



FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Marcelle Figueira Marques da Silva

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES DE VP1, VP2, VP3, VP4 E VP7 DE
AMOSTRAS DE ROTAVIRUS A GENÓTIPO G5P[8] CIRCULANDO NO BRASIL ENTRE
1986 E 2005.**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Rio de Janeiro
2009



FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARCELLE FIGUEIRA MARQUES DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES DE VP1, VP2, VP3, VP4 E VP7 DE AMOSTRAS DE ROTAVIRUS A GENÓTIPO G5P[8] CIRCULANDO NO BRASIL ENTRE 1986 E 2005.

ORIENTADOR: Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Aprovada em: 29/04/2009

EXAMINADORES:

Dra. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza – Biomanguinhos – Fiocruz – Presidente

Dra. Liliana Cruz Spano – Universidade Federal do Espírito Santo

Dr. Gonzalo Bello Betancourt – IOC- Fiocruz

Membros Suplentes:

Dr. Marcelo Alves Pinto – IOC– Fiocruz

Dra. Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia - Instituto Biomédico – UFF

Rio de Janeiro, 29 de abril de 2009

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz Fundação Oswaldo Cruz – RJ Brasil, sob orientação do Dr. José Paulo Gagliardi Leite.

“O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra”
(Aristóteles)

Aos meus pais, que me propiciaram tudo ao longo da vida e que são o meu alicerce e motivação para a realização de todos os meus projetos de vida e para a minha irmã, que mesmo longe é uma das minhas maiores incentivadoras.

AGRADECIMENTOS

Considero a elaboração de uma dissertação de mestrado um produto coletivo embora sua redação e *stress* seja predominantemente individual. Várias pessoas contribuíram para que eu chegasse até aqui (o que me torna uma pessoa de sorte) e a todas elas agradeço com todo o meu coração.

À todos os meus familiares, pelo suporte e por sempre me incentivarem, especialmente ao Wagner, por me ouvir pacientemente, por me fazer sorrir quando estou triste e, principalmente por me apoiar sempre.

Ao meu orientador, Dr. José Paulo Gagliardi Leite pela confiança no meu trabalho, constante incentivo, amizade e por se preocupar tanto comigo.

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

À Daniele Lobato, pelo carinho e por toda atenção que tem comigo.

À Dra. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza, pelo brilhante trabalho de revisão desta dissertação e por ser sempre tão gentil e carinhosa comigo.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção dispensada a este trabalho.

À Dra. Marize Miagostovich, pela amizade e por sempre me incentivar.

À toda família LVCA:

Ao Dr. Eduardo Volotão por seu carinho, companheirismo, dedicação e por estar sempre do meu lado, incentivando e torcendo. Não teria conseguido sem você!

À Rosane M. dos S. Assis (mamãe) por sempre ajudar e me defender em qualquer ocasião, além de ter me ensinado praticamente tudo no laboratório.

Ao Dr. Marcos César (Lessa) pelas ajudas e por sempre colocar uma dúvida na minha cabeça, o que me fez crescer bastante como virologista.

Ao Fernando Lopéz (Dupla) por ser tão companheiro e pensar sempre coletivamente na hora da resolução dos problemas.

À minha irmã gêmea, Carmen Baur, por ser simplesmente a melhor amiga do mundo.

À Juliana Bragazzi, por seu companheirismo e por sempre tentar me fazer ver as coisas pelo lado bom.

Ao Matías Victória, por ser sempre prestativo e pelo carinho que tem comigo.

Ao Túlio Fumian, por ser sempre um amigo de todas as horas.

À Irene Araújo, pelo carinho e por me ajudar tanto no entendimento dos rotavírus.

À chica, por, apesar dos problemas, nunca perder o bom humor e estar sempre ajudando. .

À Flávia Guimarães, por sempre me ouvir e me aconselhar.

À Mariela Martinez, por seu carinho e por sempre estar disponível pra me ajudar.

À Monica Rocha, por ter sempre um conselho e uma palavra amiga pra me dar.

À Dadade, pela amizade e por sempre me fazer rir.

Ao Edson Pereira, pela amizade e por ter deixado as amostras de G5 tão organizadinhas.

À Ludmila Rocha, por ser tão carinhosa e amiga e pela grande ajuda com o Bahia Azul.

À Ana Carolina Ganime, pela amizade e momentos de descontração.

À Tatiana Rose, por apesar do pouco tempo de LVCA ter contribuído tanto para a conclusão desta dissertação.

Ao Alexandre Fialho, por ser tão prestativo e me ensinar tanta coisa.

Ao Joeler Vargas, pela amizade e por solucionar as minhas dores de cabeça.

À Silvana Portes, pelo carinho que tem por mim.

À Marilda Almeida, por sempre me ajudar quando preciso.

À Ana Pinto, pelo carinho e por sempre me ensinar alguma coisa.

Ao Alexandre Pina, pela amizade e por sempre alegrar o ambiente.

À Julia Fioretti, por ser sempre tão querida e prestativa.

À Thaís Ribeiro, pelas conversas e risadas.

À Juliana Andrade, pela amizade e por sempre oferecer ajuda quando me vê desesperada.

À Suellen Possas, pelo carinho e por ser tão fofa comigo.

Aos amigos que não fazem mais parte, fisicamente, do LVCA: Gilmar Alcântara, Filipe Aníbal, Marilucia Pina, Marcos Bryan, Patrícia Duque, Regianne Guedes e Tatiana Robaina, por terem contribuído bastante para a minha formação como bióloga e como pessoa.

Às minhas queridas amigas do “complexo LVCA/LDT”: Carol, Débora e Tamara, por estarem sempre tão presentes na minha vida e principalmente pelas horas de terapia do riso seja na copa, B205/B220 ou via MSN.

À Fabiana Fioretti por ser uma amigona e por estar sempre preocupada com o meu futuro.

Às minhas amigas Débora Souto, Fernanda Santana, Isabel Abreu, Janayna Freire e Priscila Antunes por compreenderem a minha ausência me incentivarem sempre.

À minha amiga Kene Gallois por me entender perfeitamente, ouvir pacientemente as minhas lamentações e sempre me ajudar.

Ao Franklin Souza, pela amizade e por sua grande ajuda nas análises filogenéticas.

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

Ao Dr. Vici Varghese, por ter nos disponibilizado o seu protocolo de amplificação dos genes que codificam para VP1, VP2, e VP3 de rotavírus A.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro.

A todos os pais e crianças participantes deste estudo.

À Deus, por nunca sair do meu lado.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ l – microlitro

μ M – micromolar

A – adenina

aa – aminoácido

BLAST – *basic local alignment search tool*

C – citosina

CaCl₂ – cloreto de cálcio

Ca⁺⁺ – íons cálcio

Cl⁻ – cloreto

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

cDNA- DNA complementar

CEP/FIOCRUZ – Comissão de Ética Institucional

CsCl – cloreto de cério

dATP – desoxiadenina

dCTP – desoxicitosina

dGTP – desoxiguanina

DLP – Partículas de duplo capsídeo

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dTTP – desoxitimina

dNTP – desoxiribonucleotídeo

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

EGPA – eletroforese em gel de poliacrilamida

EIARA – ensaio imunoenzimático para detecção de rotavírus e adenovírus

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – grama

G – guanina

HCl – ácido clorídrico

IF – imunofluorescência

IME – imunomicroscopia eletrônica

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

kb – kilo bases
kDa – quilodalton
LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental
ME – microscopia eletrônica
mg – miligrama
MgCl₂ – cloreto de magnésio
mL – mililitro
mM – milimolar
NaOH – hidróxido de sódio
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NIH – *National Institutes of Health*
NJ – *Neighbor-joining*
ng – nanograma
nm – nanômetro
NSP – proteína não estrutural
nt – nucleotídeo
°C – graus centígrados
ORF – fase de leitura aberta
PA – pró-análise
PNI – Programa Nacional de Imunizações
q.s.p. – quantidade suficiente para
RE – retículo endoplasmático
RER – retículo endoplasmático rugoso
RNA – ácido ribonucléico
RNAfd – RNA de fita dupla
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR - reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa
RV – rotavírus
RV-A- rotavírus grupo A
T – timina
Tris – hidroximetil-tris-aminometano
VP – Proteína Estrutural
UV – ultravioleta

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE QUADROS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. As gastroenterites agudas	1
1.2. Histórico	2
1.3. Classificação dos rotavírus	3
1.4. Partícula do rotavírus A	6
1.4.1. Proteínas estruturais	7
1.4.2. Proteínas não-Estruturais	9
1.5. Replicação Viral	12
1.6. Mecanismos de evolução dos rotavírus	14
1.6.1. Mutações pontuais	14
1.6.2. Rearranjos genéticos	15
1.6.3. Reestruturação de segmentos gênicos (<i>Reassortments</i>)	16
1.6.4. Recombinação genética	17
1.6.5. Transmissão interespécies	18
1.7. Epidemiologia	19
1.7.1. Genótipos de rotavírus A no Brasil	20
1.8. Vacinas contra rotavírus A	23
1.8.1. Abordagem Jenneriana	23
1.8.2. Vacinas reestruturadas polivalentes (abordagem Jenneriana modificada)	24
1.8.2.1. <i>Rhesus Rotavirus Vaccine- Tetravalent (RRV-TV)</i> (Rotashield®)	24
1.8.2.2. Rotateq®	25
1.8.2.3. Vacina contra rotavírus bovino-humana multivalente (Vacina UK)	25
1.8.3. Vacinas com rotavírus A humano	26
1.8.3.1. RIX 4414 (Rotarix®)	26
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVO GERAL	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. MATERIAL	30
4.1.1. Amostras Clínicas	30

4.1.2. Iniciadores de cadeia	32
4.1.3. Soluções	34
4.1.3.1 - Tampão TRIS/HCl/Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2	34
4.1.3.2 - Sílica	34
4.1.3.3 - EDTA 0,2M pH 8,0	35
4.1.3.4 - Tampão L6	35
4.1.3.5 - Tampão L2	35
4.1.3.6 - Tampão tris-boro-EDTA 10X pH 8,4 (TBE)	36
4.1.3.7- Gel de agarose a 1,5%	36
4.1.3.8 - Solução de brometo de etídio	36
4.1.3.9 - Etanol 70%	37
4.2. MÉTODOS	37
4.2.1 - Preparo das suspensões fecais a 10%	37
4.2.2 - Extração do RNA viral pelo método da sílica (Boom et al., 1990)	37
4.2.3 - Reação de transcrição reversa (RT) para a obtenção de cDNA.	38
4.2.4 - Reação em cadeia pela polimerase para caracterização molecular dos genes que codificam para as proteínas VP7 e VP4 de rotavírus A.	39
4.2.5 - Reação em cadeia pela polimerase para caracterização molecular dos genes que codificam para as proteínas VP1, VP2 e VP3 de rotavírus A	40
4.2.6. Análise dos <i>amplicons</i> por eletroforese em gel de agarose a 1,5%	41
4.2.7. Purificação dos <i>amplicons</i>	41
4.2.8. Sequenciamento parcial dos <i>amplicons</i>	41
4.2.9. Análise filogenética das amostras	42
5. RESULTADOS	44
5.1. Análise das amostras fecais coletadas por eletroforese em gel de Poliacrilamida (EGPA)	44
5.2. RT-PCR para os genótipos G e P de rotavírus A	45
5.3. RT-PCR para os genes que codificam para as proteínas VP1, VP2, e VP3 de rotavírus A	46
5.4. Análise das sequências nucleotídicas e aminoacídicas dos genes que codificam para as proteínas estruturais VP1, VP2, VP3, VP4 e VP7	47
5.4.1. Análise do gene que codifica para a proteína VP1	47
5.4.2. Análise do gene que codifica para a proteína VP2	53
5.4.3. Análise do gene que codifica para a proteína VP3	59
5.4.4. Análise do gene que codifica para a proteína VP4	65
5.4.5. Análise do gene que codifica para a proteína VP7	70
6. DISCUSSÃO	75
7. CONCLUSÕES	82
8. PERSPECTIVAS	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Gráfico representando as principais causas de mortalidade de crianças menores de cinco anos de idade em nível global (Adaptado de WHO 2005)	1
2	Esquema representativo dos eletroferotipos dos diferentes grupos de rotavírus em gel de poliacrilamida (Adaptada de Kapikian e colaboradores, 2001)	4
3	Representação esquemática e tridimensional da partícula viral de rotavírus A símio (SA11) (adaptada de Prasad e colaboradores, 1996)	6
4	Esquema representativo da organização do gene de VP4 de rotavírus A (adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).	8
5	Esquema representativo da organização do gene de VP6 de rotavírus A (adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).	8
6	Esquema representativo da organização do gene da VP7 de Rotavírus (Adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).	9
7	Representação esquemática da NSP4 de rotavírus A (adaptada de Bowman <i>et al.</i> , 2000).	10
8	Esquema representativo da organização do gene da proteína NSP4 de rotavírus A (adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).	11
9	Modelo esquemático do ciclo de replicação dos rotavirus A (adaptada de Arias e colaboradores, 2004).	13
10	Esquema representativo das mutações pontuais.	14
11	Estruturas rearranjadas de segmentos de genoma de rotavírus contendo duplicação parcial da ORF (adaptada de Estes, 2001)	15
12	Esquema representativo dos eventos de <i>reassortment</i> .	17
13	Esquema representativo do evento de recombinação genética.	18
14	Gráfico ilustrando a distribuição continental/subcontinental de rotavírus A humano com as combinações binárias G e P. (adaptada de Santos & Hoshino, 2005)	20
15	Gráfico ilustrando os genótipos de rotavírus A no Brasil por região.	21
16	Gráfico ilustrando a taxa de detecção dos genótipos G distintos de rotavirus A no Brasil em diferentes períodos (adaptado de Leite e colaboradores, 2008)	22
17	Gráfico evidenciando a substituição do genótipo G5 pelo genótipo G9 (adaptado de Santos & Hoshino, 2005)	22
18	Fluxograma ilustrando os procedimentos para detecção e caracterização molecular de rotavírus A, a partir das amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda	32
19	Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) de RNAfd de rotavírus A	44
20	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos amplicons da RT-PCR para a determinação dos genótipos G e P de rotavírus A	45
21	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos amplicons da RT-PCR correspondentes aos os genes que codificam para as proteínas VP1, VP2, e VP3 de rotavírus A	46
22	Dendograma representando a classificação das amostras do estudo nos diferentes genótipos de VP1	50
23	Dendograma construído a partir da análise da sequência nucleotídica do gene de VP1 de amostras de RV-A genótipo G5P[8] e amostras protótipo de RV-A	51
24	Alinhamento das sequências parciais aminoacídicas do gene de VP1 das amostras brasileiras do estudo e as amostras protótipos utilizadas na análise filogenética	52

25	Dendograma representando a classificação das amostras do estudo dentro de grupo de diferentes genótipos de VP2	56
26	Dendograma construído a partir da análise da sequência nucleotídica do gene de VP2 de amostras de RV-A genótipo G5P[8] e de amostras protótipos de RV-A	57
27	Alinhamento das sequências parciais aminoacídicas do gene de VP2 das amostras brasileiras do estudo e de amostras protótipos utilizadas na análise filogenética	58
28	Dendograma representando a classificação das amostras do estudo dentro do grupo de diferentes genótipos de VP3	62
29	Dendograma construído a partir da análise da sequência nucleotídica do gene de VP3 de amostras de RV-A genótipo G5P[8] e de amostras protótipos de RV-A	63
30	Alinhamento das sequências parciais aminoacídicas do gene de VP3 das amostras do estudo e de amostras protótipo utilizadas na análise filogenética	64
31	Dendograma construído a partir da análise da sequência nucleotídica do gene de VP4 de amostras de RV-A genótipo G5P[8] e de amostras protótipo de RV-A	67
32	Alinhamento das sequências parciais aminoacídicas do gene de VP4 das amostras do estudo e de amostras protótipos utilizadas na análise filogenética	69
33	Dendograma construído a partir da análise da sequência nucleotídica do gene de VP7 de amostras de RV-A genótipo G5P[8] e de amostras protótipos de RV-A de genótipo G5	72
34	Alinhamento das sequências parciais aminoacídicas do gene de VP7 das amostras do estudo e de amostras protótipos utilizadas na análise filogenética	74

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica entre as sequências parciais do gene que codifica a proteína VP1 das amostras analisadas e amostras protótipos de diferentes genótipos de rotavírus A humanos e animais	48
2	Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica da sequência parcial de VP1 das amostras RV-A de genótipo G5P[8] analisadas	49
3	Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica entre as sequências parciais do gene de VP2 das amostras analisadas e amostras protótipos de diferentes genótipos de RV-A humanos e animais	54
4	Tabela representando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica da sequência parcial de VP2 das amostras RV-A de genótipo G5P[8] analisadas	55
5	Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica entre as sequências parciais do gene de VP3 das amostras analisadas e amostras protótipos de diferentes genótipos de RV-A humanos e animais	60
6	Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica da sequência parcial de VP3 das amostras RV-A de genótipo G5P[8] analisadas	61
7	Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica entre as sequências parciais do gene de VP4 das amostras analisadas e amostras protótipos de diferentes genótipos de RV-A humanos e animais	66
8	Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica da sequência parcial de VP4 das amostras RV-A de genótipo G5P[8] analisadas	68
9	Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica entre as sequências parciais do gene de VP7 das amostras analisadas e amostras protótipos de diferentes genótipos de RV-A humanos e animais	71
10	Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica da sequência parcial de VP7 das amostras RV-A de genótipo G5P[8] analisadas	73

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
1	Quadro de valores de <i>cut-off</i> de percentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus A considerando-se os 11 segmentos gênicos (adaptada de Matthijnssens e colaboradores, 2008b)	5
2	Quadro indicando a procedência, código de identificação e o ano de coleta das amostras analisadas no estudo.	31
3	Quadro contendo informações quanto aos iniciadores de cadeia utilizados na reação de PCR e sequenciamento dos genes que codificam para as proteínas VP1, VP2, VP3, VP4 e VP7 de rotavírus A	33
4	Quadro indicando reagentes utilizados na reação de transcrição reversa cDNA.	38
5	Quadro indicando reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para amplificação dos genes de VP7 e VP4 de rotavírus A	39
6	Quadro indicando reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para amplificação dos genes de VP1, VP2 e VP3 de rotavírus A	40
7	Quadro com o resumo das amostras protótipos utilizadas nas análises filogenéticas obtidas no <i>GenBank</i> com seus respectivos números de acesso, genótipos, local de isolamento e espécie de origem.	43

RESUMO

Nas décadas de 80 e início de 90 os rotavírus A (RV-A) de genótipo G5, comum em suínos, equinos e bovinos eram detectados com frequência em amostras fecais de crianças brasileiras. Após 1996, deixou de circular em caráter endêmico, tornando-se apenas esporadicamente detectado, enquanto o genótipo G9 começou a ser detectado com frequência. Esta situação leva a crer que houve a substituição do genótipo G5 pelo G9. Tendo em vista a escassez de dados moleculares a respeito de amostras de genótipo G5 de RV-A, no presente estudo foi realizada a análise filogenética para os genes que codificam para as proteínas VP1, VP2, VP3, VP4, e VP7 de vinte e oito amostras de RV-A humano de genótipo G5P[8], coletadas em diferentes estados brasileiros entre 1986 e 2005. A análise filogenética do gene que codifica para a proteína VP7 demonstrou que as mesmas agrupam juntamente com amostras humanas brasileiras de genótipo G5 (IAL28, Br 1054 e Br H8), no entanto a análise do gene que codifica para a proteína VP4 demonstrou que circularam três linhagens do genótipo P[8] (P[8]-1, P[8]-2, e P[8]-3) no Brasil entre 1986 e 2005 em associação com G5. As análises filogenéticas para os genes que codificam para VP1, VP2, e VP3 demonstraram que os mesmos pertencem ao genogrupo *Wa-Like*, comum a humanos, o que sugere que estas amostras possam ter se originado de uma amostra de RV-A humano. As análises filogenéticas dos genes de VP1, VP2 e Vp3 revelaram que todas as amostras foram classificadas dentro dos genótipos R1, M1 e C1, respectivamente. Os resultados do presente estudo enfatizam a importância do monitoramento contínuo e a caracterização molecular das amostras de RV-A circulantes, principalmente para prever a possível emergência e/ou re-emergência de genótipos após a introdução de uma vacina contra RV-A nos diferentes continentes do mundo e para se melhor entender a dinâmica e o padrão de evolução dos RV-A de genótipo G5.

ABSTRACT

The group A rotavirus (RV-A) genotype G5, which is common in pigs but also detected in horses and cattle was frequently detected in stool samples collected in the 1980s and the early 1990s in Brazil. After 1996, the G5 has disappeared as an endemic/epidemic strain, becoming only sporadically detected. On the other hand the RV-A G9 has showed a broad geographic distribution. Recently, the G5 was reported in children with severe diarrhea in Argentina, Brazil, Cameroon, Paraguay, People's Republic of China, and Vietnam. It suggests that the G5, although uncommon overall in humans, is found worldwide. Twenty-eight G5P[8] human RV-A strains isolated from a 19-year long sample collection (from 1986 to 2005), representing four different Brazilian states, was analyzed, and the genetic variability for VP1, VP2, VP3, VP4 and VP7 genes was determined. The nucleotide sequencing and phylogenetic analyses were performed. Based on VP7 gene phylogenetic analysis, all the analyzed sequences were clustered with other Brazilian G5 strains. The VP4 genes analyzes showed that three P[8] genetic lineages (P[8]-1, P[8]-2 and P[8]-3) circulated in Brazil between 1986 and 2005 in association with genotype G5. The analyzed partial sequences of VP1, VP2 and VP3 showed high identity with RV-A Wa-like strains, which suggests that they might have originated from a human RV-A strain. The phylogenetic analysis revealed that all Brazilian strains were classified as genotype R1, M1 and C1 for VP1, VP2 and VP3 genes, respectively. Our results show that the inner RV-A genotype G5 proteins have been adapted in humans for at least 20 years, emphasizing the importance of continuous virological surveillance of circulating RV-A to detect new variants and possible antigenic changes with potential effect on vaccine effectiveness and contribute to a better understanding of the dynamics and pattern of RV-A G5 evolution.

1. INTRODUÇÃO

1.1. As Gastroenterites Agudas

A gastroenterite aguda é um dos mais importantes agravos à saúde, sendo a segunda maior causa de óbitos em crianças menores de cinco anos de idade nos países em desenvolvimento e sendo responsável por, aproximadamente, 15% da mortalidade infantil nesta faixa etária (Figura 1). Estima-se que as diarreias agudas ocasionem, aproximadamente, 1,8 milhão de óbitos por ano no mundo (WHO 2005).

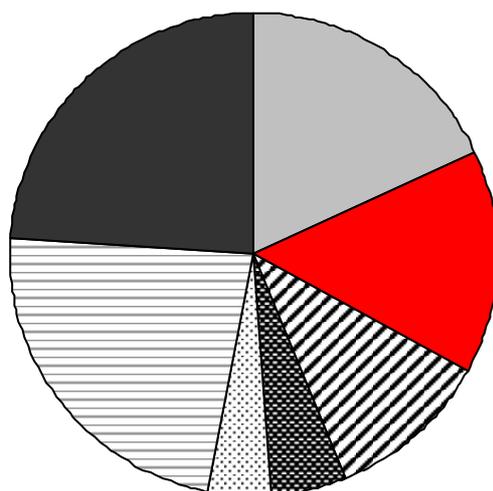
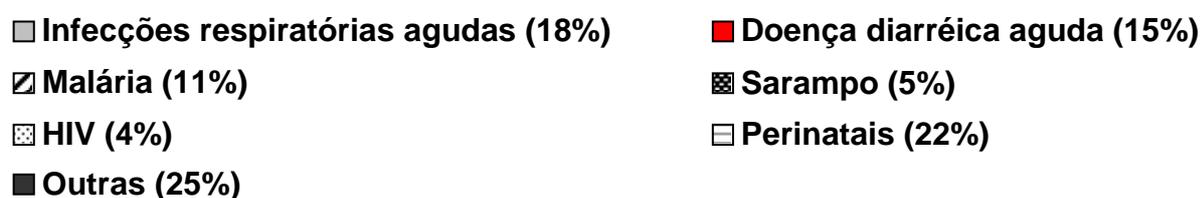


Figura 1- Gráfico representando as principais causas de mortalidade de crianças menores de cinco anos de idade em nível global (Adaptado de WHO 2005).

No Brasil, as taxas de mortalidade por gastroenterite aguda em crianças menores de cinco anos de idade apresentam variações nas cinco regiões, sendo maiores nas regiões nordeste e norte do país (Ministério da Saúde, 2006).

Os rotavírus (RV) são os principais agentes etiológicos causadores de gastroenterite aguda e, anualmente, são responsáveis por aproximadamente 111 milhões de episódios de diarreia, 25 milhões de visitas ambulatoriais, dois milhões de hospitalizações e 527.000 mortes (associadas à desnutrição) de crianças menores de cinco anos de idade, principalmente na África, América Latina e Ásia (Parashar *et al.*, 2006; CDC, 2008). Isto equivale a dizer

que, até a idade de cinco anos, todas as crianças terão experimentado um episódio de diarreia aguda por RV, uma em cada cinco terá sido atendida em ambulatórios e uma em cada 65 terá sido hospitalizada em decorrência de gastroenterite causada pelo RV (Parashar *et al.*, 2006).

Tendo estes dados como base, o Ministério da Saúde iniciou em março de 2006 uma campanha nacional de vacinação contra RV-A (vacina monovalente G1P[8], Rotarix® GlaxoSmithKline, Rixensart, Bélgica). A expectativa consistia na redução do número expressivo de hospitalizações e de mortes de, aproximadamente 1.000 crianças por ano. Considerando-se a possibilidade de emergência ou re-emergência de novos genótipos de RV-A (Cook *et al.*, 2004; Iturriza-Gomara *et al.*, 2004), torna-se fundamental um programa de monitoramento longitudinal dos genótipos circulantes e o impacto destes no Programa Nacional de Imunizações (PNI) para os RV-A.

1.2. Histórico

Os RV humanos foram descritos pela primeira vez em 1973, em Melbourne, Austrália, pela análise por microscopia eletrônica (ME), de células do epitélio de mucosa duodenal de crianças com quadro de diarreia aguda não bacteriana (Bishop *et al.*, 1973).

Esses vírus foram inicialmente denominados *Orbivirus* (Bishop *et al.*, 1973) e *Reovirus-like* (Kapikian *et al.*, 1974) em razão de sua semelhança morfológica aos membros da família *Reoviridae*. Logo após, foram denominados *Duovirus* (Davidson *et al.*, 1975) e, finalmente, *Rotavirus*, devido ao seu aspecto semelhante ao de uma roda quando examinados através da ME (Flewett *et al.*, 1978).

No Brasil, os RV foram primeiramente descritos por Linhares e colaboradores (1977) ao examinarem fezes de crianças com gastroenterite aguda através da ME. Desde então, vários estudos tem demonstrado a importância dos RV no Brasil, visto que sua ocorrência tem sido significativa nos casos de diarreia aguda nos últimos anos (Araújo *et al.*, 2001, 2002, 2007; Mascarenhas *et al.*, 2002, 2007; Carneiro *et al.*, 2006; Gurgel *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2008; Carvalho-Costa *et al.*, 2009).

1.3. Classificação dos rotavírus

Os RV pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. A partícula viral é não-envelopada, de simetria icosaédrica, com aproximadamente 100 nm de diâmetro (Hyser *et al.*, 2009) e genoma constituído por onze segmentos de RNA de fita dupla (RNAfd). Cada segmento do genoma (designados de um a onze) codifica uma proteína, com exceção do segmento 11, que codifica duas, totalizando 12 proteínas: 6 estruturais (VPs) e 6 não-estruturais (NSPs) (Estes & Kapikian, 2007).

Os RV estão classificados em sete sorogrupos distintos (A-G) pela presença de diferentes epítomos presentes na proteína estrutural VP6. Os grupos A, B, e C têm sido encontrados tanto em humanos quanto em animais, enquanto os grupos D-G somente em animais (Figura 2). Os RV do grupo A (RV-A) são epidemiologicamente os mais importantes, porque são os principais responsáveis pelos episódios de diarreia aguda em crianças em todo o mundo (Kapikian & Chanock, 2001).

Os RV-A são definidos em subgrupos (SG) e sorotipos/genótipos segundo características sorológicas e moleculares, respectivamente. A proteína VP6 é a responsável pela especificidade de diferentes SG, através da presença ou ausência de epítomos imunoreativos frente a determinados anticorpos monoclonais, denominados como SGI, SGII, SGI+II e SG não I e não II (Greenberg *et al.*, 1983; Estes, 2001). O SGII é o mais frequentemente encontrado em humanos, enquanto o SGI é mais detectado entre as amostras de origem animal (Iturriza-Gómara *et al.*, 2002).

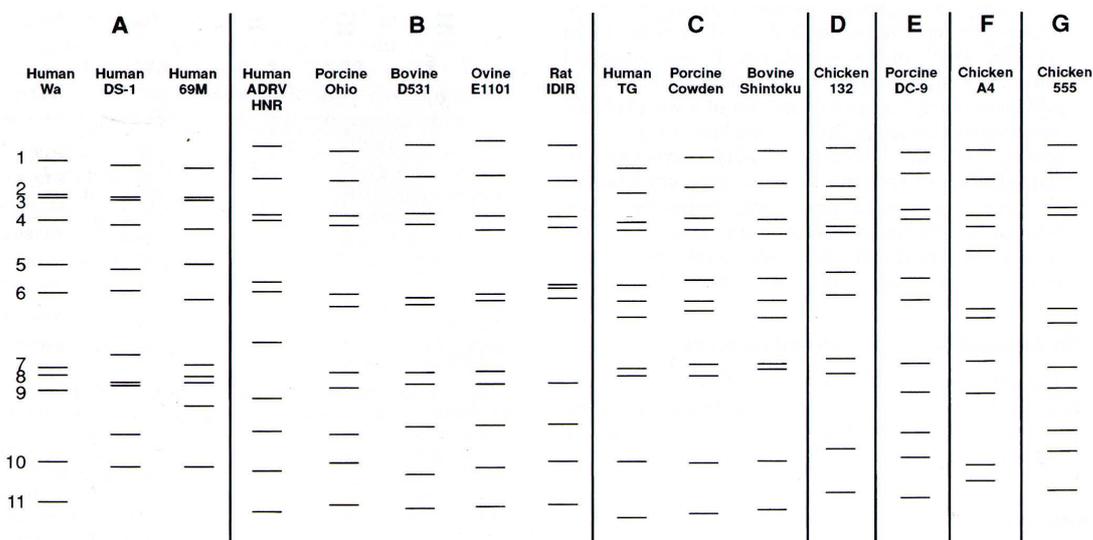
Os segmentos do genoma dos RV variam em número de nucleotídeos (nt) de 667 (segmento 11) a 3.302 pares de bases (pb) (segmento 1), do menor para o maior respectivamente. Esta diferença permite que os segmentos sejam visualizados separadamente através da utilização da técnica de eletroforese em gel de 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 RV-A, o qual apresenta quatro segmentos de RNAfd de alta massa molecular (1-4), 2 segmentos de média massa molecular (5 e 6), seguidos de um grupo contendo três segmentos (7-9) e 2 segmentos de baixa massa molecular (10 e 11). Os demais grupos de RV revelam migrações distintas (Figura 2) (Estes, 2007).

