.3 Análise filogenética

Foram reconstruídos dendogramas, utilizando as sequências nucleotídicas dos 11 segmentos gênicos de RVA das 40 amostras em estudo, com a finalidade de avaliar a diversidade genética dos RVA na Região Norte, antes e após a introdução da vacina monovalente (G1P[8]) Rotarix®. Estudos comparativos foram conduzidos com sequências de amostras protótipos, disponíveis no *GenBank* (**Quadro 6**) e amostras isoladas em diferentes regiões do Brasil e de outros países, cujas nomenclaturas estão de acordo com a proposta pelo *Rotavirus Classification Work Group*, em 2011. Além disso, para um melhor entendimento acerca dos períodos em que as amostras circularam neste estudo, será denominado **período pré-vacinal**, aquele anterior à introdução da vacina no calendário básico do PNI brasileiro (1994-mar/2006) e **período pós-vacinal** aquele posterior à introdução (mar/2006-2011).

Foram observados topologias e valores de suporte estatístico (*bootstrap*) semelhantes nos dendogramas construídos com diferentes métodos de inferência filogenética e modelos evolutivos de determinação de distância genética entre as sequências nucleotídicas (dados não mostrados). Para uma melhor comparação com os dados disponíveis acerca de RVA, o método *Neighbor-Joining* foi selecionado.

5.3.1 Análise do gene que codifica para a proteína VP7

A análise filogenética baseada nas seqüências nucleotídicas completas do gene que codifica para a proteína VP7 (1062pb) das amostras em estudo, revelou grande diversidade entre as estirpes circulantes antes e após a introdução da vacina.

5.3.1.1. Genótipo G1

Todas as 40 amostras do estudo puderam ser caracterizadas para o gene VP7. Entre elas, 17 (42,5%) foram caracterizadas com o genótipo G1, sendo que 10

pertenciam ao período pré-vacinal e sete circularam no período pós-vacinal. Baseado neste grande percentual de amostras G1 detectado foi construído um dendograma separadamente, com a finalidade de destacar a diversidade genética entre as estirpes de RVA que compartilham o genótipo da cepa vacinal (**Figura 14**).

Entre as amostras G1 do estudo, houve a circulação de duas linhagens evolutivas: G1-I e G1-II. Aquelas pertencentes ao período pré-vacinal, circularam no Estado do Pará e foram classificadas em 4 sublinhagens distintas (Ib, Ic, IIa e IIc), agrupando em *clusters* com amostras sul-americanas (Argentina, Brasil e Uruguai) contemporâneas aos seus períodos de circulação (**Figura 14**). O percentual de identidade nucleotídica e aminoacídica entre elas variou de 83 a 97% e de 91 a 99%, respectivamente (dados não mostrados).

Já no período pós-vacinal, circularam apenas amostras G1-I. O **Cluster A** demonstra o agrupamento de amostras isoladas no Pará e Amazonas entre si e a estreita relação com a cepa USA2007719739, isolada nos Estados Unidos. Nele, também estão indicadas duas estirpes de RVA isoladas de crianças que haviam sido imunizadas com as duas doses da vacina Rotarix® (RV102322 e RV102866). A sequência da cepa que constitui a vacina (sublinhagem IIa) foi incluída na análise e agrupou em um *cluster* somente com a amostra PID385 de 2001 e com outras oriundas de Montevideo/Uruguai, revelando um valor de *bootstrap* de 98%. A **Tabela 4** descreve os valores de identidade nucleotídica e de aa reveladas entre as amostras G1 e as cepas da Rotarix® e o protótipo Wa.

O alinhamento das sequências deduzidas de aa das amostras G1 está indicado na **figura 15** e demonstra além de regiões conservadas, substituições ocorrendo ao longo de todas as sequências em comparação as cepas de referência. Dentre elas, algumas ocorreram em regiões antigênicas (**A, B, C, F**) da proteína: 97(D→E); 147(S→N); 170(V→I); 218(M→T); 219(I→V). Nas posições 65/66/68, descritas como sítios de diferenciações entre linhagens, foram observadas quatro substituições: 65(A→T); 66(V→A); 68(T→A) e 68(T→S), refletindo a diversidade encontrada no estudo. Três mudanças ocorreram exclusivamente nas sete amostras do período pós-vacinal: 72(Q→R); 266(S→A) e 268(V→I), entretanto não compreendem regiões antigênicas. Em relação as amostras de crianças imunizadas, suas sequências não demonstraram diferenças significativas em relação a Rotarix®. A amostra PID385/2001 foi a única que compartilhou mudanças específicas com a cepa vacinal em relação ao protótipo Wa, como na posição 202(T → M).

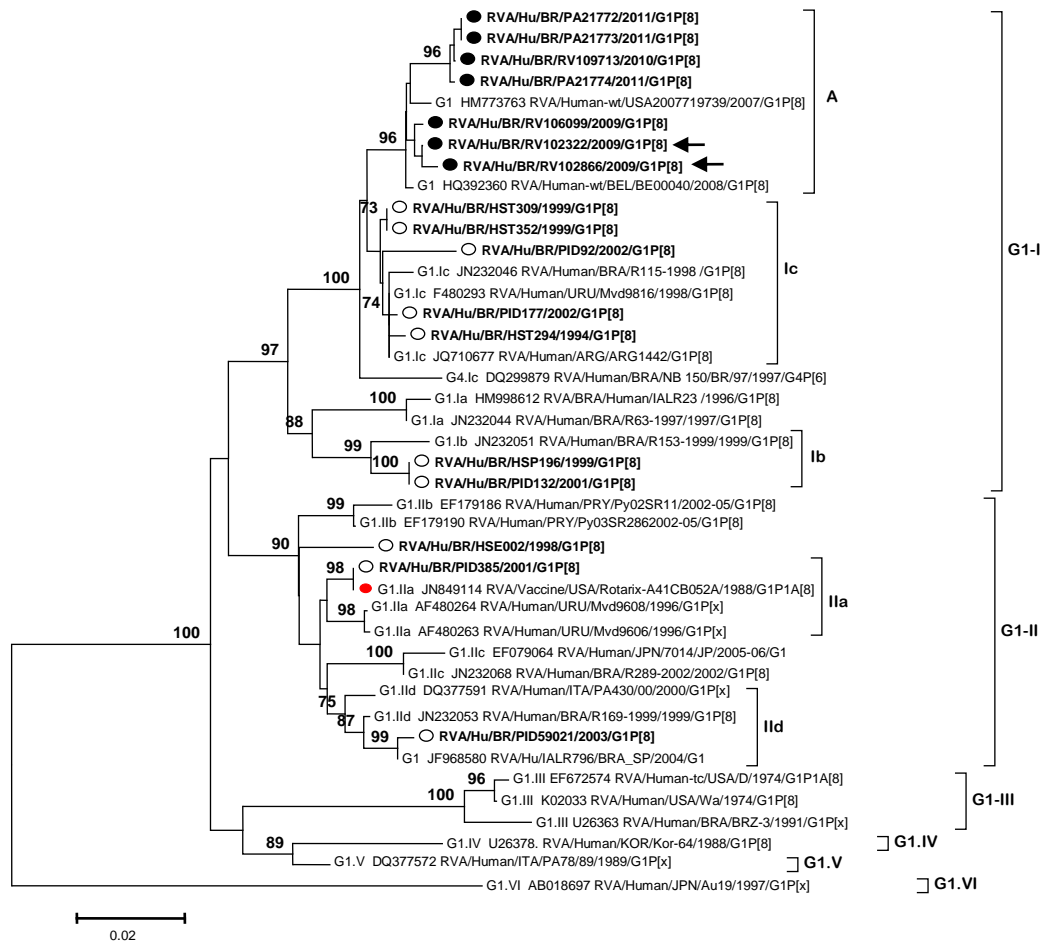


Figura 14. Dendrograma obtido através de reconstrução filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* a partir das seqüências nucleotídicas completas (978pb) da região codificante do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras de rotavírus A G1da região Norte do Brasil e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética. O círculo vazio (○) corresponde a amostras antes da vacina e o círculo preenchido (●) corresponde a amostras posteriores a introdução da vacina. As setas indicam amostras de crianças vacinadas.

Tabela 5. Identidade nucleotídica e de aminoácidos, baseada na seqüência codificante completa do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras da Região Norte do Brasil G1P[8] representantes dos diferentes *clusters* observados e amostra protótipos de rotavírus A humano.

ID Amostra	Linhagem	Wa (G1-III)		Rotarix® (G1-II)	
		nt	aa	nt	aa
RVA/Hu/BR/PID92/2002/G1P[8]	I	0.83	0.91	0.87	0.93
RVA/Hu/BR/PID385/2001/G1P[8]	II	0.86	0.93	0.96	0.99
RVA/Hu/BR/PID59021/2003/G1P[8]	II	0.86	0.93	0.96	0.97
RVA/Hu/BR/HSE002/1998/G1P[8]	II	0.87	0.92	0.95	0.97
RVA/Hu/BR/RV102322/2009/G1P[8]	I	0.88	0.91	0.90	0.94
RVA/Hu/BR/RV102866/2009/G1P[8]	I	0.86	0.90	0.88	0.92
RVA/Hu/BR/RV106099/2009/G1P[8]	I	0.87	0.91	0.90	0.93
RVA/Hu/BR/RV109713/2010/G1P[8]	I	0.83	0.90	0.88	0.92
RVA/Hu/BR/HST294/1994/G1P[8]	I	0.86	0.92	0.90	0.95
RVA/Hu/BR/HST309/1999/G1P[8]	I	0.86	0.92	0.90	0.94
RVA/Hu/BR/HST352/1999/G1P[8]	I	0.86	0.92	0.90	0.94
RVA/Hu/BR/PID177/2002/G1P[8]	I	0.86	0.92	0.92	0.94
RVA/Hu/BR/HSP196/1999/G1P[8]	I	0.88	0.93	0.91	0.94
RVA/Hu/BR/PID132/2001/G1P[8]	I	0.87	0.93	0.91	0.94
RVA/Hu/BR/PA21772/2011/G1P[8]	I	0.92	0.93	0.85	0.93
RVA/Hu/BR/PA21773/2011/G1P[8]	I	0.84	0.91	0.88	0.92
RVA/Hu/BR/PA21774/2011/G1P[8]	I	0.87	0.92	0.91	0.93

5.3.1.2. Genótipos G2, G3, G4, G9 e G12

Foram caracterizadas com o genótipo G2 (representadas em laranja na **Figura 16**), 20% (8/40) das amostras analisadas, sendo três pertencentes ao período pré-vacinal e cinco ao período pós-vacinal. As amostras agruparam em três *clusters* juntamente com amostras G2 brasileiras de diferentes períodos (**Figura 16**). Houve a circulação de duas linhagens evolutivas de G2 (II e III) no período pré-vacinal, sendo que apenas uma amostra foi caracterizada como G2-III (HST025/1998), agrupando em um *cluster* com amostras brasileiras isoladas no Rio de Janeiro em 2002. As outras duas amostras circulantes neste período agruparam com uma amostra brasileira G2-II isolada no Mato Grosso do Sul em 2005. As amostras do período pós-vacinal, detectadas no Amazonas e Pará, foram classificadas como G2-II e agruparam em *cluster* com estirpes que circularam no Nordeste brasileiro entre 2007 e 2008 (HM066086/HM066111), revelando valores de identidade nucleotídica entre elas variando de 95.4 a 99.8% (dados não mostrados) (**Figura 16**).

Duas amostras foram caracterizadas com o genótipo G3 (representadas em azul na **Figura 16**): uma estirpe isolada no Acre em 2012 (RV117270) agrupou com a amostra protótipo G3 de origem humana (AU-1), revelando identidade nucleotídica de 89% entre elas; a outra detectada no Pará em 2002 (PID084) agrupou em um *cluster* com amostras de origem felina e humana (BA222 e Omsk08-442), suportado por valor de *bootstrap* de 70% (**Figura 16**) e identidade nucleotídica e aminoacídica variando de 86,5-91% e 89-93%, respectivamente, entre elas (dados não mostrados)

Duas amostras foram caracterizadas com o genótipo G4 (representadas em roxo na **Figura 16**), ambas foram detectadas no Pará: a amostra HST357/2000 agrupou com amostras de origem humana isoladas na Bélgica e no Uruguai; e a amostra HSE005/1998 agrupou com três amostras de origem suína (sublinhagem VIIb) detectadas no Brasil e na Argentina. O valor de *bootstrap* para este agrupamento foi de 100% (**Figura 16**) com valores de identidade nucleotídica variando de 85 a 93% entre elas (dados não mostrados).

Foram caracterizadas 25% das amostras (10/40) com o genótipo G9 (representadas em verde na **Figura 16**); todas agruparam com amostras

pertencentes à linhagem G9-III. As seis amostras do período pré-vacinal, detectadas no estado do Pará, formaram um *cluster* entre si (**Cluster B**), com valores de identidade nucleotídica variando de 94.1 a 98.5% (dados não mostrados). A amostra que se mostrou mais próxima do agrupamento foi uma estirpe G9 isolada na África entre 1997-2002 (GH1319). As quatro amostras do período pós-vacinal, circulantes no Amazonas, também não agruparam com nenhuma estirpe de RVA utilizado no estudo comparativo, sugerindo possíveis características genéticas específicas dessa região; o **Cluster C** indica o agrupamento entre elas, suportado por um *bootstrap* de 99% e identidade nucleotídica variando de 92.6 a 99% (dados não mostrados). Estirpes de RVA detectadas em crianças imunizadas estão indicadas por setas no dendograma (**Figura 16**).

A amostra RV117230 de 2010, que antes havia sido genotipada como G3 pelo IEC, foi caracterizada com o genótipo G12 (**Figura 16**) e agrupou em um *cluster* com amostras de origem humana que circularam também na Região Norte em 2008/2009, pertencentes à linhagem III deste genótipo. A identidade nucleotídica entre elas variou de 85-97% (dados não mostrados).

Os alinhamentos das sequências deduzidas de aminoácidos de VP7 (326aa) para os cinco genótipos anteriormente descritos foram obtido através da comparação com as sequências aminoacídicas das principais cepas protótipos (Wa, DS-1 e AU-1), representantes dos genogrupos predominantes na análise (dados não mostrados). O **Quadro 8** descreve as principais substituições observadas ao longo das sequências de aa em amostras caracterizadas como G2, G3, G4, G9 e G12

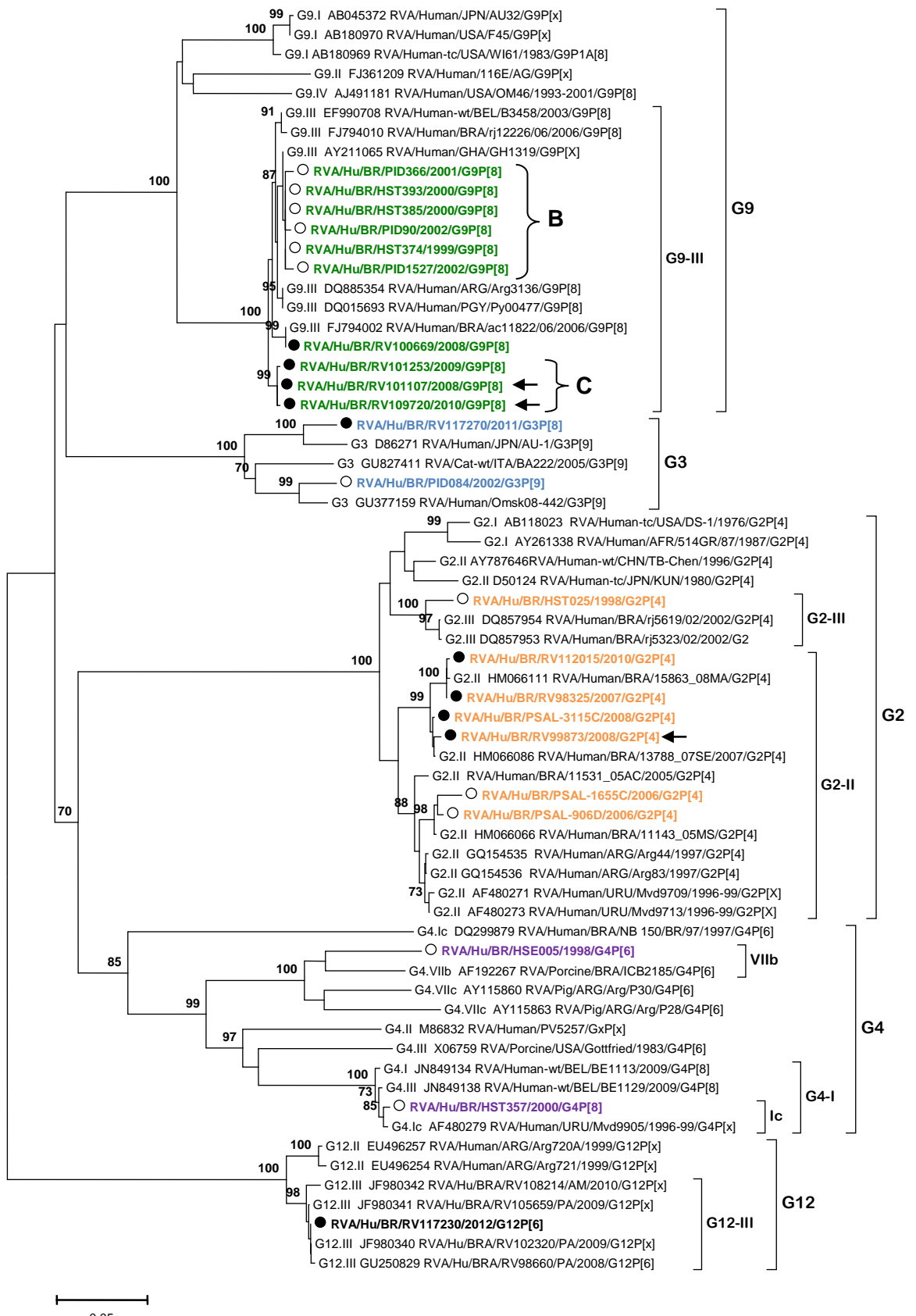


Figura 16. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* a partir das seqüências nucleotídicas completas (1062pb) da região codificante do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras de rotavírus A G2 (laranja), G3 (azul), G4 (roxo), G9 (verde) e G12 (negrito) da região Norte do Brasil e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética. O círculo vazio (○) corresponde a amostras antes da vacina e o círculo preenchido (●) corresponde a amostras posteriores a introdução da vacina. As setas indicam amostras de crianças vacinadas.

Quadro 8. Quadro demonstrativo das principais substituições observadas no alinhamento das sequências de aa do gene VP7 das amostras da Região Norte G2, G3, G4, G9 e G12 em comparação com os principais protótipos (Wa, DS-1 e AU-1).

G2	G3	G4	G9	G12
49(I→M)	32(T→I)	45(A→T)	43(I→V)	51(A→V)
66(P→A)	66(A→S)	48(T→I)	44(A→V)	66(A→D)
75(P→S)	*90(A→T)	75(N→D)	46(S→P)	156(T→I)
*87(A→T)	123(N→D)	*92(Q→A)	66(A→V)	248(G→D)
*95(D→L)	107(T→I)	*120(E→D)	73(Q→R)	263(V→I)
*213(N→D)	-	*123(N→S)	263(V→I)	-
319(A→T)	-	218(I→V)	279(A→T)	-

(*) corresponde a posição localizada em região antigênia

5.3.2 Análise do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*)

A análise filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (887pb) do gene que codifica para a proteína VP4, compreende a sequência nucleotídica completa da porção protéica VP8*.

5.3.2.1 Genótipo P[8]-G1

O dendograma obtido a partir das sequências nucleotídicas das amostras caracterizadas como G1 está demonstrado na **Figura 17**. Todas foram caracterizadas para VP8* com o genótipo P[8], sendo relacionadas com três linhagens evolutivas distintas: P[8]-I, P[8]-II ou P[8]-III.

As amostras do período pré-vacinal, detectadas no estado do Pará, não apresentaram um padrão de agrupamento, evidenciado a partir da formação de *clusters* distintos com amostras que circularam em diferentes países e anos, pertencentes as três linhagens evolutivas.

No período pós-vacinal uma amostra do estado do Pará (RV102866/2009) foi caracterizada como P[8]-II, agrupando com amostras do período pré-vacinal e duas

amostras brasileiras caracterizadas na década de 1990 (rj40644 e IAL28), indicado no **cluster C**. A identidade nucleotídica variou de 92.4 a 97.5%. O **cluster D** indica o agrupamento entre si de cinco estirpes isoladas no Pará e uma do Amazonas, todas foram caracterizadas como P[8]-III. A identidade nucleotídica variou de 99.4-99.8%.

A sequência de VP4 da cepa que constitui a vacina foi novamente incluída na análise e apenas duas amostras do Pará (PID385/2001 e PID177/2002) oriundas do período pré-vacinal foram agrupadas no *cluster* com amostras P[8]-I, a qual a vacina pertence (destacado na **Figura 17**), revelando identidades nucleotídicas variando de 94 a 96% (**Tabela 5**).

O alinhamento das sequências deduzidas de aa da VP4 (VP8*) indicado na **Figura 18** demonstrou que os potenciais sítios de clivagem da tripsina sobre as argininas 240 e 246 mantiveram-se conservadas em todas as amostras em estudo. Os resíduos de prolina 68, 71, 224 e 225, e o resíduo de cisteína na posição 215, que são altamente conservados na porção VP8* do gene VP4 de RVA, também foram mantidos em todas as amostras. São descritos cinco epítomos de neutralização na região da VP8* (M1-L10, I35-R44, I55-D66, V115-G123 e L224-P234) e algumas substituições aminoacídicas foram reveladas dentro destas regiões variáveis ao comparar as amostras com sequências de aa da cepa Wa e da cepa vacinal: 38(S→G) e 64(M→I), em todas as amostras; 120(T→N) em 10 amostras; 121(I→V), em 15 amostras. Não houveram substituições específicas entre amostras do mesmo período, apenas entre linhagens, tais como: 114(P→Q)/162(R→K)/195(N→D)/199(T→I), apenas em amostras da linhagem II; 120(T→N)/135(N→D), apenas em amostras da linhagem III; e pelo menos duas substituições ocorreram apenas na amostra PID385/2001, pertencente a linhagem I em relação ao protótipo Wa: 51(G→D) e 120(T→M). Estas últimas substituições citadas foram compartilhadas pela cepa da Rotarix[®], evidenciando a peculiaridade desta linhagem.