A classificação dos RV-A em genótipos/sorotipos consiste em um sistema binário baseado na especificidade das proteínas VP7 e VP4. Assim sendo, foram estabelecidos sorotipos/genótipos G (glicoproteína) e P (sensível à protease) para VP7 e VP4,

respectivamente. Até o momento foram descritos 19 genótipos G e 27 genótipos P (Ciarlet *et al.*, 2008).

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

Os RV-A são também classificados em genogrupos, e o termo genogrupo indica um grupo de vírus que pode ser classificado dentro de um mesmo grupo genético, tendo como base a homologia de seus segmentos genômicos. Foram descritos, até o momento quatro genogrupos de RV-A: os dois primeiros (*Wa-like*, *DS-1-like*) são constituídos de oito amostras exclusivamente humanas; o terceiro genogrupo (*AU1-like*) é formado por amostras isoladas a partir de humanos e felinos; enquanto o quarto genogrupo (*K9-like*) é formado por amostras de caninos, felinos e humanos, sendo a amostra K9, protótipo do grupo, um isolado de RV-A canino. Nakagomi & Nakagomi (1993), através de ensaios de hibridização RNA-RNA discutiram que a homologia apresentada por diferentes amostras de RV-A é interpretada como uma evidência molecular da ocorrência de transmissão de RV-A interespecíes.



Human = Humano; Porcine = Suíno; Bovine = Bovino; Ovine = Ovino; Rat = Rato; Chiken = Galinha

Figura 2- Esquema representativo dos eletroferotipos dos diferentes grupos de rotavírus em gel de poliácridamida (Adaptada de Kapikian *et al.*, 2001).

Recentemente, Matthijnssens e colaboradores (2008b) propuseram um novo sistema de classificação para os RV-A, tendo como base as propriedades moleculares dos 11 segmentos de RNAfd. Este novo sistema de classificação foi proposto baseado na caracterização molecular e análise filogenética do genoma completo de 53 protótipos. Os diferentes genótipos descritos para cada um dos segmentos são divididos segundo valores de *cut-off* específicos de identidade nucleotídica para cada um destes genes (Quadro 1). Análises filogenéticas sugerem que as características moleculares dos genes que codificam para as proteínas VP1 (*RNA-dependent RNA polymerase*), VP2 (*Core Protein*), VP3 (*Methyltransferase*), VP6 (*Inner Capsid*), NSP1 (*Interferon Antagonist*), NSP2 (*NTPase*), NSP3 (*Translation Enhancer*), NSP4 (Enterotoxin) e NSP5 (*pHosphoprotein*) resultam em 4, 5, 6, 11, 14, 5, 7, 11 e 6 diferentes genótipos, respectivamente. Os autores afirmam que este novo sistema de classificação permitirá uma pesquisa mais sistemática das possíveis similaridades genéticas entre os segmentos genômicos dos RV-A. Além disso, este sistema revela uma possível origem animal das amostras humanas de RV-A e vice-versa, demonstrando a necessidade de se realizarem análises simultâneas das amostras animais e humanas de RV-A.

Quadro 1 – Quadro de valores de *cut-off* de percentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus A considerando-se os 11 segmentos genômicos (adaptada de Matthijnssens e colaboradores, 2008b).

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

1.4. Partícula do rotavírus A

Estruturalmente, as partículas dos RV são formadas por três camadas protéicas, distribuídas em: capsídeo externo (VP7/VP4), capsídeo intermediário (VP6) e capsídeo interno (VP1, VP2 e VP3), onde se encontra o RNAfd (Figura 3). Associado ao RNAfd no capsídeo interno, encontram-se três proteínas estruturais: VP1, VP2, e VP3, codificadas pelos segmentos 1, 2, e 3, respectivamente. Essas proteínas representam, em conjunto, aproximadamente 18% das proteínas virais. O capsídeo intermediário é formado pela proteína VP6, codificada pelo segmento 6, sendo a proteína mais abundante da partícula viral (51%). No capsídeo externo encontram-se a proteína VP4, codificada pelo gene 4 e responsável pelos sorotipos/genótipos P; e VP7, codificada pelos genes 7 (*rhesus*), 8 (rotavírus bovino UK) ou 9 (SA-11), determinante dos sorotipos/genótipos G. Outras seis proteínas não-estruturais são codificadas pelos segmentos genômicos restantes, sendo denominadas: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6 (Kapikian *et al.*, 2001).

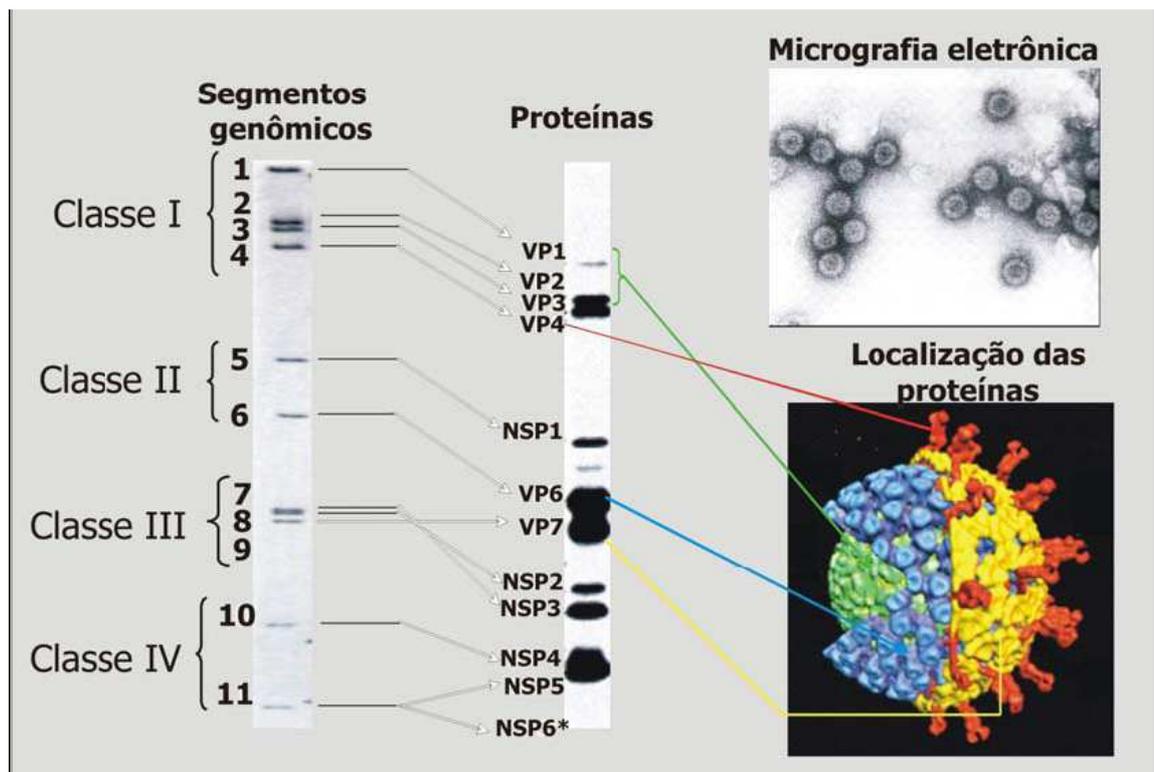


Figura 3 – Representações esquemática e tridimensional da partícula viral de rotavírus A símio (SA11) (adaptada de Prasad e colaboradores, 1996). Micrografia eletrônica gentilmente cedida por Y.B. Gabbay.

1.4.1. Proteínas Estruturais

VP1. Dentre as proteínas que constituem o capsídeo interno do vírus, a VP1 é a proteína menos abundante. Junto com as proteínas VP2 e VP3 participa do complexo de replicação e de transcrição do vírion (Arnoldi *et al.*, 2007). Vásquez-del carpio e colaboradores (2006) analisando diversas sequências do segmento genômico 1 (codifica para a proteína VP1) de RV descreveram a presença de motivos canônicos correspondentes a motivos previamente identificados em RNA-polimerase RNA dependente de outros vírus de RNAfd, levando-se a crer que a proteína VP1 atue como uma RNA-polimerase dependente de RNA dos RV. A VP1 entre as proteínas do *core* é a única que possui uma sequência específica de reconhecimento ao RNA viral, através de regiões conservadas de quatro bases, UGUG, na porção nucleotídica 3' (Lu *et al.*, 2008).

VP2. É a proteína mais abundante do *core* viral. Faz parte do complexo de replicação viral e liga-se tanto à VP1 quanto a VP3 através de um domínio na sua porção N-terminal. A interação protéica VP2/VP1/VP3 é crítica na replicação e transcrição do genoma viral (Heiman *et al.*, 2008). Além disso, a superfície externa da proteína VP2 interage com a proteína VP6 nos estágios iniciais da morfogênese viral. A interação VP2/VP6 é importante para a formação das chamadas partículas incompletas, que possuem duplo capsídeo protéico (DLPs), também influenciando na atividade transcricional da partícula completa que será formada (Estes, 2001).

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

VP4. A proteína VP4 é não glicosilada e forma espículas a partir do capsídeo externo de partículas virais maduras. Participa efetivamente de eventos funcionais importantes como adesão à célula, internalização, hemaglutinação e neutralização (Dunn *et al.*, 1995; Ludert *et al.*, 1996). A VP4 é susceptível à proteólise, o que resulta no aumento da infectividade dos RV e facilita a entrada do vírion na célula. Durante a proteólise, a VP4 é clivada em VP5* e VP8*, que permanecem associadas ao vírion. O peptídeo VP5* está associado com a

atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4 e, possivelmente, possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírion à célula, ao passo que VP8*, por outro lado, contém a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas (Jayaram *et al.*, 2004) (Figura 4).

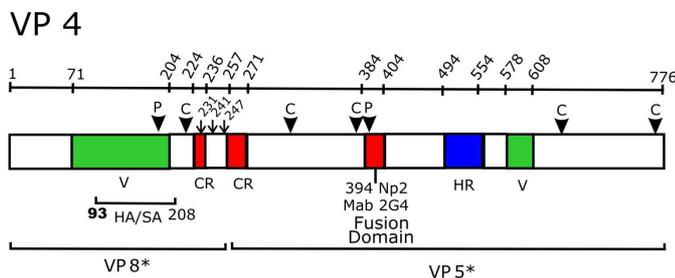


Figura 4 – Esquema representativo da organização do gene de VP4 de rotavírus A (adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).

VP6. É a proteína viral mais abundante dos RV (aproximadamente 51% da partícula viral) e possui na superfície determinantes antigenômicos que permitem a classificação dos RV em diferentes grupos (A-G) e subgrupos de RV-A (I, II, I+II, não-I e não-II). A VP6 está presente no capsídeo intermediário e é formada por dois domínios, um interagindo com as proteínas VP7 e VP4 e outro com a VP2. Desta maneira tem participação em duas funções importantes do vírus, a adsorção e penetração na célula e transcrição do RNAfd (Heiman *et al.*, 2008). O domínio de trimerização da VP6 com VP7/VP4 e VP2 situa-se entre os aa 246 e 315 (Figura 5). Os resíduos 296 a 259 e 305 da VP6, são importantes no reconhecimento por anticorpos monoclonais (MAbs) 255 e 260 de subgrupo (Kapikian *et al.*, 2001).

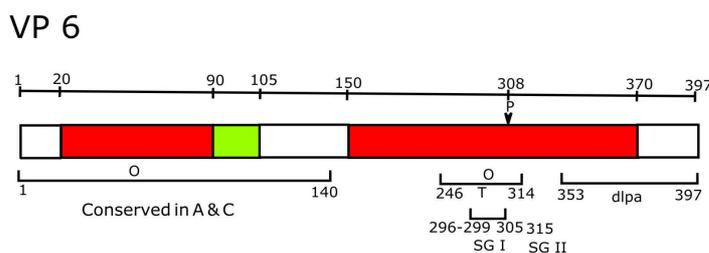


Figura 5 – Esquema representativo da organização do gene de VP6 de rotavírus A (adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).

VP7. É a glicoproteína mais imunogênica do capsídeo externo, induzindo a síntese de anticorpos neutralizantes. A proteína VP7 pode modular a atividade da VP4 no processo de adsorção e entrada do RV na célula, interagindo com moléculas da superfície celular, uma vez a proteína VP4 tenha iniciado o processo de adsorção (Jayaram *et al.*, 2004). Diferentes estudos têm demonstrado que concentrações apropriadas de íons cálcio (Ca^{++}) são necessárias

para se manter a estabilidade da partícula, aparentemente pela estabilidade de VP7. O tratamento de partículas virais utilizando agentes quelantes de Ca^{++} (EDTA) resulta na remoção do capsídeo externo através da dissociação dos trímeros de VP7 e, conseqüentemente, a perda de infectividade viral. Baixas concentrações de Ca^{++} , semelhantes às do citoplasma, geram DLPs, que são ativas para transcrição e necessárias no ciclo de replicação dos RV (Estes, 2001).

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

VP 7

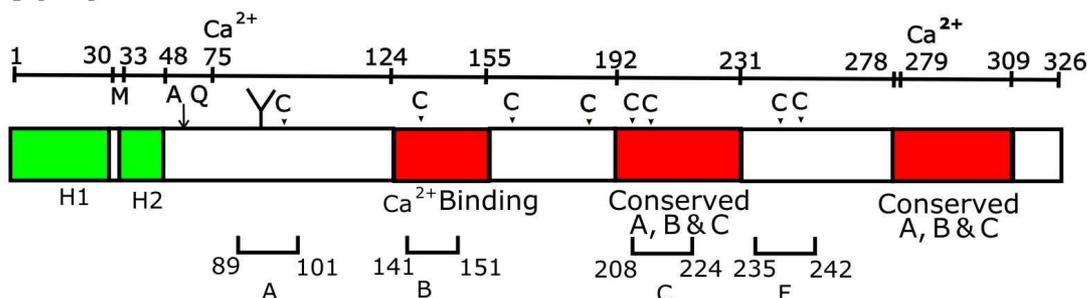


Figura 6 – Esquema representativo da organização do gene de VP7 de Rotavírus (Adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).

1.4.2. Proteínas Não-Estruturais

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

NSP2. Altamente conservada, esta proteína é expressada em altos níveis em células infectadas e está localizada no viroplasma, que é uma região eletrodensa do citoplasma, adjacente ao RE, onde ocorrem os processos de transcrição, tradução, de replicação e de

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

Um resíduo de aa nas posições 114 até 135 da NSP4 foi descrito como sendo capaz de induzir a diarreia em camundongos recém-natos e que as mudanças na atividade toxigênica e virulência dos RV-A têm sido associadas às alterações dos aa neste resíduo (Figura 8) (Huang *et al.*, 2004).

Os anticorpos induzidos pela NSP4 reduzem a capacidade desta proteína em acarretar diarreia. Em um estudo com camundongos vacinados com NSP4 foi observada a indução de proteção homotípica e heterotípica contra diarreia por RV-A (Estes *et al.*, 2001). Em humanos, a NSP4 foi descrita como sendo capaz de induzir repostas imune celular e humoral (Johansen *et al.*, 1999).

NSP4

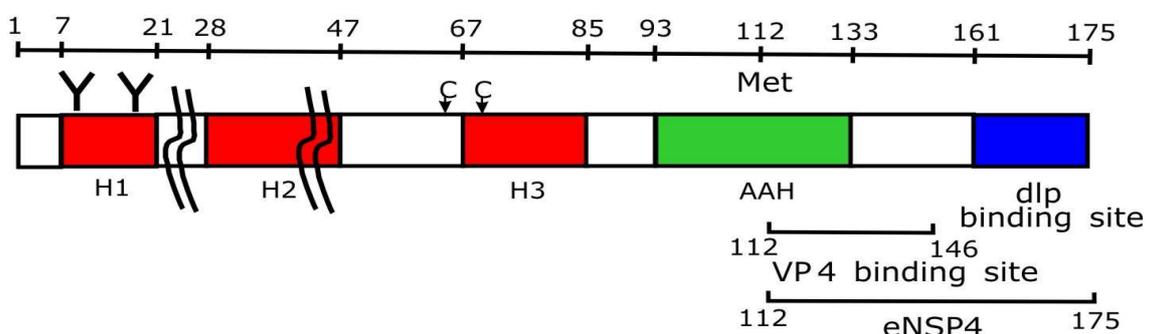


Figura 8 – Esquema representativo da organização do gene para a proteína NSP4 de rotavírus A (adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).

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

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

1.5. Replicação Viral

A replicação dos RV ocorre no citoplasma das células absorptivas diferenciadas, localizadas no terço apical das vilosidades do intestino delgado. As partículas infecciosas são liberadas no lúmen intestinal e o processo replicativo tem então continuidade ao longo do intestino delgado. O processo é normalmente limitado à mucosa intestinal, ainda que células infectadas possam ser observadas na lâmina própria e linfonodos regionais (Christensen, 1989). A replicação *in vitro* também é restrita, sendo mais bem observada em linhagens de células epiteliais de origem renal ou intestinal. Este tropismo sugere a presença de receptores específicos para a adsorção e a penetração (Estes & Cohen 1989).

A infectividade dos RV-A *in vitro* é aparentemente aumentada e dependente da presença de tripsina, uma vez que o tratamento proteolítico com tripsina resulta na clivagem de VP4, gerando os polipeptídeos VP5* e VP8*. Esta clivagem não interfere no processo de adsorção, mas está associada à internalização das partículas de RV-A nas células. Presume-se que esta condição ocorra durante a infecção no lúmen intestinal do hospedeiro, uma vez que os rotavírus estão expostos às secreções pancreáticas (Zarate *et al.*, 2000).

A penetração dos RV na célula hospedeira tem sido explicada por dois principais mecanismos: i) diretamente através da membrana plasmática, envolvendo as partículas nas quais VP4 é clivada e ii) através de um receptor para endocitose, para partículas que não sofreram a clivagem da VP4 (Conner & Ramig 1997). Após a entrada e liberação do RNAfd no citoplasma, iniciam-se as etapas de transcrição, tradução, replicação e maturação viral. A partir da fita molde de RNA, os RNAm são transcritos e as proteínas estruturais e não-

estruturais traduzidas. O sítio único de maturação para os RV nas células é o lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER). Consequentemente, o amadurecimento da partícula viral envolve o transporte de componentes através da membrana do RER. Este processo resulta no brotamento de partículas imaturas da membrana do RER, fazendo com que as mesmas adquiram um envelope transitório (Bellamy & Both, 1990). A glicoproteína NSP4, além de mediar a aquisição deste envelope transitório, parece exercer uma atividade desestabilizadora de membrana, levando à perda do envelope no processo de maturação das partículas imaturas em partículas não-envelopadas de duplo capsídeo (Tian et al., 1996). O Ca^{++} desempenha importante função neste processo de maturação na célula hospedeira, como demonstrado por Poruchynsky e colaboradores (1991), que observaram que a depleção deste íon bloqueava a maturação do RV-A, alterando a oligomerização das proteínas virais (VP4, VP7, NSP4) e, consequentemente, acumulando partículas envelopadas no lúmen do RER (Figura 9).

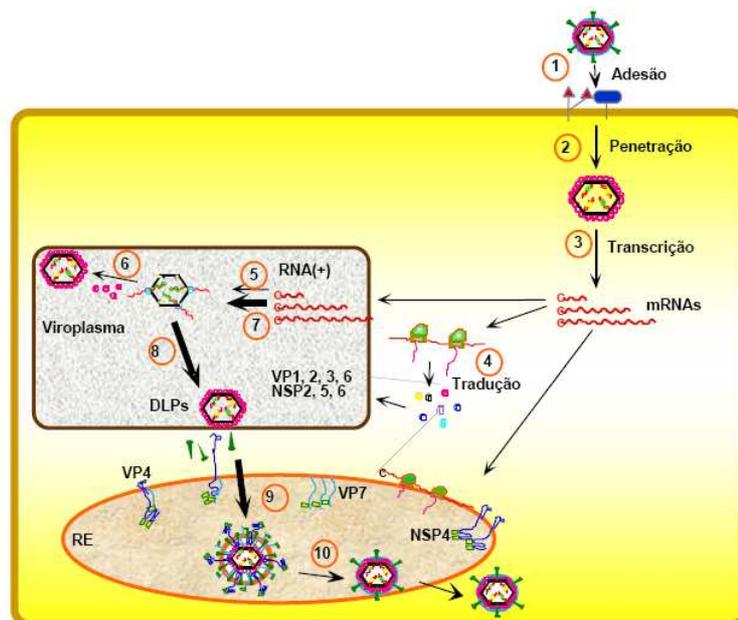


Figura 9 – Modelo esquemático do ciclo de replicação dos rotavírus A.

As etapas de replicação estão indicadas nos números abaixo (adaptada de Arias e colaboradores, 2004).

- 1 – Adsorção do vírus à superfície celular
- 2 – Penetração e liberação da partícula viral produzindo DLPs (Partículas de duplo capsídeo)
- 3 – Transcrição primária do dsRNA genômico
- 4 – Síntese das proteínas virais
- 5 – Síntese primária de fitas negativas de RNA
- 6 – Montagem da partícula viral
- 7 – Síntese secundária de fitas negativas de RNA
- 8 – Montagem das DLPs
- 9 – Brotamento da DLP na membrana do Retículo Endoplasmático
- 10 – Perda do envoltório transitório e geração de vírions maduros com triplo capsídeo

1.6. Mecanismos de evolução dos rotavírus

Um dos aspectos mais observados nos estudos de diversidade genética entre os RV-A tem sido o polimorfismo eletroforético exibido pelos segmentos de RNAfd. A diversidade está relacionada a diferentes mecanismos genéticos como as mutações pontuais, rearranjos genéticos, reestruturação de segmentos genômicos (*reassortment*) e recombinação genética (Estes & Kapikian 2007).

1.6.1. Mutações Pontuais

O acúmulo de mutações pontuais tem sido observado em isolados obtidos em surtos, utilizando as técnicas de sequenciamento de genes de amostras de RV-A. Algumas dessas mutações podem ser sinônimas ou silenciosas, não provocando nenhuma mudança na sequência de aa, e conseqüentemente na proteína, ou podem ser não-sinônimas, podendo desta forma provocar uma mudança genética que forneça uma vantagem evolutiva para o vírus ou provocando uma perda de função ou estrutura do mesmo. O fato da RNA polimerase RNA dependente não possuir um mecanismo de correção de erros (remoção de bases mal pareadas) facilita a ocorrência das mutações, que ao se acumularem no genoma podendo definir novas linhagens e sublinhagens dentro de um mesmo genótipo (Figura 10).

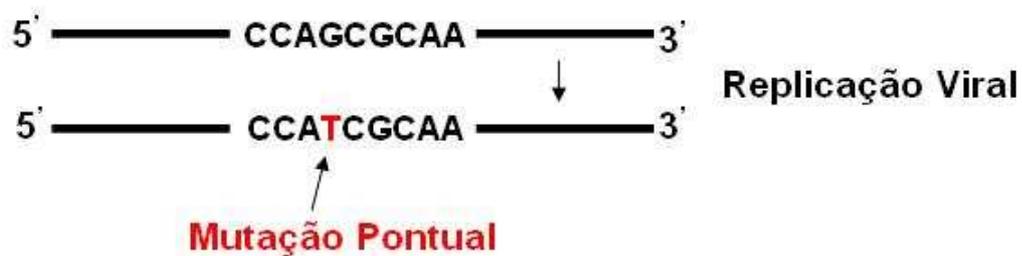


Figura 10 - Esquema representativo da ocorrência das mutações pontuais.

1.6.2. Rearranjos Genéticos

Os rearranjos genéticos são representados por alterações na sequência do segmento genômico, algumas vezes na forma de deleção ou mais frequentemente como duplicação. A visualização deste tipo de mecanismo pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) caracteriza-se pela ausência de alguns segmentos da sua posição usual e/ou o aparecimento de bandas adicionais com mobilidades diferentes (Taniguchi & Urasawa, 1995). Pedley e colaboradores (1984) investigaram RV-A isolados de crianças imunodeficientes e observaram variações na mobilidade dos segmentos do RNAfd pela EGPA. Posteriormente, foram descritos eventos de rearranjo genético entre amostras de RV-A em animais e crianças saudáveis (Desselberger, 1996).

Os rearranjos resultam de erros de transcrição de um único segmento e possuem nada mais do que a sequência de um gene. Na maioria das vezes os genomas com rearranjos surgem como produtos de uma duplicação parcial da ORF do genoma, com variadas consequências relativas à sua expressão. No momento da transcrição, provavelmente por uma falha da RNA polimerase RNA dependente, a mesma retorne à sua fita molde, reiniciando a transcrição a partir de diferentes estágios (Figura 11). As regiões codificantes são mantidas em todos os rearranjos observados, apesar de alguns destes produzirem proteínas de tamanho anormal. Os vírus com segmentos de genoma rearranjados são geneticamente estáveis e reestruturam seus segmentos em infecções mistas. Este tipo de rearranjo pode ocorrer na maioria dos segmentos (Desselberger, 1996).

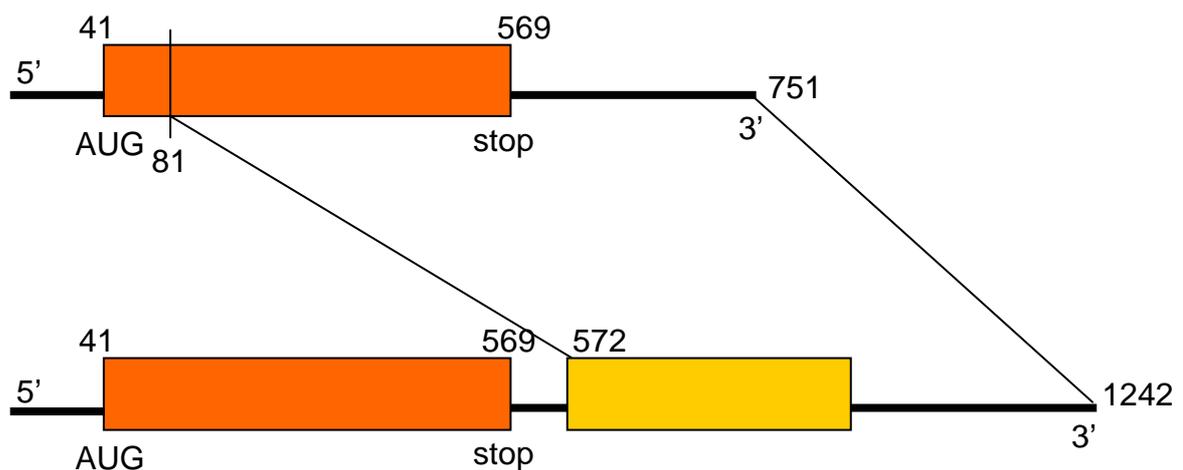


Figura 11 – Esquema representativo da ocorrência de rearranjo de segmentos de genoma de rotavírus contendo duplicação parcial da ORF. (adaptada de Estes, 2001).

1.6.3. Reestruturação de segmentos genômicos (*Reassortments*)

Nas reestruturações de segmentos genômicos (*reassortments*) ocorre uma troca de material genético entre dois vírus similares durante infecções mistas (Figura 12). No caso dos RV-A em humanos, esta troca ocorre entre dois ou mais segmentos genômicos de duas amostras de RV-A pertencentes a genótipos diferentes, podendo ser de origens diferentes e gerando uma amostra com segmentos de RV-A, por exemplo, de origem animal e humana. Os *reassortments* foram descritos por Matsuno e colaboradores (1980), através da análise de uma co-infecção em cultura celular de RV-A bovino (Lincoln) e RV-A símio (SA-11). Através de comparações eletroforéticas dos segmentos de RNAfd 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 segmentos 7, 8, e 9.

As reestruturações *in natura* que resultam em variantes não usuais, têm sido descritas (Mascarenhas *et al.*, 1989; Krishnam *et al.*, 1994), bem como em isolados com especificidade animal, sendo encontrados em outras espécies (Nakagomi & Nakagomi, 1991; Beards *et al.*, 1992; Taniguchi *et al.*, 1994; Palombo & Bishop, 1995; Alfieri *et al.*, 1996; Timenetsky *et al.*, 1997). Porém, esses isolados parecem ser mais frequentes nos países em desenvolvimento, provavelmente facilitados pelas precárias condições de saneamento básico e higiene, defesas imunológicas limitadas, parasitas, desnutrição, além do estreito relacionamento entre o homem, animais domésticos e outros animais, proporcionando, assim, infecções mistas e, conseqüentemente, maior possibilidade de ocorrer as reestruturações genéticas (Cook *et al.*, 2004)

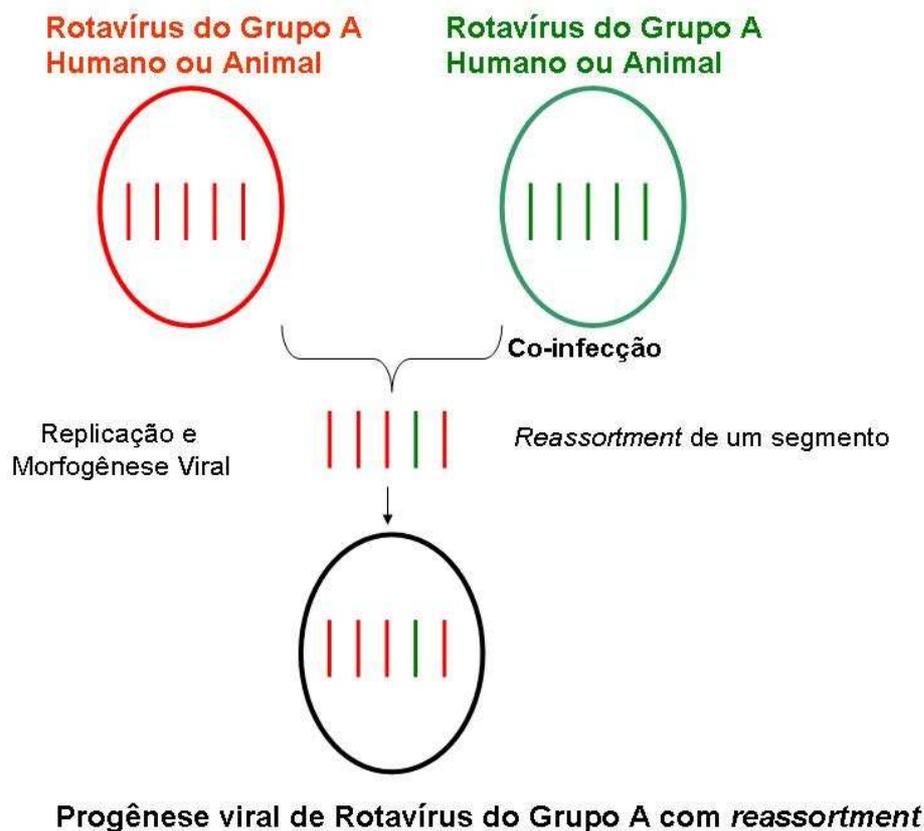


Figura 12- Esquema representativo dos eventos de *reassortment*.