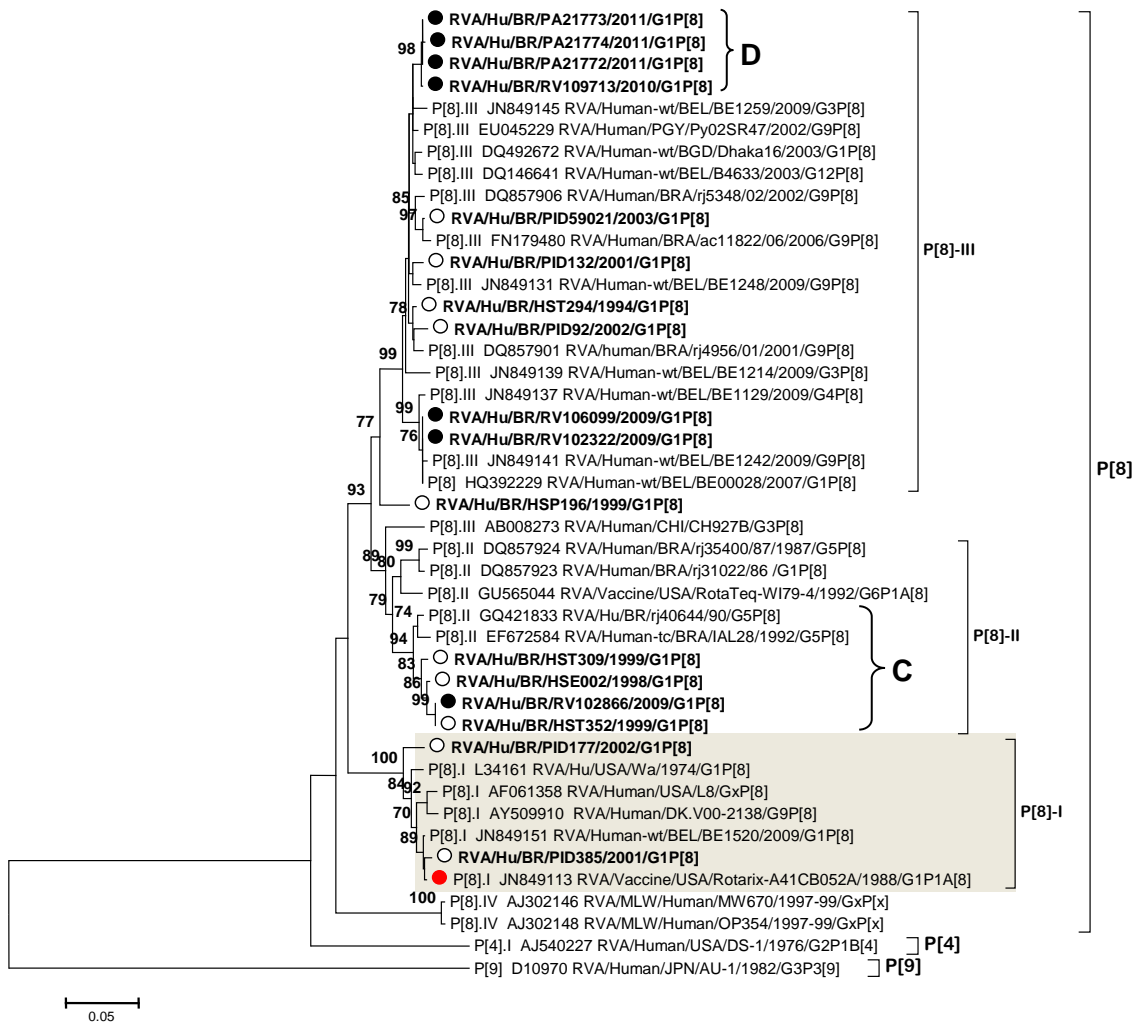


Figura 17. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* a partir das seqüências nucleotídicas parciais (877pb) da região codificante do gene que codifica para a proteína VP4 de amostras de rotavírus A G1P[8] da região Norte do Brasil e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética. O círculo vazio (○) corresponde a amostras antes da vacina e o círculo preenchido (●) corresponde a amostras posteriores a introdução da vacina.

Tabela 6. Identidade nucleotídica e de aminoácidos, baseada na seqüência codificante completa do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras da Região Norte do Brasil G1P[8] representantes dos diferentes *clusters* observados e amostra protótipos de rotavírus A humano.

ID Amostra	Linhagem	Wa (P[8]-I)		Rotarix® (P[8]-I)	
		nt	aa	nt	aa
RVA/Hu/BR/PID385/2001/G1P[8]	I	0.86	0.93	0.96	0.99
RVA/Hu/BR/PID177/2002/G1P[8]	I	0.82	0.96	0.94	0.92
RVA/Hu/BR/HSE002/1998/G1P[8]	II	0.87	0.92	0.97	0.95
RVA/Hu/BR/RV102866/2009/G1P[8]	II	0.90	0.86	0.88	0.92
RVA/Hu/BR/HST309/1999/G1P[8]	II	0.86	0.92	0.90	0.94
RVA/Hu/BR/HST352/1999/G1P[8]	II	0.86	0.92	0.90	0.94
RVA/Hu/BR/PID92/2002/G1P[8]	III	0.91	0.83	0.93	0.87
RVA/Hu/BR/PID59021/2003/G1P[8]	III	0.93	0.86	0.96	0.97
RVA/Hu/BR/RV102322/2009/G1P[8]	III	0.88	0.91	0.90	0.94
RVA/Hu/BR/RV106099/2009/G1P[8]	III	0.87	0.91	0.90	0.93
RVA/Hu/BR/RV109713/2010/G1P[8]	III	0.83	0.90	0.88	0.92
RVA/Hu/BR/HST294/1994/G1P[8]	III	0.86	0.92	0.90	0.95
RVA/Hu/BR/HSP196/1999/G1P[8]	III	0.88	0.93	0.91	0.94
RVA/Hu/BR/PID132/2001/G1P[8]	III	0.87	0.93	0.91	0.94
RVA/Hu/BR/PA21772/2011/G1P[8]	III	0.92	0.93	0.85	0.93
RVA/Hu/BR/PA21773/2011/G1P[8]	III	0.84	0.91	0.88	0.92
RVA/Hu/BR/PA21774/2011/G1P[8]	III	0.87	0.92	0.91	0.93

5.3.2.2 Genótipos P[4], P[6], P[8]-G3/G4/G9 e P[9]

As oito amostras caracterizadas com o genótipo G2 (representadas em laranja na **Figura 19**) foram classificadas como P[4] para o gene VP4 e agruparam em três *clusters* distintos. Houve a circulação de pelo menos três linhagens evolutivas distintas (II, IV e V) deste genótipo, sendo que estirpes G2-V circularam nos dois períodos e uma única amostra (HST025/1998) classificou-se como G2-II ao agrupar em *cluster* com estirpes brasileiras detectadas no Rio de Janeiro em 2002. As estirpes G2 circulantes no período pós-vacina agruparam em dois *clusters*: um compreendeu duas amostras do Amazonas e uma do Pará, classificadas na linhagem G2-IV; o segundo compreendeu somente amostras do Pará, classificadas como G2-V e agrupadas com estirpes que circularam em quatro continentes: América do Norte, América do Sul, Ásia e Europa. Os valores de identidade nucleotídica variaram de 91.5 a 99% entre elas.

Todas as amostras caracterizadas como G9 foram relacionadas ao genótipo P[8]-III. Estas agruparam em três *clusters* diferentes (representados em verde na **Figura 19**): um compreendeu uma amostra P[8] do estado do Pará (PID90/2002) relacionando-se com uma amostra brasileira isolada no Rio de Janeiro em 2001 (identidade nt de 93.6%); no segundo *cluster* agruparam entre si as amostras isoladas no Pará durante o período pré-vacinal, com valores de identidade nucleotídica variando de 99.8-100%; e no terceiro agruparam entre si somente amostras do estado do Amazonas circulantes no período pós-vacina, com identidade nucleotídica variando de 99.6-99.8% (dados não mostrados) e valor de *bootstrap* de 99% **Figura 19**.

Em relação as amostras caracterizadas com o genótipo G4, uma relacionou-se com o genótipo P[8] e a outra com P[6], ambas do estado do Pará. A reconstrução filogenética evidenciou que a amostra P[8]G4 (HST357/2000) agrupou em um *cluster* (*bootstrap* de 97%) juntamente com duas amostras P[8]-II de origem humana isoladas no Brasil na década de 1990: rj40644 e IAL28 (**Figura 19**), com identidade nucleotídica que variou de 90 a 98% entre elas (dados não mostrados). Enquanto que a amostra P[6]G4 (HSE005/1998) agrupou com amostras de origem humana e suína (221/04-13), ambas da linhagem I. O valor de identidade nucleotídica entre

elas foi de 92% (dados não mostrados). Outra amostra caracterizada como P[6], foi aquela genotipada pelo sequenciamento como G12 para o gene VP7 (RV117230). Esta agrupou em *cluster* juntamente com amostras de origem humana isoladas em Bangladesh e Venezuela em 2000, revelando um valor de *bootstrap* de 98% (**Figura 19**). A identidade nucleotídica variou de 94.5 a 98% entre elas (dados não mostrados).

As duas amostras caracterizadas como G3 foram relacionadas ao genótipo P[8] e P[9], sendo ambas detectadas no Pará: a primeira (RV117270/2011) agrupou na linhagem P[8]-III com uma cepa G3P[8] isolada na Bélgica em 2009 (BE1214). A identidade nucleotídica entre elas foi de 97.5% e o valor de *bootstrap* de 99% (**Figura 19**). Aquela relacionada ao genótipo P[9] (PID084/2002), agrupou em um *cluster* juntamente com amostras P[9] humanas e felinas, sendo que o valor de similaridade mais elevado (100%) foi em relação a uma amostra P[9] humana, circulante em 2008 na Amazônia (Maestri *et al*, 2012). O valor de *bootstrap* do agrupamento foi de 100%.

Os alinhamentos das sequências deduzidas de aminoácidos da VP4 (VP8*) para os genótipos P[8]-G3/G4/G9, P[4]-G2, P[6]-G4/G12 e P[9]-G3 foram obtidos a partir da comparação com sequências de aa das três cepas de referência: Wa, DS-1 e AU-1 (dados não mostrados). Estes revelaram conservação nos sítios de clivagem da tripsina localizados nas argininas 240 e 246 em todas as amostras em estudo, tal como os resíduos de prolina 68/71/224/225 e o resíduo de cisteína 215. As principais substituições evidenciadas nas sequências das amostras de RVA analisadas estão detalhadas no **Quadro 9**. As posições compreendidas em sítios antigênicos estão destacadas por (*).

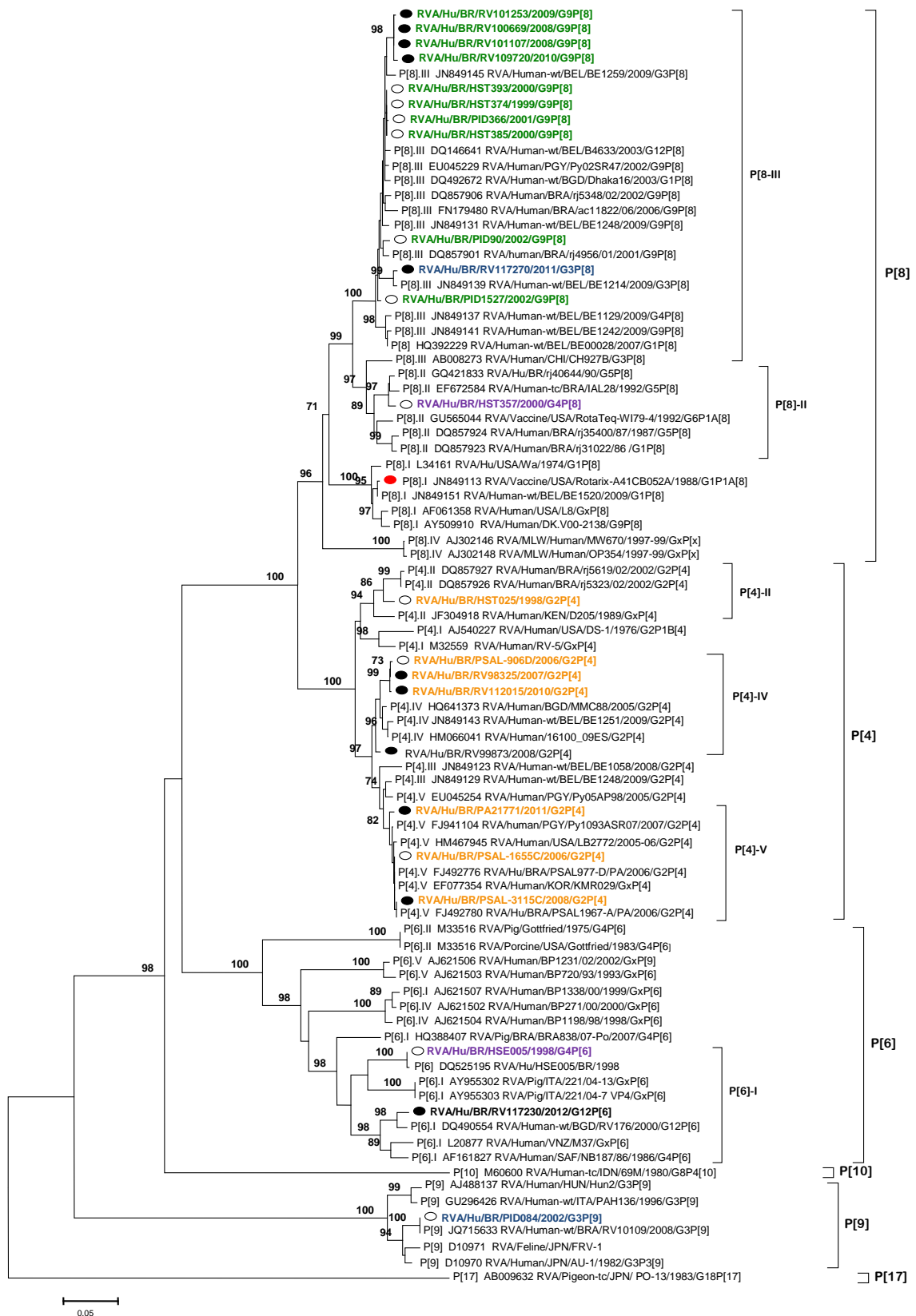


Figura 19. Dendrograma obtido através de reconstrução filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* a partir das seqüências parciais (877pb) nucleotídicas da região codificante do gene que codifica para a proteína VP4 de amostras de rotavírus A G2, G3, G4, G9 e G12 da região Norte do Brasil e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética. O círculo vazio (○) corresponde a amostras antes da vacina e o círculo preenchido (●) corresponde a amostras posteriores a introdução da vacina.

Quadro 9. Quadro demonstrativo das principais substituições observadas no alinhamento das seqüências deduzidas de aa do gene VP4 (VP8*) de amostras da Região Norte P[8]G3/G4/G9, P[4] e P[6] em comparação com a cepas protótipos (Wa, DS-1 e AU-1).

P[4]	P[6]	P[8]	P[9]
*120(I→V)	35(V→I)	35(V→I)	32(S→N)
130(V→I)	*38(G→S)	*38(G→N)	*38(G→S)
133(N→S)	185(S→R)	*64(V→I)	67(G→I)
*149(G→S)	108(V→I)	108(V→I)	89(N→D)
162(R→G)	134(S→N)	*121(L→T)	108(V→I)
279(S→N)	191(A→S)	125(N→D)	-
*89(N→D)	-	133(N→S)	-
160(S→N)	-	135(N→D)	-
245(R→K)	-	252(D→S)	-

(*) corresponde a posição localizada em região antigênica

5.3.3. Análise dos genes que codificam para as proteínas do core : VP1, VP2 e VP3

As reconstruções filogenéticas baseadas nas análises das seqüências nucleotídicas parciais (662-702pb) dos genes que codificam para VP1 (**Figura 21**), VP2 (**Figura 22**) e VP3 (**Figura 23**) das amostras do presente estudo, demonstraram que houve conservação entre a maioria dos *clusters* agrupados. Foram observadas três variantes alélicas para cada gene: VP1 (R1, R2 e R3); VP2 (C1, C2 e C3) e VP3 (M1, M2 e M3).

As amostras G1P[8] (em vermelho) e G9P[8] (em verde) agruparam geralmente entre si ou em *clusters* mistos contendo as duas especificidades, juntamente com protótipos e estirpes de RVA de origem humana circulantes em Bangladesh, Bélgica e Estados Unidos. Foram observados nas três análises, *clusters* de amostras que agruparam entre si de acordo com o período de circulação (antes ou depois da vacina). As amostras do período pós-vacinal revelaram um maior grau de conservação, com valores de *bootstrap* variando de 95-100% e de identidade nucleotídica entre elas de 98-100% (dados não mostrados). Em contrapartida, as amostras do período pré-vacinal revelaram uma maior diversidade na formação dos *clusters*, alternando agrupamentos entre si e com outras estirpes.

Todos os espécimes G1 e G9 foram classificados como R1-C1-M1, para os genes VP1-VP2-VP3, respectivamente.

As amostras classificadas como G2P[4] (em laranja) não mantiveram um padrão na formação dos *clusters*, agrupando entre si e com amostras de origem humana isoladas em Bangladesh, Brasil e Estados Unidos, além de que, amostras de períodos diferentes compartilharam o mesmo *cluster*. A amostra PSAL3115-C/2008 por exemplo, na análise do gene VP2 agrupou com amostras do período pré-vacinal, com valor de *bootstrap* de 73% (**Figura 22**). Todas as amostras G2P[4] analisadas foram classificadas como R2-C2-M2. O valor de identidade nucleotídica entre elas variou de 90-100% (dados não mostrados).

As amostras caracterizadas como G3P[8] e G4P[8] foram classificadas como R1-C1-M1, sendo que, a primeira agrupou sempre em *cluster* com a cepa VU08-09-20, descrita nos EUA em 2008-2009. A amostra genótipo G4P[8] não apresentou um *cluster* específico de agrupamento para os três genes, agrupando principalmente com amostras G1P[8] e/ou G9P[8] do presente estudo.

A amostra genótipo G3P[9] (em azul) revelou estreita relação com amostras de origem felina e humana nas análises dos genes VP1 (**Figura 21**) e VP3 (**Figura 23**). Para o gene VP1, a amostra revelou identidade nucleotídica de 87% com a estirpe felina Cat97 e de 96.5% com a cepa humana AU-1. Na análise do gene VP3 a amostras agrupou unicamente com a amostra Cat2, revelando *bootstrap* de 97% e identidade nucleotídica de 92% entre elas (dados não mostrados). Em relação ao gene VP2, esta estirpe agrupou somente com a cepa protótipo de origem humana AU-1 e foi classificada como R3-C3-M3, para os três genes respectivamente.

A amostra genótipo G4P[6] (em roxo) revelou estreita relação genética com duas amostras de referência de origem suína (OSU e Gottfried) em relação ao gene VP3 (**Figura 23**), com identidade nucleotídica variando de 91.5-92.5% entre elas e *bootstrap* de 82%. Na análise de VP1 e VP2, esta estirpe agrupou em *clusters* distintos com amostras do presente e foi classificada como R1-C2-M1.

A amostra genótipo G12P[6] foi classificada como R1-C1-M1, alternando o agrupamento com amostras G1P[8] e G9P[8] do estudo.

Os alinhamentos das sequências deduzidas parciais de aa dos genes que codificam para VP1, VP2 e VP3 foram obtidos através da comparação com as sequências de aa das cepas de referência: Wa, DS-1 e AU-1. Estes revelaram a ocorrência de diversas substituições, inserções e/ou deleções (dados não mostrados). As principais substituições evidenciadas e suas respectivas posições estão detalhadas no **Quadro 9**.

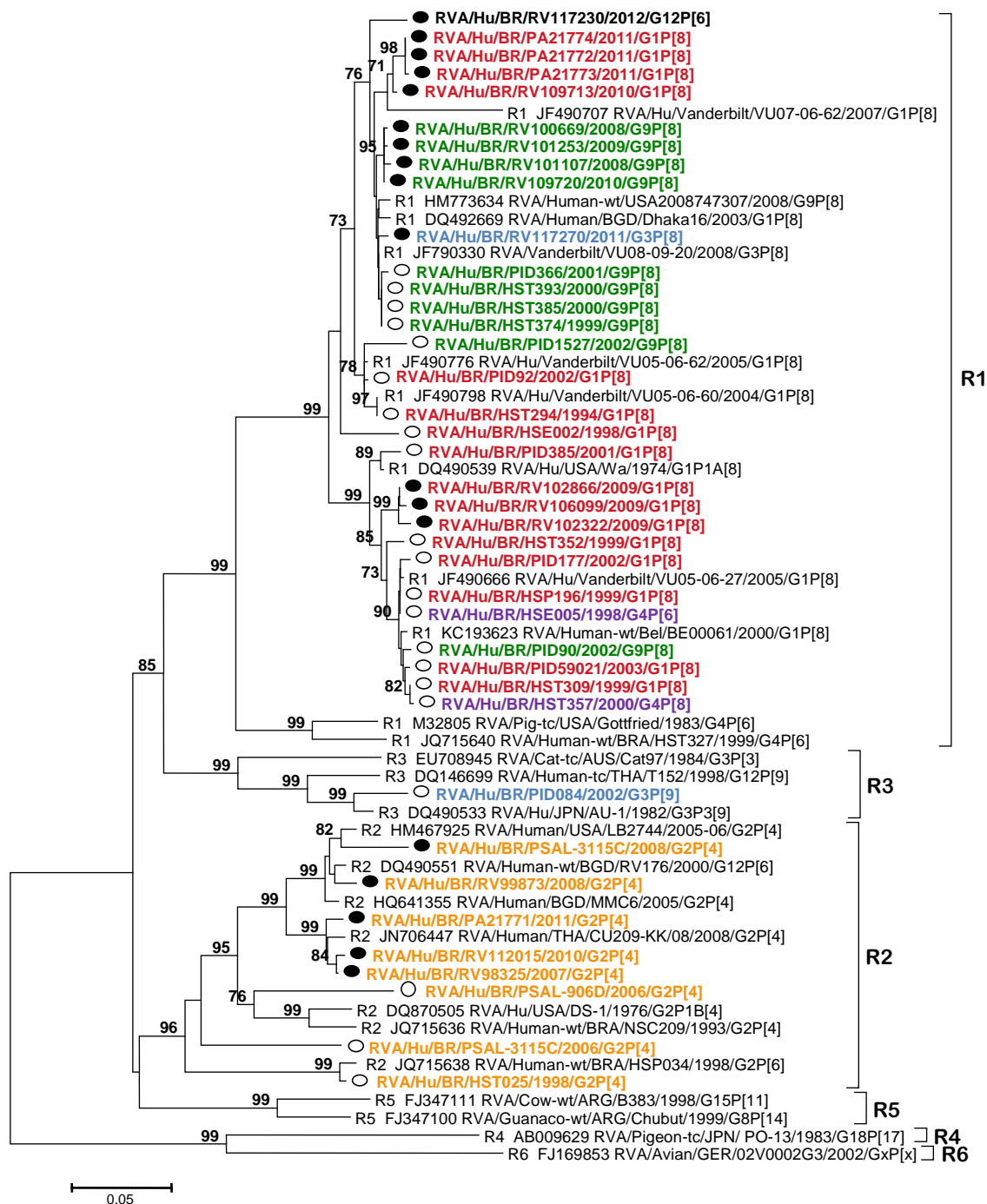


Figura 20. Dendrograma obtido através de reconstrução filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* a partir das sequências nucleotídicas parciais (663pb) do gene que codifica para a proteína VP1 de amostras de rotavírus A G1 (vermelho), G2 (laranja), G3 (azul), G4 (roxo), G9 (verde) e G12 (negrito) da região Norte do Brasil e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética. O círculo vazio (○) corresponde a amostras antes da vacina e o círculo preenchido (●) corresponde a amostras posteriores a introdução da vacina.

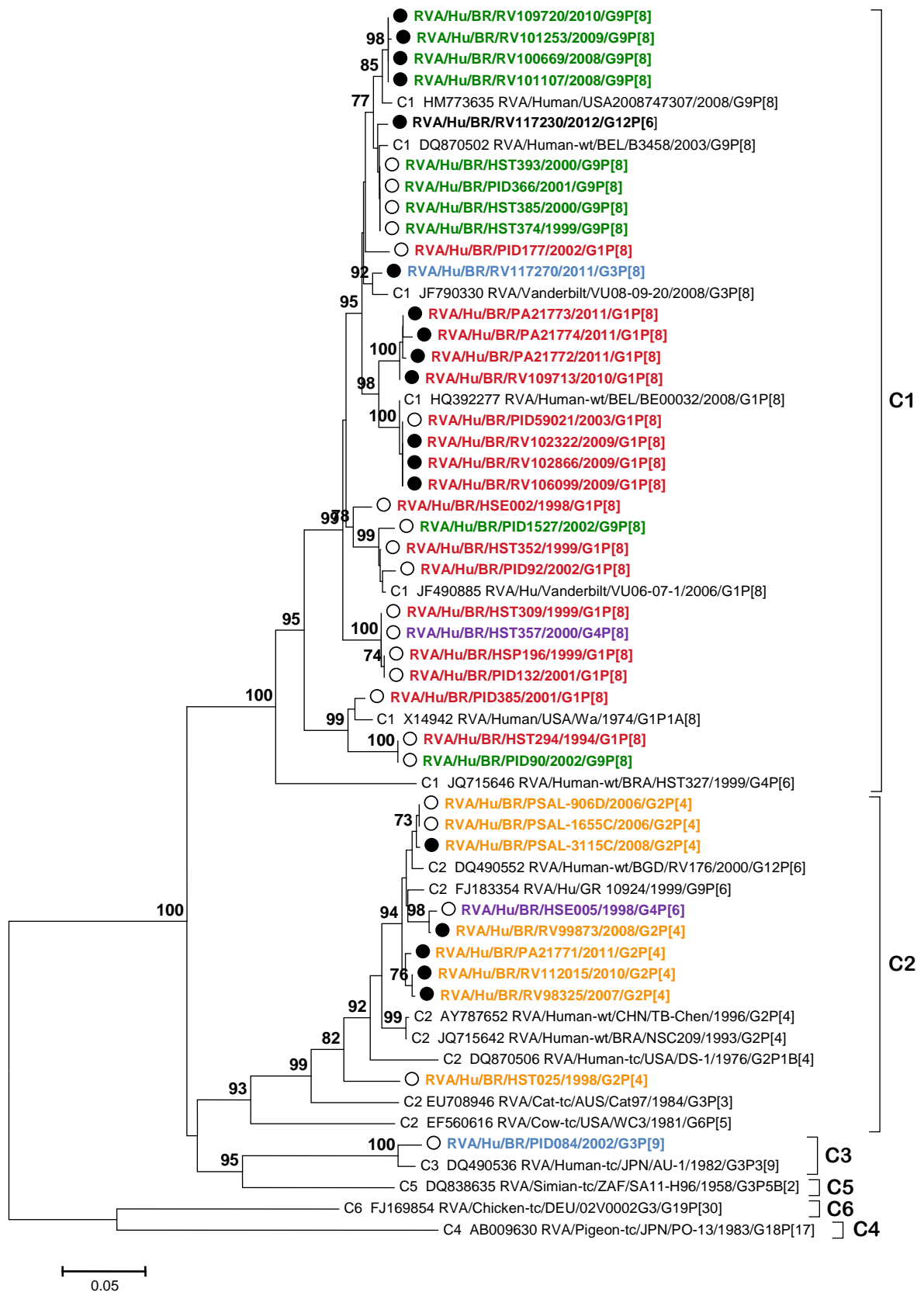


Figura 21. Dendrograma obtido através de reconstrução filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* a partir das seqüências nucleotídicas parciais (663pb) do gene que codifica para a proteína VP2 de amostras de rotavírus A G1 (vermelho), G2 (laranja), G3 (azul), G4 (roxo), G9 (verde) e G12 (negrito) da região Norte do Brasil e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética. O círculo vazio (○) corresponde a amostras antes da vacina e o círculo preenchido (●) corresponde a amostras posteriores a introdução da vacina.

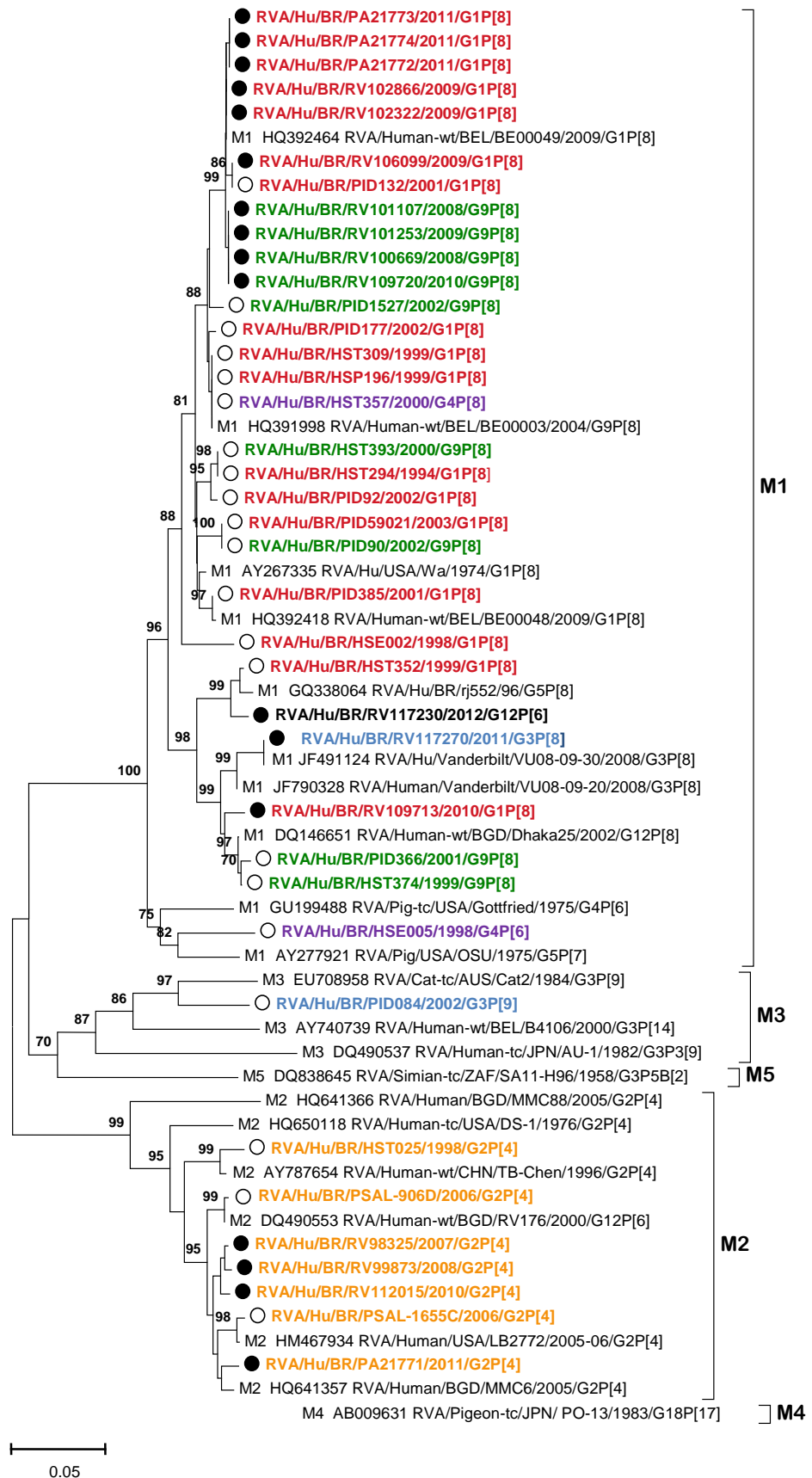


Figura 22. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* a partir das seqüências nucleotídicas parciais (702pb) do gene que codifica para a proteína VP3 de amostras de rotavírus A G1 (vermelho), G2 (laranja), G3 (azul), G4 (roxo), G9 (verde) e G12 (negrito) da região Norte do Brasil e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética. O círculo vazio (○) corresponde a amostras antes da vacina e o círculo preenchido (●) corresponde a amostras posteriores a introdução da vacina.

Quadro 10. Quadro demonstrativo das principais substituições observadas no alinhamento das sequências deduzidas de aa dos genes VP1, VP2 e VP3 de amostras G2, G3, G4, G9 e G12 da Região Norte, em comparação com os principais protótipos (Wa, DS-1 e AU-1).

VP1	VP2	VP3
15(V→I)	12(L→P)	41(L→M)
31(N→I)	31(V→M)	70(D→N)
38(E→D)	39(K→R)	86(D→N)
46(S→N)	54(V→I)	88(I→M)
65(D→N)	75(A→T)	114(I→M)
50(S→N)	89(I→V)	116(D→N)
54(L→M)	95(I→V)	133(N→D)
102(V→A)	120(I→V)	143(S→I)
107(I→L)	-	155(V→I)
198(E→D)	-	198(F→S)

5.3.4 Análise do gene que codifica para a proteína VP6

O dendograma gerado a partir da análise das sequências nucleotídicas completas (1356pb) do gene VP6 das amostras em estudo está demonstrado na **Figura 23**. Foram evidenciadas três variantes alélicas entre os isolados (I1, I2 e I3).

As amostras genótipos G1P[8] (em vermelho) e G9P[8] (em verde) novamente agruparam entre si ou em *clusters* mistos contendo as duas especificidades, juntamente com protótipos e estirpes de RVA de origem humana circulantes na Austrália, Bangladesh, Bélgica e Estados Unidos. Houve uma estreita relação entre as amostras que circularam no mesmo período (antes ou após a vacina), formando-se assim *clusters* distintos contendo amostras especificamente do mesmo período. Todas as amostras G1P[8] e G9P[8] foram classificadas com o genótipo I1, assim como as amostras genótipo G3P[8] (em azul) e G4P[8] (em roxo), que agruparam com amostras de origem humana descritas nos Estados Unidos e que possuíam a mesma especificidade G/P (**Figura 23**).

As amostras caracterizadas como G2P[4] (em laranja) agruparam em três *clusters* com amostras descritas na Rússia e no Brasil classificadas com o genótipo I2. Não houve consistência entre os agrupamentos de acordo com o período de coleta, i.e. anterior e posterior à vacina, uma vez que a amostra PA21771 de 2011

agrupou no mesmo *cluster* que amostras isoladas em janeiro de 2006. A identidade nucleotídica entre as amostras variou de 89 a 99% (dados não mostrados). A amostra HST025 agrupou unicamente com a cepa protótipo DS-1, com um valor de *bootstrap* de 100%.

A amostra caracterizada como G3P[9] foi classificada como I3, agrupando em *cluster* com amostras de origem humana e felina (cepas AU-1 e Cat97, respectivamente). O *bootstrap* entre elas foi de 100% e a identidade nucleotídica variou de 88 a 98%.

A amostra genótipo G12P[6] foi classificada com o genótipo I1 apesar de não ter agrupado em nenhum *cluster* específico, uma vez que o ramo ao qual está indicada pertence ao clado de amostras deste genótipo.

O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos de VP6 das amostras em estudo em comparação com as sequências das principais cepas de referência (Wa, DS-1 e AU-1) revelaram substituições ocorrendo ao longo das sequências (dados não mostrados). As principais mudanças ocorridas em sítios importantes, como os que mediam a estabilidade da camada intermediária (aa32,65,71); induzem a trimerização protéica (aa246-314) e garantem especificidade de sorogrupo (aa315) estão detalhadas a seguir na **Tabela 6**.

Tabela 7. Alinhamento dos resíduos das sequências aminoacídicas do gene VP6 de algumas amostras G1, G2, G3, G4, G9 e G12 da Região Norte em comparação com sequências de aa das cepas protótipos (Wa, DS-1 e AU-1). Em cinza os principais resíduos compartilhados entre as cepas.

VP6	32	65	71	197	198	199	246	247	305	314	315
Wa (I1)	Q	L	L	C	A	I	T	W	N	F	Q
DS-1 (I2)	Q	L	L	C	A	I	T	W	A	F	E
Au-1 (I3)	Q	L	L	C	A	L	T	W	A	F	V
HST294	Q	L	L	C	A	L	T	W	N	F	Q
HSE002	Q	L	L	C	A	L	T	W	N	F	Q
PID59021	Q	L	L	C	A	I	T	W	N	F	Q
RV106099	Q	L	L	C	A	I	T	W	N	F	Q
RV109713	Q	L	L	C	A	L	T	W	N	F	Q
PA21772	Q	L	L	C	A	L	T	W	N	F	Q
HST025	Q	L	L	C	A	I	T	W	A	F	E
RV112015	Q	L	L	C	A	I	T	W	A	F	E
RV117270	Q	L	L	C	A	L	T	W	N	F	Q
PID084	Q	L	L	C	A	L	T	W	A	F	V
HSE005	Q	L	L	C	A	I	T	W	N	F	Q
HST357	Q	S	L	C	A	L	T	W	M	S	Q
HST393	Q	L	L	C	A	I	T	W	A	F	E
RV100669	Q	L	L	C	A	L	T	W	N	F	Q
PID1527	Q	L	L	C	A	L	T	W	N	F	Q
RV109720	Q	L	L	C	A	L	T	W	N	F	Q
RV117230	Q	L	L	C	A	L	T	W	N	F	Q

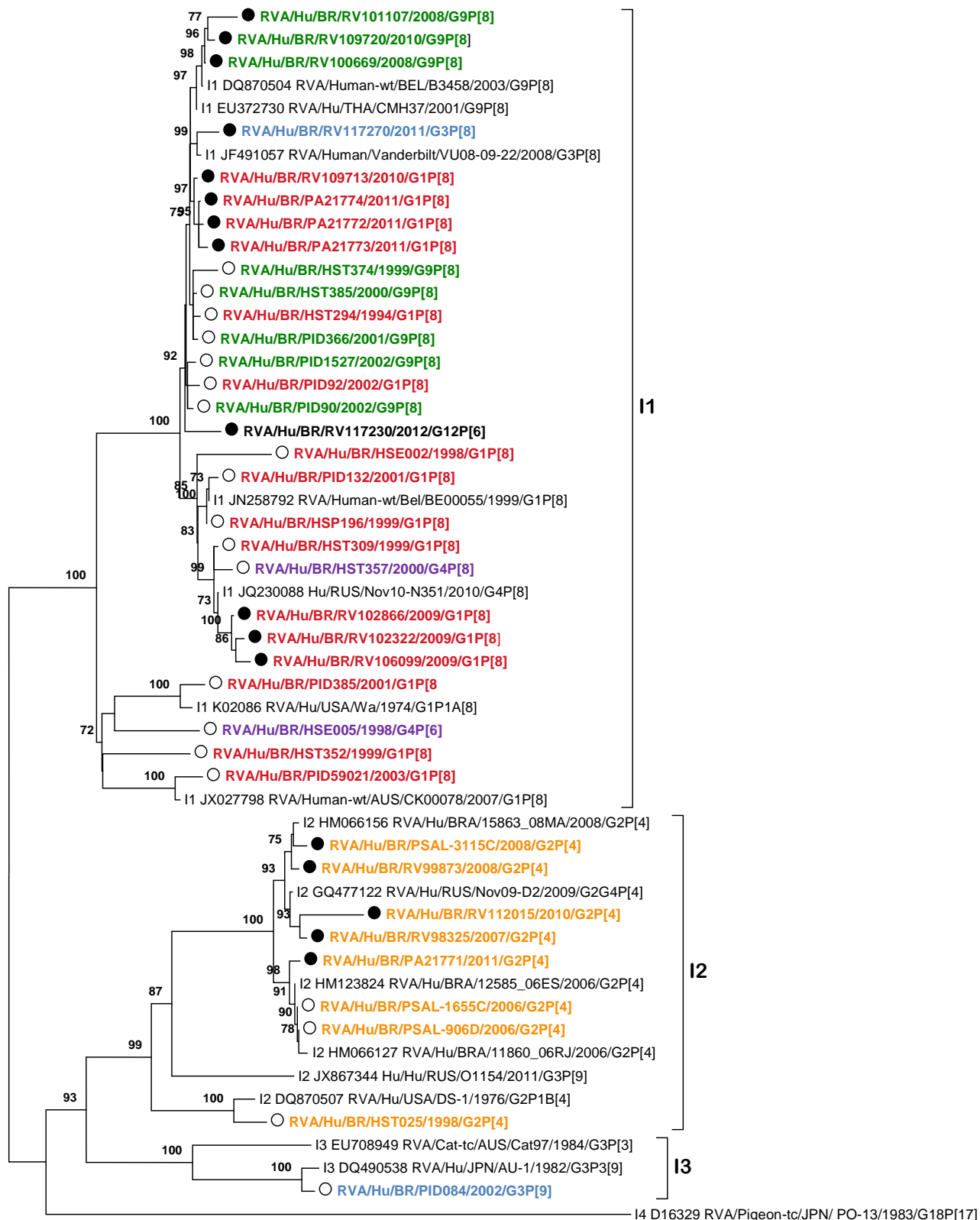


Figura 23. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* a partir das seqüências nucleotídicas completas (1356pb) do gene que codifica para a proteína VP6 de amostras de rotavírus A G1 (vermelho), G2 (laranja), G3 (azul), G4 (roxo), G9 (verde) e G12 (negrito) da região Norte do Brasil e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética. O círculo vazio (○) corresponde a amostras antes da vacina e o círculo preenchido (●) corresponde a amostras posteriores a introdução da vacina.

5.3.5 Análise dos genes que codificam para as proteínas NSP1, NSP2 e NSP3

As análises filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas completas dos genes que codificam para NSP1 (**Figura 24**), NSP2 (**Figura 25**), e NSP3 (**Figura 26**), evidenciaram a ocorrência de 3, 3 e 4 variantes alélicas, respectivamente, entre as 40 amostras analisadas.

Amostras com especificidade G1P[8] (em vermelho) e G9P[8] (em verde) agruparam geralmente entre si ou em *clusters* mistos contendo as duas variantes, juntamente com amostras de origem humana descritas no Brasil, Bélgica e Estados Unidos. Houve uma afinidade de agrupamento entre os espécimes G9P[8] de acordo com o período de circulação, uma vez que na maioria dos *clusters* agruparam amostras do mesmo período. Aquelas circulantes após a introdução da vacina agruparam na análise dos genes NSP1 e NSP3 em um *cluster* com amostras G9P[8] detectadas no Brasil em 2005, revelando identidades nucleotídicas variando de 94-99% entre elas (dados não mostrados). As amostras genótipo G1P[8] também revelaram estreita relação genética entre amostras circulantes no mesmo, agrupando em *clusters* entre si ou com protótipos isolados nos Estados Unidos. Todos os espécimes caracterizados como G1P[8] e G9P[8] foram classificadas como A1-N1-T1 para os genes NSP1, NSP2 e NSP3, respectivamente.

As amostras classificadas como G3P[8] e G4P[8], foram caracterizadas como A1-N1-T1, agrupando em *clusters* que continham amostras do presente estudo G1P[8] e amostras de referência G3P[8] descritas nos Estados Unidos. A identidade nucleotídica variou de 93-98.5% entre elas.

Entre as amostras com genótipo G2P[4], a maioria foi classificada como A2-N2-T2. Somente uma amostra (HST025) apresentou um genótipo (T1) em relação ao gene NSP3 diferente daquele esperado para esta especificidade, agrupando no mesmo *cluster* que amostras caracterizadas como G1P[8], evidenciando um possível evento de *reassortment* inter-genogrupo. O valor de *bootstrap* do agrupamento foi de 99% e a identidade nucleotídica entre elas variou de 86 a 98%. Em relação as demais estirpes, não houve um padrão de agrupamento entre o período de

circulação das amostras, entretanto, todas agruparam com cepas de origem humana, circulantes no Brasil, Estados Unidos e Bangladesh, para os três genes.

A amostra genótipo G3P[9] foi classificada como A3-N3-T3, agrupando em *clusters* contendo amostras de origem **humana** e **felina**. Para os genes NSP1 e NSP2 relacionou-se exclusivamente com cepas de origem humana, enquanto que para o gene NSP3 apresentou estreita relação com amostra de origem felina (BA222, Itália); a identidade nucleotídica entre elas foi de 87%.

A amostra com genótipo G4P[6] (HSE005) foi caracterizada para os genes NSP1 e NSP2 como A1-N1, entretanto para o gene NSP3 foi classificada com o genótipo T7, compartilhado por estirpes de RVA de origem **bovina**. O *cluster* o qual esta amostra agrupou no dendograma do gene NSP3 (**Figura 26**) continha uma amostra isolada em Belém do Pará em 1999. A identidade nucleotídica observada entre elas foi de 99% e com a cepa UK de origem **bovina** foi de 87%. Em relação aos genes NSP1 e NSP2 a amostra agrupou em *cluster* com amostras G1P[8] do presente estudo que circularam no período pré-vacinal.

A amostra com o genótipo G12P[6] foi classificada como A2-N1-T2 e agrupou em *clusters* nas três análises com amostras de origem humana, contendo especificidades G/P diversificadas.

Os alinhamentos das sequências deduzidas de aa dos genes NSP1, NSP2 e NSP3 das amostras em tudo, foi realizado em comparação com as sequências das cepas de referência (Wa, DS-1 e AU-1) e evidenciaram substituições em diferentes posições, assim como deleções e inserções (dados não mostrados). O **Quadro 12** descreve as principais mudanças observadas entre as sequências, tal como as respectivas posições em que ocorreram.

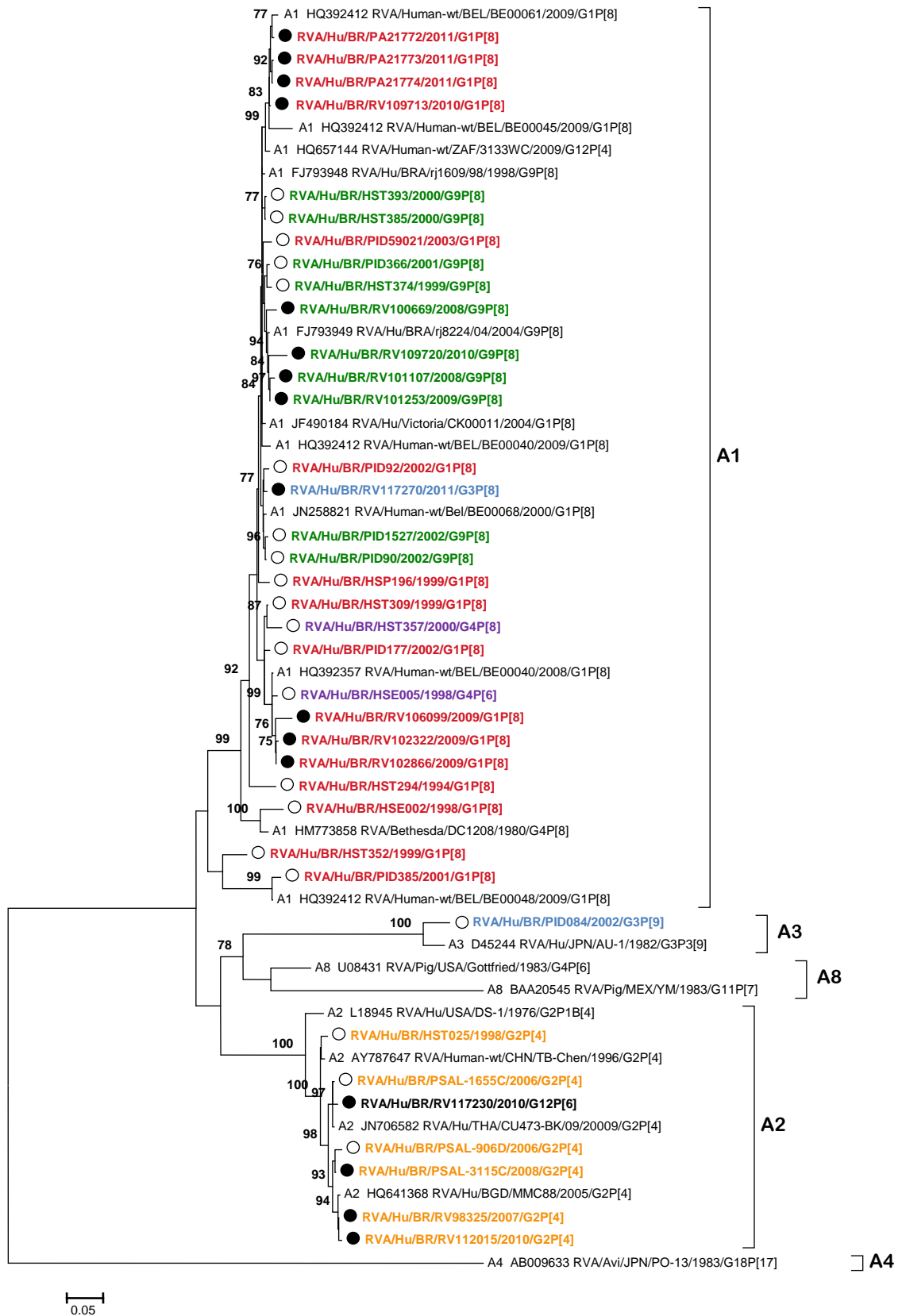


Figura 24. Dendrograma obtido através de reconstrução filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* a partir das seqüências nucleotídicas completas (1525pb) do gene que codifica para a proteína NSP1 de amostras de rotavírus A G1 (vermelho), G2 (laranja), G3 (azul), G4 (roxo), G9 (verde) e G12 (negrito) da região Norte do Brasil e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética. O círculo vazio (○) corresponde a amostras antes da vacina e o círculo preenchido (●) corresponde a amostras posteriores a introdução da vacina.