1.6.4. Recombinação Genética

A recombinação genética tem sido descrita como um importante mecanismo de geração de variabilidade genética e evolução dos vírus, ainda que sejam poucos os relatos registrando o acontecimento de eventos de recombinação genética em RV-A (Figura 13) (Worobey *et al.*, 1999). Além disto, vários estudos descrevem a ocorrência de infecções mistas com amostras de diferentes genótipos de RV-A ou com diferentes linhagens de um mesmo genótipo, ocorrendo em um mesmo indivíduo, aumentando, desta forma, as probabilidades de ocorrência de eventos de *reassortment* e/ou recombinação genética (Figura 13) (Gouvea *et al.*, 1995; Jain *et al.*, 2001). Porém, o evento de recombinação genética em RV-A ainda é pouco conhecido, e mais estudos deverão ser realizados para que melhor se entenda a dinâmica da recombinação genética e sua atuação sobre o hospedeiro (Phan *et al.*, 2007).

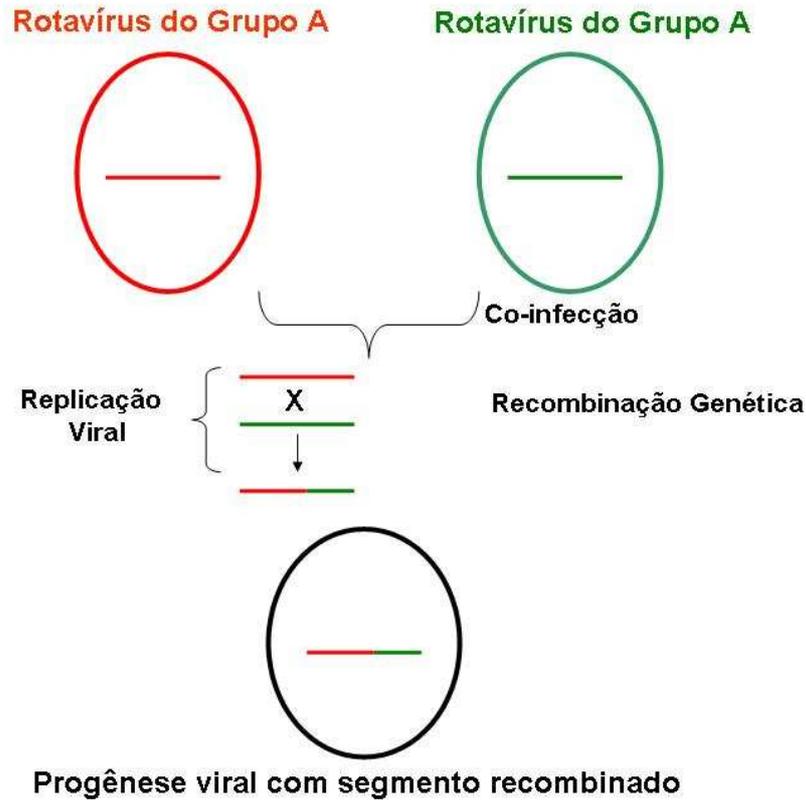


Figura 13- Esquema representativo do evento de recombinação genética.

1.6.5. Transmissão Interespécies

A ocorrência de transmissão de RV-A animal para humanos é mais descrita nos países em desenvolvimento, onde pode ocorrer um contato mais estreito entre humanos e animais, principalmente, bovinos, suínos e aves, além da carência de saneamento básico e da precariedade sistema de saúde pública (Jain *et al.*, 2001).

Vários segmentos genômicos dos RV-A parecem ser potenciais determinantes de restrição ao hospedeiro e virulência dos RV-A. Contudo, o entendimento da base molecular na restrição das espécies e a virulência dos RV-A, está começando a ser entendida, através dos dados obtidos através do sequenciamento completo do genoma de amostras de RV-A (Matthijssens *et al.*, 2008a; Tsugawa *et al.* 2008; Heiman *et al.*, 2008).

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

1.7. Epidemiologia

O impacto global causado por infecções pelos RV-A representa 527.000 óbitos entre crianças com até cinco anos de idade, sendo 85% destes casos ocorrendo em países em desenvolvimento (CDC, 2008). Nos países desenvolvidos, apesar de se observar uma elevada morbidade, o número de óbitos é limitado (Parashar *et al.*, 2006).

Considerando-se a ampla distribuição mundial dos RV-A, o padrão de sazonalidade observado varia de acordo com a região. Nos países de clima temperado, os grandes surtos por RV-A são observados nos meses mais frios e secos do ano, enquanto nas regiões com clima tropical, as infecções ocorrem durante todo o ano (Kapikian *et al.*, 2001; D'Souza *et al.*, 2007). Os estudos epidemiológicos realizados mostram que diversos genótipos P e G de RV-A podem co-circular dentro de uma mesma região e que o genótipo prevalente em uma determinada região pode mudar anualmente. Outra observação é que os genótipos prevalentes em diferentes regiões de um país podem ser diferentes dentro do mesmo período epidêmico (Pérez-Vargas *et al.*, 2006).

Existem combinações genóticas de RV-A que se repetem mundialmente e dentre as combinações mais comuns podem ser destacados cinco genótipos G (G1, G2, G3, G4 e G9) e dois genótipos P (P[4] e P[8]). Santos & Hoshino (2005) realizaram um estudo de revisão de artigos descrevendo genótipos de RV-A circulantes no mundo e demonstraram que mais de 90% das infecções por RV-A na América do Norte, Europa e Austrália eram associadas a combinações dos genótipos P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4. Na América do Sul e Ásia, elas representaram 68% e na África 50%. A combinação P[8]G1 ocorreu em mais de 70% das infecções na América do Norte, Europa e Austrália, e em 34% e 23% das infecções na América do Sul e na África, respectivamente (Figura 14).

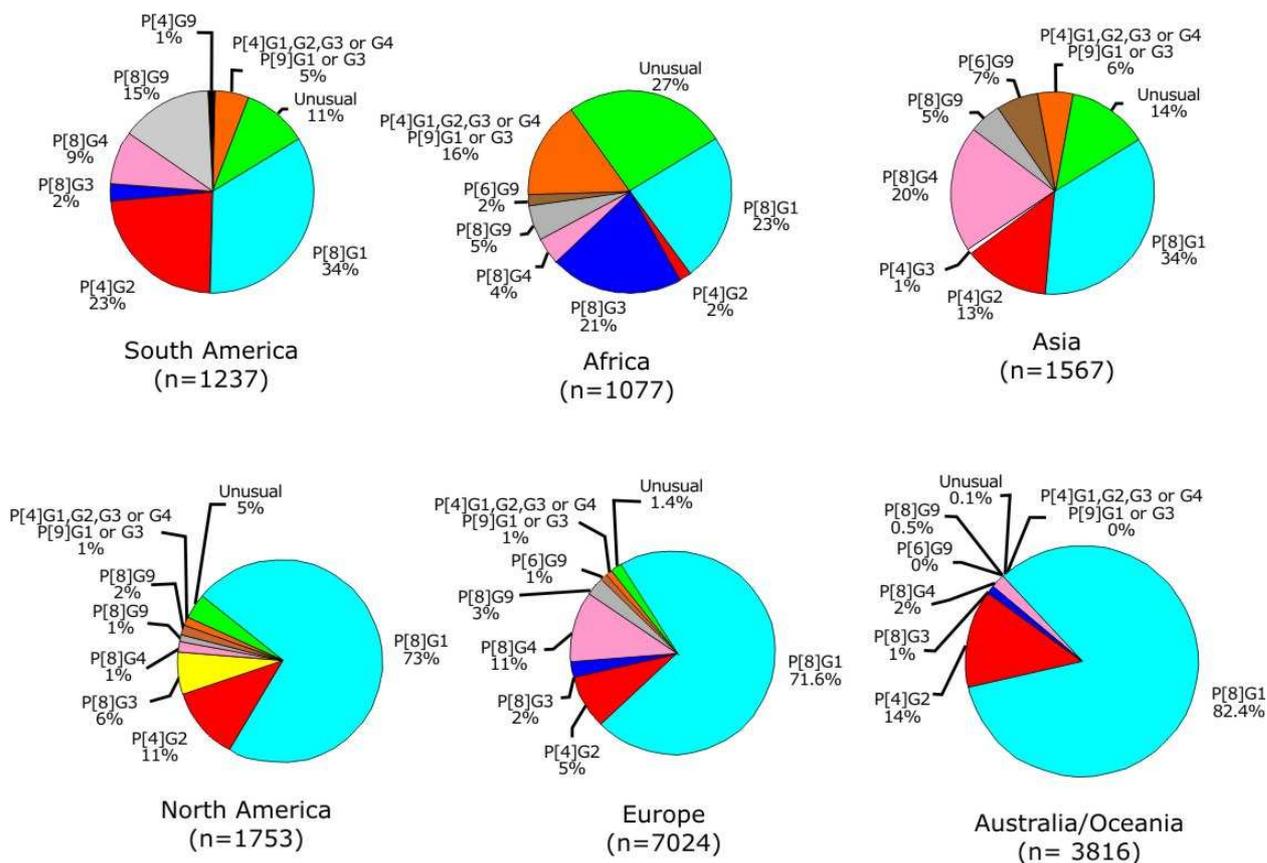


Figura 14 – Gráfico ilustrando a distribuição continental/subcontinental de rotavírus A humano com as combinações binárias G e P. (adaptada de Santos & Hoshino, 2005)

1.7.1. Genótipos de rotavírus A no Brasil

Em uma extensa revisão dos artigos que descrevem a genotipagem de RV-A circulantes no Brasil em dois períodos pré-vacinais compreendidos entre 1982-1995 e 1996-2005, Leite e colaboradores (2008) demonstraram que as combinações mais frequentemente encontradas foram: G1P[8]/G1P[?] (43%), G9P[8]/ G9P[?] (20%), G2P[4]/ G2P[?] (9%), G3P[8]/ G3P[?] (6%), G4P[8]/ G4P[?] (4%) e G5P[8]/ G5P[?] (4%) (Figuras 15 e 16). O genótipo G5 foi incluído nesta lista por ter sido frequentemente detectado durante as décadas de 80 e início de 90. Ele tem origem animal, sendo detectado principalmente em suínos (Kapikian *et al.*, 2001). No Brasil, foi descrito pela primeira vez a ocorrência do genótipo G5 por Gouvea e colaboradores (1994) entre crianças com diarreia e, posteriormente, detectados em casos de diarreia infantil em diferentes regiões (Leite *et al.*, 1996; Timenetsky *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1999; Araújo *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2003; Carmona *et al.*, 2004). No entanto, este genótipo parou de circular em caráter endêmico a partir de 1996, coincidindo com a

emergência do genótipo G9, levando-se a crer que houve uma substituição do genótipo G5 pelo genótipo G9 (Figura 17).

O genótipo G5 foi descrito em humanos mais recentemente em vários países: Camarões (Esona *et al.*, 2009), Bangladesh (Hashizume *et al.*, 2008), China (Duan *et al.*, 2007), Brasil (Carvalho-Costa *et al.*, 2007) e Vietnã (Ahmed *et al.*, 2007).

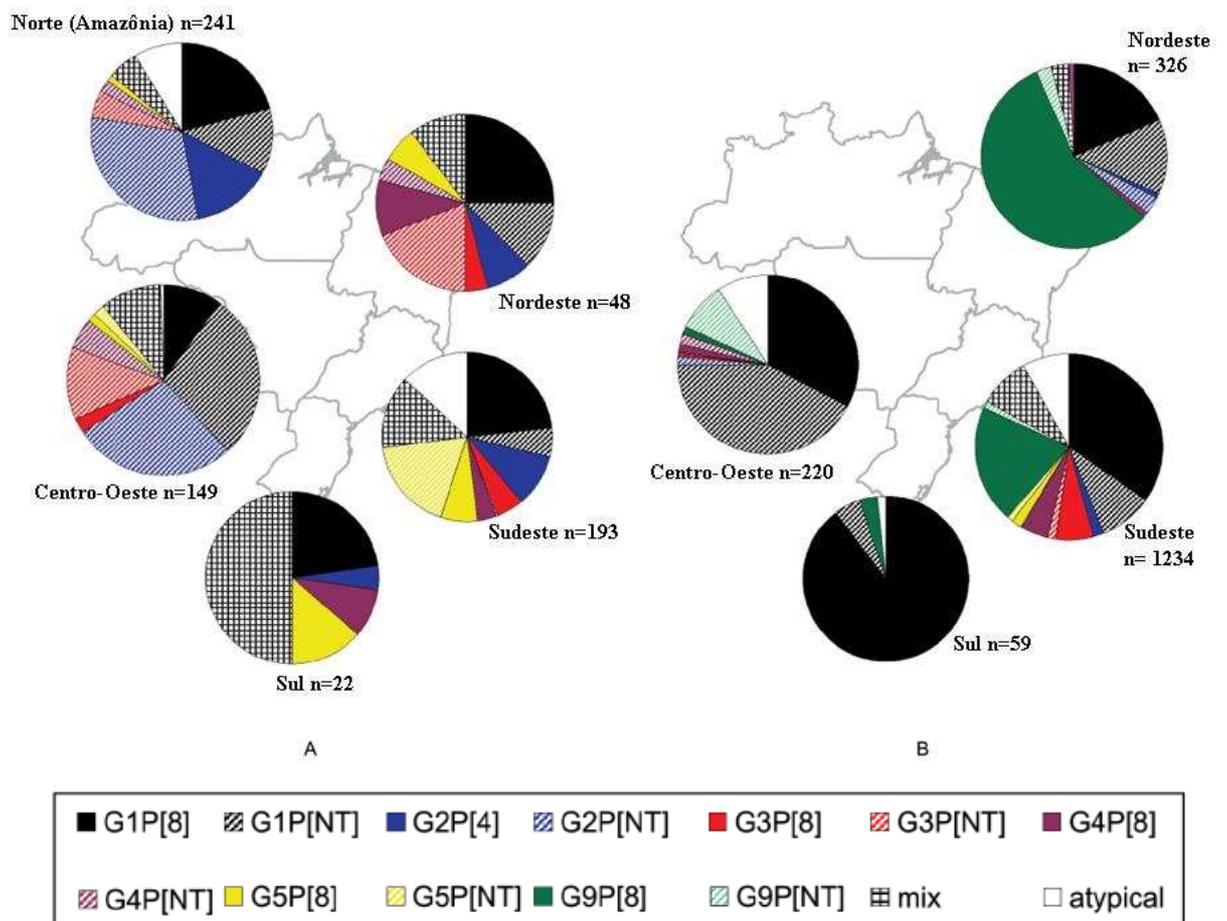


Figura 15- Gráfico ilustrando os genótipos de rotavírus A no Brasil por região. A: 1982-1995 (653 amostras positivas); B: 1996-2005 (1.839 amostras positivas). adaptado de Leite e colaboradores (2008).

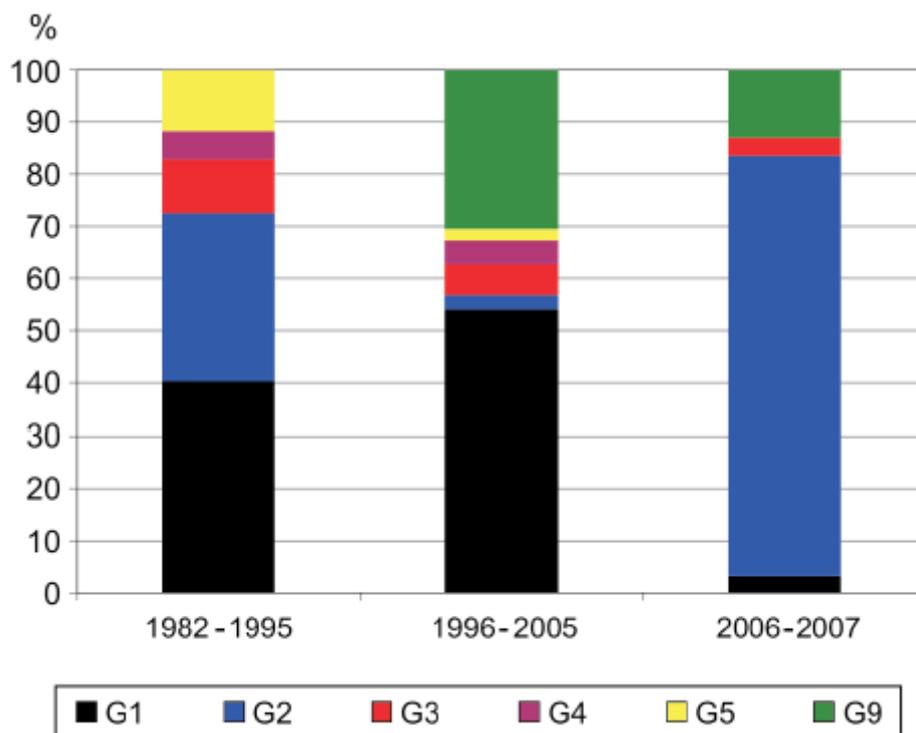


Figura 16 – Gráfico representando a taxa de detecção dos genótipos G distintos de rotavírus A no Brasil em diferentes períodos (adaptado de Leite e colaboradores, 2008)

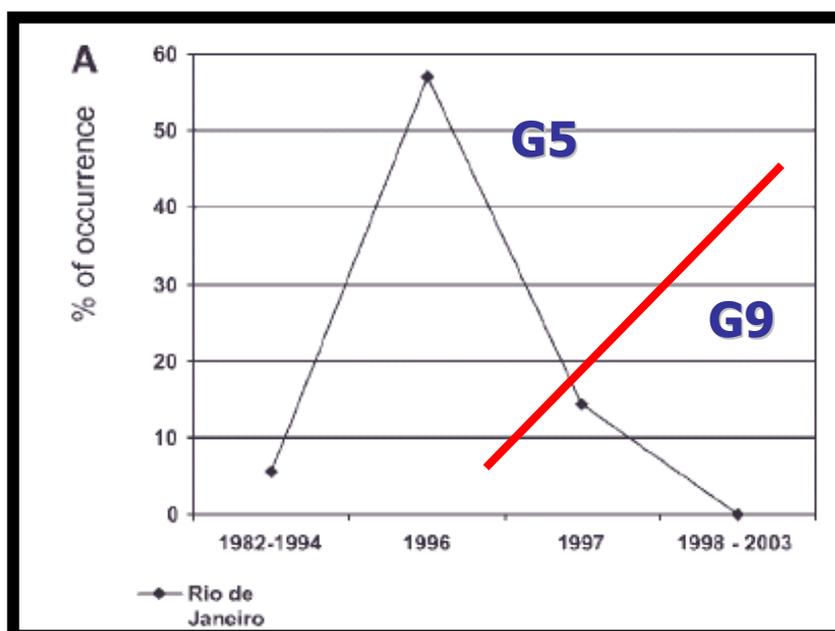


Figura 17 – Gráfico evidenciando a substituição do genótipo G5 pelo genótipo G9 (adaptado de Santos & Hoshino, 2005).

1.8. Vacinas contra rotavírus A

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

Vários grupos de pesquisa têm trabalhado neste projeto, levando-se em conta o cenário epidemiológico apresentado pelas diarreias agudas causadas pelo RV-A, ou seja, alta prevalência em países desenvolvidos e alta mortalidade, em países em desenvolvimento. O fato dos RV-A acometerem crianças de todas as classes sociais sugere que, ao contrário de outros enteropatógenos de transmissão fecal-oral, não seria possível controlar a incidência de RV-A através de melhorias na infra-estrutura sanitária das populações, o que aponta para a possibilidade de que uma vacina possa ser a única forma de prevenção possível (Glass *et al.* 2006). Neste contexto diferentes abordagens têm sido utilizadas no desenvolvimento de vacinas contra o RV-A.

1.8.1. Abordagem Jenneriana

Esta estratégia de desenvolvimento de vacinas teve como base o fato das amostras animais de RV-A serem naturalmente atenuadas para seres humanos e que, administradas por via oral, poderiam mimetizar a infecção natural pelo patógeno e desencadear uma resposta imune protetora. Desta forma, Vesikari e colaboradores (1984), administraram a amostra bovina RIT 4237 a 86 bebês finlandeses com idades entre oito e onze meses, constituindo um grupo controle de 92 crianças não vacinadas e observaram eficácia de 50% para episódios de diarreia aguda de qualquer gravidade e de 88% para quadros diarreicos graves. O mesmo grupo de investigadores conduziu mais três investigações na Finlândia, administrando a RIT 4237 a crianças de uma semana até um ano de idade, em diferentes períodos do ano, obtendo eficácias de até 100% para episódios de diarreia com desidratação grave (Vesikari *et al.*, 1991).

Infelizmente, estudos subsequentes conduzidos em países em desenvolvimento não levaram a uma conclusão otimista. Na África- Gâmbia, a eficácia da vacina foi de 33%

(Hanlon *et al.*, 1987) e no Peru 40% (Lanata *et al.*, 1989). Em índios norte-americanos – Estados Unidos da América (EUA) e novamente na África, em Ruanda não foi demonstrado qualquer grau de proteção (Santosham *et al.*, 1991).

Partindo da hipótese de que as deficiências da eficácia da RIT 4237 se deram devido a excesso de atenuação por grande número de passagens, desenvolveu-se um novo imunizante (a amostra bovina WC3) como alternativa menos atenuada. A WC3 foi alvo de quatro investigações. Em duas destas, realizados nos EUA e na China- Shangai, a eficácia contra formas graves da doença atingiu 100% (Clark *et al.*, 1996). Porém, a exemplo de sua antecessora, em dois outros estudos não foi observado qualquer grau de eficácia para a amostra WC3 (Bernstein *et al.*, 1990; Georges-Courbot *et al.*, 1991).

O passo seguinte nas pesquisas com vacinas a partir de amostras de origem não-humana envolveu o desenvolvimento da RRV (*Rhesus Rotavirus Vaccine*). A base desta vacina foi a amostra símia MMU18006, originária de macaco *Rhesus*. A eficácia da vacina RRV variou de zero a 66% para gastroenterite aguda por RV-A de qualquer gravidade e de zero a 90% para os casos com desidratação grave (Perez-Schaell *et al.*, 1990; Rennels *et al.*, 1990; Santosham *et al.*, 1991; Vesikari *et al.*, 1990).

1.8.2. Vacinas reestruturadas polivalentes (abordagem Jenneriana modificada)

1.8.2.1. *Rhesus Rotavirus Vaccine- Tetravalent* (RRV-TV)(Rotashield®)

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

Entretanto, em julho de 1999, após a administração de quase 1,5 milhão de doses, foi suspensa a aplicação da Rotashield® por estar associada a 15 casos de intussuscepção (obstrução intestinal) envolvendo crianças que haviam tomado a vacina (Hoshino *et al.*, 2003). Após este fato, motivou-se o desenvolvimento de estudos epidemiológicos onde foram caracterizados os riscos quanto ao desenvolvimento de intussuscepção, principalmente nas

duas semanas após a primeira e segunda doses. Os riscos estimados são da ordem de 1 evento obstrutivo intestinal para cada 4.500 crianças vacinadas (Murphy *et al.*, 2001); o risco assumia maiores proporções quando a vacina era administrada em idades superiores a 90 dias, quando comparadas a crianças imunizadas aos 2 meses (Fischer *et al.*, 2004). Além da intussuscepção, evidências indicam que a vacina foi indutora de outros eventos adversos importantes, como a diarreia sanguinolenta (Haber *et al.*, 2004).

1.8.2.2. Rotateq[®]

A amostra vacinal bovina WC3 também foi alvo de reestruturação seguindo-se os princípios utilizados para a criação da RRV-TV, dando origem a uma vacina pentavalente reestruturada bovino-humana. Esta vacina é constituída por RV bovino expressando na superfície VP7 correspondente aos sorotipos G1, G2, G3 e G4, além de VP4 correspondente ao sorotipo P[8]. A vacina deve ser administrada em três doses, aos dois, quatro e seis meses de idade.

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

1.8.2.3. Vacina contra rotavírus bovino-humana multivalente (Vacina UK)

Esta vacina foi desenvolvida também pelo NIH e consiste em uma amostra de RV-A bovino (UK) reestruturada no sentido de possuir o gene codificante de VP7 de RV-A humanos com especificidades genóticas G1, G2, G3 e G4 e 10 genes da amostra de rotavírus A bovino UK (P[7]G6). Isto leva à possibilidade de se desenvolver vacinas para regiões específicas, com alta prevalência de genótipos ditos emergentes. Em 2004 os NIH transferiram a patente de produção da vacina para Índia, Brasil e China (Dennehy *et al.*, 2008). No Brasil, a licença para produção foi dada ao Instituto Butantan, em São Paulo (Ferguson *et al.*, 2004).

1.8.3. Vacinas com rotavírus A humano

1.8.3.1. RIX 4414 (Rotarix®)

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

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

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

2. JUSTIFICATIVA

A possibilidade de transmissão de RV-A animal para humanos é maior e mais frequente nos países em desenvolvimento, onde pode ocorrer contato mais estreito entre humanos e animais, principalmente suínos, bovinos e aves e, devido à ocorrência de condições inadequadas de saúde e higiene (Jain *et al.*, 2001). No Brasil, vários registros têm demonstrado amostras de origem suína, especialmente os sorotipos G5 e G9, causando diarreia em crianças, sugerindo uma constante troca de material genético entre amostras de origem humana e animal (Leite *et al.*, 1996; Timenetsky *et al.*, 1997; Araújo *et al.*, 2002; Mascarenhas *et al.*, 2002; 2007; Santos *et al.*, 2005).

Nas décadas de 80 e início de 90 os rotavírus A (RV-A) de genótipo G5, comum em suínos, equinos e bovinos eram detectados com frequência em amostras fecais de crianças brasileiras. Após 1996, deixou de circular em caráter endêmico, tornando-se apenas esporadicamente detectado, enquanto o genótipo G9 começou a ser detectado com frequência. Esta situação leva a crer que houve a substituição do genótipo G5 pelo G9. Recentemente o genótipo G5 foi detectado em fezes de crianças com diarreia aguda na Argentina, Brasil, Camarões, Paraguai, China, e Vietnã, sugerindo que o genótipo G5, embora incomum em seres humanos, pode ser detectado infectando humanos em várias regiões do mundo.

O monitoramento contínuo de genótipos circulantes de RV-A em seres humanos e animais, assim como o sequenciamento das amostras com combinações usuais, e principalmente as combinações G e P atípicas, são essenciais para um melhor entendimento do potencial de rearranjo entre as espécies acometidas por RV-A (Nakagomi & Nakagomi, 2000; Volotão *et al.*, 2006).

Análises filogenéticas dos genes que codificam para a proteína estrutural (VP) e não-estruturais (NSPs), VP6 e NSP1, NSP3, NSP4 e NSP5, respectivamente, de amostras de RV-A tem demonstrado a existência de um consistente padrão evolutivo entre os diferentes segmentos de RV-A de origem humana e animal (Horie *et al.*, 1997; Kirkwood & Palombo, 1997; Matthijssens *et al.*, 2008a).

Vários segmentos genômicos de RV-A têm potencial determinante de restrição ao hospedeiro e virulência quando analisados recombinantes naturais ou gerados em laboratório (Lambden *et al.*, 1992; Cunliffe *et al.*, 1999; 2002). O estudo com amostras de RV-A heterólogos ocorrendo naturalmente e com amostras recombinantes de origem animal e humana constitui a única ferramenta para o entendimento de como as barreiras interespecies podem direcionar determinantes moleculares que controlem a especificidade e a patogenicidade para o hospedeiro. Contudo, o entendimento da base molecular na restrição das espécies e a virulência dos RV-A ainda não são bem entendidos, pois somente,

recentemente, começaram a ser publicados trabalhos descrevendo dados do sequenciamento completo do genoma de amostras de RV-A.

Sob esta perspectiva, o sequenciamento completo do genoma das amostras RV-A de origem humana e animal são fundamentais para a caracterização de genótipos atípicos e para que se possa determinar o papel de cada segmento genômico, associados ou não na evolução, destacando a virulência, adaptação de novos genótipos ou manutenção dos RV-A e dessa forma atuar na seleção de seus hospedeiros.

Matthijnssens e colaboradores (2008a) sequenciaram completamente o genoma de 53 amostras utilizadas como padrões de RV-A. Nesse contexto, destacando-se as amostras SA11, PO-13, KU, Gottfried, IAL28, OSU, YM, A253, KJ44 e KJ75. Os autores discutem sobre a evolução de amostras de RV-A humano em relação a amostras animais, baseados na análise de todos os segmentos genômicos dos RV-A, permitindo assim a identificação de genótipos distintos, que provavelmente tenham emergido pela troca de segmentos de RV-A humanos e animais. Baseados nos resultados obtidos propõem um novo sistema de classificação para as amostras de RV-A, baseados na análise de todos os segmentos genômicos dos RV-A, permitindo a identificação de genótipos distintos, que provavelmente evoluíram em momentos diferentes, além de transmissões interespecíes e eventos de *reassortments* (Matthijnssens *et al.*, 2008b).

Como discutido, os RV-A de origem animal podem atravessar a barreira interespecie e causar diarreia em seres humanos e vice-versa (Mascarenhas et al., 2007, Matthijnssens et al., 2008a). Desta maneira, o estudo dos genes que codificam para as proteínas que constituem o core viral, apresentando genótipos híbridos humanos-animais, como o genótipo G5, tem importância para se conhecer a procedência destes genes. Esta informação contribuirá no entendimento do mecanismo de evolução e adaptação dos RV-A, visto que a grande diversidade de genótipos de RV-A, principalmente nos países em desenvolvimento, podem representar um desafio para a eficácia da vacina Rotarix®.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- ❖ Analisar filogeneticamente os genes que codificam para as proteínas estruturais VP1, VP2, VP3, VP4 e VP7, amplificados por RT-PCR, obtidas durante os anos de 1986 a 2005, e relacionar com possíveis eventos de transmissão interespecies.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Amplificar pela técnica de PCR os genes de RV-A que codificam para as proteínas estruturais VP1, VP2, VP3, VP4 e VP7 das amostras de genótipo G5P[8] obtidas entre os anos de 1986 e 2005;
- ❖ Realizar o sequenciamento parcial dos genes que codificam para as proteínas estruturais VP1, VP2, VP3, VP4 e VP7 das amostras de RV-A genótipo G5P[8];
- ❖ Determinar os genótipos de VP1, VP2 e VP3 das amostras de RV-A do estudo, segundo o novo sistema de classificação dos RV-A;
- ❖ Determinar as linhagens das amostras do estudo referentes ao gene que codifica para VP4, de genótipo P[8], das amostras do presente estudo;
- ❖ Alinhar e construir dendogramas a partir das sequências nucleotídicas parciais obtidas neste estudo e de amostras protótipos disponíveis no *GenBank* para os genes que codificam para as proteínas estruturais VP1, VP2, VP3, VP4 e VP7;
- ❖ Analisar os dendogramas relacionando os dados obtidos com possíveis ocorrências de eventos de recombinação, *reassortment*, e mutação não-sinônima, inclusive a procedência das mesmas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Amostras Clínicas

Foram analisadas 28 amostras fecais (Quadro 2) de crianças hospitalizadas com quadro de gastroenterite aguda, as quais foram previamente analisadas e sendo positivas para RV pelas técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e pelo ensaio imunoenzimático para detecção de antígenos de rotavírus e adenovírus (EIARA) (Bio-Manguinhos/ Fiocruz), e apresentando genótipo G5P[8], através das técnicas de RT (síntese de cDNA) e amplificação em cadeia pela polimerase (PCR). Estas compreendem todas as amostras de RV-A de genótipo G5P[8] do Banco de Dados do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA), Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ. As mesmas foram obtidas em diferentes localidades (Distrito Federal, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo), no período compreendido entre 1986 e 2005. Não foram detectadas amostras de genótipo G5 de RV-A no LVCA de 2005 até a presente data. O Quadro 2 apresenta a procedência, o número e o período de recebimento das amostras analisadas.

As amostras fecais foram enviadas ao LVCA acompanhadas da ficha de informações clínicas e epidemiológicas, e foram mantidas sob refrigeração até o momento da análise. A Figura 18 apresenta o fluxograma dos procedimentos realizados para a detecção e caracterização molecular de RV-A investigados neste trabalho a partir da obtenção das amostras.

No item 5 (Resultados) as figuras e tabelas apresentam um número de identificação de cada amostra analisada com um código do estado brasileiro do qual foram enviadas ao LVCA, posicionado antes do número da amostra (mg, Minas Gerais, df, Distrito Federal, rj, Rio de Janeiro e sp, São Paulo), e um código do ano de isolamento depois do número da amostra (86, 1986; 87, 1987; 88, 1988; 90, 1990; 91, 1991; 92, 1992; 96, 1996; 98, 1998 e 05, 2005). Seguindo um código padrão utilizado LVCA. Por exemplo, a amostra 46855 enviada do estado de São Paulo, que foi isolada no ano 1992 esta identificada da seguinte maneira: “sp46855/92”.

Este estudo obteve aprovação pela Comissão de Ética Institucional (CEP/FIOCRUZ) sob o número 311/2006.

Quadro 2 – Quadro indicando a procedência, código de identificação e o ano de coleta das amostras analisadas no estudo.

Procedência	Código de identificação da amostra	Ano de Coleta	Total de amostras por ano
UFOP (MG)	28018	1986	13
UFOP (MG)	30582		
ISDF (DF)	30726		
ISDF (DF)	30730		
ISDF (DF)	30737		
UNICAMP (SP)	30844		
UNICAMP (SP)	30845		
UNICAMP (SP)	30846		
UNICAMP (SP)	30850		
UNICAMP (SP)	30851		
UNICAMP (SP)	30860		
FUSAM (SP)	30936		
FUSAM (SP)	30950		
IFF (RJ)	35400	1987	1
IFF (RJ)	36700	1988	1
PARTIC (RJ)	40644	1990	1
FUSAM (SP)	46798	1991	1
FUSAM (SP)	46855	1992	1
PRONIL (RJ)	454	1996	4
HSN (RJ)	552		
HSN (RJ)	717		
HSN (RJ)	749		
HSN (RJ)	1625	1998	5
HSN (RJ)	1713		
HSN (RJ)	1716		
HSN (RJ)	1719		
HSN (RJ)	1861		
HMJ (RJ)	10998	2005	1

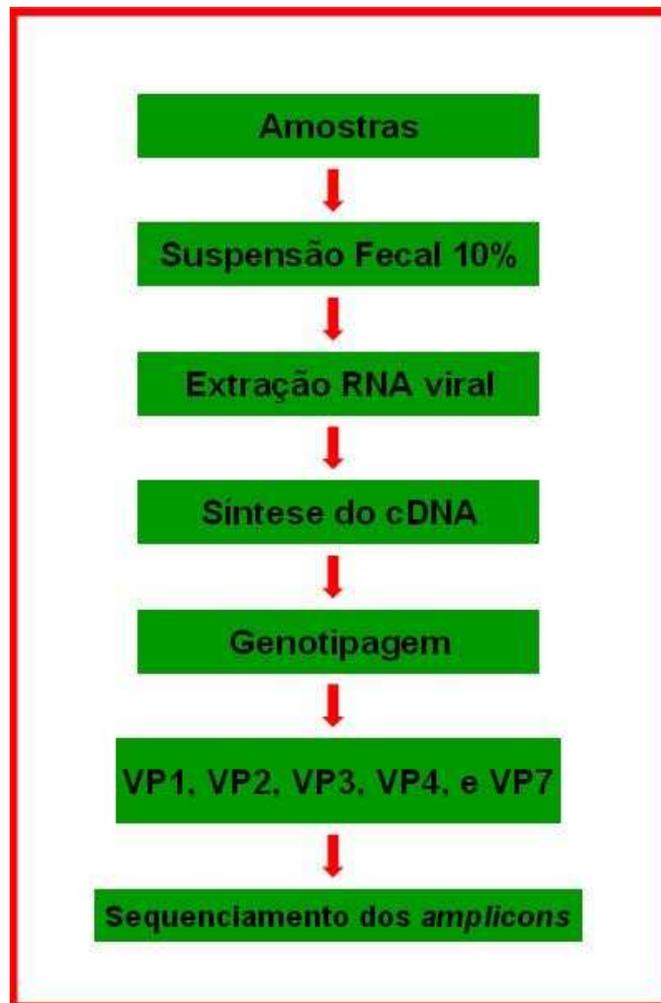


Figura 18 - Fluxograma ilustrando os procedimentos para detecção e caracterização molecular de rotavírus A, a partir das amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda

4.1.2. Iniciadores de cadeia

Os iniciadores de cadeia utilizados nas reações de PCR dos cinco genes amplificados, a localização desses iniciadores no genoma do RV-A e número de pares de bases dos *amplicons* gerados pela técnica, estão listados no Quadro 3.

Quadro 3 – Quadro contendo informações quanto aos iniciadores de cadeia utilizados na reação de PCR e de sequenciamento dos genes que codificam para as proteínas VP1, VP2, VP3, VP4 e VP7 de rotavírus A.

Iniciadores de cadeia	Sequência 5' → 3'	Região e posição no genoma	Amplicons (pb)
Denominação			
G tipo 9con1 ¹	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	VP7 (37-56)	904
G tipo 9con2 ¹	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	VP7 (922-941)	
FT5- G5 ²	CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC	VP7 (760-779)	742
P tipo 4con3 ³	CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC	VP4 (11-32)	876
P tipo 4con2 ³	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	VP4 (887-868)	
VP1F ⁴	GGCTATTAAAGCTGTACAATGGG	VP1(1–23)	686
VP1R ⁴	TAATCCTCATGAGAAAACACTGAC	VP1(686–663)	
VP2F ⁴	GGCTATTAAAGGCTCAATGGCG	VP2(1–22)	686
VP2R ⁴	CTTCATCTTGAAATATAGCATCAC	VP2(686–663)	
VP3F ⁴	GGCTATTAAAGCAGTACCAGTAG	VP3(1–23)	702
VP3R ⁴	GTAAACATAGATTTCATTACGCGGACC	VP3(702–677)	

¹ Das *et al.* (1994)

² Gouvea *et al.* (1994a)

³ Gentsch *et al.* (1992)

⁴ Varghese *et al.* (2006)

4.1.3. Soluções

4.1.3.1 - Tampão TRIS/HCl/Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2

Tris - hidroximetil-tris-aminometano (SIGMA [®])	1,21g
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) 0,0015M (Vetec [®])	0,02g
Água destilada q.s.p.	1000mL

Em um béquer de 2000mL foram adicionados os reagentes, homogeneizados com agitador magnético e ajustado a pH (7,2) com HCl PA (Merck[®]) antes de completar o volume final em balão volumétrico de 1000mL. A solução foi transferida para um frasco com vedação e autoclavada a 121°C por 20 minutos. A solução foi conservada entre 2 - 4°C.

4.1.3.2 - Sílica

Dióxido de silício (SIGMA [®])	60g
Água destilada q.s.p.	500mL

Em uma proveta de 500mL foram adicionadas água e 60g de sílica. A solução foi homogeneizada vertendo-se a proveta, deixando sedimentar por 24 horas. Por sucção foram desprezados 430mL do sobrenadante e adicionados 500mL de água destilada à sílica. Após sedimentação por 5 horas, foram desprezados 440mL do sobrenadante. O pH (2,0) foi ajustado adicionando-se 600µL de HCl 37% (Merck[®]). A solução foi separada em frascos de cor âmbar em alíquotas de 10mL, autoclavada a 121°C por 20 minutos e estocada entre 22°-25°C.

4.1.3.3 - EDTA 0,2M pH 8,0

EDTA-ácido etilenodiamino tetracético-(SIGMA [®])	37,22mg
Água destilada q.s.p.	500mL

Em um béquer de 1000mL foram adicionados EDTA e 300mL de água destilada. O pH (8,0) foi ajustado com NaOH e a solução foi homogeneizada com agitador magnético. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 500mL e ajustado o volume final. A solução foi transferida para um frasco com tampa e conservada entre 22°- 25°C.

4.1.3.4 - Tampão L6

Isotiocianato de guanidina (Invitrogen [®])	120g
Triton X-100 (SIGMA [®])	2,6g
EDTA 0,2M pH 8,0 (SIGMA [®])	22mL
Tris-HCl 0,1M pH 6,4 (SIGMA [®]) q.s.p	100mL

Em um béquer de 250mL foram adicionados os reagentes e homogeneizados com agitador magnético. A solução foi transferida para um balão volumétrico e o volume final ajustado para 100mL com Tris-HCl 0,1M pH 6,4 e transferido para frasco âmbar, que foi conservado entre 22°- 25°C.

4.1.3.5 - Tampão L2

Isotiocianato de guanidina (Invitrogen [®])	120g
Tris-HCl 0,1M pH 6,4 (SIGMA [®]) q.s.p.	100mL

Em um béquer de 250mL foram adicionados os reagentes e homogeneizados com agitador magnético. O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 100mL e o volume final completado. A solução final foi transferida para um frasco âmbar e conservada entre 22°- 25°C.

4.1.3.6 - Tampão Tris-Boro-EDTA 10X pH 8,4 (TBE)

Tris-base (Invitrogen [®])	108g
Ácido bórico (Reagen [®])	55g
EDTA 0,5M pH 8, 8 (Sigma [®])	40mL
Água Milli-Q q.s.p.	1000mL

Em um béquer de 2000mL foram adicionados os reagentes e homogeneizados com agitador magnético. O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 1000mL, completado o volume final e transferido para um frasco com vedação. A solução final foi conservada entre 2 - 4°C.

4.1.3.7- Gel de agarose a 1,5%

Agarose (Invitrogen [®])	1,2g
Tampão TBE 0,5 X pH 8,4 (Invitrogen [®])	80mL

A agarose foi pesada e colocada em um erlenmeyer e adicionados 80mL de tampão TBE 0,5X. O erlenmeyer foi levado ao forno de microondas por 1minuto (em potência alta) até que a agarose fosse dissolvida, deixando resfriar até +/- 50°C. A seguir, a agarose foi colocada na cuba de eletroforese, tendo sido evitada a formação de bolhas.

4.1.3.8 - Solução de brometo de etídio

Brometo de etídio 10mg/mL (Invitrogen [®])	15µL
Água destilada	300mL

A solução de brometo de etídio foi dissolvida em água em recipiente plástico com tampa, homogeneizada suavemente, em agitador magnético e conservada entre 22°- 25°C, sob proteção da luz.

4.1.4.9 - Etanol 70%

Etanol puro (Merck®)	70mL
Água destilada	30mL

Em uma proveta de 100mL foram adicionados 70mL de etanol puro e o volume final completado com a água destilada para 100mL. O conteúdo foi homogeneizado por inversão, transferido para frasco com vedação e conservado entre 2 - 4°C.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparo das suspensões fecais a 10%

As suspensões fecais foram preparadas em capela de fluxo laminar com sistema de exaustão destinada a este procedimento (cabine de segurança Biológica NB2 (Holten Lamin Air MS 2010 Modelo 0.9). Para tanto, tubos plásticos para centrífuga de 15 mL, foram adicionados cerca de 5g de amostra fecal e 4,5mL de tampão Tris/HCl/Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2. Após homogeneização em vórtex por 10 segundos e centrifugação a 3000 x g por 10 minutos, foram coletados 4mL do sobrenadante, transferidos para um novo tubo devidamente rotulado e estocados a -20°C até o momento da análise.

4.2.2. Extração do RNA viral pelo método da sílica (Boom *et al.*, 1990)

Em tubo plástico tipo Eppendorf® de 1,5mL foram adicionados 1 mL de tampão L6 e 400µL de suspensão fecal a 10%, previamente preparada (item 4.2.1.) juntamente com 15µL de sílica. Os tubos foram submetidos à agitação constante em plataforma orbital com agitação lenta por 20 minutos, sendo posteriormente centrifugados a 16.000 x g por 60 segundos, descartando-se o sobrenadante em solução de NaOH 10N. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de tampão L2 para ressuspender o sedimento formado. Após nova precipitação por centrifugação a 16.000 x g por 60 segundos, o sobrenadante foi desprezado em solução de NaOH 10N. A seguir foram realizadas duas etapas de lavagens, a primeira, adicionando-se 1 mL de etanol a 70% gelado e a segunda 1 mL de acetona P.A (Merck®) gelada, utilizando o mesmo procedimento acima de homogeneização e precipitação para o tampão L2, desprezando a seguir o sobrenadante em solução de hipoclorito de sódio a 5%.

Após a última lavagem, os tubos foram incubados a 56° C por 15 minutos com as tampas abertas para completa evaporação da acetona. Após esse período, foram adicionados

50µL de água livre de endo e exonucleases (Invitrogen[®]) em cada tubo. Os tubos foram novamente homogeneizados em vórtex por 10 segundos, incubados a 56° C por 15 minutos com as tampas fechadas. Após a centrifugação a 16.000 x g por 3 minutos, 40µL do sobrenadante contendo o RNAfd foram coletados cuidadosamente e transferidos para outro tubo.

4.2.3. Reação de transcrição reversa (RT) para a obtenção de cDNA.

De cada amostra extraída foi feita a transcrição do RNA para um DNA complementar (cDNA), utilizando-se o iniciador randômico pd(N)₆[®] (Amersham Biosciences, USA). A reação de transcrição foi feita utilizando uma mistura de reagentes descrita no Quadro 4.

Quadro 4 – Quadro indicando reagentes utilizados na reação de transcrição reversa cDNA.

Reagente	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O livre de DNAase / RNAase (GIBCO- BRL [®])	-	22,5µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen [®])	10X	5µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen [®])	2,5mM	5µL
MgCl ₂ (Invitrogen [®])	50mM	2,5µL
RT Superscript III [™] (Invitrogen [®])	200U/µL	1µL
pd(N) ₆ [®] (Amersham Biosciences [®])	50 unidades (A ₂₆₀)	2µL

Em tubo plástico tipo Eppendorf[®] de 200µL foi adicionado 2µL de dimetil sulfóxido (DMSO) (SIGMA[®]) e 10µL do RNAfd extraído. Após a incubação a 97°C por 7 minutos para desnaturação do RNAfd, o tubo foi mantido em banho de gelo por 2 minutos. A seguir foram adicionados 38µL da mistura de reagentes (Quadro 4) totalizando um volume 50µL e o tubo incubado a 42° C por 1 hora e 95°C por 10 minutos. O produto foi estocado a -20°C até o momento da realização da PCR.

4.2.4. Reação em cadeia pela polimerase para caracterização molecular dos genes que codificam para as proteínas VP7 e VP4 de rotavírus A.

Para a amplificação dos genes de VP7 e VP4 dos RV-A, foi utilizada a técnica descrita por Das e colaboradores (1994) para os genótipos G, e Gentsch e colaboradores (1992) para os genótipos P, com modificações introduzidas por Leite e colaboradores (1996), na época de recebimento das amostras. Para o desenvolvimento deste trabalho os genes de VP7 e VP4 foram amplificados novamente (com cDNA recém sintetizado) com os mesmos iniciadores de cadeia utilizados anteriormente e o genótipo G5 de VP7 ainda foi confirmado com a realização de nova reação de amplificação de VP7, desta vez com a utilização de FT5 (Gouvea *et al*,1994), iniciador de cadeia específico para a detecção deste genótipo de RV-A, além do iniciador de cadeia 9con1 (Das *et al*, 1994). A reação de amplificação foi feita utilizando uma mistura de reagentes descrita no Quadro 5.

Quadro 5 – Quadro indicando reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para amplificação dos genes de VP7 e VP4 de rotavírus A.

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (GIBCO- BRL [®])	-	31,25µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen [®])	10X	5,0 µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen [®])	2,5mM/cada	4,0 µL
MgCl ₂ (Invitrogen [®])	50mM	2,5 µL
Taq DNA polimerase Platinum II (Invitrogen [®])	5U/µL	0,25µL
Conjunto de iniciadores de cadeia consensuais G-tipo (9Con1+9Con2/ FT5 ^c) ^a ou P-tipo(4Con3+4Con2) ^b	20µM (cada)	2,0 µL
Total	-	45 µL

^a Das *et al* (1994) ^b Gentsch *et al* (1992) ^c Gouvea *et al*,1994

Para cada reação de PCR, foram adicionados 45µL da mistura da reagentes (Quadro 5) e 5,0 µL de cDNA da amostra. Os tubos foram incubados em termocicladores (PTC 200 da MJ Research, Inc) programados para a etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos para a hibridação e

72°C por 1 minuto para a fase de extensão das fitas de DNA. A última etapa foi a de alongamento final da fita de DNA, a 72°C por 10 minutos.

4.2.5. Reação em cadeia pela polimerase para caracterização molecular dos genes que codificam para as proteínas VP1, VP2 e VP3 de rotavírus A.

Para a amplificação dos genes de VP1, VP2 e VP3 de RV-A, foi utilizada a técnica descrita por Varghese e colaboradores (2006), com modificações incluídas neste estudo. A reação de amplificação foi feita utilizando uma mistura de reagentes descrita no Quadro 6.

Quadro 6- Quadro indicando reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para amplificação dos genes de VP1, VP2 e VP3 de rotavírus A.

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (GIBCO- BRL [®])	-	33,25µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen [®])	10X	5,0 µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen [®])	2,5mM/ cada	4,0 µL
MgCl ₂ (Invitrogen [®])	50mM	1,5 µL
Taq DNA polimerase Platinum II (Invitrogen [®])	5U/µL	0,25µL
Conjunto de iniciadores de cadeia: VP1 (VP1F+VP1R), VP2 (VP2F+VP2R) ou VP3 (VP3F+VP3R) ^a	20µM (cada)	1,0 µL
Total	-	45 µL

a- Varghese *et al* (2006).

Para cada reação de PCR, foram adicionados 45µL da mistura de reagentes (Quadro 6) e 5,0 µL de cDNA da amostra. Os tubos foram incubados em termocicladores (PTC 200 da MJ Research, Inc) programados para a etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos, 49°C por 30 segundos para o anelamento e

72°C por 45 segundos para a fase de extensão das fitas de DNA. A última etapa foi a de alongamento final da fita de DNA, a 72°C por 7 minutos.

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

Para análise dos *amplicons* obtidos nos itens 4.2.4 e 4.2.5, 2µL de corante azul de bromofenol (Invitrogen®) foi adicionado a 10µL de cada *amplicon* e os mesmos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (GIBCO-BRL®) a 1,5% em tampão TBE 0,5% (GIBCO-BRL®) por 1 hora a 100 volts. Após a impregnação de 20 minutos com Brometo de Etídeo (0,5 µg/mL), os *amplicons* foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Labnet®). Para identificar os pesos moleculares dos *amplicons* foi utilizado um marcador de massa molecular de 100 pb (GIBCO-BRL®). As imagens obtidas após a eletroforese foram registradas em sistema de captura de imagem (BioImaging Systems®) utilizando o programa Labworks 4.0.

Foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram *amplicons* com os seguintes de pares de bases: 686 para VP1, 686 para VP2, 702 para VP3, 876 para VP4 e 906 para VP7. Controles negativos foram introduzidos durante todos os procedimentos desde a extração do RNAfd.

4.2.7. Purificação dos produtos da reação em cadeia pela polimerase (*amplicons*)

Para a purificação do produto amplificado pela técnica de PCR foram utilizados os Kits comerciais “QIAquick® PCR Purification Kit” (QIAGEN™, Valencia, CA, USA), quando obtida banda positiva única e “QIAquick® Gel Extraction Kit” (QIAGEN™, Valencia, CA, USA), quando além do *amplicon* esperado também foram observadas bandas inespecíficas.

4.2.8. Sequenciamento parcial dos *amplicons*

Para o sequenciamento direto dos produtos amplificados e purificados foi utilizado o kit comercial “Big Dye Terminator® v 3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems®, CA, USA), conforme recomendado pelo fabricante. Foram utilizados os mesmos iniciadores de cadeia utilizados na reação de PCR de cada um dos cinco genes. Os produtos da reação de sequência foram purificados com as colunas CENTRI-SEP® (Princeton Separations®, CA,

USA) conforme orientação do fabricante. A quantificação do DNA amplificado foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Scientific, USA).

Os cromatogramas das sequências foram obtidos a partir do sequenciador automático de 48 capilares “ABI Prism 3730 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) do serviço da “Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ” (Otto *et al.*, 2008).

4.2.9. Análise filogenética das amostras

As sequências nucleotídicas (e as aminoacídicas deduzidas a partir das mesmas) foram alinhadas utilizando o método CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), contido no programa BioEdit® (Hall *et al.*, 1999). As sequências protótipos representantes dos diferentes genótipos de RV-A de origem humana e animal, descritas em diferentes países, foram resgatadas no site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através dos seus números de acesso ou mediante a utilização da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível no *Genbank*. Os números de acesso das diferentes sequências dos protótipos utilizados nas análises filogenéticas, encontram-se descritos no Quadro 7.

As relações filogenéticas entre as diferentes sequências foram determinadas mediante a utilização do pacote de programas MEGA v. 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) através do método de reconstrução filogenética *Neighbor-joining*. As distâncias genéticas entre as diferentes amostras foram calculadas mediante o modelo *Kimura-dois-parâmetros* como modelo de substituição nucleotídica e o modelo *Poisson Correction* como modelo de substituição aminoacídica. A significância estatística das diferentes filogenias obtidas foi estimada através de 2.000 réplicas de *bootstrap*. O mapeamento das diferentes mutações sinônimas e não-sinônimas foi realizado através da análise direta dos alinhamentos de aa obtidos para os cinco genes (VP1, VP2, VP3, VP4 e VP7) de todas as amostras analisadas, tendo a amostra protótipo IAL28, amostra brasileira de especificidade G5P[8], disponível no *GenBank*.

Quadro 7 – Quadro com o resumo das amostras protótipos utilizadas nas análises filogenéticas obtidas no *GenBank* com seus respectivos números de acesso, genótipos, local de isolamento e espécie de origem.

Amostra protótipo	Genótipo	Localidade Geográfica	Espécie de Origem	Número de acesso no <i>GenBank</i>				
				VP1	VP2	VP3	VP4	VP7
IAL28	G5P[8]	Brasil	Humana	EF583029	EF583030	EF583031	EF672584	EF672588
Br 1054	G5P[8]	Brasil	Humana	X	X	X	U41004	U41003
Br H8	G5P[8]	Brasil	Humana	X	X	X	U41006	U41005
YM	G11P[7]	México	Suína	X76486	X	AY300922	X	X
Gottfried	G4P[6]	EUA	Suína	M32805	X	X	X	X
Wa	G1P[8]	EUA	Humana	DQ490539	X14942	AY267335	L34161	X
ST-3	G4P[6]	Inglaterra	Humana	EF583045	EF583046	EF583047	X	X
Hosokawa	G4P[8]	Japão	Humana	DQ870489	X	X	X	X
T152	G12P[9]	Tailândia	Humana	X	X	DQ146701	X	X
D	G1P[8]	EUA	Humana	EF583021	X	X	X	X
OSU	G5P[7]	EUA	Suína	X	X	X	X	X06722
DS-1	G2P[4]	EUA	Humana	AF044360	EF583026	AY277914	EF672577	X
B3458	G9P[8]	Bélgica	Humana	X	X	DQ870503	EF990707	X
MW279	G1P[8]	Malauí	Humana	X	X	X	AJ302144	X
OP351	G1P[8]	Malauí	Humana	X	X	X	AJ302147	X
MW670	G4P[8]	Malauí	Humana	X	X	X	AJ302147	X
OP354	G4P[8]	Malauí	Humana	X	X	X	AJ302148	X
F45	G9P[8]	Japão	Humana	X	X	X	U30716	X
A46	G5P[23]	Argentina	Suína	X	X	X	X	L35054
C134	G5P[26]	Argentina	Suína	X	X	X	X	L35058
KH210	G5P[6]	Vietnã	Humana	X	X	X	X	AB257126
MRC3105/2000	G5P[8]	Camarões	Humana	X	X	X	X	AY327107
KJ44	G5P[1]	Coréia do Sul	Bovina	X	X	X	X	DQ494393
KJ75	G5P[5]	Coréia do Sul	Bovina	X	X	X	X	DQ494394
HP140	G6P[13]	Índia	Suína	X	AY601118	X	X	X
RMC321	G9P[19]	Índia	Humana	X	AY601115	X	X	X
Wi61	G9P[8]	EUA	Humana	X	DQ490201	X	X	X
YO	G3P[8]	Japão	Humana	X	DQ870498	DQ870499	X	X
ITA-MAR37	G9P[8]	Itália	Humana	X	X	X	EF150324	EF150339
OP530	G4P[8]	Malauí	Humana	X	X	X	AJ302152	X

X - Amostra protótipo que não foi utilizada na análise ou não possui sequência disponível no *GenBank*.

5. RESULTADOS

5.1. Análise das amostras fecais coletadas por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Foram selecionadas para o presente estudo todas as amostras de RV-A de genótipo G5P[8] que constam no banco de dados do LVCA, IOC, FIOCRUZ. Estas amostras fecais foram previamente analisadas pelas metodologias de EIARA, para a detecção de RV-A e adenovírus a partir da suspensão fecal, extraídas e analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida e apresentaram resultado positivo para RV-A, todas apresentando perfil eletroforético longo (Figura 19).

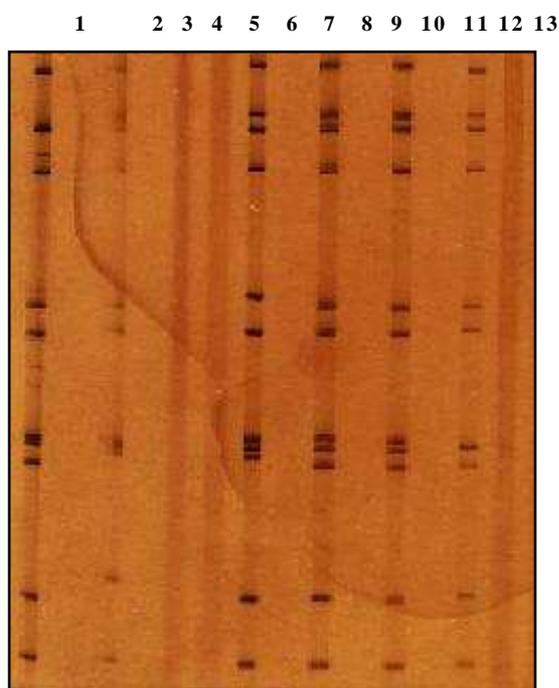


Figura 19 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) de RNAfd de rotavírus A. Linha 1- Controle positivo (Amostra de rotavírus A símio SA-11); Linhas 2, 6, 8, 10 e 12 - amostras positivas de rotavírus A; Linhas 3, 4, 5, 7, 9, 11 e 13 - amostras negativas.

5.2. PCR para os genótipos G (VP7) e P (VP4) de rotavírus A

Apesar das 28 amostras já possuírem seus genótipos de VP7 e VP4 determinados através de genotipagem pelo serviço de rotina do LVCA na época de recebimento das amostras, foi realizada nova reação de PCR utilizando dois pares de iniciadores de cadeia: 9con1/9con2 para a amplificação de VP7 (G); 4con2/4con3 para a amplificação de VP4 (P) onde os produtos obtidos a partir dos cDNAs das amostras geraram *amplicons* consensuais de 904 pb e 876pb, respectivamente (Figura 20). Posteriormente, para fins de confirmação do genótipo G5 de VP7, foi realizada uma nova reação de PCR desta vez utilizando-se o par de iniciadores de cadeia (9con1/FT5), onde o FT5 é específico para a detecção do genótipo G5 de RV-A. Todas as amostras analisadas no estudo possuem a combinação G5P[8].

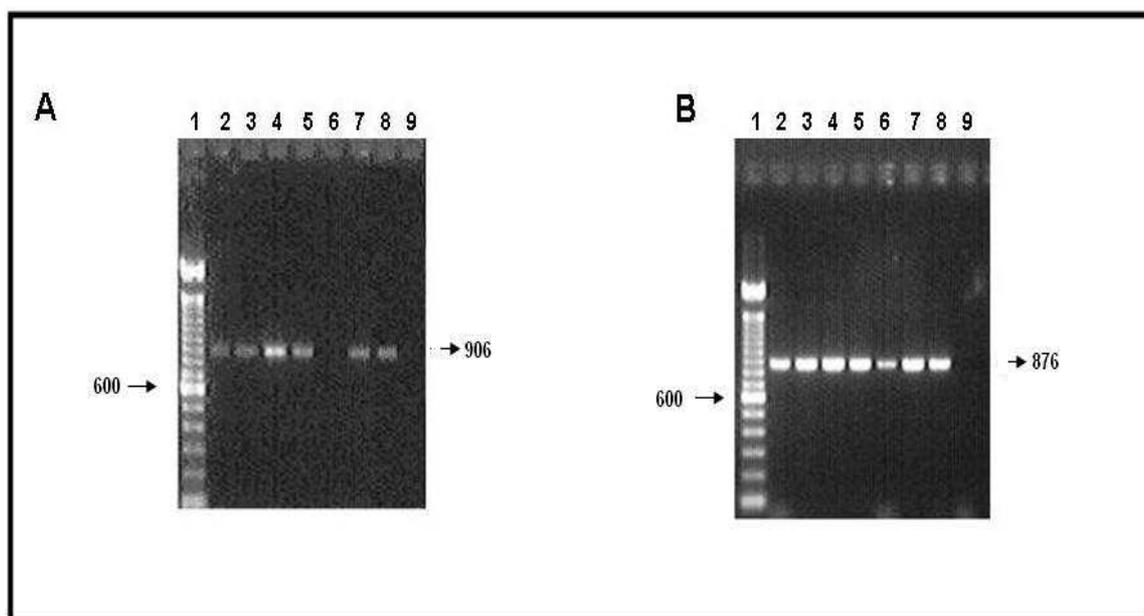


Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos amplicons da RT-PCR para a determinação dos genótipos G e P de rotavírus A. A- Amplificação parcial do gene de VP7- Linha 1- Marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®); Linhas 2, 3, 4, 5, 7 e 8- amostras positivas para RV-A, Linha 6- amostra negativa; Linha 9- controle negativo de extração e amplificação. B- Amplificação parcial do gene de VP4- Marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen®); Linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8- amostras positivas para RV-A; Linha 9- controle negativo de extração e amplificação.