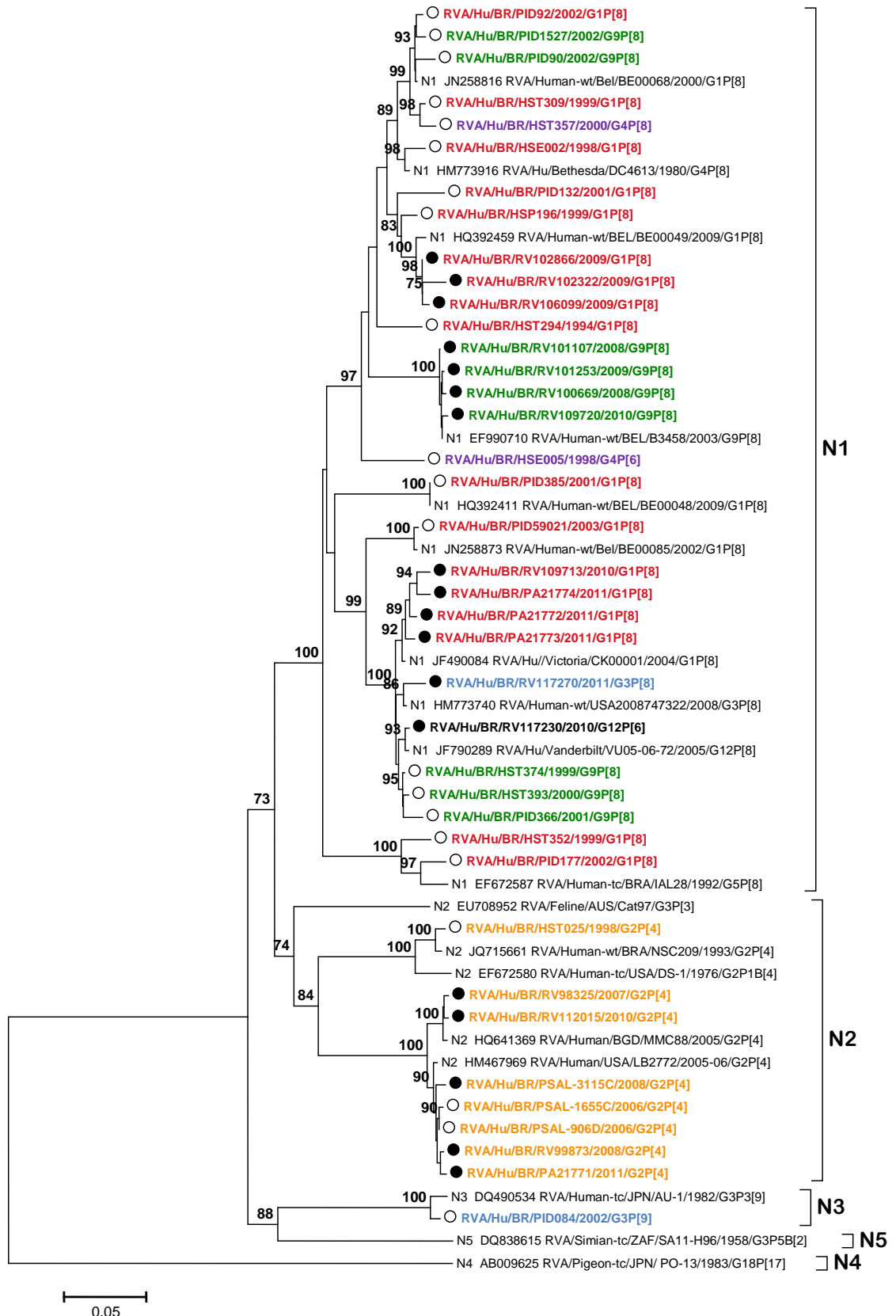


Figura 25. Dendrograma obtido através de reconstrução filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* a partir das seqüências nucleotídicas completas (1059pb) do gene que codifica a proteína NSP2 de amostras de rotavírus A G1 (vermelho), G2 (laranja), G3 (azul), G4 (roxo), G9 (verde) e G12 (negrito) da região Norte do Brasil e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética. O círculo vazio (○) corresponde a amostras antes da vacina e o círculo preenchido (●) corresponde a amostras posteriores a introdução da vacina.

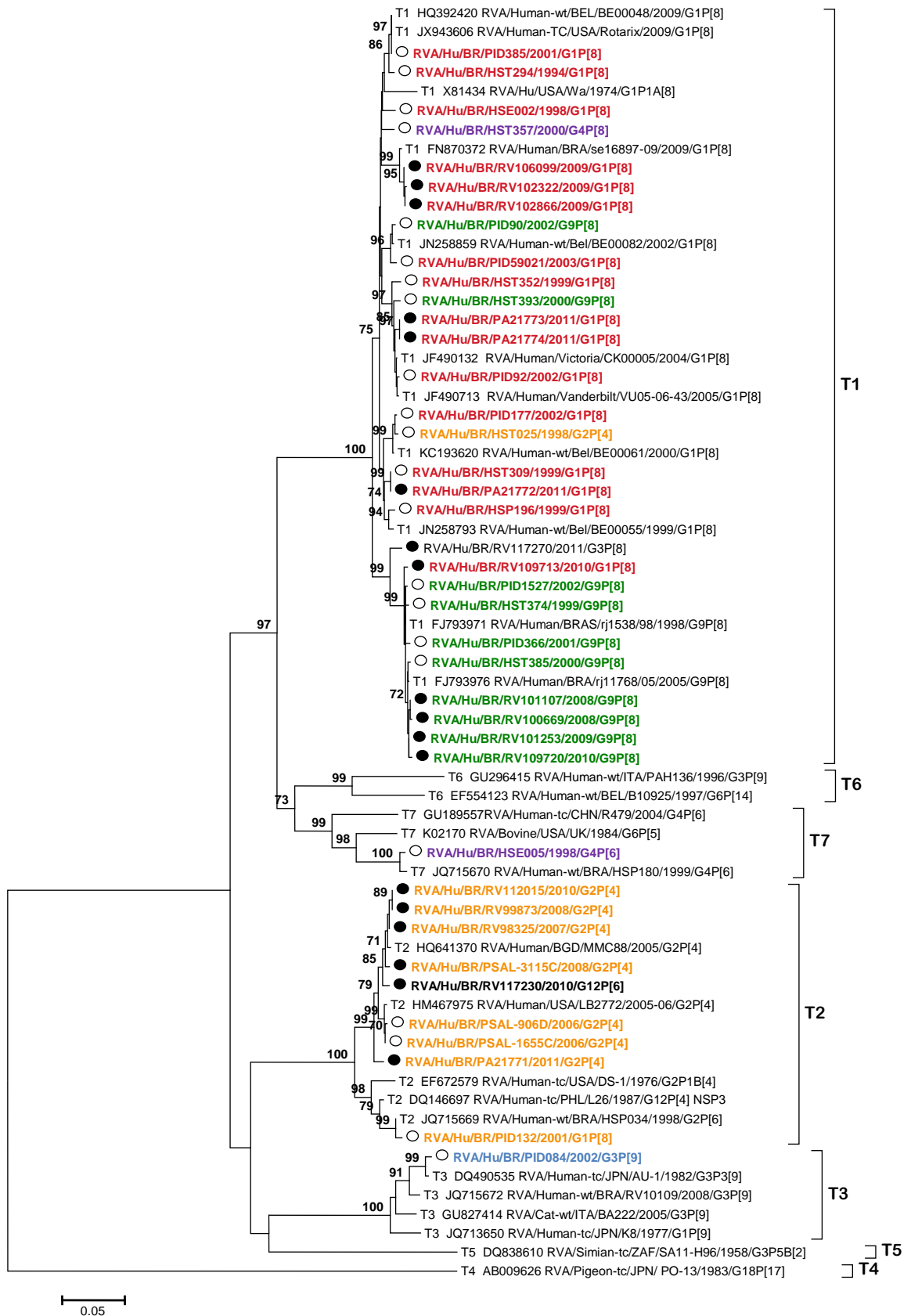


Figura 26. Dendrograma obtido através de reconstrução filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* a partir das seqüências nucleotídicas completas (1031pb) do gene que codifica para a proteína NSP3 de amostras de rotavírus A G1 (vermelho), G2 (laranja), G3 (azul), G4 (roxo), G9 (verde) e G12 (negrito) da região Norte do Brasil e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética. O círculo vazio (○) corresponde a amostras antes da vacina e o círculo preenchido (●) corresponde a amostras posteriores a introdução da vacina.

Quadro 11. Quadro demonstrativo das principais substituições observadas no alinhamento das sequências deduzidas de aa dos genes NSP1, NSP2 e NSP3 de amostras G2, G3, G4, G9 e G12 da Região Norte, em comparação com os principais protótipos (Wa, DS-1 e AU-1).

NSP1	NSP2	NSP3
56(T→N)	43(I→V)	45(N→D)
68(I→V)	61(S→G)	67(I→V)
121(N→D)	134(T→N)	90(S→G)
157(V→A)	147(N→D)	91(T→N)
99(I→V)	198(S→A)	135(N→A)
139(N→D)	236(I→V)	178(N→D)
-	245(T→N)	183(I→S)
-	246(T→N)	190(I→L)
-	86(R→K)	238(V→I)
-	137(M→N)	-

5.3.6 Análise dos genes que codificam para as proteínas NSP4 e NSP5

As análises filogenéticas realizadas a partir das sequências nucleotídicas completas dos genes NSP4 e NSP5 demonstraram que houve a circulação de três variantes alélicas para cada gene: E1, E2 e E3 (NSP4), representado na **Figura 27** e H1, H2 e H3 (NSP5) representado na **Figura 28**.

Amostras com especificidade G1P[8] (em vermeho) e G9P[8] (em verde) agruparam entre si ou em *clusters* mistos contendo as duas variantes, juntamente com amostras de origem humana descritas no Brasil, Bélgica e Estados Unidos. Houve afinidade de agrupamento entre as estirpes G9P[8] de acordo com o período que circularam, uma vez que apenas agruparam entre si amostras do mesmo período. Já as G1P[8] agruparam em *clusters* onde havia amostras dos dois períodos. Todas foram classificadas como E1-H1 para os genes NSP4-NSP5, respectivamente, tal como as amostras G3P[8], G4P[8], G12P[6], que agruparam em *clusters* com amostras de origem humana, principalmente estirpes G1P[8] do presente estudo.

As amostras com genótipo G2P[4] foram classificadas como E2-H2, agrupando em quatro *clusters* para cada uma das análises. Houve consistência no agrupamento entre estirpes que circularam no mesmo período. As amostras RV98325 e RV112015, agruparam em um *cluster* com amostras brasileiras de

origem humana descritas por Gómez *et al* (2011) e com duas amostras de origem bovina, descritas na Itália e Índia. O valor de suporte do agrupamento foi de 82%, com identidades nucleotídicas variando de 85 a 95% entre elas.

A amostra genótipo G3P[9] foi classificada como E3-H3, agrupando em *clusters* com amostras de origem **humana** e **bovina**. Sendo este último evento observado na análise do gene NSP5, ao demonstrar estreita relação com a cepa WC3 descrita nos Estados Unidos em um **bovino (Figura 28)**. O valor de *bootstrap* foi de 99% e a identidade nucleotídica entre elas foi de 95%.

A amostra com genótipo G4P[6] foi classificada como E1-H1, agrupando na análise do gene NSP4 em um *cluster* com a cepa protótipo *Gottfried* de origem suína; e apresentou estreita relação com este protótipo para NSP5. A identidade nucleotídica entre elas foi de 85% e 95%, para NSP4 e NSP5, respectivamente.

Os alinhamentos das sequências deduzidas de aa dos genes NSP4 (**Figura 29**) e NSP5 (**Figura 30**) demonstraram substituições ocorrendo em comparação com as sequências das três cepas de referência (Wa, DS-1 e AU-1). Em relação ao gene NSP4, foi observado que o peptídeo sintético correspondente aos resíduos de aa114-135 (em destaque na **Figura 29**) se manteve conservado em todas as amostras de RVA analisadas, essa região compreende possíveis aminoácidos relacionados à ação toxigênica; os resíduos correspondentes aos sítios de ligação com a VP4 e VP6 (aa112-146 e aa156-175) se mantiveram conservados entre os resíduos 112-128 e extremamente variáveis entre 129-175, essa região também compreende os domínios variáveis inter-espécies (aa131-141) (**Figura 29**).

Através do alinhamento das sequências do gene NSP5, foi demonstrado substituições e deleções (**Figura 30**) ocorrendo em sítios de oligomerização da proteína (aa103-146), o qual está relacionado com a formação dos viroplasmas essenciais para a replicação: 27 amostras H1 apresentaram substituição específica na posição 108(M→L); todas as amostras com genótipo H2 revelaram mais de uma substituição específica como 119(F→I) e 121(V→M); a região que compreende o domínio de ligação com a proteína NSP2 (aa132-146) revelou interessantes mudanças que ocorreram especificamente nos espécimes isolados de crianças imunizadas: 113(T→N), 132(H→N e 132(S→P) que ocorreu no genótipo H2 (**Figura 30**).

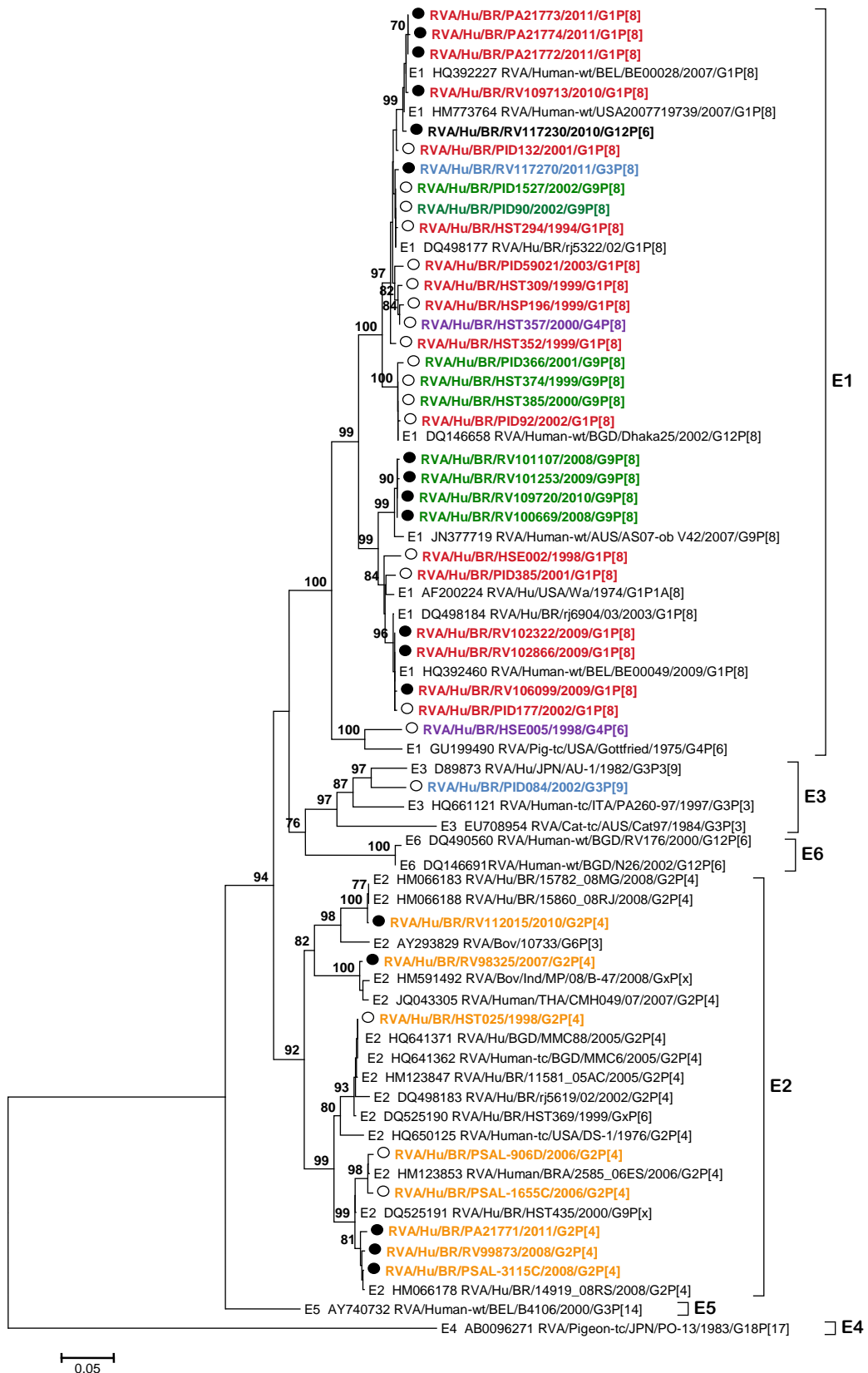


Figura 27. Dendrograma obtido através de reconstrução filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* a partir das seqüências completas (673pb) nucleotídicas da região codificante do gene que codifica para a proteína NSP4 de amostras de rotavírus A G1 (vermelho), G2 (laranja), G3 (azul), G4 (roxo), G9 (verde) e G12 (negrito) da região Norte do Brasil e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética. O círculo vazio (○) corresponde a amostras antes da vacina e o círculo preenchido (●) corresponde a amostras posteriores a introdução da vacina.

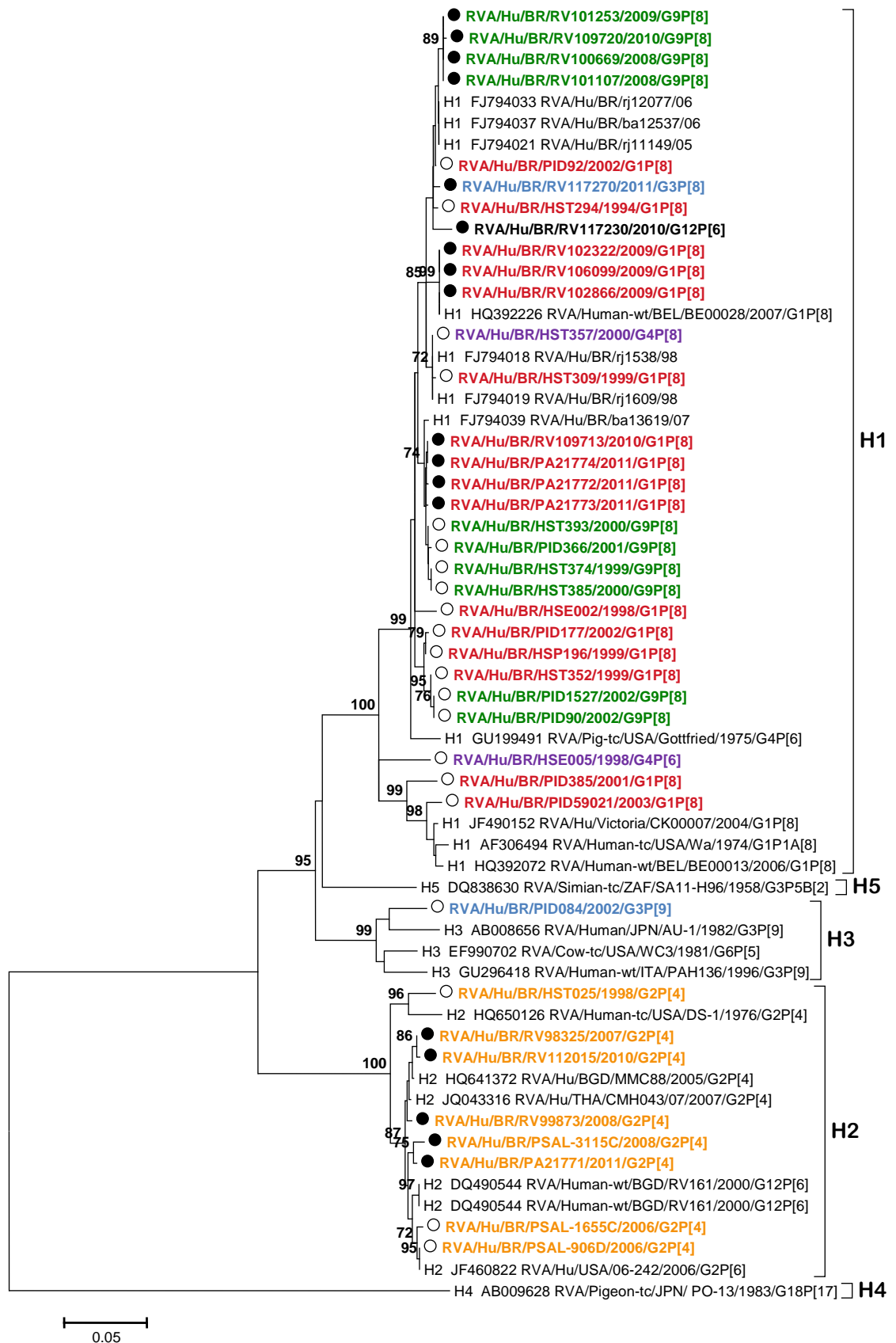


Figura 28. Dendograma obtido através de reconstrução filogenética baseada no método *Neighbor-Joining* a partir das seqüências completas (664pb) nucleotídicas da região codificante do gene que codifica para a proteína NSP5 de amostras de rotavírus A G1 (vermelho), G2 (laranja), G3 (azul), G4 (roxo), G9 (verde) e G12 (negrito) da região Norte do Brasil e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética. O círculo vazio (○) corresponde a amostras antes da vacina e o círculo preenchido (●) corresponde a amostras posteriores a introdução da vacina.