5.3. PCR para os genes que codificam para as proteínas VP1, VP2, e VP3 de rotavírus A

Para amplificação dos genes que codificam as proteínas VP1, VP2 e VP3 o protocolo descrito por Varghese e colaboradores (2006) foi utilizado. Detalhes específicos deste protocolo foram obtidos diretamente através de contato com o próprio autor. Para a otimização dos resultados, a temperatura de hibridação do ciclo foi modificada, como já descrito anteriormente, no item 4.2.5. Como resultado da amplificação dos 3 genes obtivemos *amplicons* visualizados como bandas únicas em gel de agarose a 1,5 % (Figura 21).

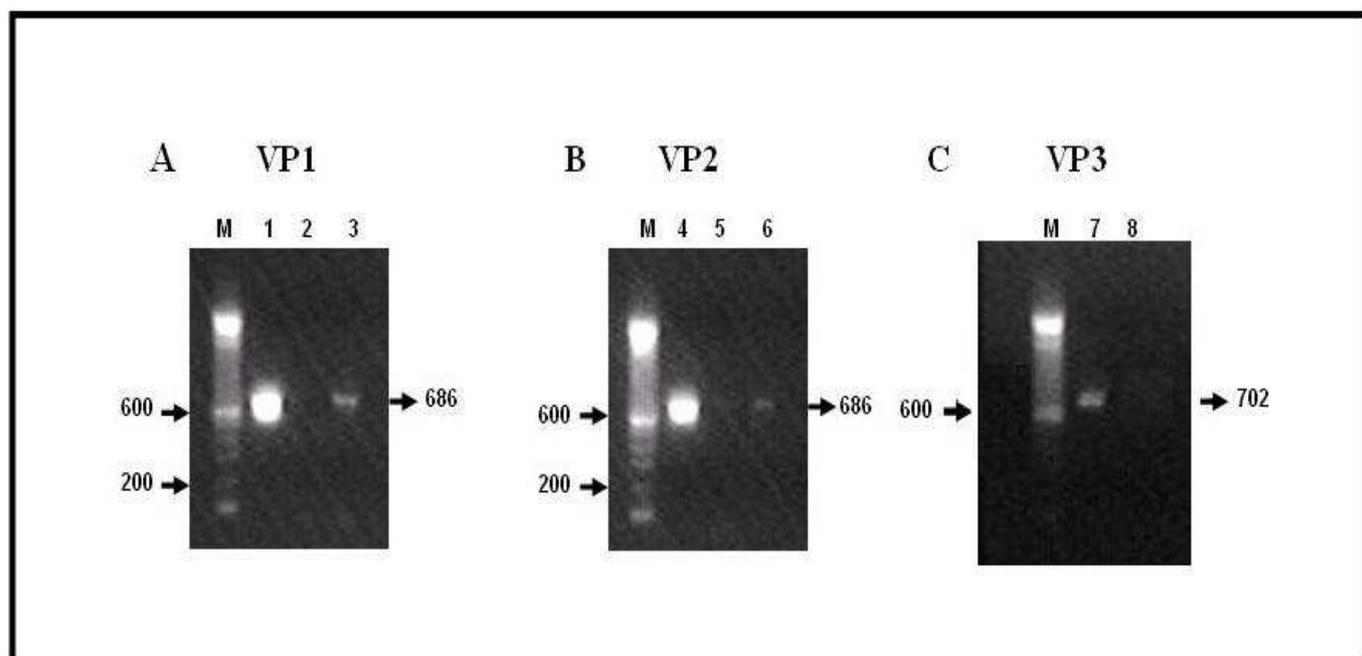


Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos amplicons da PCR correspondente aos genes que codificam para as proteínas VP1, VP2 e VP3 de rotavírus A. A: M: marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen[®]); Linhas 1 e 3- amostras positivas para VP1; linha 2- controle negativo; B: M: marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen[®]); Linhas 4 e 6- amostras positivas para VP2; linha 5- controle negativo; C: M: marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen[®]); Linha 7- amostra positiva para VP3; linha 8- controle negativo.

5.4. Análise das sequências nucleotídicas e aminoacídicas dos genes que codificam para as proteínas estruturais VP1, VP2, VP3, VP4, e VP7.

Foram realizadas análises filogenéticas para os cinco genes que codificam para as proteínas: VP1, VP2, VP3, VP4 e VP7 através da análise das sequências parciais (nucleotídicas e aminoacídicas) das 28 amostras analisadas e os dendogramas construídos foram baseados nas sequências nucleotídicas das amostras, de acordo com dados bibliográficos (Matthijnssens *et al.*, 2008a; Phan *et al.*, 2007b). Foram utilizados diferentes modelos de determinação de distância genética entre as sequências: Kimura-dois-parâmetros, *Tajima-Nei* e *Maximum Composite Likelihood*, que estão contidos no pacote de programas MEGA v 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Os três modelos revelaram a mesma topologia com valores de bootstrap similares nos diferentes dendogramas gerados (dados não mostrados). Deste modo, o modelo de reconstrução filogenética escolhido para a realização das análises foi o *Neighbor-joining* e o modelo de determinação de distância genética o Kimura-dois-parâmetros.

5.4.1. Análise do gene que codifica para a proteína VP1

A análise das sequências parciais do gene que codifica a proteína VP1 de todas as amostras estudadas revelou que as mesmas apresentam elevada similaridade com a amostra protótipo IAL28 (G5P[8]), com percentagem máxima de similaridade nucleotídica de aproximadamente 99% (Tabela 1). As amostras estudadas, assim como a IAL28, foram classificadas como pertencentes ao genogrupo I (*Wa-Like*) e, de acordo com o novo sistema de classificação dos RV-A, em sua totalidade pertencem ao genótipo R1, comum a RV-A suínos e humanos (Figura 22). A matriz de identidade entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos de VP1 das amostras analisadas está demonstrada na Tabela 2.

Apesar de todas as amostras estudadas possuírem o mesmo genótipo, pode-se observar uma variabilidade genética entre as amostras. Como pode ser visto no dendograma na Figura 23, as amostras obtidas até o ano de 1996 (1986-1996) agruparam no mesmo *cluster* da amostra IAL28, como já mencionado. Após esse período (1998-2005) as amostras agruparam em outro *cluster*, juntamente com as amostras Wa e D, de especificidade G1P[8], combinação que predominantemente circulava no período de detecção destas amostras.

O alinhamento obtido da sequência parcial de aa de VP1 utilizando amostras deste estudo e protótipos de VP1 de RV-A está demonstrado na Figura 24. Pode-se observar por esta figura a ocorrência de várias mutações não-sinônimas nas amostras em estudo,

comparando-as com amostras protótipo, principalmente com as suínas YM e Gottfried, onde foram detectadas mutações específicas nas posições 38 (E→D) e 46 (S→N). Foram verificadas também algumas substituições específicas em determinados grupos de amostras, como nas posições 65 (D→N) e 102 (V→A) em amostras coletadas em São Paulo em 1986 e na posição 50 (S→N) nas amostras coletadas em Minas Gerais no mesmo ano e na mesma posição (S→G) das amostras coletadas no Rio de Janeiro no período compreendido entre 1998 e 2005.

Tabela 1 – Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica entre as sequências parciais do gene que codifica a proteína VP1 das amostras analisadas e amostras protótipos de diferentes genótipos de rotavírus A humanos e animais.

Amostras	% de identidade entre as amostras brasileiras deste estudo e protótipos:							
	Hu IAL28		Hu Wa		Hu RMC321		Po YM	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
mg28018/86	0,968	0,990	0,965	0,985	0,915	0,957	0,857	0,933
mg30582/86	0,968	0,990	0,965	0,985	0,915	0,957	0,857	0,933
df30726/86	0,970	0,990	0,970	0,985	0,920	0,957	0,859	0,933
df30730/86	0,970	0,990	0,970	0,985	0,920	0,957	0,859	0,933
df30737/86	0,976	0,995	0,970	0,985	0,920	0,957	0,865	0,933
sp30844/86	0,979	0,985	0,962	0,981	0,913	0,952	0,857	0,929
sp30845/86	0,978	0,985	0,960	0,981	0,912	0,952	0,859	0,929
sp30846/86	0,979	0,985	0,962	0,981	0,913	0,952	0,857	0,929
sp30850/86	0,978	0,990	0,957	0,976	0,912	0,948	0,856	0,924
sp30851/86	0,979	0,985	0,962	0,981	0,913	0,952	0,857	0,929
sp30860/86	0,978	0,985	0,960	0,981	0,912	0,952	0,859	0,929
sp30936/86	0,934	0,981	0,951	0,990	0,918	0,971	0,860	0,938
sp30950/86	0,970	0,990	0,967	0,985	0,917	0,957	0,859	0,933
rj35400/87	0,971	0,990	0,965	0,981	0,915	0,952	0,863	0,929
rj36700/88	0,987	1,000	0,956	0,981	0,917	0,952	0,868	0,929
rj40644/90	0,995	1,000	0,954	0,981	0,909	0,952	0,868	0,929
sp46798/91	0,992	1,000	0,957	0,981	0,912	0,952	0,865	0,929
sp46855/92	0,973	0,995	0,967	0,985	0,917	0,957	0,865	0,933
rj454/96	0,968	0,962	0,959	0,971	0,915	0,943	0,862	0,919
rj552/96	0,985	0,990	0,948	0,971	0,906	0,943	0,866	0,919
rj717/96	0,962	0,976	0,931	0,957	0,887	0,929	0,846	0,905
rj749/96	0,982	0,990	0,945	0,971	0,899	0,943	0,863	0,919
rj1625/98	0,970	0,962	0,957	0,971	0,910	0,943	0,860	0,919
rj1713/98	0,918	0,948	0,956	0,966	0,893	0,929	0,829	0,910
rj1716/98	0,942	0,971	0,979	0,990	0,918	0,952	0,852	0,929
rj1719/98	0,940	0,966	0,978	0,985	0,917	0,948	0,851	0,924
rj1861/99	0,953	0,981	1,000	1,000	0,928	0,962	0,857	0,938
rj10998/05	0,948	0,971	0,982	0,990	0,915	0,952	0,856	0,929

^a - Amostra IAL28: humana, genótipo G5P[8] isolada no ano 1992 no Brasil;

^b - Amostra Wa: humana, genótipo G1P[8], isolada nos Estados Unidos em 1974;

^c - Amostra RMC321: humana, genótipo G9P[8], isolada na Índia em 2001;

^d - Amostra YM: suína, genótipo G11P[7], isolada no México em 1983.

Tabela 2 – Tabela apresentando a percentagem de identidade^a nucleotídica e aminoácídica da sequência parcial de VP1 das amostras RV-A de genótipo G5P[8] analisadas. ^a

A percentagem de identidade nucleotídica e aminoácídica estão indicadas abaixo e acima da diagonal, respectivamente.

	28018	30582	30726	30730	30737	30844	30845	30846	30850	30851	30860	30936	30950	35400	36700	40644	46798	46855	454	552	717	749	1625	1713	1716	1719
28018		1,00	0,99	0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,97	0,98	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98	0,98
30582	1,00		0,99	0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,97	0,98	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98	0,98
30726	1,00	1,00		1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,96	0,98	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98	0,98
30730	1,00	1,00	1,00		1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,96	0,98	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98	0,98
30737	1,00	1,00	1,00	1,00		0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,97	0,99	0,99	0,99	0,97	0,98	0,98	0,98
30844	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99		1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,95	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97
30845	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00		1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,95	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97
30846	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00		0,99	1,00	1,00	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,95	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97
30850	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,96	0,99	0,99	0,99	0,97	0,97	0,97	0,97
30851	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,95	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97
30860	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,95	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97
30936	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,96	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
30950	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00		0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,97	0,98	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98	0,98
35400	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99		0,99	0,99	0,99	1,00	0,96	0,98	0,99	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97
36700	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99		1,00	1,00	1,00	0,96	0,99	1,00	0,99	0,97	0,97	0,97	0,97
40644	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00		1,00	1,00	0,96	0,99	1,00	0,99	0,97	0,97	0,97	0,97
46798	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00		1,00	0,96	0,99	1,00	0,99	0,97	0,97	0,97	0,97
46855	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		0,97	0,99	0,99	0,99	0,97	0,98	0,98	0,98
454	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,98	0,97	0,97	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98		0,96	0,97	0,96	0,97	0,96	0,96	0,96
552	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	0,97		1,00	0,99	0,97	0,96	0,96	0,96
717	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	0,98	1,00		1,00	0,97	0,97	0,97	0,97
749	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,97	0,99	1,00		0,97	0,96	0,97	0,96
1625	0,99	0,99	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98		0,99	1,00	0,99
1713	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	1,00		0,99
1716	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	1,00	1,00	
1719	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	1,00	1,00	1,00
1861	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,99	0,98	0,99	1,00	1,00	1,00
10998	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,97	0,99	0,99	0,99

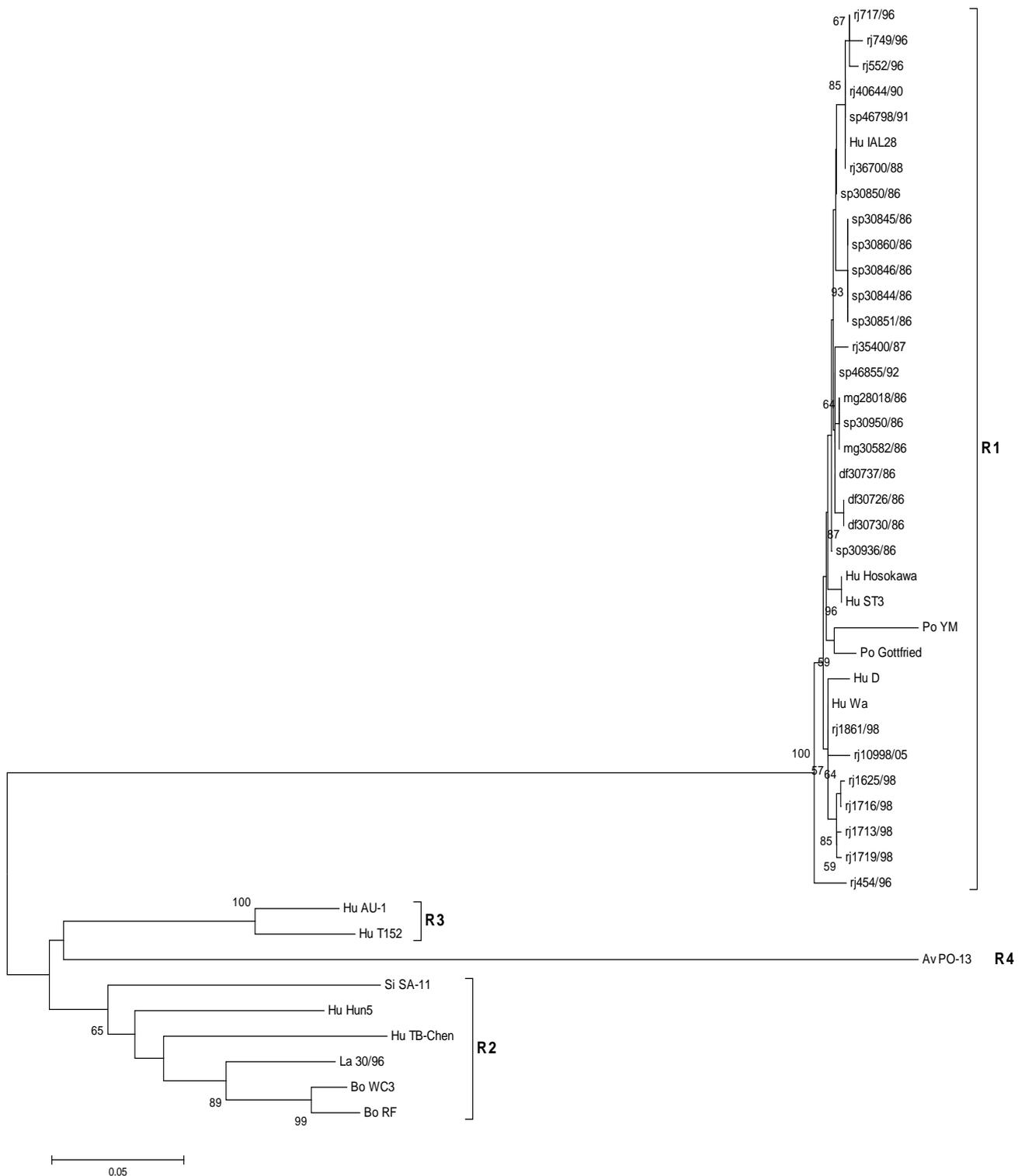


Figura 22 – Dendrograma representando a classificação das amostras do estudo dentro do grupo de diferentes genótipos de VP1^a. O método utilizado foi o de *Neighbor-Joining* com o modelo de reconstrução filogenética Kimura-dois-parâmetros. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nodos da árvore, os valores inferiores a 50% foram excluídos. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

^a - Matthijssens *et al.*, 2008

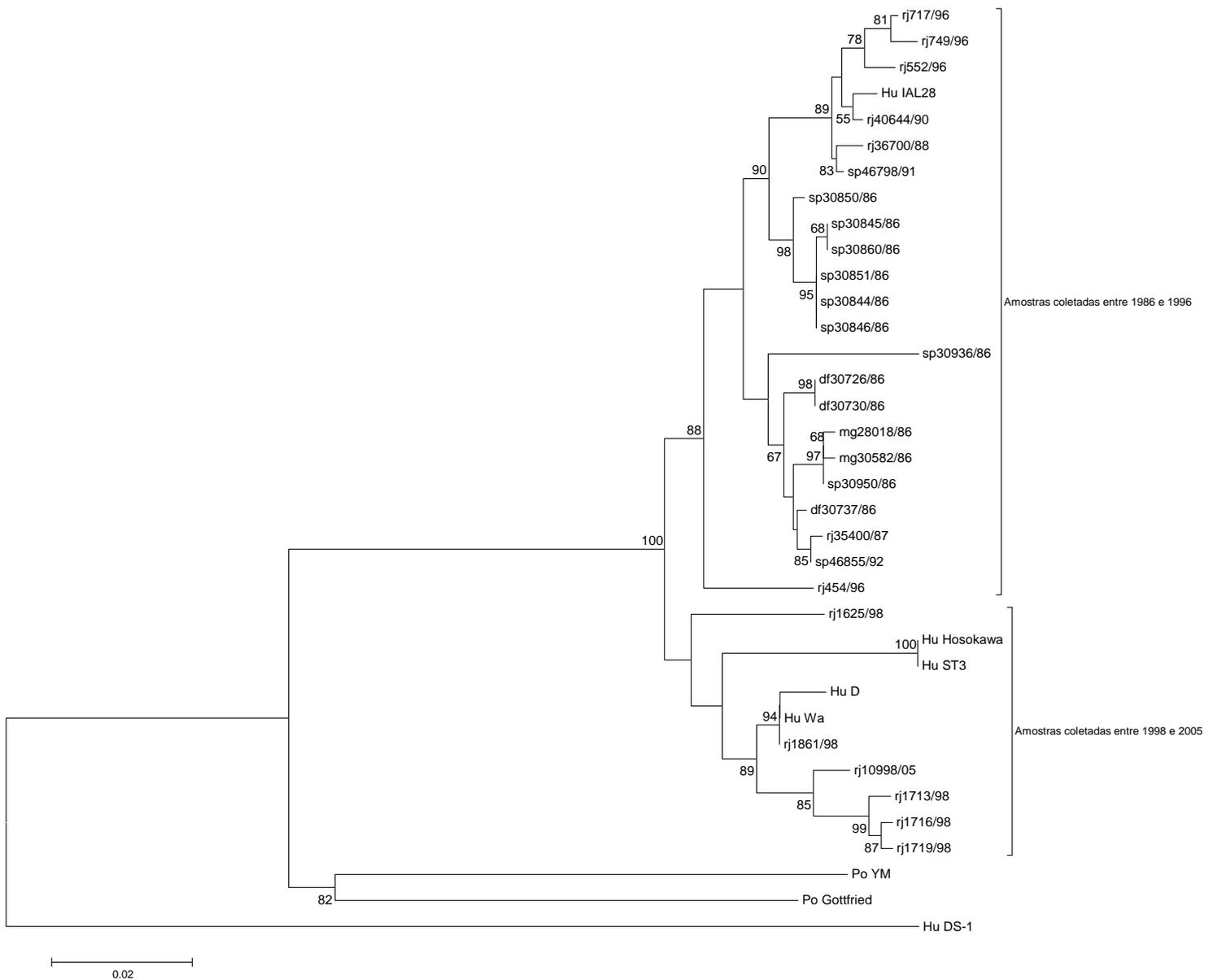


Figura 23 - Dendograma construído a partir da análise da sequência nucleotídica do gene de VP1^a de amostras de RV-A genótipo G5P[8] e amostras protótipo de RV-A. O método utilizado foi o de *Neighbor-Joining* com o modelo de reconstrução filogenética Kimura-dois-parâmetros. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nodos da árvore, os valores inferiores a 50% foram excluídos. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

^a - Matthijssens *et al.*, 2008

5.4.2. Análise do gene que codifica para a proteína VP2

A análise das sequências parciais do gene que codifica para VP2 das 28 amostras estudadas demonstrou que as mesmas apresentam variações em suas sequências, incluindo inserções e/ou deleções e que, apesar destas diferenças, todas pertencem ao genogrupo I. De acordo com o novo sistema de classificação dos RV-A, pertencem ao genótipo C1 (Figura 25). A tabela 3 demonstra a percentagem de identidade nt e aa entre as sequências parciais do gene de VP2 das amostras analisadas e amostras protótipos de diferentes genótipos de RV-A humanos e animais. A matriz de identidade entre as sequências de nt e aa de VP2 das amostras analisadas está demonstrada na tabela 4 .

Assim como para o gene que codifica a VP1, as amostras possuem variabilidade genética, formando três *clusters*. Como pode ser visto no dendograma na Figura 26, as amostras obtidas até o ano de 1992 (1986-1992) agruparam em um mesmo *cluster* e as amostras, coletadas entre 1996-2005, formaram outro *cluster*. O terceiro *cluster* foi formado com duas amostras coletadas no Rio de Janeiro em 1998 (1719 e 1861) e amostras protótipos Wa, IAL28 e T152, também humanas.

O alinhamento das sequências parciais aminoacídicas do gene que codifica para VP2 das amostras em estudo comparadas com amostras protótipos de VP2 de RV-A está demonstrado na Figura 27. Pode-se notar uma grande variação entre as sequências de aa, sobretudo entre as amostras coletadas em anos distintos. Foram detectadas diversas mutações entre as sequências, como por exemplo, nas posições 12 (L→P), inserção de um ácido glutâmico (E) na posição 21 das três amostras coletadas no Distrito Federal em 1986, duas coletadas no Rio de Janeiro (1987-90) e duas coletadas em São Paulo (1991-92), posição 39 (K → R) e 54 (V→I).

Tabela 3 – Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica entre as sequências parciais do gene de VP2 das amostras analisadas e amostras protótipos de diferentes genótipos de RV-A humanos e animais.

Amostras	% de identidade entre as amostras brasileiras deste estudo e protótipos:							
	Hu IAL28 ^a		Hu Wa ^b		Hu RMC321 ^c		Po HP140 ^d	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
mg28018/86	0,755	0,976	0,743	0,937	0,733	0,951	0,719	0,932
mg30582/86	0,755	0,976	0,743	0,937	0,733	0,951	0,719	0,932
df30726/86	0,754	0,971	0,746	0,928	0,733	0,937	0,719	0,918
df30730/86	0,754	0,971	0,746	0,928	0,733	0,937	0,719	0,918
df30737/86	0,754	0,971	0,746	0,928	0,733	0,937	0,719	0,918
sp30844/86	0,754	0,971	0,741	0,932	0,732	0,947	0,717	0,927
sp30845/86	0,754	0,971	0,741	0,932	0,732	0,947	0,717	0,927
sp30846/86	0,751	0,966	0,738	0,927	0,728	0,942	0,714	0,923
sp30850/86	0,755	0,976	0,743	0,937	0,733	0,951	0,719	0,932
sp30851/86	0,752	0,961	0,740	0,923	0,730	0,937	0,716	0,918
sp30860/86	0,754	0,971	0,741	0,932	0,732	0,947	0,717	0,927
sp30936/86	0,755	0,976	0,743	0,937	0,733	0,951	0,719	0,932
sp30950/86	0,751	0,961	0,743	0,927	0,733	0,951	0,719	0,932
rj35400/87	0,759	0,976	0,746	0,928	0,736	0,942	0,722	0,923
rj36700/88	0,760	0,980	0,748	0,933	0,738	0,947	0,724	0,928
rj40644/90	0,760	0,985	0,751	0,937	0,735	0,933	0,720	0,913
sp46798/91	0,762	0,985	0,748	0,928	0,738	0,942	0,724	0,923
sp46855/92	0,762	0,985	0,748	0,928	0,738	0,942	0,724	0,923
rj454/96	0,732	0,923	0,768	0,990	0,727	0,937	0,714	0,918
rj552/96	0,732	0,923	0,768	0,990	0,727	0,937	0,714	0,918
rj717/96	0,730	0,918	0,767	0,985	0,727	0,937	0,714	0,918
rj749/96	0,730	0,918	0,767	0,985	0,727	0,937	0,714	0,918
rj1625/98	0,732	0,909	0,738	0,937	0,717	0,918	0,703	0,899
rj1713/98	0,730	0,918	0,767	0,985	0,727	0,937	0,714	0,918
rj1716/98	0,738	0,918	0,748	0,947	0,725	0,923	0,711	0,903
rj1719/98	0,881	0,923	0,926	0,947	0,858	0,923	0,846	0,903
rj1861/98	0,875	0,918	0,998	0,995	0,865	0,932	0,855	0,913
rj10998/05	0,730	0,909	0,740	0,932	0,717	0,908	0,704	0,889

^a- Amostra IAL28: humana, genótipo G5P[8] isolada no ano 1992 no Brasil;

^b- Amostra Wa: humana, genótipo G1P[8], isolada nos Estados Unidos em 1974;

^c- Amostra RMC321: humana, genótipo G9P[8], isolada na Índia em 2001;

^d- Amostra HP140: suína, genótipo G6P[13], isolada na Índia em 2006.

Tabela 4 – Tabela apresentando a percentagem de identidade^a nucleotídica e aminoacídica da sequência parcial de VP2 das amostras RV-A de genótipo G5P[8] analisadas.