Ação
toxigênica

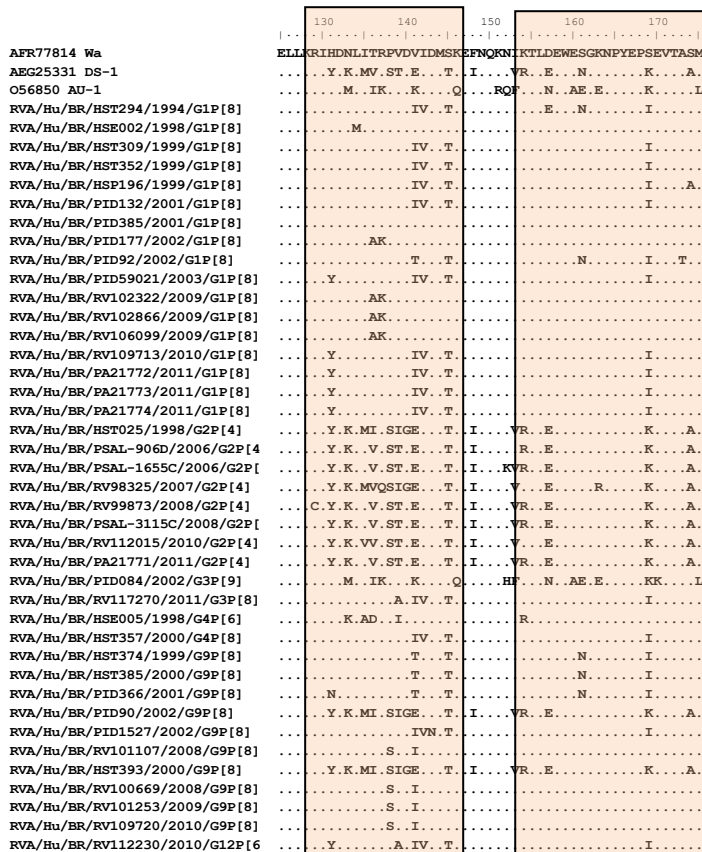
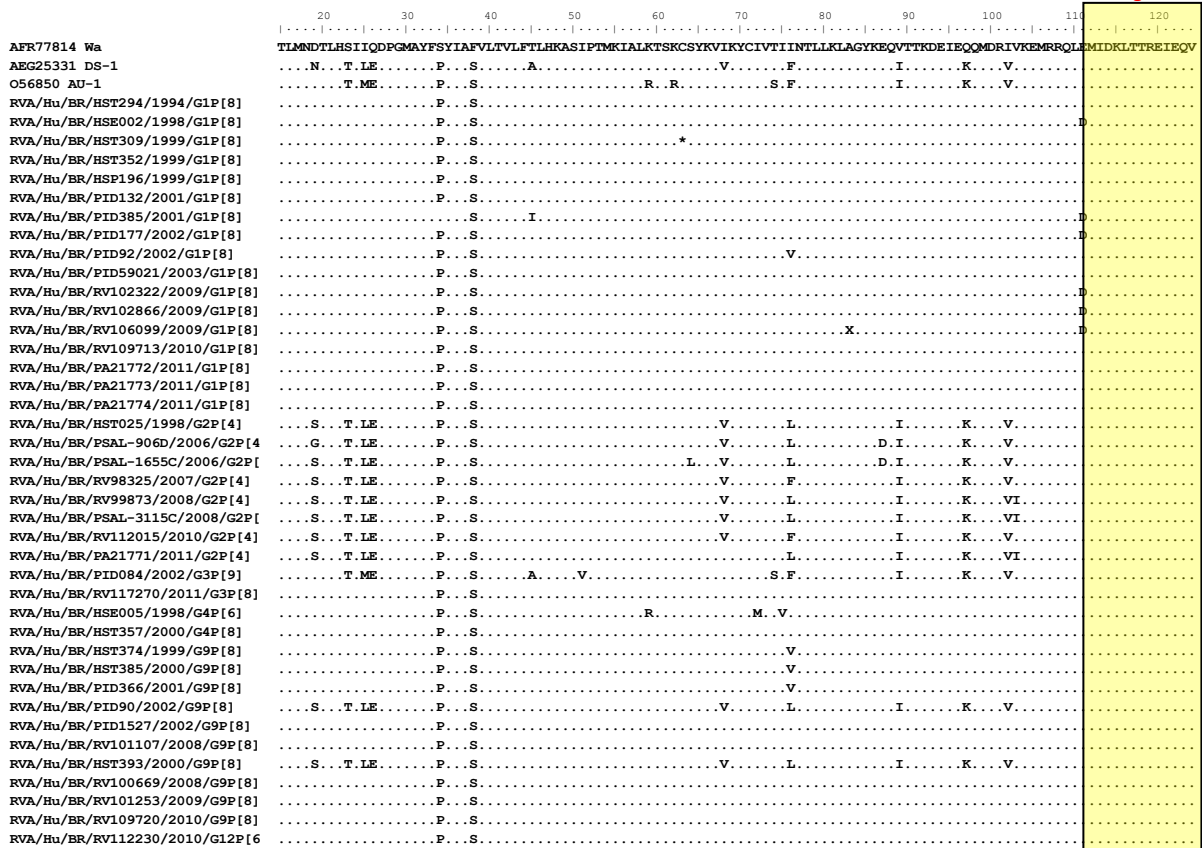


Figura 29. Alinhamento das sequências aminoacídicas parciais da proteína NSP4 (160aa) de amostras coletadas na Região Norte do Brasil entre 1994-2011, amostra protótipo e sequência aa da cepa RIX4414 (Rotarix). Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com a amostra protótipo Wa. As regiões destacadas indicam mudanças ocorridas em sítios antiqênicos.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100     110
AAK15269 Wa H1  MSLSIDVTSLPSISISSIFNNESSSTTSTSGKSGIQRNEQVSSDIEAFNKYMLSKSPEDIGPDSASNNPLTFSIRSNVAKTNADAGVMSDSSQSRPSNVGDCQMD
RVA/Hu/BR/HST294/1994/G1P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/HSE002/1998/G1P[8] . . . . . R . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . P . . . . . L .
RVA/Hu/BR/HST309/1999/G1P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/HST352/1999/G1P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/HSP196/1999/G1P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/PID385/2001/G1P[8] . . . . . . . . . . V . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/PID92/2002/G1P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/PID177/2002/G1P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/PID59021/2003/G1P[8] . . . . . . . . . . . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/RV102322/2009/G1P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/RV102866/2009/G1P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/RV106099/2009/G1P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/RV109713/2010/G1P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/PA21772/2011/G1P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/PA21773/2011/G1P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/PA21774/2011/G1P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/RV117270/2011/G3P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/HST357/2000/G4P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/HSE005/1998/G4P[6] . . . . . . . . . . I P X . . . . . D . . . . . V .
RVA/Hu/BR/HST374/1999/G9P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/HST393/2000/G9P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/HST385/2000/G9P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/PID366/2001/G9P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/PID1527/2002/G9P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/PID90/2002/G9P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/RV100669/2008/G9P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/RV101107/2008/G9P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/RV101253/2009/G9P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/RV109720/2010/G9P[8] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
RVA/Hu/BR/RV112230/2010/G12P[6] . . . . . S . I P X . . . . . D . . . . . L .
AEG25332 DS-1 H2 . . . . . VY . . . . . I . . . . . S I P A . . . . . D . . . . . A . . . . . DI Y .
RVA/Hu/BR/HST025/1998/G2P[4] . . . . . VY . . . . . F . . . . . I . . . . . S I P X . . . . . D . . . . . V . . . . . DI .
RVA/Hu/BR/PSAL-1655C/2006/G2P[4] . . . . . VY . . . . . F . . . . . I . . . . . S I P X . . . . . D . . . . . A . . . . . DI Y .
RVA/Hu/BR/PSAL-906D/2006/G2P[4] . . . . . VY . . . . . F . . . . . I . . . . . S I P X . . . . . D . . . . . A . . . . . DI Y .
RVA/Hu/BR/RV98325/2007/G2P[4] . . . . . VY . . . . . F . . . . . I . . . . . S I P X . . . . . D . . . . . A . . . . . DI Y .
RVA/Hu/BR/RV9873/2008/G2P[4] . . . . . Y . . . . . F . . . . . I . . . . . S I P X . . . . . D . . . . . A . . . . . DI Y .
RVA/Hu/BR/PSAL-3115C/2008/G2P[4] . . . . . VY . . . . . F . . . . . I . . . . . S I P X . . . . . D . . . . . A . . . . . DI Y .
RVA/Hu/BR/RV112015/2010/G2P[4] . . . . . S . . . . . VY . . . . . F . . . . . I . . . . . S I P X . . . . . P . . . . . A . . . . . DI Y .
RVA/Hu/BR/PA21771/2011/G2P[4] . . . . . VY . . . . . F . . . . . I . . . . . S I P X . . . . . D . . . . . A . . . . . DI Y .
BAB83813 AU-1 H3 . . . . . Y . . . . . . . . . . S I P A S . . . . . D . . . . . L . . . . . V .
RVA/Hu/BR/PID084/2002/G3P[9] . . . . . Y . . . . . . . . . . S I P X S . . . . . D . . . . . V .

```

```

      120      130      140      150      160      170      180
AAK15269 Wa H1  SLTKGINVSASLDSCVSISTNKKKESKRDKSRKHPRIEADSDYEDYVLLDDSDSDGKCKNCKYKKYFALRMFK
RVA/Hu/BR/HST294/1994/G1P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . E . . . . . S .
RVA/Hu/BR/HSE002/1998/G1P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . E . . . . . S .
RVA/Hu/BR/HST309/1999/G1P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X R . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/HST352/1999/G1P[8] . . . . . N . . . . . IA . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/HSP196/1999/G1P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/PID385/2001/G1P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . X . . . . . S . . . . . XV .
RVA/Hu/BR/PID92/2002/G1P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/PID177/2002/G1P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/PID59021/2003/G1P[8] . . . . . S . . . . . . . . . . . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/RV102322/2009/G1P[8] . . . . . N . . . . . N . . . . . I . . . . . DN . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/RV102866/2009/G1P[8] . . . . . N . . . . . N . . . . . I . . . . . DN . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/RV106099/2009/G1P[8] . . . . . N . . . . . N . . . . . I . . . . . DN . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/RV109713/2010/G1P[8] . . . . . N . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/PA21772/2011/G1P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/PA21773/2011/G1P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/PA21774/2011/G1P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/RV117270/2011/G3P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/HST357/2000/G4P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/HSE005/1998/G4P[6] . . . . . V I . . . . . N . . . . . L . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/HST374/1999/G9P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . V .
RVA/Hu/BR/HST393/2000/G9P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/HST385/2000/G9P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . V .
RVA/Hu/BR/PID366/2001/G9P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/PID1527/2002/G9P[8] . . . . . A . . . . . N . . . . . IA . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/PID90/2002/G9P[8] . . . . . A . . . . . N . . . . . IA . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/RV100669/2008/G9P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/RV101107/2008/G9P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/RV101253/2009/G9P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/RV109720/2010/G9P[8] . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
RVA/Hu/BR/RV112230/2010/G12P[6] . . . . . N . . . . . N . . . . . I . . . . . D . . . . . X . . . . . . . . . . S .
AEG25332 DS-1 H2 . . . . . N . . . . . KFD . TV . . . . . SI . . . . . TS . . . . . QENKN . YKCKYPKIEAES . SDDYVL . DS . SDDGK . . NC . YKCKYFALRL
RVA/Hu/BR/HST025/1998/G2P[4] . . . . . N . . . . . KID . TV . . . . . SI . . . . . TS . . . . . QENKN . YKCKYPKIEAES . SDDYVL . DS . SDDGK . . NC . YKCKYFALRL
RVA/Hu/BR/PSAL-1655C/2006/G2P[4] . . . . . N . . . . . KID . TM . . . . . SI . . . . . TS . . . . . QENKN . YKCKYPKIEAES . SDEYVL . DS . SDDGK . . NC . YKCKYFALRL
RVA/Hu/BR/PSAL-906D/2006/G2P[4] . . . . . N . . . . . KID . TM . . . . . SI . . . . . TS . . . . . QENKN . YKCKYPKIEAES . SDEYVL . DS . SDDGK . . NC . YKCKYFALRL
RVA/Hu/BR/RV98325/2007/G2P[4] . . . . . N . . . . . KID . TM . . . . . SI . . . . . TS . . . . . QENKN . YKCKYPKIEAES . SDEYVL . DS . SDDGK . . NC . YKCKYFALRL
RVA/Hu/BR/RV9873/2008/G2P[4] . . . . . N . . . . . KID . TM . . . . . SI . . . . . TP . . . . . QENKN . YKCKYPKIEAES . SDEYVL . DS . SDDGK . . NC . YKCKYFALRL
RVA/Hu/BR/PSAL-3115C/2008/G2P[4] . . . . . N . . . . . KID . TM . . . . . SI . . . . . TS . . . . . QENKN . YKCKYPKIEAES . SDEYVL . DS . NDDGK . . NC . YKCKYFALRL
RVA/Hu/BR/RV112015/2010/G2P[4] . . . . . N . . . . . KID . TM . . . . . SI . . . . . TS . . . . . QENKN . YKCKYPKIEAES . SDEYVL . DS . SDDGK . . NC . YKCKYFALRL
RVA/Hu/BR/PA21771/2011/G2P[4] . . . . . N . . . . . KID . TM . . . . . SI . . . . . TS . . . . . QENKN . YKCKYPKIEAES . SDEYVL . DS . SDDGK . . NC . YKCKYFALRL
BAB83813 AU-1 H3 . . . . . N . . . . . K . . . . . N . . . . . S . . . . . V . . . . . N . HRSRKY . YPKIEAES . DYVL . DSDS . DGKCKNCKY . RRYFALRMM
RVA/Hu/BR/PID084/2002/G3P[9] . . . . . N . . . . . K . . . . . N . . . . . S . . . . . I . . . . . V . . . . . N . HRSR . YPKIEAES . SDDYVL . DS . SDDGK . . NC . YKCKYFALRL

```

Figura 30. Alinhamento das sequências aminoácidas parciais da proteína NSP5 (187aa) de amostras coletadas na Região Norte do Brasil entre 1994-2011, amostra protótipo e sequência aa da cepa RIX4414 (Rotarix). Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com a amostra protótipo Wa. As regiões destacadas indicam mudanças ocorridas em sítios antígenicos.

5.4. Constelação gênica baseada em código de cores

Para uma melhor visualização da diversidade gênica entre as 40 estirpes de RVA circulantes na Região Norte, foi construído um quadro contendo as constelações genômicas baseadas em código de cores (**Quadro 12**), no qual foi possível observar que a maioria das estirpes exibiu um perfil gênico conservado. Além disso, houve a ocorrência de mecanismos de variabilidade genética, como *reassortments* inter-genogrupos, ocorrendo antes e após a introdução da vacina Rotarix® entre alguns segmentos de origem humana e humana-animal (suíno, bovino e/ou felino). Houve a prevalência do genogrupo *Wa-like* (vermelho), seguido por *DS1-like* (verde) e *AU-like* (rosa/marrom) que foi relacionado a uma amostra (PID084).

Quadro 12. Quadro demonstrando as constelações gênicas baseado em código de cores observadas nas amostras em estudo. Genes de origem **humana** correspondem as cores: amarelo, azul, lilás, rosa, vermelho e verde claro e escuro; origem **suína**: laranja; origem **bovina**: azul marinho e origem **felina**: marrom; (**X**) corresponde a sequenciamento não obtido.

ID amostra	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
HST294	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
HSE002	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
HST309	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
HST352	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
HSP196	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
PID132	Red	Red	Red	X	Red	X	Red	Red	Red	Red	X
PID385	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
PID92	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
PID177	Red	Red	X	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
PID59021	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
RV102322	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
RV102866	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
RV106099	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
RV109713	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
PA21772	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
PA21773	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
PA21774	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
HST025	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
PSAL-906D	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
PSAL-1655C	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
RV98325	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Blue	Blue	Green
RV99873	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
PSAL-3115C	Green	Green	Green	Green	Green	X	Green	Green	Green	Green	Green
RV112015	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Blue	Blue	Green
PA21771	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
RV117270	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
PID084	Pink	Pink	Brown	Brown	Pink	Brown	Pink	Pink	Brown	Brown	Pink
HSE005	Yellow	Orange	Red	Red	Green	Orange	Red	Red	Blue	Orange	Red
HST357	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
HST374	Purple	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
HST393	Purple	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
HST385	Purple	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
PID366	Purple	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
PID90	Purple	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
PID1527	Purple	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
RV101107	Purple	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
RV100669	Purple	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
RV101253	Purple	Red	Red	Red	Red	X	Red	Red	Red	Red	Red
RV109720	Purple	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
RV117230	Green	Orange	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Red	Red

Período pré-vacina

Período pós-vacina

6. DISCUSSÃO

Na região Norte do Brasil a GA é uma das causas mais importantes de morbimortalidade em crianças ≤ 5 anos de idade, segundo os Indicadores Básicos de Desenvolvimento do Ministério da Saúde (2010). No Estado do Pará, Dias *et al* (2010) através de um estudo descritivo, analisando dados relativos a morbidade e mortalidade por GA nesta faixa etária, evidenciaram um coeficiente de mortalidade de 16,36 (por 100.000) entre os anos 2000 a 2004. Tal número reflete o grande impacto desta doença entre as causas de mortalidade infantil na região.

Neste contexto, a vigilância dos agentes etiológicos das GA, como os RVA, é considerada essencial para o monitoramento dos genótipos circulantes de RVA e desenvolvimento de medidas de prevenção e controle eficazes. Adicionalmente, com a introdução da vacina Rotarix® no PNI, em março de 2006, é fundamental que o surgimento de novas variante virais seja monitorado e suas características antigênicas sejam analisadas com o objetivo de detectar variações que possam induzir ao escape da imunidade induzida pela vacina (Widdowson *et al*, 2009; Chandran *et al*, 2010).

A maioria dos estudos realizados em diferentes regiões brasileiras basearam-se na caracterização de genótipos de VP4, VP6, VP7 e NSP4 de RVA circulantes antes e após a introdução da vacina (Mascarenhas *et al*, 1999, 2002a e 2002b, 2006, 2007; Carvalho-Costa *et al*, 2006 e 2009; Araújo *et al*, 2007a e b; Macedo *et al*, 2007; Tavares *et al*, 2008a e b; Benati *et al*, 2010; Gómez *et al*, 2010; Borges *et al*, 2011; Gómez *et al*, 2011; Costa *et al*, 2012). Raros são os estudos que analisaram mais de quatro genes simultaneamente, além destes mencionados (Silva *et al*, 2011). Neste contexto, os dois únicos trabalhos que incluíram amostras da região Amazônica foram realizados por Tórt *et al* (2010) e Maestri *et al* (2012).

Neste estudo foi possível fazer a caracterização simultânea dos 11 genes responsáveis pela codificação de VPs e NSPs de RVA circulantes na Região Norte do Brasil, antes e após a introdução da vacina Rotarix®.

6.1 Variabilidade genômica dos RVA circulantes na região Norte antes e após a introdução da Rotarix®

A variabilidade genômica dos RVA é resultado da acumulação de pelos menos dois mecanismos diferentes: mutações pontuais (*drift* genético) e mudanças repentinas no genoma destes vírus (*shift* genético), que, na maioria das vezes, implica em eventos de *reassortment* (Estes & Kapikian, 2007). O aumento do número de sequências nucleotídicas de RVA disponíveis nos bancos de dados mundialmente conhecidos, tem proporcionado estudos evolutivos mais contundentes (McDonald *et al*, 2009b). Conseqüentemente, o número de trabalhos que demonstram eventos de *reassortment* aumentou consideravelmente (Matthijnssens *et al*, 2008b, 2010a e b, 2011; McDonald *et al*, 2009a e b; Gómez *et al*, 2010, 2011; Bányai *et al*, 2011).

Concomitantemente a estas descobertas, estudos vêm revelando através de técnicas como a hibridização RNA-RNA e sequenciamento, perfis de conservação genômica entre RVA de diferentes genótipos. Com base nestes resultados três genogrupos principais de RVA vem sendo caracterizados, representados pelas cepas de referência RVA/Human-tc/USA/**Wa**/1974/G1P1[8]; RVA/Human-tc/USA/**DS-1**/1976/G2P1B (Nakagomi *et al*, 1989; Nakagomi e Nakagomi, 1996; Matthijnssens *et al*, 2008; Matthijnssens and Van Rast, 2012); e um genogrupo menor, contendo também amostras de origem felina e canina representado pela cepa RVA/Human-tc/JPN/**AU-1**/1982/G3P3 (Nakagomi *et al*, 1990; Matthijnssens *et al*, 2008b; Matthijnssens & Van Ranst, 2012).

Recentemente, o sistema de genotipagem recomendado pelo RCWG baseado no genoma completo dos RVA tem sido aceito como o método padrão para a classificação dos RVA. Assim, o genogrupo Wa-, DS1- ou AU1-*like* pode ser atribuído a uma cepa de RVA humano se, pelo menos, sete segmentos gênicos pertencerem a um destes genogrupos (Matthijnssens *et al*, 2008b; Matthijnssens and Van Ranst, 2012).

6.1.1 Análise de estirpes genótipo G1P[8]

Mundialmente, o genótipo G1P[8] de RVA é descrito como o prevalente entre as estirpes circulantes, revelando frequências variadas em diferentes períodos (Santos & Hoshino, 2005; Patton, 2012). Estudos têm investigado variantes genéticas de cepas G1 e vêm descrevendo um elevado grau de variabilidade genética entre estas (Jayasinghe and Palombo, 1999; Maunula and von Bonsdorff, 2002; Parra *et al*, 2005; Arista *et al*, 2006; Rodríguez-Castillo *et al*, 2006; Arora *et al*, 2009, 2011; Nagaoka *et al*, 2012; Zeller *et al*, 2012).

A análise filogenética baseada nas sequências nucleotídicas dos 11 genes que codificam para as VPs e NSPs de RVA G1P[8] do presente estudo revelou que, o perfil gênico se manteve conservado tanto no período pré-vacinal quanto pós-vacinal, permitindo relacioná-las 100% com o genogrupo de origem humana *Wa-like* (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1). Estes resultados corroboram com aqueles relatados recentemente em países como: Coreia do Sul, Bangladesh, Índia e Estados Unidos, de que estirpes G1P[8] possuem elevada conservação gênica (Rahman *et al*, 2010; Arora *et al*, 2011; Arora & Chitambar, 2011; Bányai *et al*, 2011; Ghosh *et al*, 2011; Cho *et al*, 2013; McDonald *et al*, 2012; Shintani *et al*, 2012). No Brasil, um trabalho desenvolvido por Rose, TL (2012 – contato pessoal) revelou que estirpes G1P[8] que infectaram crianças vacinadas também apresentaram constelação conservada *Wa-like*. Em relação a estirpes circulantes antes da vacina, o presente estudo é o primeiro a realizar a caracterização simultânea dos 11 segmentos. Entretanto, para os genes VP7 e VP4 diversas sequências brasileiras puderam ser incluídas no estudo comparativo, tal como as sequências nucleotídicas da cepa que constitui a vacina monovalente Rotarix® (RIX4414 – G1P[8]), relatadas por Zeller *et al* (2012).

Em relação ao gene VP7, os dados do presente estudo revelaram que entre as amostras houve a circulação de duas linhagens evolutivas de G1 (G1-I e G1-II), sendo que todas as amostras que circularam após a introdução da vacina Rotarix® agruparam na linhagem I (**Figura 14 - Cluster A**) e aquelas que circularam em período anterior agruparam em *clusters* de linhagem I e II. Maranhão *et al* (2012) em estudo realizado com amostras brasileiras G1 de 1996 a 2004 encontraram

resultado semelhante em seus dados em relação a circulação de duas linhagens distintas de G1 (I e II). Entretanto, diferentemente de Maranhão *et al* (2012), uma amostra (PID385/2001) agrupou em *cluster* juntamente com a vacina (sublinhagem IIa), o que não tinha sido observado em seu estudo.

Estes resultados sugerem que após a introdução da vacina Rotarix® não houve a circulação de estirpes pertencentes à linhagem vacinal (G1-IIa) nos estados do Pará e Amazonas. Inclusive, duas estirpes do período pós-vacinal eram oriundas de crianças imunizadas com as duas doses da Rotarix® e agruparam no **Cluster A** com amostras da linhagem I, demonstrando que a eficácia de 85% alcançada pela vacina no Brasil (Linhares *et al*, 2006) se deve as diferenças entre as linhagens circulantes. Estes resultados reforçam a teoria de perpetuação do genótipo G1, através do conceito de substituição contínua das estirpes G1 por introdução de linhagens e sublinhagens evolutivamente mais aptas deste genótipo (Arista *et al*, 2006). Entretanto, a partir do alinhamento das sequências deduzidas de aa, não foram observadas variações significativas entre as amostras quando comparadas com a vacina Rotarix®, apesar de serem de linhagens diferentes. Portanto, estudos envolvendo um número maior de amostras genótipo G1 circulantes nos dois períodos serão necessários para uma melhor compreensão desses aspectos evolutivos dos RVA.

A reconstrução filogenética baseada nas sequências nucleotídicas do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) também demonstrou elevada variabilidade genética entre as 17 estirpes P[8]-G1 isoladas. Foram observados a formação de pelo menos três *clusters* distintos entre as amostras do presente estudo e outras amostras do Brasil, Paraguai, Bangladesh, Bélgica e Estados Unidos, pertencentes a três linhagens evolutivas: P[8]-I, P[8]-II, e P[8]-III (**Figura 17**) dentre as quatro linhagens descritas até o momento (Cunliffe *et al*, 2001; Gouvea *et al*, 1999; Arista *et al*, 2006). Na Índia, Tatte & Chitambar (2011) detectaram P[8]-IV ao invés de P[8]-I em amostras circulantes entre 1993-2007, enquanto que Araújo *et al* (2007a), evidenciaram a circulação apenas de P[8]-I e P[8]-II, em amostras isoladas no Rio de Janeiro entre 1984-2004.

No presente estudo, diferentemente de Araújo *et al* (2007a), as 10 amostras que circularam no período anterior a vacina (1994-2006) agruparam em *clusters* pertencentes às três linhagens citadas (P[8]-I, P[8]-II, e P[8]-III), tal como as amostras

P[8]G5 analisadas por Silva *et al* (2011) circulantes no período 1986-2005. Já as sete amostras do período pós-vacinal classificaram-se como P[8]-II ou P[8]-III, sendo que em 2009, no estado do Pará co-circularam as duas linhagens. Duas amostras agruparam no mesmo *cluster* da Rotarix® (linhagem I). Entretanto, estas circularam no período pré-vacinal (2001 e 2002), demonstrando novamente que espécimes G1P[8] circulantes no período pós-vacinal, incluindo aquelas detectadas em crianças imunizadas não pertencem as linhagens G1P[8] vacinal.

O alinhamento das sequências deduzidas de aa de VP4 (VP8*) das amostras G1P[8] demonstrou a conservação de diversas regiões importantes entre os quais: sítios de clivagem da tripsina, localizados nos resíduos R240 e R246; resíduos P68, P71, P224 e P225, e o resíduo C215. Não foram observadas diferenças em sítios antigênicos entre as diferentes linhagens. Mudanças como 38(S→G), 64(M→I) e 121(I→V) ocorreram em pelo menos uma estirpe de cada linhagem, corroborando com as substituições identificadas por Arista *et al* (2005) em estudo realizado com diferentes linhagens de P[8] detectadas na Itália. Tal achado sugere que estas substituições contribuem para a permanência das estirpes ao longo do tempo e em diferentes continentes.

As análises filogenéticas para os demais genes que codificam para VPs e NSPs mostraram-se bastante conservadas principalmente entre as amostras G1P[8] circulantes no período pós-vacinal, uma vez que os *clusters* observados apresentaram consistência entre seus agrupamentos e valores de *bootstrap* mais elevados. Além disso, as identidades nucleotídicas entre elas foram menos divergentes (dados não mostrados). Por outro lado, foi possível observar entre as amostras do período pré-vacinal, uma maior diversidade entre os *clusters*, evidenciando possíveis eventos de *reassortment* intra-genogrupo e mais especificamente intra-genotípica, tal como descritos por McDonald *et al* (2011) em análise de estirpes *Wa-like*. Adicionalmente, mais estudos serão necessários para avaliar possíveis consequências das substituições que ocorreram em todos os genes analisado e que são responsáveis por codificar proteínas importantes no processo de replicação, morfogênese e patogênese dos RV. Dessa forma, seria possível identificar potenciais mudanças que possam estar relacionadas ao escape vacinal, uma vez que este genótipo é homólogo da vacina Rotarix®.

6.1.2 Análise de amostras genótipo G2P[4]

O genótipo G2 associado ao P[4] é considerado em muitos países o segundo mais prevalentes entre os RVA circulantes na espécie humana (Santos & Hoshino, 2005; Patton, 2012). No Brasil, Carvalho-Costa *et al* (2011) descreveram um aumento considerável deste genótipo entre 2006 e 2008, e uma redução no ano de 2009, destacando a importância do fenômeno da reemergência de G2P[4], que pode estar associado à pressão seletiva da vacina, baixa proteção heteróloga desta e/ou variação temporal natural da distribuição de G2P[4].

Todas as amostras caracterizadas com o genótipo G2P[4] no presente estudo tiveram suas constelações genômicas relacionadas ao genogrupo DS1-*like* (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2), tal como observado em trabalhos recentes (Banyia *et al*, 2011; Jere *et al*, 2011) Entretanto, a amostra HST025/1998 apresentou o genótipo de NSP3 (T1) discordante da cepa protótipo, evidenciando um possível mono-rearranjo entre cepas *Wa-like* e DS1-*like*. Estudos realizados em Bangladesh e Estados Unidos (Banyia *et al*, 2011; Ghosh *et al*, 2011) com amostras G2P[4], também evidenciaram um possível rearranjo alélico, mas para o gene NSP2, tal como Doan *et al* (2012) ao caracterizarem amostras G2P[4] isoladas no Japão. De acordo com os dados de Kaga & Nakagomi (1994) através de análises moleculares e dos perfis eletroforéticos de cepas G2P[4], este tipo de rearranjo ocorre nos genes NSP2 ou NSP3, não sendo observada uma simultaneidade entre os rearranjos.

A análise do alinhamento de aa revelou substituições em diferentes regiões de VP4 (VP8*) quando comparadas a da amostra protótipo DS-1 (dados não mostrados). Uma destas, na posição 120, ocorreu em um dos três sítios antigênicos (Kovacs-Nolan *et al*, 2003) (**Quadro 9**). Esta substituição foi observada em todas as amostras pertencentes à linhagem V. Duas amostras do período pós-vacinal que agruparam juntas (RV98325 e RV112015), mostraram substituição aminoacídica diferencial nas posições 130 e 147. (dados não mostrados). Estas substituições foram descritas em estudos prévios com espécimes clínicos coletados de 2005 a 2009 no Brasil (Mascarenhas *et al*, 2010; Gómez *et al*, 2011). Além disso, outras duas amostras do período pós-vacina (PA21771 e PSAL-3115C) que também compartilharam um *cluster*, mostraram substituições aminoacídicas nas posições 130, 162 e 279. A substituição na posição 162 foi compartilhada por amostras

brasileiras isoladas em diferentes regiões (Mascarenhas *et al*, 2010; Gómez *et al*, 2011). Foram observadas em todas as amostras P[4] substituições em resíduos associados a neutralização cruzada limitada: 89(N→D) e 149(G→S) (**Quadro 9**). Análises prévias determinaram que os aa 87-89 e 148-150 são associados a neutralização cruzada limitada, enquanto que resíduos nas posições 100, 114-135 e 173-188 representam sítios de neutralização tipo-específica de VP8* (Ludert *et al*, 1998).

Comparando as sequências de aa de VP7 com as da amostra protótipo DS-1, três substituições foram observadas em sítios antigênicos previamente descritos: 87(A→T), 95(D→L) e 213(N→D) (Kirkwood *et al*, 1993) (**Quadro 8**). Algumas dessas substituições foram encontradas não apenas nas sequências das amostras do presente estudo, mas também na maioria das cepas utilizadas no estudo comparativo. A substituição aminoacídica da posição 95 foi anteriormente associada a um surto de RVA G2P[4] que ocorreu em Taiwan em 1993 (Zao *et al*, 1999). Outros relatos sugerem que estas substituições para VP4 e VP7 devem ter se tornado comuns na população como produto da seleção positiva, possivelmente, proporcionando vantagem evolutiva ao vírus com especificidade G2P[4] (Han *et al*, 2010; Gómez *et al*, 2011; Pietsch *et al*, 2011). Entretanto, para se confirmar esta hipótese será necessário aumentar a investigação da ocorrência dessas mutações para avançar no conhecimento da evolução dos RVA e para determinar a relação dessas mutações com a eficácia vacinal.

Na análise filogenética do gene que codifica para a proteína NSP4, duas amostras oriundas do Amazonas circulantes no período pós-vacinal (RV112015 e RV98235), apresentaram estreita relação genética com amostras de RVA de origem bovina isoladas na Itália (10773) e na Índia (MP/B-47) (Martella *et al*, 2003a). Por outro lado, quando realizada a análise parcial da região codificante (dados não apresentados), as amostras em estudo mostraram uma relação genética próxima com estirpes humana (Bányai *et al*, 2009), revelando identidade nucleotídica de 97%. Tais resultados corroboram com a hipótese de Matthijnssens *et al* (2008a) de que a origem de cepas humanas e bovinas DS1-*like* é comum. No Brasil, Gómez *et al* (2011) e Sá, AC (2012) obtiveram o mesmo resultado para variantes que circularam nas regiões Nordeste e Sudeste entre 2008-2009, sugerindo que esta variante foi introduzida no Brasil recentemente, embora o evento de *reassortment*

bovino-humano, provavelmente teria ocorrido anteriormente à introdução da variante na população brasileira (Gómez *et al*, 2011).

A caracterização dos demais genes que codificam para VPs e NSPs demonstrou conservação entre os *clusters* observados, sendo que para o gene VP6, pelo menos cinco amostras detectadas na região Nordeste e Sudeste (Gómez *et al*, 2011) apresentaram estreita relação genética com as estirpes deste estudo, revelando assim um alto grau de dispersão dessa variante genética de G2P[4]. Em relação as análises dos genes que codificam para NSP1-NSP3 e NSP5, apenas duas estirpes isoladas na Amazônia e descritas por Maestri *et al* (2012) agruparam em *clusters* comuns as estirpes do presente estudo. Não se pode afirmar que esta variante circulou apenas na Região Norte, uma vez que ainda não existem relatos de caracterização de amostras G2P[4] além do gene que codifica para NSP4.

6.1.3 Análise de amostras genótipos G3P[8] e G3P[9]

Dentre os genótipos descritos até o momento de RVA, o G3 é o que possui a maior variedade de hospedeiros e foram descritos em diversas espécies, incluindo macacos, coelhos, suínos, caninos e felinos (Martella *et al*, 2001, 2003b; Khamrin *et al*, 2006). Entre os humanos, os genótipos de VP4 mais relacionados são o P[8] e o P[9] (De grazia *et al*, 2008; McDonal *et al*, 2009b Martella *et al*, 2011).

Neste estudo a amostra classificada como G3P[8] (RV117270) apresentou um padrão genotípico conservado, relacionando-se com o genogrupo *Wa-like*. As análises filogenéticas dos 11 segmentos demonstraram que esta amostra não apresentou similaridade com estirpes de origem animal, agrupando quase na totalidade em *cluster* com um espécime isolado nos Estados Unidos em 2008 (VU08-09-20) e que possui a mesma especificidade G/P. A caracterização desta amostra americana foi realizada por McDonald *et al* (2009b) juntamente com outras 50 amostras G3P[8]. Os dados obtidos evidenciaram, tal como no presente estudo, um padrão conservado entre as constelações gênicas, sugerindo que, embora as possibilidades de *reassortment* inter-genogrupos existam, houve a manutenção da constelação pura *Wa-like* do genoma de RVA G3P[8], sugerindo assim características bem específicas deste genótipo. Entretanto, estudos com um número

maior de estirpes pertencentes a este genótipo deve ser realizados para se confirmar tal hipótese.

A segunda amostra caracterizada como G3P[9] (PID084), isolada em 2002, relacionou-se com o genogrupo AU1-*like* (G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3), com base na análise dos 11 segmentos. Segundo Tsugawa & Hoshino (2008) este perfil é geralmente associado a amostras de RVA felinas e caninas, o que foi demonstrado nas análises filogenéticas dos genes VP1, VP3, VP6, NSP3 e NSP4, onde revelaram estreita relação genética com as cepas Cat97 e/ou Cat2 isoladas de felino (Martella *et al*, 2011). Estudos de caracterização molecular deste genótipo vem aumentando substancialmente (Taniguchi *et al*, 1989; Khamrin *et al*, 2007; De Grazia *et al*, 2008) e fornecendo dados semelhantes em relação a esta similaridade com amostras de origem felina ou canina. No Brasil, Maestri *et al* (2012) no Pará e Luchs *et al* (2012) em São Paulo, descreveram recentemente, em seus estudos amostras G3P[9] e G3P[3], respectivamente, as quais também apresentaram estreita relação com amostras de origem felina.