	28018	30582	30726	30730	30737	30844	30845	30846	30850	30851	30860	30936	30950	35400	36700	40644	46798	46855	454	552	717	749	1625	1713	1716	1719
28018		1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	0,98	0,99	0,99	0,94	0,94	0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,95
30582	1,00		0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	0,98	0,99	0,99	0,94	0,94	0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,95
30726	0,99	0,99		1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,99	0,97	0,98	0,99	0,97	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,93	0,93	0,92	0,92	0,93	0,92	0,94	0,95
30730	0,99	0,99	1,00		1,00	0,98	0,98	0,98	0,99	0,97	0,98	0,99	0,97	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,93	0,93	0,92	0,92	0,93	0,92	0,94	0,95
30737	0,99	0,99	1,00	1,00		0,98	0,98	0,98	0,99	0,97	0,98	0,99	0,97	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,93	0,93	0,92	0,92	0,93	0,92	0,94	0,95
30844	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99		1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,95	0,95
30845	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00		1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,95	0,95
30846	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	1,00	1,00		0,99	0,99	1,00	0,99	0,98	0,98	0,99	0,97	0,98	0,98	0,93	0,93	0,92	0,92	0,92	0,92	0,94	0,95
30850	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00		0,99	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	0,98	0,99	0,99	0,94	0,94	0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,95
30851	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	1,00	1,00	0,99	0,99		0,99	0,99	0,97	0,98	0,98	0,97	0,98	0,98	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,94	0,94
30860	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,95	0,95
30936	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00		0,99	0,99	1,00	0,98	0,99	0,99	0,94	0,94	0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,95
30950	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99		0,98	0,98	0,97	0,98	0,98	0,93	0,93	0,93	0,93	0,92	0,93	0,93	0,94
35400	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99		1,00	0,98	0,99	0,99	0,93	0,93	0,92	0,92	0,92	0,92	0,93	0,94
36700	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	0,99	1,00		0,99	1,00	1,00	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,94
40644	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,97	0,99	0,99		0,99	0,99	0,94	0,94	0,93	0,93	0,92	0,93	0,93	0,94
46798	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	1,00	1,00	0,99		1,00	0,93	0,93	0,92	0,92	0,92	0,92	0,93	0,94
46855	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	1,00	1,00	0,99	1,00		0,93	0,93	0,92	0,92	0,92	0,92	0,93	0,94
454	0,96	0,96	0,95	0,95	0,95	0,96	0,96	0,95	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,95	0,96	0,95	0,95		1,00	1,00	1,00	0,94	1,00	0,95	0,95
552	0,96	0,96	0,95	0,95	0,95	0,96	0,96	0,95	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,95	0,96	0,95	0,95	1,00		1,00	1,00	0,94	1,00	0,95	0,95
717	0,96	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95	0,95	0,95	0,96	0,95	0,95	1,00	1,00		1,00	0,94	1,00	0,95	0,95
749	0,96	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95	0,95	0,95	0,96	0,95	0,95	1,00	1,00	1,00		0,94	1,00	0,95	0,95
1625	0,95	0,95	0,96	0,96	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95		0,94	0,98	0,97
1713	0,96	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95	0,95	0,95	0,96	0,95	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00	0,95		0,95	0,95
1716	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,99	0,96		0,99
1719	0,75	0,75	0,74	0,74	0,74	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,76
1861	0,75	0,75	0,74	0,74	0,74	0,75	0,75	0,74	0,75	0,75	0,75	0,75	0,74	0,74	0,74	0,75	0,74	0,74	0,77	0,77	0,77	0,77	0,74	0,77	0,75	0,92
10998	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,95	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,98	0,95	0,99	0,75

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

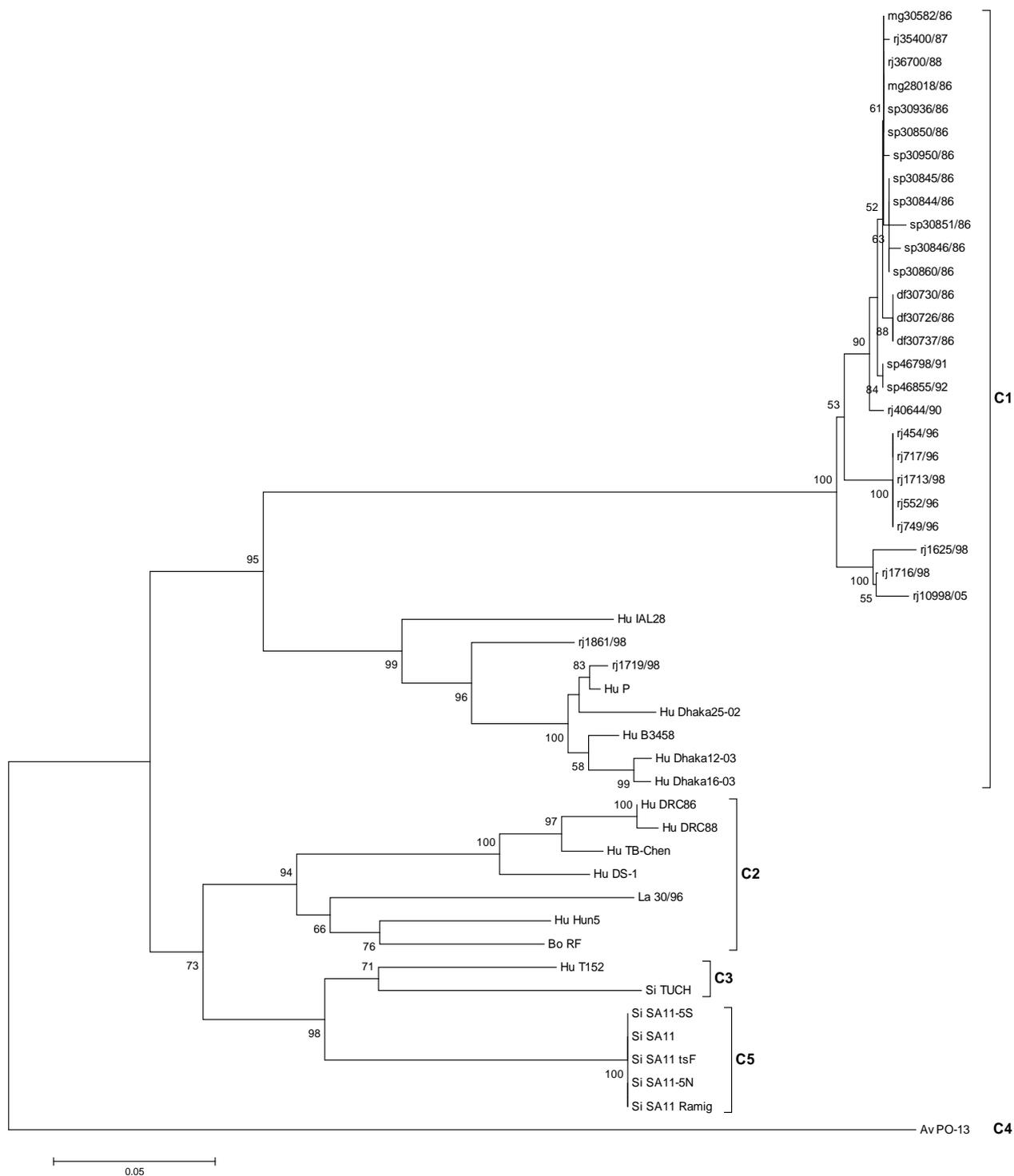


Figura 25 – Dendograma representando a classificação das amostras do estudo dentro do grupo de diferentes genótipos de VP2 ^a. O método utilizado foi o de Neighbor-Joining com o modelo de reconstrução filogenética Kimura-dois-parâmetros. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nodos da árvore, os valores inferiores a 50% foram excluídos. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

^a Matthijnssens *et al.*, 2008

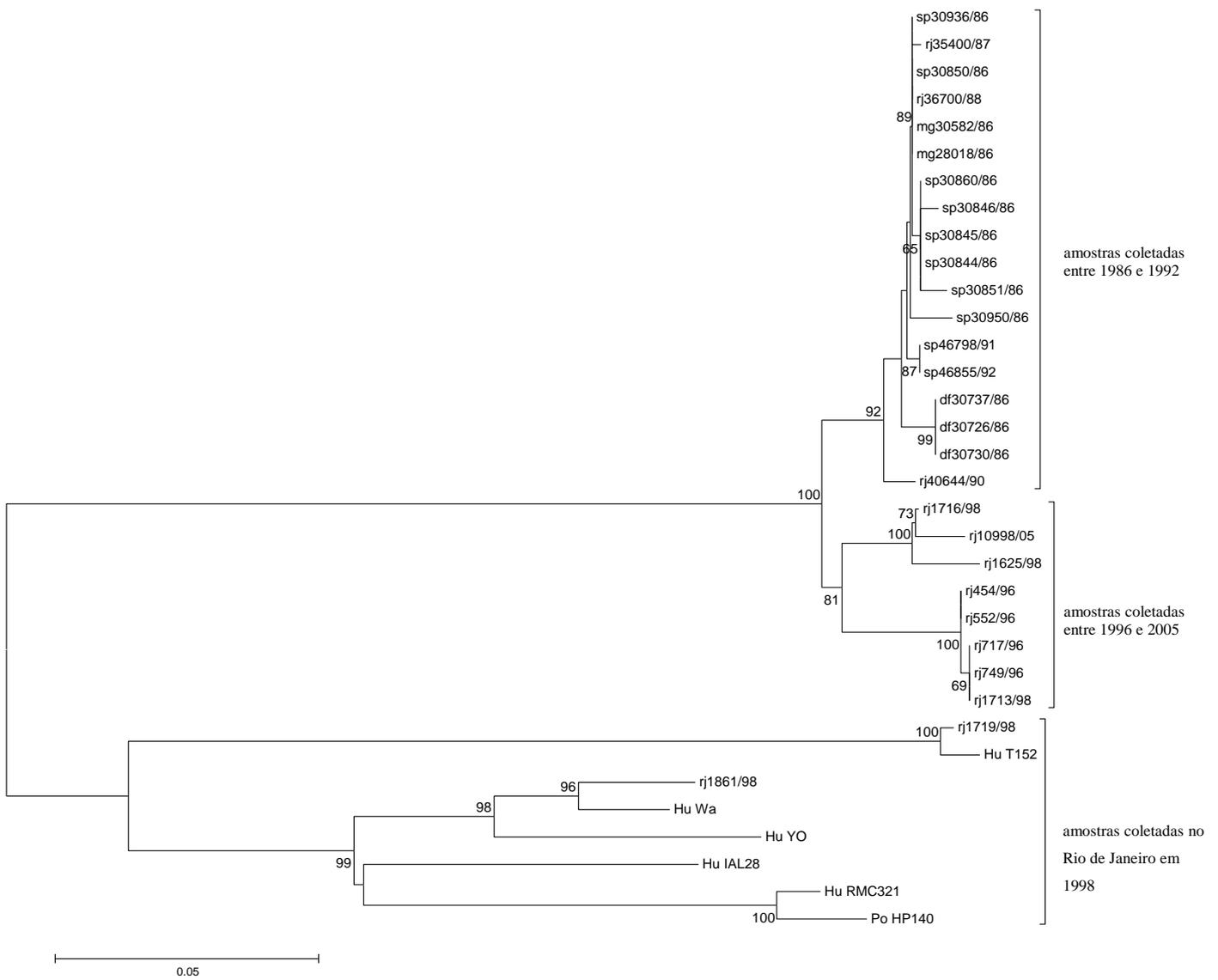


Figura 26 - Dendograma construído a partir da análise da sequência nucleotídica do gene de VP2^a de amostras de RV-A genótipo G5P[8] e amostras protótipo de RV-A. O método utilizado foi o de Neighbor-Joining com o modelo de reconstrução filogenética Kimura-dois-parâmetros. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nodos da árvore, os valores inferiores a 50% foram excluídos. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

^a - Matthijnssens *et al.*, 2008

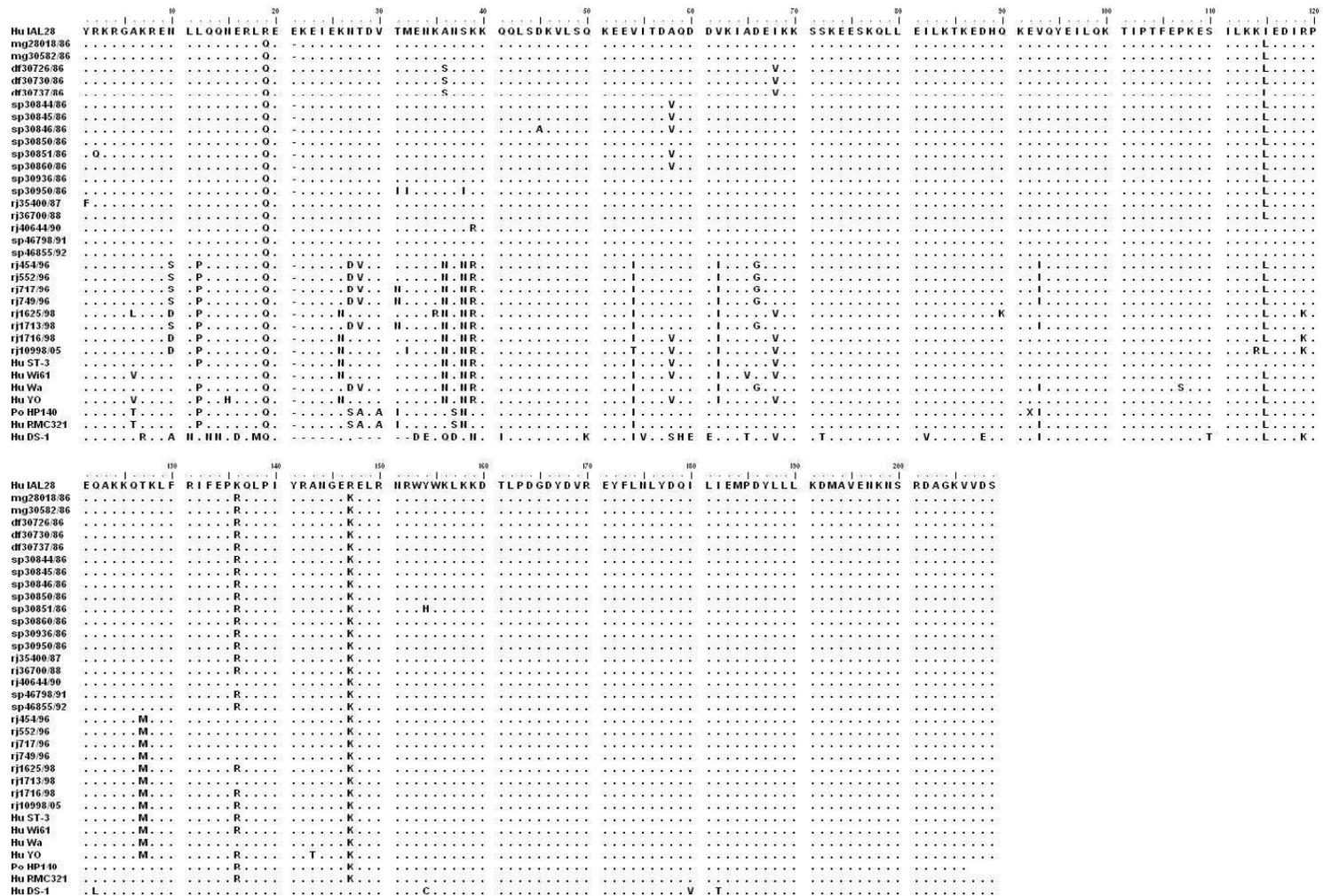


Figura 27 – Alinhamento das seqüências parciais aminoacídicas do gene de VP2 das amostras brasileiras do estudo e as amostras protótipos utilizadas na análise filogenética. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade do aminoácido com amostra protótipo IAL28 (G5P[8]).

5.4.3. Análise do gene que codifica para a proteína VP3

A análise da sequência parcial do gene que codifica para a proteína VP3 de todas as amostras estudadas demonstrou que as mesmas apresentam elevada similaridade com as amostras protótipos IAL28 (G5P[8]) e Wa (G1P[8]), assim como as duas proteínas analisadas anteriormente (Tabela 5). Assim como os referidos protótipos, as amostras do estudo pertencem ao genogrupo I (*Wa-Like*) e, de acordo com o novo sistema de classificação dos RV-A, em sua totalidade pertencem ao genótipo M1, comum a RV-A suínos e humanos (Figura 28). A matriz de identidade entre as sequências de nt e aa de VP3 das amostras analisadas está demonstrada na Tabela 6.

Apesar de todas possuírem o mesmo genótipo, pode-se observar uma variabilidade genética entre as amostras. Como pode ser visto no dendograma na Figura 29, as amostras obtidas até o ano de 1996 (1986-1996) agruparam no mesmo *cluster* da amostra IAL, como já mencionado. Após esse período (1998-2005) as amostras agruparam em outro *cluster*, juntamente com a amostra Wa, de especificidade G1P[8], combinação que predominantemente circulava no período de detecção destas amostras, assim como ocorrido nas análises das sequências do gene que codifica para VP1.

O alinhamento das sequências parciais aminoacídicas da VP3 das amostras analisadas com amostras protótipos de VP3 de RV-A está demonstrado na Figura 30. Pode-se observar que dentre as proteínas do core viral, as sequências de aminoácidos de VP3 foram as que menos apresentaram mutações entre elas e entre as amostras protótipos. Foram observadas substituições nas sequências aminoacídicas nas posições: 88 (I →M) em amostras coletas no ano de 1986 e 143 (S→I), 155 (V→I) e 198 (F →S) em amostras coletadas no Rio de Janeiro no período compreendido entre 1996 e 2005.

Tabela 5 – Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica entre as sequências parciais do gene de VP3 das amostras analisadas e amostras protótipos de diferentes genótipos de RV-A humanos e animais.

Amostras	% de identidade entre as amostras brasileiras deste estudo e protótipos:							
	Hu IAL28 ^a		Hu Wa ^b		Hu RMC321 ^c		Po YM ^d	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
mg28018/86	0,986	0,989	0,929	0,974	0,876	0,949	0,907	0,939
mg30582/86	0,984	0,989	0,931	0,974	0,881	0,949	0,906	0,939
df30726/86	0,978	0,989	0,931	0,974	0,871	0,949	0,899	0,939
df30730/86	0,978	0,989	0,931	0,974	0,871	0,949	0,899	0,939
df30737/86	0,976	0,984	0,929	0,969	0,869	0,944	0,897	0,934
sp30844/86	0,981	0,989	0,931	0,974	0,877	0,949	0,906	0,939
sp30845/86	0,979	0,994	0,931	0,979	0,881	0,954	0,906	0,944
sp30846/86	0,974	0,969	0,921	0,954	0,867	0,929	0,896	0,924
sp30850/86	0,981	0,989	0,931	0,974	0,881	0,949	0,902	0,939
sp30851/86	0,981	0,989	0,931	0,974	0,877	0,949	0,906	0,939
sp30860/86	0,983	0,989	0,932	0,974	0,879	0,949	0,907	0,939
sp30936/86	0,981	0,984	0,927	0,969	0,874	0,944	0,906	0,934
sp30950/86	0,978	0,989	0,934	0,974	0,874	0,949	0,906	0,939
rj35400/87	0,988	0,989	0,934	0,974	0,881	0,949	0,909	0,939
rj36700/88	0,991	0,994	0,934	0,979	0,881	0,954	0,909	0,944
rj40644/90	0,986	0,984	0,929	0,969	0,876	0,944	0,907	0,944
sp46798/91	0,988	0,994	0,934	0,979	0,877	0,954	0,906	0,944
sp46855/92	0,976	0,989	0,929	0,974	0,872	0,949	0,897	0,939
rj454/96	0,951	0,989	0,974	0,984	0,889	0,959	0,902	0,949
rj552/96	0,984	0,989	0,931	0,974	0,876	0,949	0,909	0,949
rj717/96	0,983	0,984	0,929	0,969	0,874	0,944	0,907	0,944
rj749/96	0,983	0,984	0,929	0,969	0,874	0,944	0,907	0,944
rj1625/98	0,931	0,974	0,984	0,989	0,889	0,959	0,899	0,949
rj1713/98	0,931	0,974	0,984	0,989	0,889	0,959	0,899	0,949
rj1716/98	0,931	0,974	0,984	0,989	0,889	0,959	0,899	0,949
rj1719/98	0,932	0,974	0,993	0,989	0,887	0,959	0,897	0,949
rj1861/98	0,934	0,979	0,998	0,994	0,889	0,964	0,899	0,954
rj10998/05	0,919	0,969	0,974	0,984	0,901	0,959	0,892	0,949

^a - Amostra IAL28: humana, genótipo G5P[8] isolada no ano 1992 no Brasil;

^b - Amostra Wa: humana, genótipo G1P[8], isolada nos Estados Unidos em 1974;

^c - Amostra RMC321: humana, genótipo G9P[8], isolada na Índia em 2001;

^d - Amostra YM: suína, genótipo G11P[7], isolada no México em 1983.

Tabela 6 – Tabela apresentando a percentagem de identidade ^a nucleotídica e aminoacídica da sequência parcial de VP3 das amostras RV-A de genótipo G5P[8] analisadas.

	28018	30582	30726	30730	30737	30844	30845	30846	30850	30851	30860	30936	30950	35400	36700	40644	46798	46855	454	552	717	749	1625	1713	1716	1719	
28018		0,99	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	1,00	0,94	0,99	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
30582	0,99		0,97	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,95	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	
30726	0,99	0,98		0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,97	0,98	0,98	0,97	0,98	0,97	0,97	0,97	0,98	0,92	0,97	0,96	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	
30730	0,99	0,98	0,98		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	1,00	0,94	0,99	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
30737	1,00	0,99	0,99	0,99		1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	1,00	0,94	0,99	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
30844	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00		1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	1,00	0,94	0,99	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
30845	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99		1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	1,00	0,94	0,99	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
30846	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99		1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	1,00	0,94	0,99	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
30850	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99		0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	1,00	0,94	0,99	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
30851	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99		0,99	0,99	0,99	1,00	0,98	0,99	0,99	0,99	0,94	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
30860	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99		1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	1,00	0,94	0,99	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
30936	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99		0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	1,00	0,94	0,99	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
30950	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00		0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,95	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	
35400	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99		0,99	0,98	0,99	1,00	0,94	0,99	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
36700	0,98	0,98	0,97	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	0,98	1,00		0,98	0,99	0,99	0,94	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
40644	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98		0,99	0,98	0,94	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
46798	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99	0,98	0,99	1,00	0,98	0,98	0,99		0,99	0,95	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	
46855	0,98	0,98	0,97	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	0,98	1,00	1,00	0,98	0,98		0,94	0,99	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	
454	0,91	0,91	0,90	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,90	0,91	0,91	0,91	0,91	0,90	0,90	0,91	0,91	0,90		0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	
552	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,91		0,99	0,99	0,97	0,97	0,97	0,97	
717	0,98	0,98	0,97	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,91	1,00		1,00	0,97	0,97	0,97	0,97	
749	0,98	0,98	0,97	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,91	1,00	1,00		0,97	0,97	0,97	0,97	
1625	0,93	0,93	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,92	0,93	0,92	0,92		1,00	1,00	1,00
1713	0,93	0,93	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,92	0,93	0,92	0,92	1,00		1,00	1,00
1716	0,93	0,93	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,92	0,93	0,92	0,92	1,00	1,00		1,00
1719	0,93	0,93	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,99	0,99	0,99	
1861	0,93	0,93	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,94	0,94	0,93	0,93	0,93	0,94	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,99	0,99	0,99	0,99
10998	0,92	0,92	0,91	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,91	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,91	0,92	0,92	0,92	0,97	0,97	0,97	0,97

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

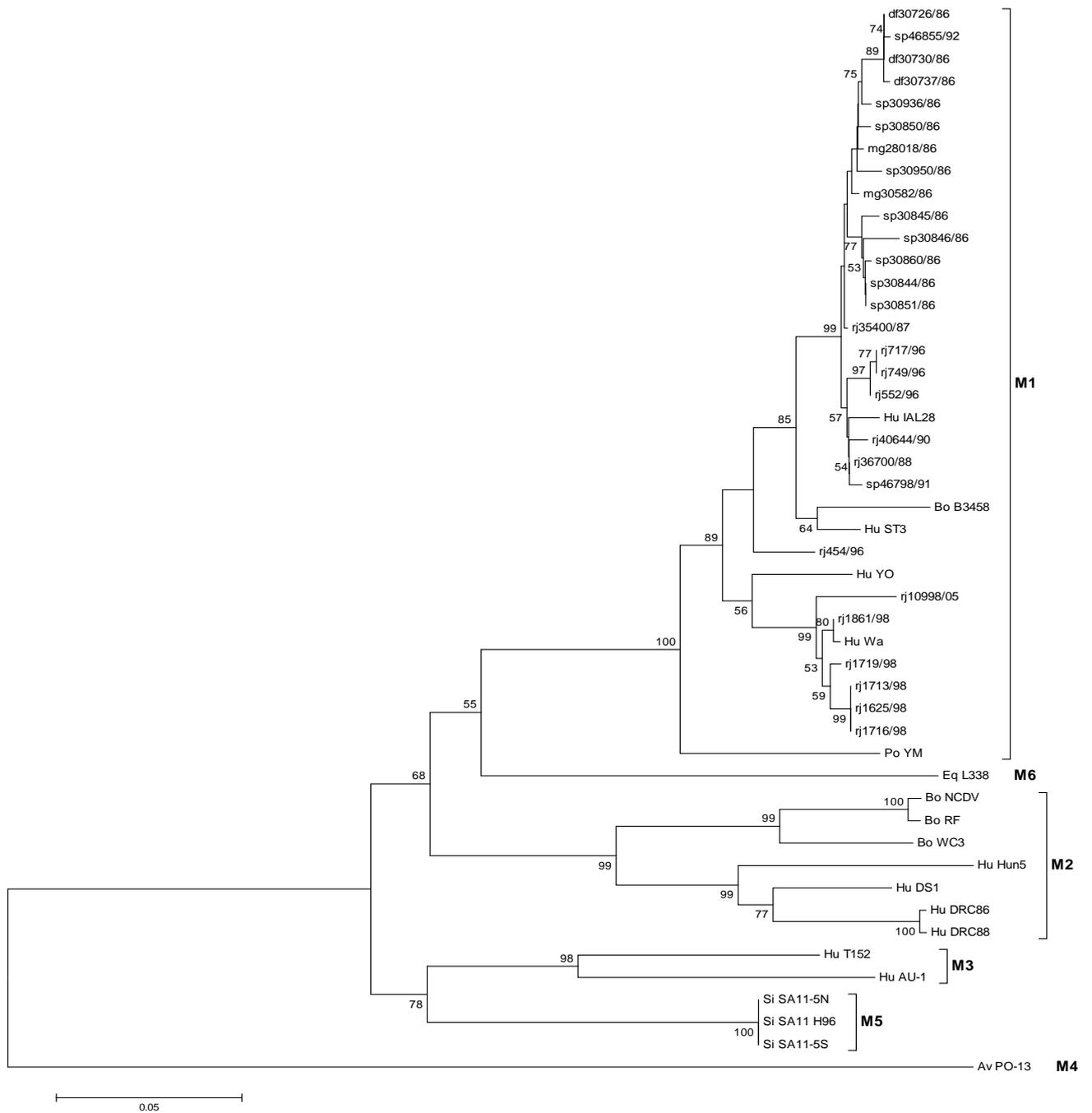


Figura 28 – Dendrograma representando a classificação das amostras do estudo dentro do grupo de diferentes genótipos de VP3^a. O método utilizado foi o de Neighbor-Joining com o modelo de reconstrução filogenética Kimura-dois-parâmetros. Os valores de *Bootstrap* (2000 réplicas) estão indicados nos nodos da árvore, os valores inferiores a 50% foram excluídos. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

^a - Matthijnssens *et al.*, 2008

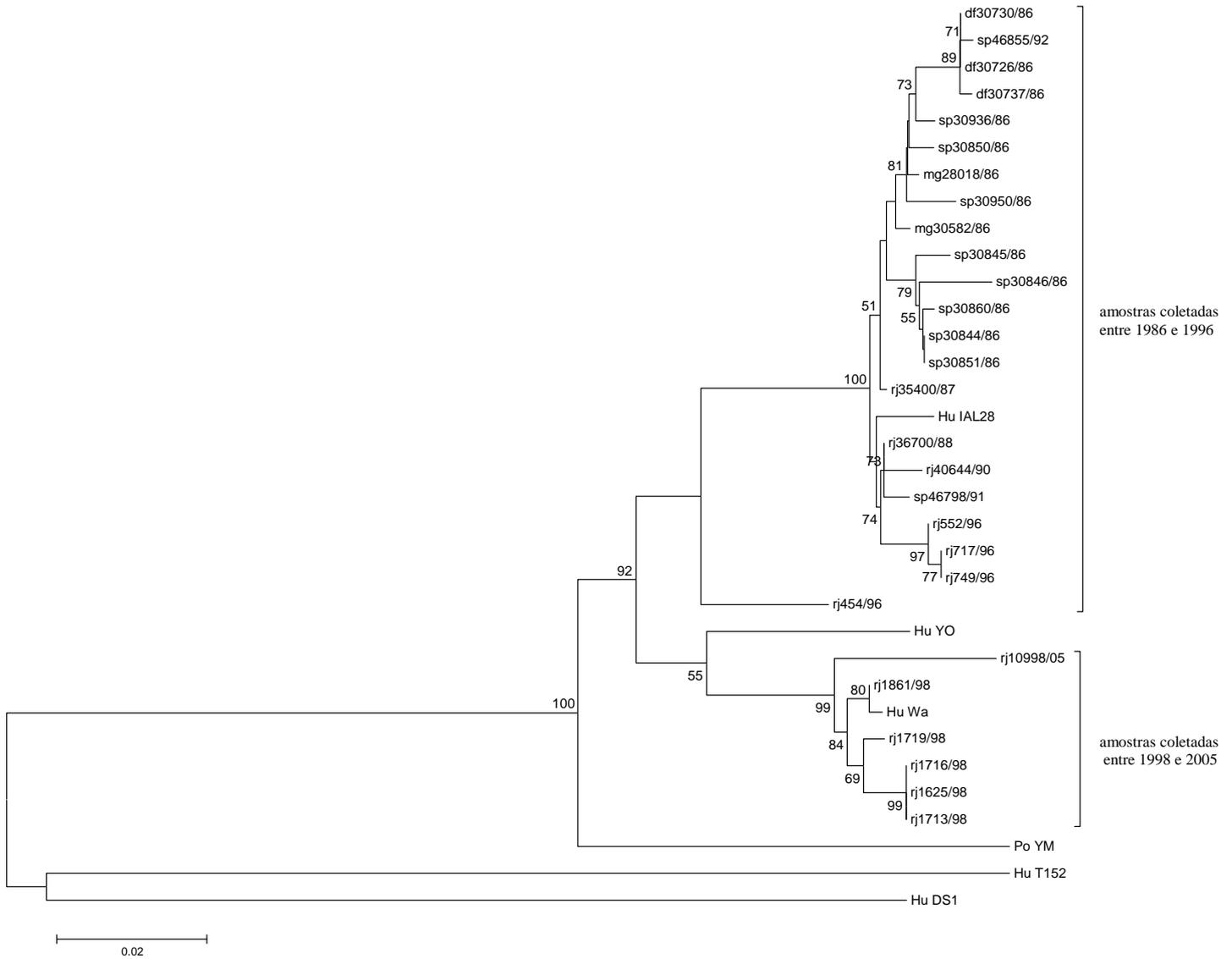


Figura 29 - Dendograma construído a partir da análise da sequência nucleotídica do gene de VP3 de amostras de RV-A genótipo G5P[8] e de amostras protótipos de RV-A representantes de diferentes genótipos humanos e animais. O método utilizado foi o de Neighbor-Joining com o modelo de reconstrução filogenética Kimura-dois-parâmetros. Os valores de Bootstrap (2.000 réplicas) estão indicados nos nodos da árvore, os valores inferiores a 50% foram excluídos. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

^a - Matthijnssens *et al.*, 2008

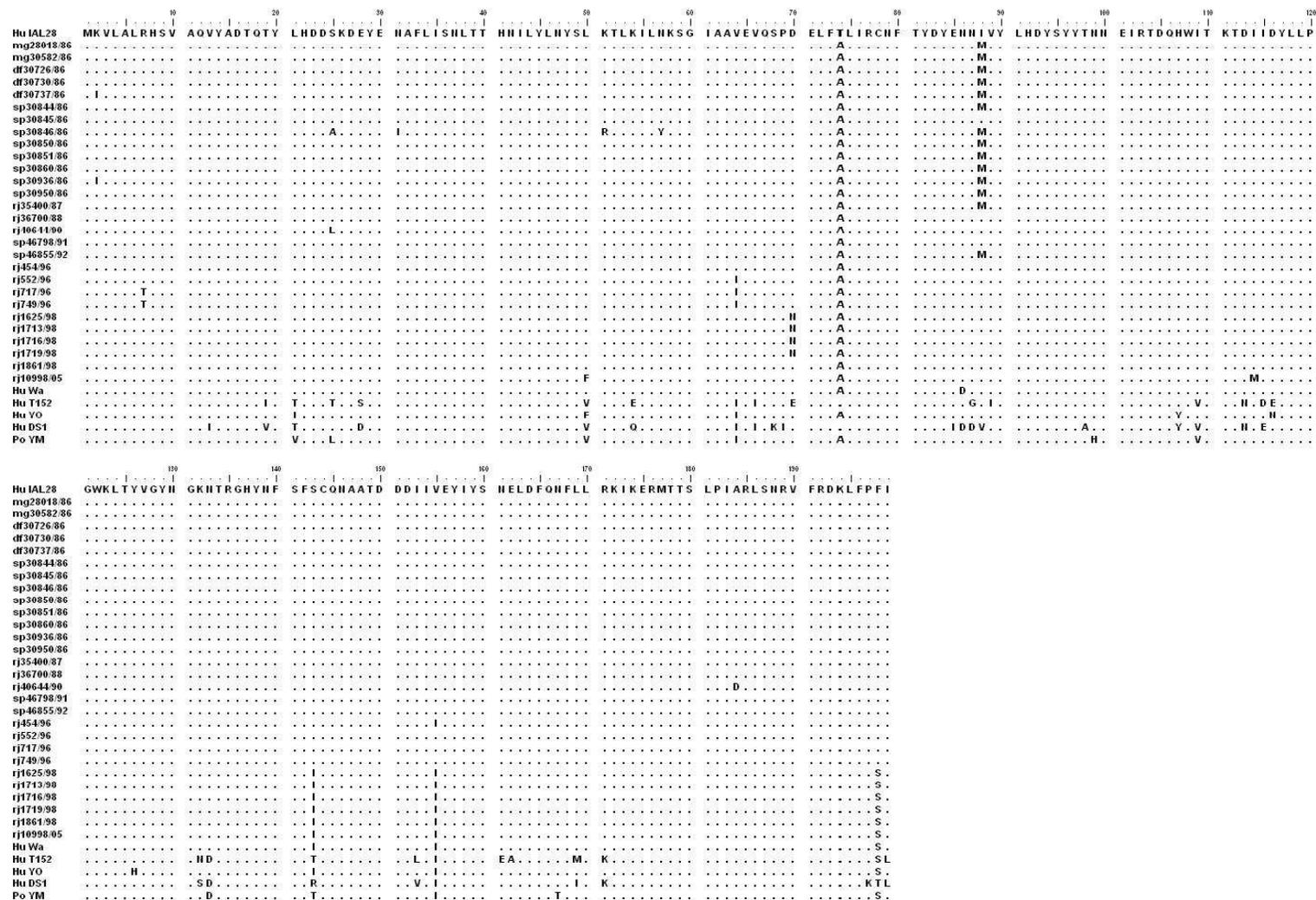


Figura 30 – Alinhamento das sequências parciais aminoacídicas do gene de VP3 das amostras do estudo e de amostras protótipo utilizadas na análise filogenética. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade do aminoácido com a amostra protótipo IAL28 (G5P[8]).