Quanto a possível origem da circulação desta variante entre humanos, tem sido demonstrado que os RVA podem infectar humanos como consequência de uma infecção direta zoonótica por amostras circulantes de caninos/felinos ou por *reassortment* entre RVA humanos e RVA que infectam essas espécies (Martella *et al*, 2010). Consequentemente, a amostra PID084 pode representar um evento de *reassortment*, uma vez que os valores de identidade nucleotídicas evidenciadas entre ela e estirpes felinas foram baixos (menores que 90%) em comparação com amostras de origem humana (maiores que 95%). Caso a infecção zoonótica tivesse ocorrido de forma direta as identidades entre a cepa PID084 e estirpes felinas deveriam prevalecer. Segundo Martella *et al* (2011) este é o evento mais relatado entre estirpes caracterizadas como G3P[9] e se deve, possivelmente, ao longo processo de domesticação de animais (como gatos e cachorros), que ao conviverem com o homem aumentaram a probabilidade de interação genética entre os vírus de diferentes espécies.

Apesar da caracterização destes RVA incomuns ser epidemiologicamente importante, este tipo de constelação genômica, com características animais aparece em número reduzido, tal como nos estudos de Maestri *et al* (2012) e Luchs *et al* (2012), o que sugere uma restrição rigorosa ao hospedeiro, possivelmente devido a

falta de constelações animais evolutivamente favoráveis a disseminarem na população humana (Matthijnssens & Van Ranst, 2012). No caso da amostra PID084 como a maioria do seus segmentos gênicos (VP7, VP4, VP2, NSP1, NSP2 e NSP5) apresentou estreita relação com a cepa humana AU-1, isto deve ter favorecido a infecção. Entretanto, Martella *et al* (2011) destacaram que a escassez de dados acerca de estirpes animais dificulta a compreensão contundente deste tipo de evento. Com esta nova abordagem e disponibilização de dados mais completos dos RVA será possível esclarecer mais esse processo de interação e evolução de RVA de diferentes espécies.

6.1.4 Análise de amostras genótipo G4P[6] e G4P[8]

Entre os 37 genótipos G descritos até o momento, o genótipo G4 está entre os dez mais detectados no mundo (Matthijnssens *et al*, 2011; Patton, 2012). Circula frequentemente associado ao genótipo P[8] e, eventualmente, ao P[6] (Arista *et al*, 2005; Santos & Hoshino, 2005; Lorenzetti *et al*, 2011). No presente estudo, foram encontradas as duas combinações citadas.

A amostra caracterizada como G4P[8] (HST537) revelou conservação genotípica nas análises dos 11 segmentos, relacionando-se com o genogrupo *Wa-like*. Entretanto, apresentou diversidade genética através da relação com estirpes de diferentes genótipos e anos, entre os *clusters* com os quais agrupou. McDonald *et al* (2011) reportaram resultado semelhante na análise de 11 amostras circulantes nos Estados Unidos entre 1974-1991, as quais não demonstraram uma consistência entre os clados formados no decorrer das 11 análises, o que os levou a deduzir uma grande diversidade intragenotípica relacionada a este genótipo, embora seja caracterizada 100% com o alelo 1 (*Wa-like*).

A segunda amostra, caracterizada como G4P[6] (HSE005), apresentou uma constelação genotípica *Wa-like* predominante, havendo duas variáveis alélicas para os genes VP2 (C2) e NSP3 (T7) diferenciado deste genogrupo. Vale ressaltar que esta combinação binária G/P é considerada incomum entre os RVA humanos, afetando principalmente crianças recém-nascidas (Mascarenhas *et al*, 2007; Lorenzetti *et al*, 2011). O genótipo P[6], além de ser detectado em humanos é

considerado um dos genótipos P mais comuns descritos em outras espécies animais (Santos & Hoshino, 2005; Lorezenti *et al*, 2011).

Através das análises filogenéticas dos 11 segmentos gênicos da amostra HSE005 foi observada estreita relação genética com amostras de origem suína em pelos menos 3 genes (VP4, VP3 e NSP4) e com estirpe bovina no gene NSP3. As relações humana-animal dos gene NSP3 e VP3 constituem as informações mais recentes desta estirpe, uma vez que esta já havia sido caracterizada por Mascarenhas *et al* (2007) para os genes VP4 e NSP4. Os dados aqui apresentados reforçam aqueles obtidos por Mascarenhas *et al* (2007) e adiciona informações importantes sobre a caracterização dos demais genes. Foi demonstrado que na maior parte da análise, a amostra agrupou em *clusters* com amostras de origem humana de especificidades G1P[8], G2P[4] e G9P[8] detectadas no presente estudo, corroborando com os resultados descritos recentemente por Maestri *et al* (2012) sobre a estirpe HSP180 que possui o genótipo G4P[6]. Entretanto, o padrão genotípico observado não foi semelhante a esta estirpe em relação ao gene VP2 (**Figura 21**), sugerindo um evento de *reassortment* inter-genogrupo. Na análise do gene NSP3 (**Figura 26**) a amostra apresentou estreita relação com amostras de origem humana (China) e bovina que compartilham o genótipo A8 deste gene. A única descrição deste genótipo de NSP3 no Brasil foi feita no estudo de Maestri *et al* (2012) com amostras circulantes na Amazônia, Região Norte.

Novamente, ressalta-se que apesar desta variante ser encontrada em baixa frequência é de extrema importância sua caracterização e disponibilização dos dados para posteriores estudos comparativos. Assim, busca-se ampliar o conhecimento acerca das origens de genótipos não usuais, visando o estudo de transmissões inter-espécies e mecanismos evolutivos que permitam tal evento.

6.1.5. Análise de amostras genótipo G9P[8]

Estirpes de RVA genótipo G9 foram identificadas inicialmente nos Estados Unidos e no Japão na década de 1980 (Clark *et al*, 1987; Nakagomi *et al*, 1990). Reemergiu em meados de 1990 e desde então a prevalência global aumentou consideravelmente, de tal forma que, em combinação com P[8], P[4] e P[6] foram

detectados em mais de 55 países da Europa, Ásia, África do Sul e América do Norte, representando o genótipo predominante em algumas regiões durante a última década (Santos & Hoshino, 2005; Matthijnsens *et al*, 2010a). No Brasil, o estudo mais abrangente feito com amostras G9P[8] foi conduzido por Tort *et al* (2010), através da caracterização múltipla de cinco genes (VP7, VP4, NSP1, NSP3 e NSP5). Os dados descritos por Tort *et al* (2010) foram utilizados para análise comparativa dos dados apresentados neste estudo.

Até o momento, seis linhagens para o genótipo G9 (G9-I a VI) foram descritas (Matthijnsens *et al*, 2010a). Neste contexto, as amostras com a especificidade G9P[8] do presente estudo foram classificadas como G9-III, tal como no estudo realizado por Guerra, SF (2010) e Tort *et al* (2010) com amostras brasileiras e, recentemente, por Donato *et al* (2012) com amostras da Austrália. Stupka *et al* (2007; 2009) também caracterizaram amostras na Argentina e detectaram a linhagem G9-III entre as estirpes de RVA. Corroborando assim com os dados disponibilizados por dois vastos estudos acerca da diversidade genética de amostras G9 que demonstraram a predominância global desta linhagem (Phan *et al*, 2007; Matthijnsens *et al*, 2010a). Em relação ao genótipo P[8], todas foram classificadas como P[8]-III, tal como a maioria das amostras circulantes nas Américas, segundo Matthijnsens *et al* (2010b).

Mijatovic-Rustempasic *et al* (2011) sequenciaram os 11 segmentos de amostras G9P[8] circulantes nos Estados Unidos entre 1997 e 2000 e revelaram um elevado padrão de conservação entre essas amostras, relacionando-as ao genogrupo *Wa-like*. Tal achado se assemelha com os dados encontrados no presente estudo, onde 100% das amostras G9P[8] foram relacionadas aos padrões genotípicos *Wa-like*. Além disso, no decorrer das análises filogenéticas foi observado que as quatro estirpes G9P[8] circulantes após a vacina, oriundas do estado do Amazonas, mantiveram um consistente padrão de agrupamento, uma vez que, permaneceram sempre juntas nos *clusters* da maioria dos dendogramas. As estirpes G9P[8] descritas por Tort *et al* (2010) circulantes na Região Sudeste e Nordeste revelaram estreita relação com as estirpes G9P[8] deste estudo, demonstrando assim, que esta variante tem circulado no Brasil em diferentes regiões geográficas e pelo menos desde 2004, quando foram coletadas as primeiras amostras que se relacionaram (Tort *et al*, 2010). As identidades nucleotídicas e

aminoacídicas entre elas e os RVA do Amazonas variaram de 95 a 99% (dados não mostrados).

Em relação as estirpes G9P[8] do período pré-vacinal, somente estirpes detectadas na Bélgica e Estados Unidos compartilharam o mesmo *cluster*, sugerindo que no período anterior a 2004 circulava outra variante G9P[8] na região Norte, a qual compartilha características com RVA circulantes em diferentes continentes.

6.1.6. Análise da amostra genótipo G12P[6]

A única caracterização realizada com amostras G12P[6] circulantes no Brasil e na América Latina foi feita por Soares *et al* (2012). O genótipo G12 é considerado globalmente emergente, tendo sido identificado pela primeira vez nas Filipinas em 1987 (Taniguchi *et al*, 1990; Urasawa *et al*, 1990). Desde então estudos realizados na Ásia, África, Europa e Estados Unidos têm relatado a circulação deste genótipo, que é frequentemente encontrado relacionado ao genótipo P[6] (Pun *et al*, 2007; Cunliffe *et al*, 2009; Matthijnsens *et al*, 2010a; Jere *et al*, 2011; ; Le *et al*, 2011; Tra My *et al*, 2011; Than *et al*, 2011; Cilla *et al*, 2012; Stupka *et al*, 2012).

Quatro linhagens evolutivas de G12 (G12-I a IV) foram relatadas até o momento (Matthijnsens *et al*, 2010a). No presente estudo a amostra RV117230/2010 agrupou com a linhagem G12-III, a mesma detectada por Soares *et al* (2012) entre amostras circulantes no período 2008-2010, na Amazônia Brasileira. Em relação ao genótipo P[6], esta foi caracterizada como P[6]-I. Para as demais análises agrupou em todos os *clusters* com amostras de origem humana (*Wa-like* ou *DS1-like*), revelando uma identidade nucleotídica que variou de 87-95% entre a estirpe e outras amostras que compartilharam os *clusters*.

Até o momento, poucas constelações genóticas foram descritas para estirpes com genótipo G12P[6] (Matthijnsens *et al*, 2011a). A amostra RV117230 do presente estudo apresentou o seguinte padrão de constelação: G12-P[6]-I1-R1-C1-M1-A2-N1-T2-E1-H1, sugerindo pouca conservação alélica entre os genes. Além disso, nenhuma das cepas caracterizadas até o presente apresentou o padrão observado, o que sugere até o momento que as cepas G12P[6] circulantes na Região Norte podem apresentar uma constelação diferente daquelas circulantes em

outros continentes. Entretanto, uma única amostra não sustenta tal hipótese, sendo necessária a caracterização de mais amostras deste genótipo circulante na Região Norte e no Brasil.

6.1.7. Mecanismos evolutivos observados nos RVA circulantes na região Norte

Os resultados observados neste estudo demonstram o grau de variabilidade genética apresentada pelos RVA circulantes na Região Norte antes e após a introdução da vacina Rotarix®. Os RVA, como a imensa maioria dos vírus de RNA, apresentam elevada taxa de variação genética que, no decorrer do tempo, pode distanciar-se geneticamente cada vez mais das amostras protótipos e dos padrões já conhecidos. Com base no novo sistema de classificação (Matthinjssens *et al*, 2008b) apoiado pelas características de diferentes protótipos, espera-se que novos genótipos e/ou novas linhagens e sub-linhagens sejam descritos mais frequentemente.

Como observado em diferentes estudos, este trabalho mostrou a segregação independente dos genes que codificam para VPs e NSPs. Os dados revelam que a variabilidade dos RVA analisados está diretamente associada à ocorrência de mutações pontuais e *reassortment*, tanto entre amostras humanas quanto entre amostras humanas e animais, como bovinos, suínos, felinos e canídeos (McDonald *et al*, 2009 a e b; Gómez *et al*, 2010, 2011; Bányai *et al*, 2011; Silva *et al*, 2011; Martella *et al*, 2011).

Pelas análises filogenéticas observadas neste estudo, percebe-se que há uma diferença genética entre as amostras que circularam antes e após a introdução da vacina Rotarix®. As estirpes do período pré-vacinal apresentaram um maior grau de variabilidade entre elas; enquanto as estirpes do período pós-vacinal apresentaram um maior grau de conservação genética entre si, apesar de ter sido detectado possível rearranjo intra-genotípico neste período. Além disso, foi observado que diversas amostras do presente estudo compartilham características genéticas com estirpes circulantes em diferentes continentes, tal como apresentaram características particulares na análise de alguns genes. Este padrão filogenético indica o fluxo global de variantes virais, sugerindo a entrada e saída de

variantes de RVA. Neste contexto, a caracterização de genótipos emergentes, a exemplo do genótipo G12P[6] analisado, demonstra a importância de se conhecer as particularidades para cada Região do Brasil e do mundo.

A diversidade de estirpes selvagens de RVA circulando no mundo é cada vez maior, com flutuações anuais entre as estirpes dominantes. Ambas as vacinas contra RVA (Rotateq[®] e Rotarix[®]) demonstraram efeito protetor contra doenças causadas pelos genótipos mais prevalentes mundialmente (de Palma *et al*, 2010; Justino *et al*, 2011; Steele *et al*, 2011; Kawamura *et al*, 2011). Contudo, a proteção contra variantes e genótipos emergentes ainda não pode ser definida.

As características biológicas dos RVA faz com que este seja capaz de evoluir rapidamente por acúmulo de mutações pontuais, que proporcionam mudanças antigênicas (*drift*) ou a emergência de novas variantes, possivelmente por eventos de *reassortment* (*shift*) entre RVA detectados em animais e humanos. Somente com a caracterização completa dos 11 genes pode-se saber mais até que ponto a pressão seletiva induzida pela implementação de vacinas venham aumentar a ocorrência desses eventos, já que novas variantes podem emergir com diferentes combinações de VP4 e VP7 para a qual a vacina pode não oferecer proteção (Kirkwood, 2010). Além disso, esta caracterização mostrou-se uma ferramenta fundamental para auxiliar a elucidar eventos de infecções inter-espécies e reagrupamentos genéticos, fornecendo consequentemente dados para estudos comparativos entre cepas circulantes no Brasil e no Mundo e que possam representar algum desafio para a vacina no Programa Nacional de Imunização.

7. CONCLUSÃO

- Foram caracterizadas amostras pertencentes aos principais genogrupos de RVA humano: *Wa-like* (G1/G3/G4/G9-P[8]/P[6]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1), *DS1-like* (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) e *AU1-like* (G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3);
- Foram evidenciadas variantes genéticas em todos os genes que codificam para VPs e NSPs de estirpes circulantes no período anterior e posterior à introdução da vacina Rotarix[®], demonstrando a segregação independente dos genes de RVA analisados;
- Entre os principais mecanismos de geração de diversidade em RVA, foi possível evidenciar a ocorrência de: *i*) mutações pontuais e *ii*) *reassortments* ocorrendo tanto intra-espécie (humano-humano), quanto inter-espécie (humano-animal);

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson EJ. Prevention and treatment of viral diarrhea in pediatrics. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010 ;8(2):205-17.

Aoki ST, Settembre EC, Trask SD, Greenberg HB, Harrison SC, Dormitzer PR. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science.* 2009 ;324(5933):1444-7.

Araujo IT, Assis RM, Fialho AM, Mascarenhas JD, Heinemann MB, Leite JP. Brazilian P[8],G1, P[8],G5, P[8],G9, and P[4],G2 rotavirus strains: nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *J Med Virol.* 2007a; 79: 995-1001.

Araújo IT, Heinemann MB, Mascarenhas JD, Assis RM, Fialho AM, Leite JP. Molecular analysis of the NSP4 and VP6 genes of rotavirus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol.* 2007b Jun;56(Pt 6):854-9.

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

Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C, Martella V. Genetic variability among serotype G4 Italian human rotaviruses. *J Clin Microbiol.* 2005 Mar;43(3):1420-5.

Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Ramirez S, Lo Biundo C, Colomba C, Cascio A, Martella V. Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population. *J Virol.* 2006 Nov;80(21):10724-33.

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

Arnold, MM & Patton, JT. Diversity of Interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. *J Virology.* 2011; 85 (5): 1970-9.

Arora R, Chhabra P, Chitambar SD. Genetic diversity of genotype G1 rotaviruses co-circulating in western India. *Virus Res.* 2009 Dec;146(1-2):36-40.

Arora R, Chitambar SD. Full genomic analysis of Indian G1P[8] rotavirus strains. *Infect Genet Evol.* 2011a Mar;11(2):504-11.

Arora R, Dhale GS, Patil PR, Chitambar SD. Sequence analysis of VP4 genes of wild type and culture adapted human rotavirus G1P[8] strains. *Asian Pac J Trop Med.* 2011b Jul;4(7):541-6.

Ball JM, Tian P, Zeng CY. Age-dependent diarrhea induced by rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science.* 1996; 272: 101-4.

Banyái K, Bogdan A, Domonkos G, Kisfali P, Molnár P, Tóth A, Melegh B, Martella V, Gentsch JR, Szucs G. Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. *J. Med. Virol.* 2009; 81 (2): 362-70.

Bányai K, Mijatovic-Rustempasic S, Hull JJ, Esona MD, Freeman MM, Frace AM, Bowen MD, Gentsch JR. Sequencing and phylogenetic analysis of the coding region of six common rotavirus strains: evidence for intragenogroup reassortment among co-circulating G1P[8] and G2P[4] strains from the United States. *J Med Virol.* 2011; 83(3):532-9.

Bányai K, László B, Duque J, Steele AD, Nelson EA, Gentsch JR, Parashar UD. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine.* 2012 Apr 27;30 Suppl 1:A122-30.

Banerjee I, Iturriza-Gomara M, Rajendran P, Primrose B, Ramani S, Gray JJ, Brown DW, Kang G. Molecular characterization of G11P[25] and G3P[3] human rotavirus strains associated with asymptomatic infection in South India. *J Med Virol.* Nov;79(11):1768-74., 2007.

Benati FJ, Maranhão AG, Lima RS, Silva RC, Santos N. Multiple-Gene Characterization of Rotavirus Strains: Evidence of Genetic Linkage Among the VP7-, VP4-, VP6-, and NSP4-Encoding Genes. *Journal of Medical Virology* 2010; 82:1797-1802.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1973; 2(7841):1281-3.

Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, Jha P, Campbell H, Walker CF, Cibulskis R, Eisele T, Liu L, Mathers C; Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet.* 2010; 375: 1969-87.

Blutt SE, Conner ME. Rotavirus: to the gut and beyond! *Curr Opin Gastroenterol.* 2007a Jan;23(1):39-43.

Blutt SE, Matson DO, Crawford SE, Staat MA, Azimi P, Bennett BL, Piedra PA, Conner ME. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med.* 2007b Apr;4(4):e121.

Borges AM, Dias e Souza M, Fiaccadori FS, Cardoso Dd. Monitoring the circulation of rotavirus among children after the introduction of the Rotarix™ vaccine in Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 Jun;106(4):499-501.

Boshuizen JA, Rossen JW, Sitaram CK, Kimenai FF, Simons-Oosterhuis Y, Laffeber C, Büller HA, Einerhand AW. Rotavirus enterotoxin NSP4 binds to the extracellular matrix proteins laminin-beta3 and fibronectin. *J Virol* 2004; 78(18):10045-53.

Both GW, Siegman LJ, Bellamy AR, Ikegami N, Shatkin AJ, Furuichi Y. Comparative sequence analysis of rotavirus genomic segment 6 the gene specifying viral subgroups 1 and 2. *J Virol.* 1984 Jul; 51(1):97-101.

Bowman GD, Nodelman IM, Levy O, Lin SL, Tian P, Zamb TJ, Udem SA, Venkataraghavan B, Schutt CE. Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site. *J Mol Biol.* 2000; 304, 861-71.

Bresee J, Fang ZY, Wang B, Nelson EA, Tam J, Soenarto Y, Wilopo SA, Kilgore P, Kim JS, Kang JO, Lan WS, Gaik CL, Moe K, Chen KT, Jiraphongsa C, Ponguswanna Y, Nguyen VM, Phan VT, Le TL, Hummelman E, Gentsch JR, Glass R; Asian Rotavirus Surveillance Network. First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(6):988-95.

Carvalho-Costa FA, Assis RM, Fialho AM, Bóia MN, Alves DP, Martins CM, Leite JP. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 May;101(3):291-4.

Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, Fialho AM, de Assis Martins CM, Bóia MN, Leite JP. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(1):95-7.

Carvalho-Costa FA, Volotão EM, de Assis RM, Fialho AM, de Andrade J da S, Rocha LN, Tort LF, da Silva MF, Gómez MM, de Souza PM, Leite JP. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. *Pediatr Infect Dis Journal.* 2011; 30(1):S35-41.

Chami M, Oulès B, Paterlini-Bréchet P. Cytobiological consequences of calcium-signaling alterations induced by human viral proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Nov;1763(11):1344-62.

Chandran A, Zhen A, Santosham M. Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. *Biologics.* 2010; 9(4):213-29.

Cho MK, Jheong WH, Lee SG, Park CJ, Jung KH, Paik SY. Full genomic analysis of a human rotavirus G1P[8] strain isolated in South Korea. *J Med Virol.* 2013 Jan;85(1):157-70.

Cilla G, Montes M, Gomariz M, Alkorta M, Iturzaeta A, Perez-Yarza EG, Perez Trallero E. Rotavirus genotypes in children in the Basque Country (North of Spain): rapid and intense emergence of the G12[P8] genotype. *Epidemiol Infect.* 2012 Jul 3:1-7.

Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, Groff J, Hess G, Bachman P, Offit PA. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J Clin Microbiol.* 1987 Sep;25(9):1757-62.

Costa MS, Nogueira PA, Magalhães GF, Taquita P, Mariúba LA, Penatti M, Orlandi PP. Rotavirus genotyping in gastroenteritis cases of an infantile population from Western Brazilian Amazonia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 Jul-Aug;45(4):52 -2.

Crawford SE, Patel DG, Cheng E, Berkova Z, Hyser JM, Ciarlet M, Finegold MJ, Conner ME, Estes MK. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. *J Virol.* 2006 May;80(10):4820-32.

Cunliffe NA, Gondwe JS, Graham SM, Thindwa BD, Dove W, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol.* 2001 Mar;39(3):836-43.

- Cunliffe NA, Ngwira BM, Dove W, Nakagomi O, Nakagomi T, Perez A, Hart CA, Kazembe PN, Mwansambo CC. Serotype g12 rotaviruses, Lilongwe, Malawi. *Emerg Infect Dis*. 2009 Jan;15(1):87-90.
- Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol*. 1994; 32:1820-2.
- Davidson GP, Bishop RF, Townley RR, Holmes IH. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet*. 1975 Feb 1;1(7901):242-6.
- De Grazia S, Giammanco GM, Martella V, Ramirez S, Colomba C, Cascio A, Arista S. Rare AU-1-like G3P[9] human rotaviruses with a Kun-like NSP4 gene detected in children with diarrhea in Italy. *J Clin Microbiol*. 2008 Jan;46(1):357-60.
- De Palma O, Cruz L, Ramos H, de Baires A, Villatoro N, Pastor D, de Oliveira LH, Kerin T, Bowen M, Gentsch J, Esposito DH, Parashar U, Tate J, Patel M. Effectiveness of rotavirus vaccination against childhood diarrhoea in El Salvador: case-control study. *BMJ* 2010; 340, c2825.
- Desselberger U. Genome rearrangements of rotaviruses. *Adv Virus Res*. 1996; 46: 69-95.
- Dias DM, Silva APS, Helfer AM, Maciel ANTR, Loureiro ECB, Souza CO. Morbimortalidade por gastroenterites no Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 2010; 1(1):53-60.
- Do Carmo GM, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, de Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ, Lopman B, Flannery B, de Oliveira LH, Carmo EH, Patel M. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Med*. 2011 ;8(4):e1001024.
- Doan YH, Nakagomi T, Nakagomi O. Repeated circulation over 6 years of intergenogroup mono-reassortant G2P[4] 3 rotavirus strains with genotype N1 of the NSP2 gene. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012 Aug;12(6):1202-12.
- Donato CM, Ch'ng LS, Boniface KF, Crawford NW, Buttery JP, Lyon M, Bishop RF, Kirkwood CD. Identification of strains of RotaTeq rotavirus vaccine in infants with gastroenteritis following routine vaccination. *J Infect Dis*. 2012 Aug 1;206(3):377-83.
- Dunn SJ, Fiore L, Werner RL, Cross TL, Broome RL, Ruggeri FM, Greenberg HB. Immunogenicity, antigenicity, and protection efficacy of baculovirus expressed VP4 trypsin cleavage products, VP5(1)* and VP8* from rhesus rotavirus. *Arch Virol*. 1995; 140: 1969-78.
- Estes MK Rotaviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. *Fields Virology*. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001, p. 1426-1454.
- Estes MK & Kapikian A Z. Rotaviruses In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th edição. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2007, p1917-74.

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

Flewett TH & Woode GN. The rotaviruses. *Arch Virol.* 1978; 57(1):1-23.

Gabbay YB, Borges AA, Oliveira DS, Linhares AC, Mascarenhas JD, Barardi CR, Simões CM, Wang Y, Glass RI, Jiang B. Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belém, Brazil. *J Med Virol.* 2008 Sep;80(9):1666-74.

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

Gentsch, JR; Parashar UD, Glass RI. Impact of rotavirus vaccination: the importance of monitoring strains. *Future Microbiol.* 2009 Dec;4:1231-4.

Ghosh S, Paul SK, Yamamoto D, Nagashima S, Kobayashi N. Full genomic analyses of human rotavirus strains possessing the rare P[8]b VP4 subtype. *Infection, Genetics and Evolution.* 2011 Aug;11(6):1481-6.

Ghosh S, Adachi N, Gatheru Z, Nyangao J, Yamamoto D, Ishino M, Urushibara N, Kobayashi N. Whole-genome analysis reveals the complex evolutionary dynamics of Kenyan G2P[4] human rotavirus strains. *J Gen Virol.* 2011 Sep; 92(Pt 9):2201-8.

Gómez MM, Volotão EM, de Mendonça MC, Tort LF, da Silva MF, Leite JPG.. Detection of uncommon rotavirus A strains P[8]G8 and P[4]G8 in the city of Rio de Janeiro, 2002. *J Med Virol.* 2010; 82(7):1272-6.

Gómez MM, de Mendonça MC, Volotão E de M, Tort LF, da Silva MF, Cristina J, Leite JPG. Rotavirus A genotype P[4]G2: genetic diversity and reassortment events among strains circulating in Brazil between 2005 and 2009. *J Med Virol.* 2011; 83(6):1093-106.

Gorziglia M, Larrea C, Liprandi F, Esparza J. Biochemical evidence for the oligomeric (possibly trimeric) structure of the major inner capsid polypeptide (45K) of rotaviruses. *J Gen Virol.* 1985 ;66(9):1889-1900.

Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1990 ;28(2):276-82.

Gouvea V, Lima RC, Linhares RE, Clark HF, Nosawa CM, Santos N. Identification of two lineages (WA-like and F45-like) within the major rotavirus genotype P[8]. *Virus Research.* 1999 Feb;59(2):141-7

Guerra, SFS. Caracterização molecular dos genótipos G e P de rotavírus, cepa G9, de crianças com gastroenterite aguda na Região Metropolitana de Belém, Estado do Pará, de 1999 a 2007. Dissertação [Mestrado em Doenças Tropicais], UFPA, 2010.

Guerrero CA, Méndez E, Zárate S, Isa P, López S, Arias CF. Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(26):14644-9.

- Han TH, Kim CH, Chung JY, Park SH, Hwang ES. Genetic characterization of rotavirus in children in South Korea from 2007 to 2009. *Arch Virol.* 2010 ;155(10):1663-73.
- Heiman EM, McDonald SM, Barro M, Taraporewala ZF, Bar-Magen T, Patton JT. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J Virol.* 2008; 82(22):11106-16.
- Hewish MJ, Takada Y, Coulson BS. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol.* 2000;7 (1):228-36.
- Huang H, Schroeder F, Estes MK, McPherson T, Ball JM. Interaction(s) of rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) C-terminal peptides with model membranes. *Biochem J.* 2004; 380: 723-33.
- Isa P, López S, Segovia L, Arias CF. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol.* 1997; 71(9):6749-56.
- Iturriza-Gómara M, Isherwood B, Desselberger U, Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol.* 2001;75(8):3696-705.
- Iturriza-Gomara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol.* 2002 76(13):6596-6601.
- Jain V, Das BK, Bhan MK, Glass RI, Gentsch JR, Indian Strain Surveillance Collaborating Laboratories. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. *J Clin Microbiol.* 2001 Oct;39(10):3524-9.
- Jayasinghe SM, Palombo EA. Genetic homogeneity of human serotype G1 rotaviruses isolated during a single epidemic season: implications for vaccine strategies. *Acta Virol.* 1999 Feb;43(1):53-5.
- Jere KC, Mlera L, O'Neill HG, Potgieter AC, Page NA, Seheri ML, van Dijk AA. Whole genome analyses of African G2, G8, G9, and G12 rotavirus strains using sequence-independent amplification and 454® pyrosequencing. *J Med Virol.* 2011 Nov;83(11):2018-42.
- Johansen K, Hinkula J, Espinoza F, Levi M, Zeng C, Rudén U, Vesikari T, Estes M, Svensson L. Humoral and cell-mediated immune responses in humans to the NSP4 enterotoxin of rotavirus. *J Med Virol.* 1999; 59(3), 369-77.
- Justino MCA, Linhares AC, Lanzieri R, Miranda Y, Mascarenhas JD, Abreu E, Guerra SF, Oliveira AS, da Silva VB, Sanchez N, Meyer N, Shafi F, Ortega-Barria E, Soriano-Gabarró M, Colindres RE. Effectiveness of the monovalent G1P[8] human rotavirus vaccine against hospitalization for severe G2P[4] rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011; 30, 396–401.
- Kaga E & Nakagomi O. Recurrent circulation of single nonstructural gene substitution reassortants among human rotaviruses with a short RNA pattern. *Arch Virol.* 1994 ;136(1-2):63-71.

Kang JO, Kilgore P, Kim JS, Nyambat B, Kim J, Suh HS, Yoon Y, Jang S, Chang C, Choi S, Kim MN, Gentsch J, Bresee J, Glass R. Molecular epidemiological profile of rotavirus in South Korea, July 2002 through June 2003: emergence of G4P[6] and G9P[8] strains. *J Infect Dis.* 2005 Sep 1;192 Suppl 1:S57-63.

Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Kalica AR, James HD Jr, VanKirk D, Chanock RM. Reovirus like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science.* 1974; 185(156):1049-53.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. *Fields Virology* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p.1787-833.

Kawamura N, Tokoeda Y, Oshima M, Okahata H, Tsutsumi H, Van Doorn LJ, Muto H, Smolenov I, Suryakiran PV, Han HH. Efficacy, safety and immunogenicity of RIX4414 in Japanese infants during the first two years of life. *Vaccine* 2011; 29, 6335– 6341.

Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J Med Virol.* 2006 Jul;78(7):986-94.

Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of rare G3P[9] rotavirus strains isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis. *J Med Virol.* 2007 Jun;7 (6):843-51.

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

Kirkwood CD, Bishop RF, Coulson BS. Human rotavirus VP4 contains strain-specific, serotype-specific and cross-reactive neutralization sites. *Arch. Virol.* 1996; 141: 587–600.

Kirkwood CD, Gentsch JR, Glass RI. Sequence analysis of the NSP4 gene from human rotavirus strains isolated in the United States. *Virus Genes.* 1999; 19(2):113-22.

Kirkwood CD. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. *J Infect Dis.* 2010; 1 (202):S43-8.

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

Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol.* 1997;4(2):118-21.

Le VP, Kim JB, Shon DH, Chung IS, Yoon Y, Kim K, Chung SI, Lim I, Kim W. Molecular characterization of rare G12P[6] rotavirus isolates closely related to G12 strains from the United States, CAU 195 and CAU 214. *Arch Virol.* 2011 Mar;156(3):511-6.

Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103, 745-53.

- Lemey P, Salemi M, Vandamme AM. The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing. Cambridge Univ Print. Ed: 2nd. 2009 April; p. 5.
- Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, Müller G, Peters D. Duovirus (Rotavirus) in Belem, State of Para, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1977; 19(4):278-9.
- Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, da Rosa ES, Mascarenhas JD, Loureiro EC. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. *Epidemiol Infect*. 1989; 102(1):129-45.
- Linhares AC, Ruiz-Palacios GM, Guerrero ML, Salinas B, Perez-Schael I, Clemens SA, Innis B, Yarzabal JP, Vespa G, Cervantes Y, Hardt K, De Vos B. A short report on highlights of world-wide development of RIX4414: a Latin American experience. *Vaccine*. 2006 May 1;24(18):3784-5.
- Linhares AC, Stupka JA, Ciapponi A, Bardach AE, Glujovsky D, Aruj PK, Mazzoni A, Rodriguez JA, Rearte A, Lanzieri TM, Ortega-Barria E, Colindres R. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2011; 83(3): 377–557.
- Liu B, Fujita Y, Arakawa C, Kohira R, Fuchigami T, Mugishima H, Kuzuya M. Detection of rotavirus RNA and antigens in serum and cerebrospinal fluid samples from diarrheic children with seizures. *Jpn J Infect Dis*. 2009 Jul;62(4):279-83.
- Lorenzetti E, da Silva Medeiros TN, Alfieri AF, Alfieri AA. Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. *Vet Microbiol*. 2011 Dec 29;154(1-2):191-6.
- López T, Rojas M, Ayala-Bretón C, López S, Arias CF. Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J Gen Virol*. 2005; 86(6): 1609-17.
- López S & Arias CF. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol*. 2004;12(6):271-8.
- Lu X, McDonald SM, Tortorici MA, Tao YJ, Vasquez-Del Carpio R, Nibert ML, Patton JT, Harrison SC. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure*. 2008; 16(11):1678-88.
- Luchs A, Cilli A, Morillo SG, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: possible human-canine interspecies transmission. *J Clin Virol*. 2012 May;54(1):89-92.
- Ludert JE, Feng N, Yu JH, Broome RL, Hoshino Y, Greenberg HB. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. *J Virology*. 1996; 70: 487-493.
- Ludert JE, Mason BB, Angel J, Tang B, Hoshino Y, Feng N, Vo PT, Mackow EM, Ruggeri FM, Greenberg HB. Identification of mutations in the rotavirus protein VP4 that alter sialic-acid-dependent infection. *J Gen Virol*. 1998; 79 (Pt 4):725-9.

- Macedo CI, Christofolletti A, Munford V, Rácz ML. G and P rotavirus genotypes in stool samples from children in Teresina, State of Piauí. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007 Jul-Aug;40(4):381-4.
- Maestri RP, Kaiano JHL, Neri DL, Soares LS, Guerra SFS, Oliveira DS, Farias YN, Gabbay YB, Leite JPG, Linhares AC, Mascarenhas JDP. Phylogenetic Analysis of Probable Non-Human Genes of Group A Rotaviruses Isolated From Children With Acute Gastroenteritis in Belém, Brazil. *J Med Virol.* 2012 Dec ;84(12): 1993–2002.
- Maranhão AG, Vianez-Júnior JL, Benati FJ, Bisch PM, Santos N. Polymorphism of rotavirus genotype G1 in Brazil: in silico analysis of variant strains circulating in Rio de Janeiro from 1996 to 2004. *J Gen Evol.* 2012 Oct;12(7):1397-404.
- Martella V, Pratelli A, Elia G, Decaro N, Tempesta M, Buonavoglia C. Isolation and genetic characterization of two G3P5A[3] canine rotavirus strains in Italy. *J Virol Methods.* 2001 Jul;96(1):43-9.
- Martella V, Ciarlet M, Pratelli A, Arista S, Terio V, Elia G, Cavalli A, Gentile M, Decaro N, Greco G, Cafiero MA, 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. *J. Clin. Microbiol.* 2003a.;41 (12), 5665-75.
- Martella V, Ciarlet M, Camarda A, Pratelli A, Tempesta M, Greco G, Cavalli A, Elia G, Decaro N, Terio V, Bozzo G, Camero M, Buonavoglia C. Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotaviruses identified in Italy: emergence of a novel VP4 genotype. *Virology.* 2003b Sep 15;314(1):358-70.
- Martella V, Bányai K, Ciarlet M, Iturriza-Gómara M, Lorusso E, De Grazia S, Arista S, Decaro N, Elia G, Cavalli A, Corrente M, Lavazza A, Baselga R, Buonavoglia. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology.* 2006 Jan 20;344(2):509-19.
- Martella V, Bányai K, Matthijnsen S J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol.* 2010 Aug ;140(3-4):246-55.
- Martella V, Potgieter AC, Lorusso E, De Grazia S, Giammanco GM, Matthijnsens J, Bányai K, Ciarlet M, Lavazza A, Decaro N, Buonavoglia C. A feline rotavirus G3P[9] carries traces of multiple reassortment events and resembles rare human G3P[9] rotaviruses. *J Gen Virol.* 2011 May;92(Pt 5):1214-21.
- Martin D, Ouldali M, Ménétrey J, Poncet D. Structural organisation of the rotavirus nonstructural protein NSP5. *J Mol Biol.* 2011 Oct 14;413(1):209-21.
- Mascarenhas JD, Gusmao RH, Barardi CR, Paiva FL, Simoes CO, Gabbay YB, Monteiro TA, Linhares AC. Characterization of rotavirus P genotypes circulating among paediatric inpatients in northern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1999 May;41(3):165-70.
- Mascarenhas JDP, Leite JP, Gabbay YB, Freitas RB, Oliveira CS, Monteiro TA, Linhares AC. Rotavirus G serotypes and P[6], G genotypes identified in cases of

reinfection among children participating in a trial with rhesus-human reassortant tetravalent vaccine (RRV-TV) in Belem, Brazil. *J Trop Pediatr.* 2002a ;48(2):93-7.

Mascarenhas JDP, Linhares AC, Gabbay YB, Leite JP. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belem, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2002b ;97(1):113-7.

Mascarenhas JDP, Leite JPG, Lima JC, Heinemann MB, Oliveira DS, Araújo IT, Soares LS, Gusmão RH, Gabbay YB, Linhares AC. Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin. *J Med Microbiol.* 2007a Apr;56(Pt 4):524-32.

Mascarenhas JD, Linhares AC, Gabbay YB, Lima CS, Guerra Sde F, Soares LS, Oliveira DS, Lima JC, Macêdo O, Leite JP. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belem, Brazil. *Virus Res.* 2007b; 126(1-2): 149-58.

Mascarenhas JD, Lima CS, de Oliveira DS, Guerra Sde F, Maestri RP, Gabbay YB, de Lima IC, de Menezes EM, Linhares Ada C, Bensabath G. Identification of two sublineages of genotype G2 rotavirus among diarrheic children in Parauapebas, Southern Pará State, Brazil. *J Med Virol.* 2010 ;82(4):712-9.

Matsuno S, Hasegawa A, Kalica AR, Kono R. Isolation of a recombinant between simian and bovine rotaviruses. *J Gen Virol.* 1980; 48: 253-6.

Matthijnssens J, Rahman M, Martella V, Xuelei Y, Vos S de, Leener K de, Ciarlet M, Buonavoglia C, Van Ranst M. Full Genomic Analysis of Human Rotavirus Strain B4106 and Lapine Rotavirus Strain 30/96 Provides Evidence for Interspecies Transmission. *J. Virol.* 2006 ;80:3801-3810.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palumbo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *Journal of Virology.* 2008a Apr;82(7):3204-19.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008b ;153: 1621-9.

Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M, Rahman M, Lemey P, Van Ranst M. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol.* 2010a ;27(10): 2431-6.

Matthijnssens J, Rahman M, Ciarlet M, Zeller M, Heylen E, Nakagomi T, Uchida R, Hassan Z, Azim T, Nakagomi O, Van Ranst M. Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. *Emerg Infect Dis.* 2010b Apr;16(4):625-30.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD,

Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol.* 2011a ;156(8):1397-413.

Matthijnssens J, De Grazia S, Piessens J, Heylen E, Zeller M, Giammanco GM, Banyai K, Buonavoglia C, Ciarlet M, Martella V, Van Ranst M. Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains. *Infection, Genetics and Evolution.* 2011b ;11(6):1396-406.

Matthijnssens J & Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Current Opinion in Virology* 2012 ;2:426–433.

Maunula L, Von Bonsdorff CH. Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains. *J Virol.* 2002 Dec; 76(23):11793-800.

McClain B, Settembre E, Temple BR, Bellamy AR, Harrison. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol.* 2010 Mar ;397(2):587-99.

McDonald SM, Aguayo D, Gonzalez-Nilo FD, Patton JT. Shared and group-specific features of the rotavirus RNA polymerase reveal potential determinants of gene reassortment restriction. *J Virol.* 2009a ;83(12):6135-48.

McDonald SM, Matthijnssens J, McAllen JK, Hine E, Overton L, Wang S, Lemey P, Zeller M, Van Ranst M, Spiro DJ, Patton JT. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathog.* 2009b; 5(10):e1000634.

McDonald SM & Patton JT. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends in Microbiology.* 2011; 19(3):136-44.

McDonald SM, Davis K, McAllen JK, Spiro DJ, Patton JT. Intra-genotypic diversity of archival G4P[8] human rotaviruses from Washington, DC. *Infect Genet Evol.* 2011 Oct;11(7):1586-94.

McDonald SM, McKell AO, Rippinger CM, McAllen JK, Akopov A, Kirkness EF, Payne DC, Edwards KM, Chappell JD and Patton JT. Diversity and Relationships of Circulating Modern Human Rotaviruses Revealed Using Large-Scale Comparative Genomics. *J Virol.* 2012 ;86(17):9148.

Medici MC, Abelli LA, Martinelli M, Corradi D, Dodi I, Tummolo F, Albonetti V, Martella V, Dettori G, Chezzi C. Clinical and molecular observations of two fatal cases of rotavirus-associated enteritis in children in Italy. *J Clin Microbiol.* 2011 Jul;49(7):2733-9.

Mijatovic-Rustempasic S, Banyai K, Esona MD, Foytich K, Bowen MD, Gentsch JR. Genome sequence based molecular epidemiology of unusual US Rotavirus A G9 strains isolated from Omaha, USA between 1997 and 2000. *Infect Genet Evol.* 2011 Mar;11(2):522-7.

Ministério da Saúde, 2010. www.datasus.gov.br/ Acesso em 02 de janeiro de 2013, às 10h.

Müller H & Johne R. Rotaviruses: diversity and zoonotic potential- a brief review. *Berl. Münch. Terrärztl. Wochenschr.* 2007 ;120: 108-112.

Mukherjee A, Dutta D, Ghosh S, Bagchi P, Chattopadhyay S, Nagashima S, Kobayashi N, Dutta P, Krishnan T, Naik TN, Chawla-Sarkar M. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. *Arch Virol.* 2009, 154(5):733-46.

Mukherjee A, Ghosh S, Bagchi P, Dutta D, Chattopadhyay S, Kobayashi N, Chawla-Sarkar M. Full genomic analyses of human rotavirus G4P[4], G4P[6], G9 [19] and G10P[6] strains from North-eastern India: evidence for interspecies transmission and complex reassortment events. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Sep;17(9):1343-6.

Nagaoka Y, Tatsumi M, Tsugawa T, Yoto Y, Tsutsumi H. Phylogenetic and computational structural analysis of VP7 gene of group a human rotavirus G1P[8] strains obtained in Sapporo, Japan from 1987 to 2000. *J Med Virol.* 2012 May;84(5):832-8.

Nakagomi O, Nakagomi T, Akatani K, Ikegami N. Identification of rotavirus genogroups by RNA-RNA hybridization. *Mol Cell Probes.* 1989 Sep;(3):251-61.

Nakagomi O, Ohshima A, Aboudy Y, Shif I, Mochizuki M, Nakagomi T, Gottlieb Stematsky T. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J Clin Microbiol.* 1990 Jun;28(6):1198-203.

Nakagomi O, Mochizuki M, Aboudy Y, Shif I, Silberstein I, Nakagomi T. Hemagglutination by a human rotavirus isolate as evidence for transmission of animal rotaviruses to humans. *J Clin Microbiol.* 1992 Apr ;30(4):1011-3.

Nakagomi O, Nakagomi T. Molecular epidemiology of human rotaviruses: genogrouping by RNA-RNA hybridization. *Arch Virol Suppl.* 1996 ;12:93-8.

Oka T, Nakagomi T, Nakagomi O. A lack of consistent amino acid substitutions in NSP4 between rotaviruses derived from diarrheal and asymptotically-infected kittens. *Microbiol Immunol.* 2001;45(2):173-7.

Oliveira A, Mascarenhas JDP, Soares LS, Guerra SFS, Gabbay YB, Sánchez N, Colindres RE, Maria Cleonice A. Justino a, Alexandre C. Linhares. Rotavirus serotype distribution in northern Brazil trends over a 27 year period pre and post national vaccine introduction. *Trials in Vaccinology.* 2012, 1:4-9.

O'Ryan M, Lucero Y, Linhares AC. Rotarix®: vaccine performance 6 years postlicensure. *Expert Rev Vaccines.* 2011 ;10(12):1645-59.

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

- Palumbo E, Malorgio C, Siani A, Bonora G. Diarrhoea in children: etiology and clinical aspects. *Infez Med*. 2009 Jun;17(2):95-9.
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(2):304-306.
- Parra GI, Bok K, Martínez V, Russomando G, Gómez J. Molecular characterization and genetic variation of the VP7 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. *J Med Virol*. 2005 Dec;77(4):579-86.
- Patton JT. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med*. 2012 Jan;13(68):85-97.
- Pereira HG, Linhares AC, Candeias JA, Glass RI. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bull Pan Am Health Organ*. 1993; 27(3):224-233.
- Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses *Infection, Genetics and Evolution*. 2007 ;7:656–663
- Pietsch C, Schuster V, Liebert UG. A hospital based study on inter- and intragenotypic diversity of human rotavirus A VP4 and VP7 gene segments, Germany. *J Clin Virol*. 2011; 50(2):136-41.
- Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Venkataram Prasad BV. Rotavirus Proteins: Structure and Assembly. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006 ;309:189-219.
- Pun SB, Nakagomi T, Sherchand JB, Pandey BD, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA, Nakagomi O. Detection of G12 human rotaviruses in Nepal. *Emerg Infect Dis*. 2007 Mar;13(3):482-4.
- Qin L, Lei XB, Ren LL, Wang JW, Hong T. Study on the ubiquitin ligase activity of rotavirus NSP1 protein. *Zhonghua Shi Yan He Lin*. 2010 Dec;24(6):451-4.
- Rahman M, Matthijnssens J, Saiada F, Hassan Z, Heylen E, Azim T, Van Ranst M. Complete genomic analysis of a Bangladeshi G1P[8] rotavirus strain detected in 2003 reveals a close evolutionary relationship with contemporary human Wa-like strains. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010 ;10:746–754.
- Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol*. 2004; 78(19): 10213-10220.
- Rodríguez-Castillo A, Ramírez-González JE, Padilla-Noriega L, Barrón BL. Analysis of human rotavirus G1P[8] strains by RFLP reveals higher genetic drift in the VP7 than the VP4 gene during a 4-year period in Mexico. *J Virol Methods*. 2006 Dec;138(1-2):177-83.
- Rossignol JF, Abu-Zekry M, Hussein A, Santoro MG. Effect of nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhoea: randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet*. 2006; 8;368(9530):124-9.
- Ruiz MC, Leon T, Diaz Y, Michelangeli F. Molecular biology of rotavirus entry and replication. *ScientificWorldJournal*. 2009 Dec 16;9:1476-97.

Sá AC. Detecção e caracterização genotípica de rotavírus da espécie A e norovírus em amostras fecais humanas de Fortaleza, Ceará. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Parasitária]- Instituto Oswaldo Cruz; 2012.

Santos N & Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 2005; 15:29-56.

Shintani T, Ghosh S, Wang YH, Zhou X, Zhou DJ, Kobayashi N. Whole genomic analysis of human G1P[8] rotavirus strains from different age groups in China. *Viruses.* 2012 Aug;4(8):1289-304.

Silva MM, Tort LL, Gómez MM, Assis RM, de Mendonça MC, Volotão Ede M, Leite JP. Phylogenetic analysis of VP1, VP2, and VP3 gene segments of genotype G5 group A rotavirus strains circulating in Brazil between 1986 and 2005. *Virus Research.* 2011; 160: 381-8.

Soares L da S, Lobo P dos S, Mascarenhas JD, Neri DL, Guerra S de F, de Oliveira A do S, Maestri RP, Oliveira D de S, de Menezes EM, Linhares A da C. Identification of lineage III of G12 rotavirus strains in diarrheic children in the Northern Region of Brazil between 2008 and 2010. *Arch Virol.* 2012 Jan;157(1):135-9.

Steele AD, Peenze I, De Beer MC, Pager CT, Yeats J, Potgieter N, Ramsaroop U, Page NA, Mitchell JO, Geyer A, Bos P, Alexander JJ. Anticipating rotavirus vaccines: epidemiology and surveillance of rotavirus in South Africa. *Vaccine.* 2003 ;21(5-6):354-60.

Steele AD, Madhi SA, Louw CE, Bos P, Tumbo JM, Werner CM, Bicer C, De Vos B, Delem A, Han HH. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of human rotavirus vaccine RIX4414 in human immunodeficiency virus-positive infants in South Africa. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011; 30, 25–30.

Stupka JA, Parra GI, Gómez J, Arbiza J. Detection of human rotavirus G9P[8] strains circulating in Argentina: phylogenetic analysis of VP7 and NSP4 genes. *J Med Virol.* 2007 Jun;79(6):838-42.

Stupka JA, Carvalho P, Amarilla AA, Massana M, Parra GI, Argentinean National Surveillance Network for Diarrheas. National Rotavirus Surveillance in Argentina: high incidence of G9P[8] strains and detection of G4P[6] strains with porcine characteristics. *Infect Genet Evol.* 2009 Dec;9(6):1225-31.

Stupka JA, Degiuseppe JI, Parra GI, Argentinean National Rotavirus Surveillance Network. Increased frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008-2009: whole-genome characterization of emerging G12 [8] strains. *J Clin Virol.* 2012 Jun;54(2):162-7.

Subodh S, Bhan MK, Ray P. Genetic characterization of VP3 gene of group A rotaviruses. *Virus Genes.* 2006; 33(2), 143-5.

Suguna K. & Rao C. Rotavirus nonstructural proteins: a structural perspective. *Current Science (Bangalore)*, 2010; 98(3). pp. 352-359.

Sugunan AP, Roy S, Murhekar MV, Naik TN, Sehgal SC. Outbreak of rotaviral diarrhoea in a relief camp for tsunami victims at Car Nicobar Island, India. *J Public Health (Oxf)*. 2007; 29(4):449-50.

Tafazoli F, Zeng CQ, Estes MK, Magnusson KE, Svensson L. NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *J Virol*. 2001; 75(3):1540-6.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011 ;28: 2731-2739.

Taniguchi K, Urasawa T, Kobayashi N, Mise K, Hasegawa A, Yamazi Y, Urasawa S. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new G serotype specificity. *J Virol*. 1990; 64:5640–5644.

Taniguchi K & Urasawa S. Diversity in rotavirus genomes. *Seminars in Virology*. 1995 ;6: 123-31.

Taraporewala Z, Chen D, Patton JT. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J. Virol*. 1999 ;73: 9934-43.

Taraporewala ZF & Patton JT. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res*. 2004; 101: 57-66.

Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD, and the WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012a ; 12: 136–41.

Tate JE, Patel MM, Cortese MM, Lopman BA, Gentsch JR, Fleming J, Steele AD and Parashar UD. Remaining issues and challenges for rotavirus vaccine in preventing global childhood diarrheal morbidity and mortality. *Expert Rev. Vaccines*. 2012b; 11(2), 211–220.

Tatte VS & Chitambar SD. Intragenotypic diversity in the VP4 encoding genes of rotavirus strains circulating in adolescent and adult cases of acute gastroenteritis in Pune, Western India: 1993 to 1996 and 2004 to 2007. *J Gen Mol Virol*. Vol. 2011 Oct; 3(4), pp. 53-62.

Tavares T de M, Brito WM, Fiaccadori FS, Freitas ER, Parente JA, Costa PS, Giugliano LG, Andreasi MS, Soares CM, Cardoso Dd. Molecular characterization of the NSP4 gene of human group A rotavirus samples from the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008a May;103(3):288-94.

Tavares T de M, de Brito WM, Fiaccadori FS, Parente JA, da Costa PS, Giugliano LG, Andreasi MS, Soares CM, Cardoso Dd. Molecular characterization of VP6

encoding gene of group A human rotavirus samples from central west region of Brazil. *J Med Virol.* 2008b Nov;80(11):2034-9.

Taylor JA & Bellamy AR. Interaction of the rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 with the viral and cellular components. *Viral Gastroenteritis* (Elsevier Science). 2003 ;pp. 225–235.

Than VT, Le VP, Lim I, Kim W. Complete genomic characterization of cell culture adapted human G12P[6] rotaviruses isolated from South Korea. *Virus Genes.* 2011 Jun;42(3):317-22.

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

Thompson MJ, Gowdie PJ, Kirkwood CD, Doherty RR, Fahey M. Rotavirus cerebellitis: new aspects to an old foe? *Pediatr Neurol.* 2012 Jan;46(1):48-50.

Tort LF, Volotão Ede M, de Mendonça MC, da Silva MF, Siqueira AA, Assis RM, Moratorio G, Cristina J, Leite JP. Phylogenetic analysis of human P[8]G9 rotavirus strains circulating in Brazil reveals the presence of a novel genetic variant. *J Clin Virol.* 2010; 47(4):345-55.

Tra My PV, Rabaa MA, Vinh H, Holmes EC, Hoang NV, Vinh NT, Phuong le T, Tham NT, Bay PV, Campbell JI, Farrar J, Baker S. The emergence of rotavirus G12 and the prevalence of enteric viruses in hospitalized pediatric diarrheal patients in southern Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Oct ;85(4):768-75.

Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Jan ;10(3):165-77.

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. *Virology.* 2008 Oct ;38 (2):344-53.

Urasawa S, Urasawa T, Wakasugi F, Wakasugi F, Kobayashi N, Taniguchi K, Lintag IC, Sanie MC, Goto H. Presumptive seventh serotype of human rotavirus. *Arch Virol.* 1990; 113:279–282.

Varghese V, Ghosh S, Das S, Bhattacharya SK, Krishnan T, Karmakar P, Kobayashi N, Naik TN. Characterization of VP1, VP2 and VP3 gene segments of a human rotavirus closely related to porcine strains. *Virus Genes.* 2006; 32(3):241-247.

Vesikari T, Clark HF, Offit PA, Dallas MJ, DiStefano DJ, Goveia MG, Ward RL, Schödel F, Karvonen A, Drummond JE, DiNubile MJ, Heaton PM. Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants. *Vaccine.* 2006; 24(22), 4821-9.

Vranjac, A. Diarréia e rotavírus. *Rev Saúde Pública, São Paulo,* 2004; 38(6).

Wentz, MJ, Patton, JT, Ramig, RF. The 3-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 1996; 70:7833–41.

Widdowson MA, Steele D, Vojdani J, Wecker J, Parashar U. Global rotavirus surveillance: determining the need and measuring the impact of rotavirus vaccines. *J Infect Dis.* 2009 Nov 1;200 Suppl 1:S1-8.

World Health Organization. Global networks for surveillance of rotavirus gastroenteritis, 2001–2008. 2008 ; No. 47(83), 421–428.

World Health Organization. Meeting of the Immunization Strategic Advisory Group of Experts, April 2009 - conclusions and recommendations. *Weekly Epidemiology.* 2009; 84: 220–36.

World Health Organization. Meeting of the Immunization Strategic Advisory Group of Experts, Novembro de 2011 - Conclusions and recommendations. *Weekly Epidemiology.* 2011;86 (48): p 541-56.

Zao CL, Yu WN, Kao CL, Taniguchi K, Lee CY, Lee CN. Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. *J. Gen. Virol.* 1999 ;80(Pt 6): 1407-15.

Zárate S, Cuadras MA, Espinosa R, Romero P, Juárez KO, Camacho-Nuez M, Arias CF, López S. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J Virol.* 2003; 77(13):7254-60.

Zeller M, Patton JT, Heylen E, De Coster S, Ciarlet M, Van Ranst M, Matthijnssens J. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J Clin Microbiol.* 2012 Mar;50(3):966-76.

ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS-CEP/IEC



Parecer de Aprovação nº 004/2011
Protocolo CEP/IEC - Nº 026/10
CAAE: 0027.0.072.000-10

Ananindeua/PA, 01 de fevereiro de 2011.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS- CEP

Projeto: “Genes estruturais e não estruturais de rotavírus A circulantes na Amazônia: genealogia transmissão entre espécies e impacto no programa nacional de imunização anti-rotavírus”

Pesquisador Responsável: JOANA D' ARC PEREIRA MASCARENHAS

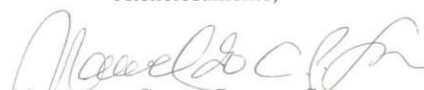
Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epigrafe foi considerado **aprovado**.

Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

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

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

Atenciosamente,


MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC

AV. ALMIRANTE BARROSO, 492 – BAIRRO: MARCO – CEP: 66090-000 – BELÉM-PA – C.N.P.J.: 26.989.350/0489-09 FONE: (091) 246-6422 – FAX: (091) 266-4669

RODOVIA BR 316 – KM 07, SNº - BAIRRO - LEVILÂNDIA – CEP: 67 030-000 – ANANINDEUA-PA – FONE: (091) 214-2000
<http://www.icc.pa.gov.br>