5.4.4. Análise do gene que codifica para a proteína VP4

A análise da sequência parcial do gene de VP4 das 28 amostras demonstrou que durante o período analisado, três linhagens de VP4 circularam em associação ao genótipo G5 no Brasil: P[8]-2 (amostras coletadas entre 1986 e 1990); P[8]-1 (amostras coletadas entre 1991-2005); e P[8]-3 (uma amostra coletada no Rio de Janeiro em 1996) (Figura 31). Na Tabela 7 está demonstrada a identidade nucleotídica e aminoacídica entre as amostras do estudo comparadas com protótipos. A matriz de identidade entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos de VP4 das amostras analisadas está demonstrada na Tabela 8. Pode-se observar que as amostras brasileiras coletadas até o ano de 1990 agruparam no mesmo *cluster* que as amostras protótipo Br 1054, Br H8, F45 e IAL28 com Bootstrap de 90%, todas pertencentes à linhagem P[8]-2. A maioria das amostras coletadas entre os anos de 1991 e 2005 agruparam no mesmo *cluster* das amostras protótipos de especificidade G1P[8]: Wa, L8 e PhiM, desta forma pertencendo à linhagem P[8]-1. A amostra 454, coletada no Rio de Janeiro em 1996, assim como as amostras protótipos B3458, MW279, OP351 e ITA-MAR37, pertence à linhagem P[8]-3 (Bootstrap de 100%).

O alinhamento das sequências aminoacídicas de VP4 das amostras analisadas, demonstrou a existência de mutações não-sinônimas em diferentes posições aminoacídicas. Na Figura 32 pode-se notar que muitas das substituições aminoacídicas observadas nas amostras analisadas nas posições: I35-R44, aa 38 (I→T) em todas as amostras, com exceção da amostra 30726, coletada em 1986 no Distrito Federal, aa 42 (I→M) nas amostras coletadas a partir do ano de 1991, com exceção da amostra 454, coletada no Rio de Janeiro em 1996; I55-D66, aa 56 (T→I/N), aa 63 (S→N) em todas as amostras, com exceção da amostra 30726, coletada em 1986 no Distrito Federal e V115-G123, aa 123 (S→G) na amostra 454, coletada no Rio de Janeiro em 1996. Outras substituições aminoacídicas foram observadas em posições que não representam nenhuma das regiões hiper-variáveis: 67 (N→S), 86 (V→I), 92 (Q→P), 113 (D→N), 139 (P→T), 140 (K→R), 141 (L→F), 151 (I→V) e 173 (D→N/G).

Tabela 7 – Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica entre as sequências parciais do gene de VP4 das amostras analisadas e amostras protótipos de diferentes genótipos de RV-A humanos e animais.

Amostras	% de identidade entre as amostras brasileiras deste estudo e protótipos:							
	Hu IAL28 ^a		Hu Wa ^b		Hu Br 1054 ^c		Hu B3458 ^d	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
mg28018/86	0,974	0,987	0,913	0,917	0,961	0,954	0,934	0,942
mg30582/86	0,974	0,987	0,913	0,917	0,961	0,954	0,934	0,942
df30726/86	0,995	1,000	0,896	0,909	0,939	0,942	0,922	0,938
df30730/86	0,972	0,983	0,915	0,921	0,963	0,958	0,935	0,946
df30737/86	0,969	0,979	0,915	0,917	0,965	0,962	0,931	0,942
sp30844/86	0,974	0,987	0,913	0,917	0,961	0,954	0,934	0,942
sp30845/86	0,974	0,987	0,913	0,917	0,961	0,954	0,934	0,942
sp30846/86	0,974	0,987	0,913	0,917	0,961	0,954	0,934	0,942
sp30850/86	0,974	0,987	0,913	0,917	0,961	0,954	0,934	0,942
sp30851/86	0,972	0,983	0,912	0,913	0,963	0,958	0,933	0,938
sp30860/86	0,975	0,987	0,912	0,917	0,960	0,954	0,933	0,942
sp30936/86	0,965	0,979	0,913	0,917	0,969	0,962	0,930	0,942
sp30950/86	0,964	0,979	0,912	0,917	0,971	0,962	0,928	0,942
rj35400/87	0,953	0,975	0,907	0,921	0,979	0,967	0,922	0,946
rj36700/88	0,986	0,987	0,905	0,921	0,949	0,954	0,931	0,950
rj40644/90	0,986	0,987	0,898	0,921	0,938	0,954	0,928	0,950
sp46798/91	0,952	0,958	0,941	0,950	0,934	0,938	0,926	0,938
sp46855/92	0,916	0,930	0,979	0,979	0,915	0,909	0,919	0,913
rj454/96	0,934	0,954	0,909	0,917	0,920	0,938	0,986	0,983
rj552/96	0,923	0,938	0,969	0,971	0,924	0,917	0,923	0,921
rj717/96	0,948	0,950	0,948	0,958	0,927	0,930	0,926	0,934
rj749/96	0,948	0,950	0,948	0,958	0,927	0,930	0,926	0,934
rj1625/98	0,928	0,942	0,967	0,967	0,927	0,921	0,928	0,925
rj1713/98	0,928	0,942	0,967	0,967	0,927	0,921	0,928	0,925
rj1716/98	0,937	0,954	0,959	0,954	0,935	0,934	0,937	0,938
rj1719/98	0,928	0,942	0,967	0,967	0,927	0,921	0,928	0,925
rj1861/99	0,919	0,934	0,976	0,975	0,918	0,913	0,922	0,917
rj10998/05	0,926	0,938	0,961	0,971	0,924	0,917	0,918	0,921

^a- Amostra IAL28: humana, genótipo G5P[8] isolada no ano 1992 no Brasil;

^b- Amostra Wa: humana, genótipo G1P[8], isolada nos Estados Unidos em 1974;

^c- Amostra Br 1054: humana, genótipo G5P[8], isolada no Brasil em 1996;

^d- Amostra B3458: humana, genótipo G9P[8], isolada na Bélgica em 2005.

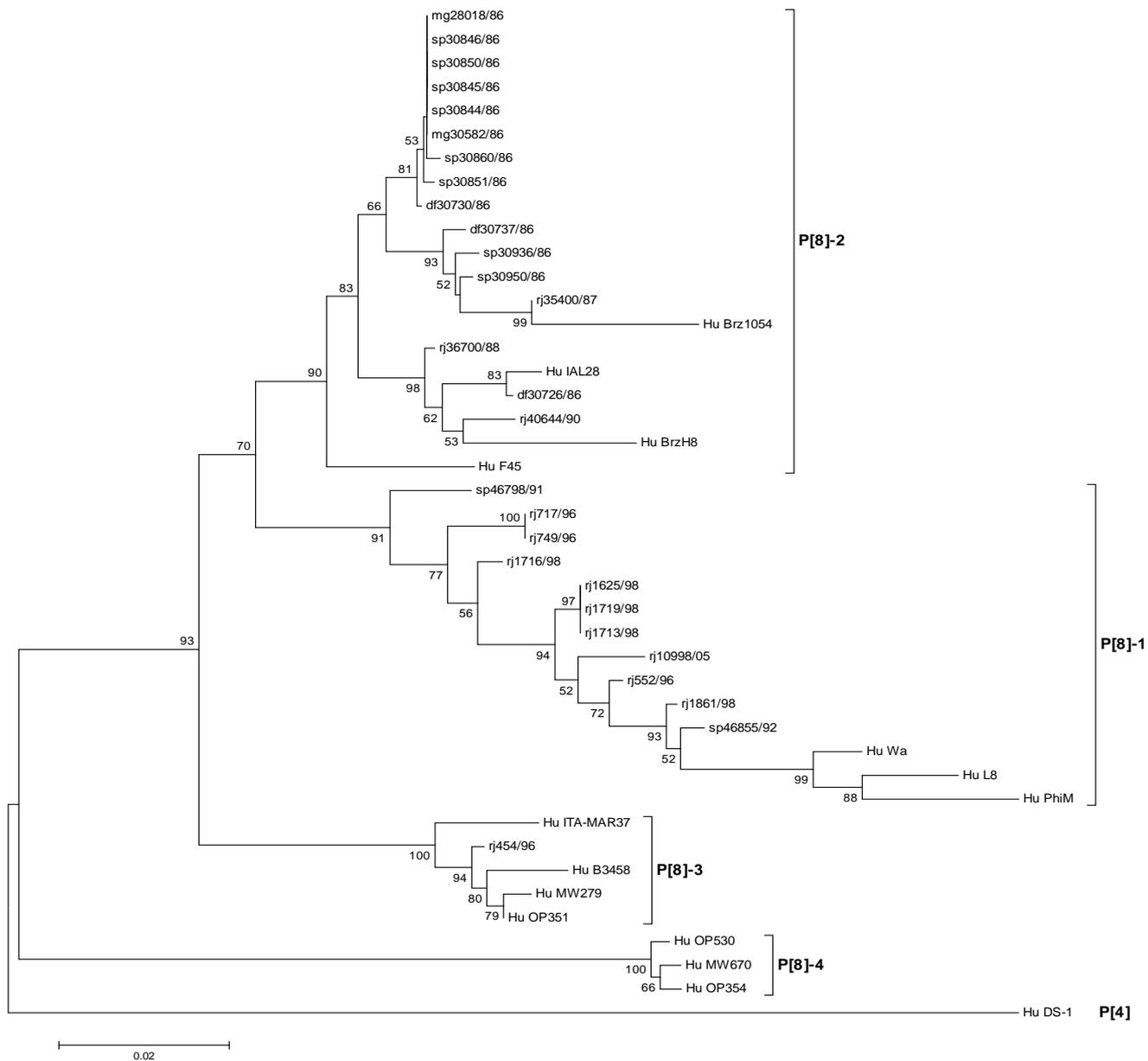


Figura 31 - Dendograma construído a partir da análise da sequência nucleotídica do gene de VP4 de amostras de RV-A genótipo G5P[8] e de amostras protótipos de RV-A representantes das quatro diferentes linhagens descritas do genótipo P[8]. O método utilizado foi o de Neighbor-Joining com o modelo de reconstrução filogenética Kimura-dois-parâmetros. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nodos da árvore, os valores inferiores a 50% foram excluídos. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Tabela 8 – Tabela apresentando a Percentagem de identidade^a nucleotídica e aminoacídica da sequência parcial de VP4 das amostras RV-A de genótipo G5P[8] analisadas

	28018	30582	30726	30730	30737	30844	30845	30846	30850	30851	30860	30936	30950	35400	36700	40644	46798	46855	454	552	717	749	1625	1713	1716	1719
28018		1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,97	0,94	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95
30582	1,00		0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,97	0,94	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95
30726	0,98	0,98		0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,96	0,93	0,95	0,94	0,95	0,95	0,94	0,94	0,95	0,94
30730	1,00	1,00	0,98		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,97	0,94	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,97	0,95
30737	0,99	0,99	0,97	0,99		0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	0,98	0,98	0,97	0,94	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95
30844	1,00	1,00	0,98	1,00	0,99		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,97	0,94	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95
30845	1,00	1,00	0,98	1,00	0,99	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,97	0,94	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95
30846	1,00	1,00	0,98	1,00	0,99	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,97	0,94	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95
30850	1,00	1,00	0,98	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,97	0,94	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95
30851	1,00	1,00	0,98	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,96	0,93	0,95	0,94	0,95	0,95	0,95	0,95	0,96	0,95
30860	1,00	1,00	0,98	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,97	0,94	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95
30936	0,99	0,99	0,97	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98		1,00	1,00	0,98	0,98	0,97	0,94	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95
30950	0,99	0,99	0,97	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00		1,00	0,98	0,98	0,97	0,94	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95
35400	0,98	0,98	0,96	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99		0,99	0,99	0,97	0,94	0,96	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,97	0,95
36700	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,97		1,00	0,97	0,94	0,97	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,97	0,95
40644	0,97	0,97	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,96	0,96	0,99		0,97	0,94	0,97	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,97	0,95
46798	0,96	0,96	0,95	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95		0,97	0,95	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98	0,99	0,98
46855	0,93	0,93	0,92	0,94	0,94	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,92	0,96		0,93	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99
454	0,94	0,94	0,93	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,93	0,92		0,94	0,95	0,95	0,94	0,94	0,95	0,94
552	0,94	0,94	0,92	0,95	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,93	0,93	0,97	0,99	0,93		0,99	0,99	1,00	1,00	0,98	1,00
717	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,94	0,95	0,95	0,98	0,97	0,93	0,98		1,00	0,99	0,99	1,00	0,99
749	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,94	0,95	0,95	0,98	0,97	0,93	0,98	1,00		0,99	0,99	1,00	0,99
1625	0,95	0,95	0,93	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,94	0,94	0,93	0,97	0,99	0,93	0,99	0,98	0,98		1,00	0,99	1,00
1713	0,95	0,95	0,93	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,94	0,94	0,93	0,97	0,99	0,93	0,99	0,98	0,98	1,00		0,99	1,00
1716	0,95	0,95	0,94	0,96	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,94	0,97	0,98	0,95	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99		0,99
1719	0,95	0,95	0,93	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,94	0,94	0,93	0,97	0,99	0,93	0,99	0,98	0,98	1,00	1,00	0,99	
1861	0,94	0,94	0,92	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,93	0,93	0,92	0,96	1,00	0,93	0,99	0,97	0,97	0,99	0,99	0,98	0,99
10998	0,94	0,94	0,93	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,93	0,97	0,98	0,93	0,99	0,97	0,97	0,98	0,98	0,98	0,98

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

5.4.5. Análise do gene que codifica para a proteína VP7

A análise da sequência parcial do gene que codifica para VP7 de todas as amostras em estudo demonstrou que as mesmas possuem elevada identidade entre elas e se agruparam no mesmo *cluster* das amostras brasileiras Br 1054, H8 e IAL28, com *bootstrap* de 100%. Sendo que as amostras coletadas até o ano de 1992 agruparam no mesmo *cluster* das amostras Br 1054 e Br H8 e as amostras coletadas após este período (1996-2005) agruparam no mesmo *cluster* da amostra IAL28 (Figura 33). Na tabela 9 está demonstrada a identidade nucleotídica e aminoacídica entre as amostras do estudo e algumas sequências de VP7 de amostras protótipos. A matriz de identidade entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos de VP7 das amostras analisadas está demonstrada na Tabela 10.

O alinhamento da sequência aminoacídica parcial do gene de VP7 demonstrou a existência de mutações não-sinônimas em diferentes posições da sequência de aminoácidos de VP7. Na Figura 34 foi demonstrado que a maioria das substituições aminoacídicas observadas nas amostras em estudo estão fora destas regiões hiper-varáveis, com exceção da substituição (P→S) na posição 240 da sequência de aminoácidos das amostras 30844 e 30855, coletadas em São Paulo no ano de 1986. Foram verificadas substituições aminoacídicas que só ocorreram em determinadas amostras coletadas no mesmo período e/ou no mesmo estado, entre elas: na posição aa 24, onde foi verificada uma substituição (A→T) em todas as amostras coletadas até o ano de 1992. Na posição aa 46, pode-se verificar uma substituição (A→V) nas três amostras coletadas no Distrito Federal em 1986. Nas posições aa 174, 187 e 199 substituições (T→A), (S→N) e (V→A), respectivamente, em todas as amostras coletadas até o ano de 1996.

Tabela 9 – Tabela apresentando a percentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica entre as sequências parciais do gene de VP7 das amostras analisadas e amostras protótipos de diferentes genótipos de RV-A humanos e animais.

Amostras	% de identidade entre as amostras brasileiras deste estudo e protótipos:							
	Hu IAL28 ^a		Hu Br 1054 ^b		Po OSU ^c		Po YM ^d	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
mg28018/86	0,986	0,984	0,787	0,788	0,873	0,921	0,798	0,886
mg30582/86	0,988	0,984	0,787	0,788	0,877	0,921	0,798	0,886
df30726/86	0,984	0,980	0,786	0,784	0,873	0,921	0,796	0,886
df30730/86	0,983	0,980	0,786	0,784	0,872	0,921	0,795	0,886
df30737/86	0,984	0,980	0,786	0,784	0,873	0,921	0,796	0,886
sp30844/86	0,984	0,976	0,786	0,784	0,871	0,913	0,798	0,890
sp30845/86	0,985	0,976	0,787	0,784	0,872	0,913	0,799	0,890
sp30846/86	0,986	0,980	0,787	0,784	0,873	0,917	0,798	0,886
sp30850/86	0,988	0,984	0,787	0,788	0,875	0,921	0,798	0,886
sp30851/86	0,986	0,980	0,787	0,784	0,873	0,917	0,798	0,886
sp30860/86	0,986	0,980	0,787	0,784	0,873	0,917	0,798	0,886
sp30936/86	0,989	0,984	0,789	0,788	0,876	0,921	0,799	0,886
sp30950/86	0,985	0,980	0,785	0,784	0,877	0,921	0,798	0,886
rj35400/87	0,986	0,968	0,785	0,784	0,873	0,905	0,796	0,870
rj36700/88	0,984	0,976	0,783	0,780	0,876	0,921	0,798	0,886
rj40644/90	0,989	0,980	0,783	0,784	0,876	0,917	0,800	0,882
sp46798/91	0,993	0,984	0,786	0,788	0,877	0,921	0,800	0,886
sp46855/92	0,988	0,972	0,786	0,788	0,875	0,909	0,798	0,874
rj454/96	0,988	0,976	0,779	0,776	0,873	0,917	0,798	0,878
rj552/96	0,988	0,980	0,777	0,776	0,873	0,921	0,799	0,882
rj717/96	0,993	0,984	0,783	0,784	0,877	0,921	0,799	0,878
rj749/96	0,985	0,976	0,774	0,772	0,873	0,917	0,796	0,878
rj1625/98	0,998	1,000	0,781	0,772	0,877	0,921	0,802	0,890
rj1713/98	0,997	0,992	0,779	0,772	0,876	0,921	0,800	0,886
rj1716/98	0,997	0,992	0,779	0,772	0,876	0,921	0,800	0,886
rj1719/98	0,997	0,992	0,779	0,772	0,876	0,921	0,800	0,886
rj1861/98	0,985	0,980	0,772	0,768	0,871	0,917	0,795	0,874
rj10998/05	0,970	0,968	0,759	0,764	0,861	0,909	0,785	0,870

^a- Amostra IAL28: humana, genótipo G5P[8] isolada no ano 1992 no Brasil;

^b- Amostra Br 1054: humana, genótipo G5P[8], isolada no Brasil em 1996;

^c- Amostra OSU: suína, genótipo G5P[7] isolada nos Estados Unidos em 1976;

^d- Amostra YM: suína, genótipo G11P[7], isolada no México em 1983.

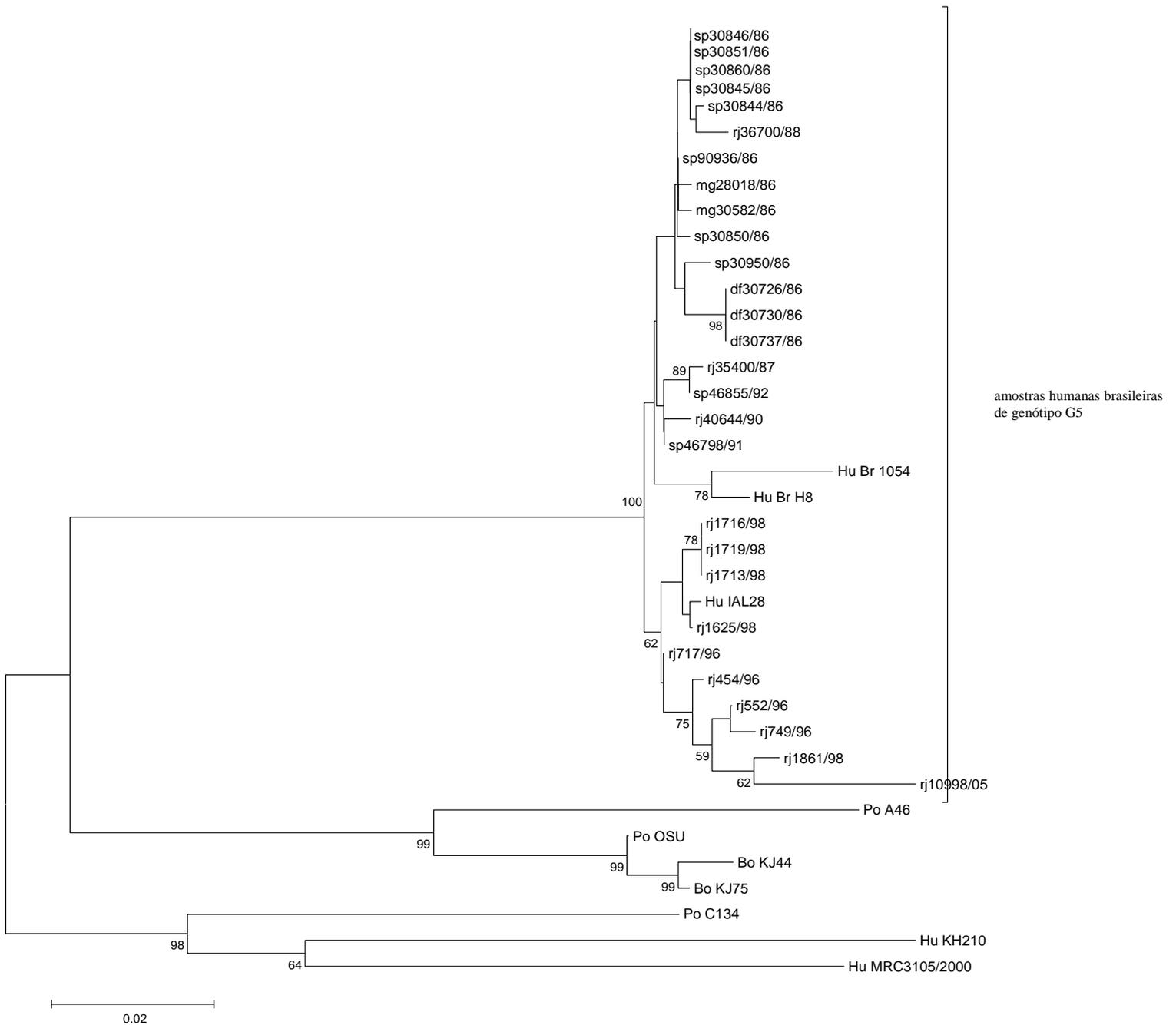


Figura 33 - Dendograma construído a partir da análise da sequência nucleotídica do gene de VP7 de amostras de RV-A genótipo G5P[8] e de amostras protótipos de RV-A de genótipo G5. O método utilizado foi o de Neighbor-Joining com o modelo de reconstrução filogenética Kimura-dois-parâmetros. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nodos da árvore, os valores inferiores a 50% foram excluídos. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Tabela 10 – Tabela apresentando a percentagem de identidade^a nucleotídica e aminoacídica da sequência parcial de VP7 das amostras RV-A de genótipo G5P[8] analisadas.

	28018	30582	30726	30730	30737	30844	30845	30846	30850	30851	30860	30936	30950	35400	36700	40644	46798	46855	454	552	717	749	1625	1713	1716	1719
28018		1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,98	0,99	1,00	1,00	0,99	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
30582	1,00		1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,98	0,99	1,00	1,00	0,99	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
30726	0,99	0,99		1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	0,98	0,99	0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
30730	0,99	0,99	1,00		1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	0,98	0,99	0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
30737	0,99	0,99	1,00	1,00		0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	0,98	0,99	0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
30844	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99		1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
30845	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00		1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
30846	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,98	1,00	0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
30850	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99		1,00	1,00	1,00	1,00	0,98	0,99	1,00	1,00	0,99	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
30851	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99		1,00	1,00	0,99	0,98	1,00	0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
30860	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00		1,00	0,99	0,98	1,00	0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
30936	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	0,98	0,99	1,00	1,00	0,99	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
30950	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00		0,98	0,99	0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
35400	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99		0,98	0,98	0,98	1,00	0,98	0,97	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97
36700	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98		0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
40644	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99		1,00	0,98	0,99	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98
46798	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00		0,99	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
46855	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99		0,98	0,98	0,99	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97
454	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99		0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98
552	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99		0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
717	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99		0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
749	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99	1,00	0,99		0,98	0,98	0,98	0,98
1625	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98		0,99	0,99	0,99
1713	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00		1,00	1,00
1716	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00		1,00
1719	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	
1861	0,98	0,98	0,98	0,97	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,99	0,98	0,99	0,99
10998	0,96	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,97	0,96	0,96	0,97	0,96	0,96	0,96	0,97	0,97	0,97	0,98	0,98	0,97	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97

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

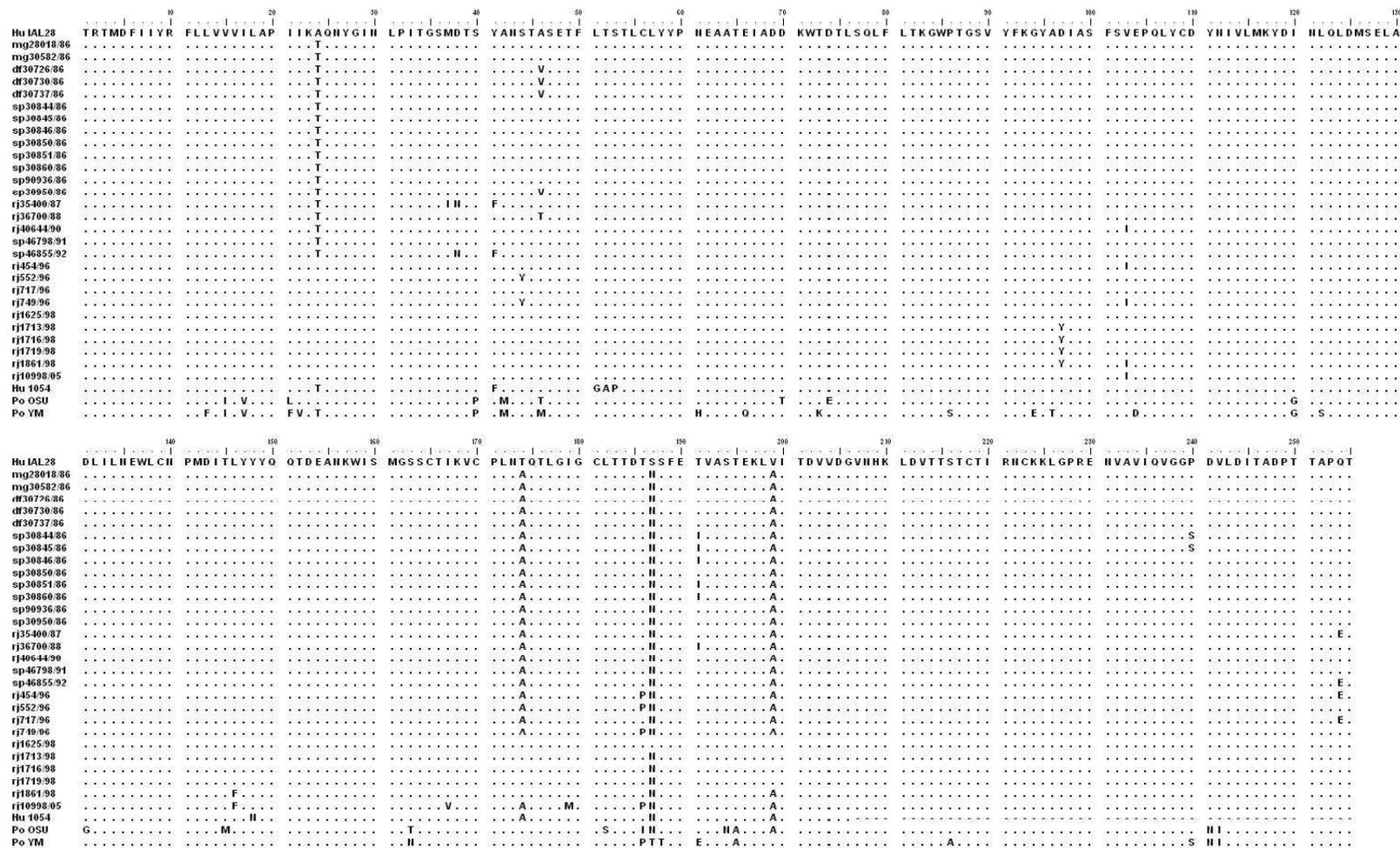


Figura 34 – Alinhamento das sequências parciais aminoacídicas do gene de VP7 das amostras do estudo e de amostras protótipos utilizadas na análise filogenética. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade do aminoácido com a amostra protótipo IAL28 (G5P[8]).

6. DISCUSSÃO

Os RV-A representam a principal causa de diarreia associada à desidratação em crianças de até cinco anos de idade e a prevenção por meio da vacinação parece ser a medida mais eficaz no controle das formas mais graves da doença. Para isso, fazem-se necessárias investigações sobre a distribuição e prevalência dos genótipos de RV-A em programas de vigilância epidemiológica em diferentes países (Santos & Hoshino, 2005; Araújo *et al.*, 2007; Mascarenhas *et al.*, 2007, Leite *et al.*, 2008; Carvalho-Costa *et al.*, 2009). O monitoramento dos genótipos que estão infectando uma população em determinado momento possibilita avaliar a eficácia de uma vacina que visa diminuir a morbidade e os custos associados aos atendimentos médicos e hospitalizações das crianças.

Em decorrência da natureza segmentada do genoma de RV-A (RNAfd), encontram-se atualmente descritos quatro mecanismos de geração de variabilidade genética e evolução destes vírus: mutação pontual, *reassortment*, rearranjos genéticos e recombinação genética. As mutações pontuais permitem a geração de novas linhagens e sublinhagens dentro dos diferentes genótipos de RV-A, os *ressortments*, mediante a troca de segmentos com amostras de origem animal permitem a transmissão interespecie e possível geração de novas amostras virais (Estes & Kapikian, 2007). No presente estudo, pesquisamos a possibilidade de ocorrência destes dois últimos mecanismos de evolução dos RV-A em amostras de genótipo G5P[8] que circulou no Brasil entre 1986 e 2005. Estes mecanismos evolutivos foram pesquisados para cinco genes que codificam para as proteínas estruturais VP1, VP2, VP3, VP4, e VP7.

Leite e colaboradores (2008), através de pesquisa na literatura, descreveram a diversidade de genótipos de RV-A circulantes no Brasil em dois períodos pré-vacinais compreendidos entre 1982-1995 e 1996-2005, de modo que as combinações mais frequentemente encontradas foram: G1P[8]/G1P[?] (43%), G9P[8]/ G9P[?] (20%), G2P[4]/G2P[?] (9%), G3P[8]/ G3P[?] (6%), G4P[8]/ G4P[?] (4%) e G5P[8]/ G5P[?] (4%). Vale destacar que todas as amostras analisadas no presente estudo estão compreendidas nestes dois períodos pré-vacinais e que o genótipo G5 foi incluído nesta lista por ter sido frequentemente detectado durante as décadas de 80 e início de 90. Ele tem origem animal, sendo detectado principalmente em suínos (Kapikian *et al.*, 2001).

Alfieri e colaboradores (1996) caracterizaram duas amostras de genótipo G5P[8] como híbridos humano-animal, apresentando gene que codifica para a proteína VP7 de origem suína e gene que codifica para a proteína VP4 de origem humana. Estas amostras foram utilizadas nas análises de VP4 e VP7 do presente estudo (Br H8 e Br 1054). Através de análises de

hibridização RNA-RNA eles demonstraram que os genes que codificam para as proteínas VP1, VP2 e VP3 destas amostras pertencem ao genogrupo Wa-like, assim como os achados do presente estudo. Deve-se ressaltar que existem poucos dados na literatura referentes a análises moleculares de amostras de genótipo G5.

No Brasil, o genótipo G5 foi descrito pela primeira vez por Gouvea e colaboradores (1994) entre crianças com diarreia e posteriormente detectados em casos de diarreia infantil em diferentes ocasiões (Leite *et al.*, 1996; Timenetsky *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1999; Araújo *et al.*, 2002; Carmona *et al.*, 2004). No entanto, deixou de apresentar caráter endêmico aproximadamente em 1996, coincidindo com a grande detecção do genótipo G9, levando-se a crer que houve uma substituição do genótipo G5 pelo genótipo G9. Posteriormente G5 voltou a ser detectado, em humanos, em alguns países: Camarões (Esona *et al.*, 2009), Bangladesh (Hashizume *et al.*, 2008), China (Duan *et al.*, 2007), Brasil (Carvalho-Costa *et al.*, 2007) e Vietnã (Ahmed *et al.*, 2007). Ainda não se sabe por que o genótipo G9 substituiu o G5 de maneira tão efetiva, nem se os genes que codificam para as proteínas estruturais e não-estruturais estão inseridos neste processo, sendo ainda necessários mais estudos envolvendo o sequenciamento completo do genoma de amostras de RV-A de genótipo G9 e G5 para que se possa compreender este processo.

As sequências parciais do gene de VP7 das amostras analisadas demonstraram uma grande similaridade entre elas e entre amostras protótipos brasileiras IAL28, Br H8 e Br 1054 (Alfieri *et al.*, 1996), formando um grupo separado dos isolados de origem suína (OSU e A46) e bovina (KJ75 e KJ44) e outras amostras de genótipo G5 de origem humana, como a KH210, isolada no Vietnã e a amostra do país de Camarões MRC3205/2000 e a amostra suína C134. Isto pode ser um indicativo de que as amostras humanas de genótipo G5 encontradas na África e Ásia tem uma origem distinta das amostras humanas brasileiras de genótipo G5. As amostras analisadas neste estudo formaram dois principais *clusters*: - um contendo amostras coletadas até o ano de 1992, juntamente com as amostras Br1054 e BrH8, correspondendo, segundo Leite e colaboradores (2008) ao primeiro período pré-vacinal, - e outro *cluster* contendo as amostras coletadas entre 1996 e 2005 (segundo período pré-vacinal) e a amostra protótipo IAL28. Estes resultados podem sugerir a existência de uma elevada diversidade genética entre os genes de VP7 de genótipo G5, com possíveis diferentes linhagens, porém são necessárias análises com mais amostras protótipos para que esta hipótese possa ser afirmada.

Estudos analisando sequências de aa do gene que codifica para VP7 culminaram no mapeamento de nove regiões hiper-variáveis (VR1-VR9) em diferentes genótipos de RV-A, sendo quatro destas regiões consideradas sítios antigênicos desta proteína: região A (aa 87 –

101), região B (aa 143 – 152), região C (aa 208 – 223) e região F (aa 235 – 242) (Ciarlet *et al.*, 1997; Dyall-Smith *et al.*, 1986; Kirkwood *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 1991b). Através da análise do alinhamento das sequências de aa das amostras analisadas no estudo e amostras protótipos, podem ser visualizadas mutações não-sinônimas em regiões variáveis e sítios antigênicos previamente descritos, além de mutações fora destas regiões, o que evidencia a grande diversidade genética destas amostras, reforçando a hipótese de que possam existir diferentes linhagens do gene VP7 de genótipo G5.

Atualmente, encontram-se descritas na literatura quatro linhagens distintas do genótipo P[8], baseados em estudos filogenéticos do gene de VP4 em diferentes genótipos de RV-A (Arista *et al.*, 2005; Cunliffe *et al.*, 2001; Gouvea *et al.*, 1999). De acordo com os presentes resultados, durante os 19 anos que as amostras de genótipo G5P[8] circularam no Brasil, foi possível evidenciar a ocorrência de três distintas linhagens de P[8]. As amostras coletadas até o ano de 1990 agruparam juntamente num *cluster* contendo as amostras protótipo IAL28, Br 1054 e Br H8, sendo todas classificadas como P[8]-2. As amostras coletadas no período compreendido entre 1991 e 2005 foram, quase na totalidade, classificadas como P[8]-1, se agrupando juntamente com amostras protótipos Wa, PhiM e L8. Uma exceção foi a amostra 454, que foi coletada no Rio de Janeiro em 1996, e que se agrupou juntamente com amostras protótipos humanos B3458, MW279, ITA-MAR37 e OP351 (bootstrap de 100%), sendo, portanto classificada como P[8]-3, assim como as referidas amostras protótipos. Segundo Tort, L.F.L, todas as amostras analisadas em sua dissertação de mestrado (análise de genes de NSP1, NSP3, NSP5, VP4 e VP7 de amostras de genótipo G9P[8] coletadas em diferentes estados brasileiros entre os anos de 1998 à 2005), em relação ao gene de VP4, foram todas classificadas como pertencentes da linhagem [P8]-3, o que pode sugerir um possível início de entendimento sobre o processo de substituição do genótipo G5 pelo G9, já que todas as amostras G9 mostraram associação com P[8]-3 e a amostra do Rio de Janeiro, 454 do presente estudo agrupou juntamente com amostras de genótipo G9. Porém novas análises serão realizadas para que se possa comparar os genes destas amostras com amostras protótipos disponíveis no GenBank e amostras do presente estudo e assim se avaliar se o processo de substituição de G5 por G9 foi possibilitado pelo gene que codifica para a proteína VP4.

Foram descritos por Kovacs-Nolan e colaboradores (2003), cinco epítomos de neutralização dentro da subunidade VP8 da proteína VP4, localizados nas posições aminoacídicas M1-L10, I35-R44, I55-D66, V115-G123 e L223-P234. A análise do alinhamento das sequências parciais de VP4 das amostras do estudo e amostras protótipos demonstrou a elevada heterogeneidade genética entre as sequências de VP4 das amostras.

Foram detectadas mutações não-sinônimas em diferentes posições aminoacídicas, algumas delas localizadas dentro das regiões hiper-variáveis descritas por Kovacs-Nolan e colaboradores (2003).

Recentemente, Matthijssens e colaboradores (2008a), sequenciaram o genoma completo de 53 amostras utilizadas como padrões (protótipos) para os diferentes genótipos de RV-A animais e humanos. Mediante a análise filogenética dos genes que codificam as proteínas estruturais internas (VP1, VP2 e VP3) e não-estruturais (NSPs), foi evidenciado um consistente padrão evolutivo entre os RV-A de origem humana e animal (RV-A humanos *Wa-like* e os RV-A suínos; e RV-A humanos *DS-I-like* e os RV-A bovinos). Baseados nos resultados obtidos, estes autores propuseram um novo sistema de classificação para as amostras de RV-A, tendo como base as propriedades moleculares dos 11 segmentos de RNAfd, possibilitando a identificação de genótipos distintos, que provavelmente poderiam ter evoluído em momentos diferentes, além de transmissões interespecies e eventos de *reassortments* (Matthijssens *et al.*, 2008b). Com base nesta nova classificação, as 28 amostras analisadas foram classificadas dentro do genótipo R1 para o gene VP1; genótipo C1 para o gene VP2; e genótipo M1 para o gene VP3.

A maioria dos dados disponíveis na literatura são referentes aos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7, entretanto a investigação dos outros genes, como VP1, VP2, e VP3 são importantes para que se possa pesquisar eventos de *ressortment*, mutações pontuais, ou qualquer outro mecanismo gerador de variabilidade genética entre amostras de RV-A, devido a suas participações significativas, na patogênese, replicação, regulação da tradução e morfogêneses viral (Estes & Kapikian, 2007).

Existem poucos dados na literatura sobre a caracterização molecular e as funções das proteínas formadoras do core viral de amostras de RV-A que circulam endemicamente. Sabe-se que a proteína VP1 (RNA-polimerase RNA-dependente viral) possui atividade de replicase e transcriptase, desta forma catalisando a formação do RNAm e do genoma viral (RNAfd), respectivamente (Heiman *et al.*, 2008). Foi descrito também que, entre as proteínas do *core*, a VP1 é a única que possui uma sequência específica de reconhecimento ao RNA viral, através de regiões conservadas de quatro bases, UGUG, na sua sequência 3' (Lu *et al.*, 2008), porém não se sabe que regiões da sequência de VP1 são responsáveis por este reconhecimento específico; assim como as suas regiões (motivos) de interação proteína-proteína (Vásquez *et al.*, 2006). No intuito de se obter mais dados sobre esta proteína, foi analisada a sequência nucleotídica parcial deste gene das 28 amostras (G5P[8]) deste estudo. Pode-se constatar que a sequência do gene de VP1 de cada uma das 28 amostras é de origem humana e que todas

são classificadas como pertencentes ao genótipo R1 (*RNA-dependent RNA polymerase*), segundo o novo sistema de classificação proposto por Matthijnssens e colaboradores (2008b). O dendograma construído a partir da análise destas sequências demonstrou a formação de dois diferentes *clusters* entre as amostras analisadas, com valor de *bootstrap* de 100%. No primeiro *cluster* estão contidas as amostras coletadas no período compreendido entre 1986 e 1996 e a amostra protótipo brasileira humana IAL28 (G5P[8]). No segundo, as amostras coletadas no período de 1998-2005 agrupando com amostras protótipo humanas Wa (G1P[8]), D (G1P[8]), Hosokawa (G4P[8]) e ST-3 (G4P[6]). Deve-se ressaltar a larga distância genética entre as amostras analisadas e as amostras protótipo de origem suína como a YM e a Gottfried e a humana DS-1 (grupo externo).

A análise do alinhamento das sequências de aa do gene de VP1 das amostras do estudo com amostras protótipos demonstra a existência de mutações não-sinônimas em determinadas posições no grupo das amostras coletadas no mesmo período. Estes resultados sugerem a existência de certa diferenciação genética de ordem temporal com relação a sequência do gene de VP1. Serão necessários mais dados sobre a caracterização molecular do gene de VP1 para que se possa afirmar essa hipótese.

Assim como em VP1, existe uma carência de estudos filogenéticos sobre a caracterização molecular dos genes da proteína VP2 de RV-A. Foi descrito que ela desempenha um papel fundamental na estrutura e na atividade do core viral, como por exemplo, interage com trímeros da proteína de VP6, que circunda o core viral, transportando metabólitos e RNAm durante a transcrição. Além disso, VP2 faz parte do complexo de replicação viral e liga-se tanto à VP1 quanto à VP3 através de um domínio na sua porção N-terminal. Esta interação VP2/VP1/VP3 é crítica na replicação e transcrição do genoma viral (Heiman *et al.*, 2008). Labbé e colaboradores (1994) descreveram que o domínio de ligação do ácido nucléico na sequência do gene de VP2 está localizado entre os aminoácidos 1 e 132, região esta contida no sequenciamento parcial de VP2 realizado no presente estudo (sequenciamento entre os aminoácidos 1 e 209).

Analisando as sequências parciais de VP2 das amostras em estudo, pode-se constatar que todas pertencem ao genótipo C1 (*Core Protein*), segundo o novo sistema de classificação de RV-A (Matthijnssens *et al.*, 2008b) e que todas as sequências são de origem humana. A análise do dendograma construído a partir da análise destas sequências demonstrou a formação de três *clusters* entre as amostras analisadas. No primeiro *cluster* agruparam-se as amostras coletadas até o ano de 1992. Segundo Leite e colaboradores (2008) estas amostras pertencem ao primeiro período pré-vacinal. No segundo *cluster* pode-se verificar o agrupamento das amostras coletadas no período compreendido entre 1996 e 2005 (segundo

período pré-vacinal) e no terceiro *cluster* duas amostras coletadas em 1998 no Rio de Janeiro (1719 e 1861) e amostras protótipos humanas Wa (G1P[8]), YO (G3P[8]) e IAL28 (G5P[8]). Deve-se ressaltar a grande distância genética verificada entre as amostras analisadas e a amostra protótipo de origem suína HP140 e a humana RMC321.

Ainda com relação a VP2, nas amostras coletadas no Distrito Federal em 1986, três amostras coletadas no Rio de Janeiro nos anos de 1987, 1988 e 1990 (35400, 36700 e 40644, respectivamente) e duas amostras coletadas em São Paulo (46798/91 e 46855/92), pode-se detectar a ocorrência de um ácido glutâmico (E) na posição 21 desta proteína (dentro do domínio de ligação do ácido nucléico), ao passo que as demais amostras do estudo não possuem, corroborando com os achados de Heiman e colaboradores (2008), onde foi demonstrada a existência de regiões de inserções/deleções na porção inicial da sequência de VP2 de amostras protótipos de diferentes genótipos.

Embora o papel da proteína VP3 na morfogênese dos RV-A ainda não tenha sido totalmente elucidado, vários estudos vem demonstrando suas atividades guanilil e metiltransferase (Fresco *et al.*, 1994; Patton, 1995; Subodh *et al.*, 2006). Dados sobre a caracterização molecular do gene de VP3 ainda são bastante limitados. Cook e colaboradores (2004) observaram uma grande similaridade entre as sequências deste gene entre as amostras humanas, mas baixa homologia de sequências quando em comparação com amostras animais. Analisando as sequências parciais de VP3 das 28 amostras (G5P[8]) do estudo, pode-se constatar que todas pertencem ao genótipo M1 (*Methyltransferase*), segundo o novo sistema de classificação de RV-A (Matthijssens *et al.*, 2008b) e que assim como as outras duas proteínas constituintes do core viral de RV-A, todas as sequências são de origem humana.

A análise do dendograma construído das sequências nucleotídicas que codificam para a proteína VP3 das amostras estudadas demonstrou a formação de dois diferentes *clusters*. Assim como na análise do dendograma do gene de VP1, no primeiro *cluster* agruparam-se as amostras coletadas até o ano de 1996 juntamente com a amostra protótipo IAL28 (G5P[8]). No segundo *cluster* agruparam-se as amostras coletadas entre 1998 e 2005 e amostras protótipo humanas Wa (G1P[8]) e YO (G3P[8]). As sequências do estudo demonstraram uma elevada distância genética da amostra protótipo suína YM e humanas T152 (G12P[9]) e DS-1 (G2P[4]).

A análise do alinhamento das sequências de aa do gene de VP3 das amostras do estudo comparando com protótipos demonstra a existência de mutações não-sinônimas em várias posições das sequências analisadas, por exemplo a substituição de (T→A) na posição 74 e a substituição de (S→I) e (V→I) nas posições 143 e 155, respectivamente (amostras coletadas entre os períodos de 1998 e 2005). Estes resultados sugerem a existência de certa diferenciação

genética de ordem temporal entre sequências do gene de VP3 das amostras, porém ainda são necessários mais dados sobre a caracterização molecular deste gene para que se possa afirmar esta hipótese.

No presente trabalho foram identificadas varias mutações não-sinônimas acontecendo ao longo dos cinco genes analisados, contudo, a influência destas mutações na estrutura tridimensional da proteína e sua possível atividade na função das mesmas ainda devem ser estudadas.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram os dados apresentados por Heiman e colaboradores (2008), onde foi descrito que os genes que codificam para as proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3 de RV-A de uma amostra parecem invariavelmente, pertencer ao mesmo genótipo. Por outro lado nos levam a questionamentos sobre as possíveis ocorrências de pressões seletivas intrínsecas influenciando a diversidade de RV-A. Entre as quais poderiam ser elaboradas as seguintes questões: Podem as proteínas de RV-A de diferentes genótipos funcionarem em associação com proteínas de RV-A de outros genótipos e ainda sim gerar uma partícula viral infectiva? Quais as mutações não-sinônimas específicas responsáveis pela classificação de uma determinada amostra dentro do genótipo 1, 2 ou 3? Estas mutações se localizam em regiões de interação proteína-proteína destes genes?

O potencial efeito de novas variantes virais de RV-A, assim como as possíveis mudanças antigênicas decorrentes de mutações genéticas, podem acarretar em alterações e até mesmo na perda de efetividade das vacinas contra RV-A. Portanto, como recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o monitoramento da diversidade genética de amostras de RV-A circulantes, particularmente para prever a possível emergência, re-emergência, como por exemplo, o genótipo G5, e o surgimento de novos genótipos após a introdução de uma vacina contra RV-A nos diferentes continentes do mundo é uma necessidade constante. Além disso, são fundamentais estudos como este apresentado para que se possa elucidar o processo de evolução dos diferentes genótipos de RV-A, particularmente os híbridos humanos-animais. O sequenciamento de todos os genes de tais amostras poderá resultar em conclusões que irão determinar quais genes estão envolvidos nos processos de restrição ao hospedeiro, replicação e virulência dos RV-A.

7. CONCLUSÕES

- ❖ Mediante a análise filogenética dos genes que codificam para as proteínas VP1, VP2, e VP3 das 28 amostras analisadas neste estudo as mesmas foram classificadas dentro dos genótipos R1, C1, e M1, respectivamente.
- ❖ Não se verificou a ocorrência de eventos de *reassortment* entre genes humanos e animais nas 28 amostras analisadas, em nenhum dos cinco genes estudados, sendo todos de origem humana;
- ❖ Análise filogenética dos genes que codificam para as proteínas VP4 demonstrou que durante o período compreendido entre 1986 e 2005, circularam três linhagens distintas do genótipo P[8] (P[8]-1, P[8]-2, e P[8]-3) em associação com o genótipo G5;
- ❖ Algumas das mutações detectadas entre as sequências foram verificadas em regiões hipervariáveis do segmento gênico, porém ainda não se sabe se estas mutações influenciam na interação proteína-proteína destes genes;
- ❖ Parece ocorrer uma diversidade entre os genes de VP1, VP2 e VP3 de ordem temporal, onde amostras coletadas na década de 80 e início de 90 tendem a formar um determinado cluster com a amostra protótipo IAL28 (G5P[8]). As amostras coletadas de 1998 até 2005, por outro lado formam outro *cluster*, com amostras protótipos Wa (G1P[8]), D (G1P[8]), WI61 (G9P[8]), entre outros, os quais foram genótipos predominantes no Brasil neste período (segundo período pré-vacinal).

8. PERSPECTIVAS

- ❖ Amplificar, sequenciar e realizar a caracterização molecular dos demais genes das amostras de RV-A de genótipo G5P[8] analisadas no presente estudo, para que se tenha uma completa identificação da constelação de genes destas amostras;
- ❖ Analisar os genes de VP4 das amostras de genótipo G9P[8] disponíveis no Banco de Dados do LVCA para que se possa analisar como ocorreu o processo de substituição do genótipo G5 pelo G9 e como esse processo se deu com tanta eficiência;
- ❖ Analisar eventuais amostras de genótipo G5P[8] que sejam enviadas para o LVCA, para que se possam comparar eventuais mudanças nos genes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, K., Anh, D. D., and Nakagomi, O. (2007). Rotavirus G5P[6] in child with diarrhea, Vietnam. *Emerg Infect Dis* **13**(8), 1232-5.
- Alfieri, A. A., Leite, J. P., Nakagomi, O., Kaga, E., Woods, P. A., Glass, R. I. & Gentsch, J. R. (1996). Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. *Arch Virol* **141**, 2353-2364.
- Araujo, I. T., Assis, R. M., Fialho, A. M., Mascarenhas, J. D., Heinemann, M. B. & Leite, J. P. (2007a). Brazilian P[8],G1, P[8],G5, P[8],G9, and P[4],G2 rotavirus strains: nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *J Med Virol* **79**, 995-1001.
- Araujo, I. T., Ferreira, M. S., Fialho, A. M., Assis, R. M., Cruz, C. M., Rocha, M. & Leite, J. P. (2001). Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* **39**, 1999-2001.
- Araujo, I. T., Fialho, A. M., de Assis, R. M., Rocha, M., Galvao, M., Cruz, C. M., Ferreira, M. S. & Leite, J. P. (2002). Rotavirus strain diversity in Rio de Janeiro, Brazil: characterization of VP4 and VP7 genotypes in hospitalized children. *J Trop Pediatr* **48**, 214-218.
- Araujo, I. T., Heinemann, M. B., Mascarenhas, J. D., Assis, R. M., Fialho, A. M. & Leite, J. P. (2007). Molecular analysis of the NSP4 and VP6 genes of rotavirus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol* **56**, 854-859.
- Arias, C. F., Dector, M. A., Segovia, L., Lopez, T., Camacho, M., Isa, P., Espinosa, R., and Lopez, S. (2004). RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res* **102**(1), 43-51.
- Arnoldi, F., Campagna, M., Eichwald, C., Desselberger, U. & Burrone, O. R. (2007). Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. *J Virol* **81**, 2128-2137.
- Beards, G., Xu, L., Ballard, A., Desselberger, U., and McCrae, M. A. (1992). A serotype 10 human rotavirus. *J Clin Microbiol* **30**(6), 1432-5.

Bellamy, A.R. & Both, G.W. (1990). Molecular biology of rotaviruses. *Adv. Virus Res.* 38 :1-43.

Bernstein, D. I., Smith, V. E., Sander, D. S., Pax, K. A., Schiff, G. M., and Ward, R. L. (1990). Evaluation of WC3 rotavirus vaccine and correlates of protection in healthy infants. *J Infect Dis* 162(5), 1055-62.

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

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

Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H. & Ruck, B. J. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2, 1281-1283.

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

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

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

Cardoso, D. D., Soares, C. M., Dias e Souza, M. B., de Azevedo Mda, S., Martins, R. M., Queiroz, D. A., de Brito, W. M., Munford, V., and Racz, M. L. (2003). Epidemiological features of rotavirus infection in Goiania, Goias, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(1), 25-9.

Carmona, R. C., Timenetsky Mdo, C., da Silva, F. F., and Granato, C. F. (2004). Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in Sao Paulo, Brazil. *J Med Virol* **74**(1), 166-72.

Carneiro, N. B., Diniz-Santos, D. R., Amorim, C., Galeno, C., Raposo, J., Brandao, L., Magalhaes, M., Cathala, R., Sardeiro, S., Mello, C., and Silva, L. R. (2006). Septic shock complicating acute rotavirus-associated diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* **25**(6), 571-2.

Carvalho-Costa, F. A., Assis, R. M., Fialho, A. M., Boia, M. N., Alves, D. P., Martins, C. M. & Leite, J. P. (2007). Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**, 291-294.

Carvalho-Costa, F. A., Araujo, I. T., Santos de Assis, R. M., Fialho, A. M., de Assis Martins, C. M., Boia, M. N., and Leite, J. P. (2009). Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis* **15**(1), 95-7.

Castello, A. A., Arvay, M. L., Glass, R. I. & Gentsch, J. (2004). Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. *Pediatr Infect Dis J* **23**, S168-172.

CDC (2008). Rotavirus surveillance worldwide, 2001-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **57**, 1255-1257.

Christensen, M.L. (1989). Human viral gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol. Rev.* **2**:51-89.

Ciarlet, M., Hoffmann, C., Lorusso, E., Baselga, R., Cafiero, M. A., Banyai, K., Matthijssens, J., Parreno, V., de Grazia, S., Buonavoglia, C., and Martella, V. (2008). Genomic characterization of a novel group A lamb rotavirus isolated in Zaragoza, Spain. *Virus Genes* **37**(2), 250-65.

Ciarlet, M., Hoshino, Y., and Liprandi, F. (1997). Single point mutations may affect the serotype reactivity of serotype G11 porcine rotavirus strains: a widening spectrum? *J Virol* **71**(11), 8213-20.

Clark, H. F., Offit, P. A., Ellis, R. W., Eiden, J. J., Krah, D., Shaw, A. R., Pichichero, M., Treanor, J. J., Borian, F. E., Bell, L. M., and Plotkin, S. A. (1996). The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. *J Infect Dis* **174 Suppl 1**, S73-80.

Conner, M.E. & Ramig, R.F. (1997). Viral Enteric Diseases. In: *Viral Pathogenesis*, ed. by Neal Nathanson et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 713-743.

Cook, N., Bridger, J., Kendall, K., Gomara, M. I., El-Attar, L. & Gray, J. (2004). The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect* **48**, 289-302.

Cunliffe, N. A., Gondwe, J. S., Broadhead, R. L., Molyneux, M. E., Woods, P. A., Bresee, J. S., Glass, R. I., Gentsch, J. R. & Hart, C. A. (1999). Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: predominance of novel P[6]G8 strains. *J Med Virol* **57**, 308-312.

Cunliffe, N. A., Gondwe, J. S., Graham, S. M., Thindwa, B. D., Dove, W., Broadhead, R. L., Molyneux, M. E., and Hart, C. A. (2001). Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* **39**(3), 836-43.

Cunliffe, N. A., Bresee, J. S., and Hart, C. A. (2002). Rotavirus vaccines: development, current issues and future prospects. *J Infect* **45**(1), 1-9.

D'Souza, R. M., Hall, G., and Becker, N. G. (2008). Climatic factors associated with hospitalizations for rotavirus diarrhoea in children under 5 years of age. *Epidemiol Infect* **136**(1), 56-64.

Das, B. K., Gentsch, J. R., Cicirello, H. G., Woods, P. A., Gupta, A., Ramachandran, M., Kumar, R., Bhan, M. K. & Glass, R. I. (1994). Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* **32**, 1820-1822.

Dyall-Smith, M. L., Lazdins, I., Tregear, G. W., and Holmes, I. H. (1986). Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(10), 3465-8.

Davidson, G. P., Bishop, R. F., Townley, R. R. & Holmes, I. H. (1975). Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* **1**, 242-246.

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

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

Duan, Z. J., Li, D. D., Zhang, Q., Liu, N., Huang, C. P., Jiang, X., Jiang, B., Glass, R., Steele, D., Tang, J. Y., Wang, Z. S., and Fang, Z. Y. (2007). Novel human rotavirus of genotype G5P[6] identified in a stool specimen from a Chinese girl with diarrhea. *J Clin Microbiol* **45**(5), 1614-7.

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

Esona, M. D., Geyer, A., Banyai, K., Page, N., Aminu, M., Armah, G. E., Hull, J., Steele, D. A., Glass, R. I., and Gentsch, J. R. (2009). Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon. *Emerg Infect Dis* **15**(1), 83-6.

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

Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. *Fields Virology. 4th.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; **2001.** p. 1426-1454.

Estes MK & Kapikian AZ (2007). Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. *Fields Virology. 5th.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.1917-1975.

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

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

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

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

Fresco, L.D. & Buratowski, S. (1994). Active site of the mRNA-capping enzyme guanylyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*: Similarity to the nucleotidyl attachment motif of DNA and RNA ligases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 91, pp. 6624-6628.

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

Georges-Courbot, M. C., Monges, J., Siopathis, M. R., ROUNGOU, J. B., Gresenguet, G., Bellec, L., Bouquety, J. C., Lanckriet, C., Cadoz, M., Hessel, L., and et al. (1991). Evaluation of the efficacy of a low-passage bovine rotavirus (strain WC3) vaccine in children in Central Africa. *Res Virol* **142**(5), 405-11.

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

Gouvea, V., de Castro, L., Timenetsky, M. C., Greenberg, H. & Santos, N. (1994a). Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol* **32**, 1408-1409.

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

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

Greenberg, H., McAuliffe, V., Valdesuso, J., Wyatt, R., Flores, J., Kalica, A., Hoshino, Y. & Singh, N. (1983). Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun* **39**, 91-99.

Gurgel, R. Q., Cunliffe, N. A., Nakagomi, O. & Cuevas, L. E. (2008). Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review. *J Clin Virol* **43**, 1-8.

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

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

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

Hashizume, M., Armstrong, B., Wagatsuma, Y., Faruque, A. S., Hayashi, T., and Sack, D. A. (2008). Rotavirus infections and climate variability in Dhaka, Bangladesh: a time-series analysis. *Epidemiol Infect* **136**(9), 1281-9.

Heiman, E. M., McDonald, S. M., Barro, M., Taraporewala, Z. F., Bar-Magen, T. & Patton, J. T. (2008). Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J Virol* **82**, 11106-11116.

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

Hoshino, Y., Honma, S., Jones, R. W., Ross, J., Santos, N., Gentsch, J. R., Kapikian, A. Z. & Hesse, R. A. (2005). A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains. *Virology* **332**, 177-188.

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

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

Hyser, J. M. & Estes, M. K. (2009). Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008. *Curr Opin Gastroenterol* **25**, 36-43.

Iturriza Gomara, M., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U., and Gray, J. (2002). Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol* **76**(13), 6596-601.

Iturriza-Gomara, M., Kang, G., and Gray, J. (2004). Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol* **31**(4), 259-65.

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

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

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

Kapikian, A.Z, Hoshino, Y., Chanock, R.M. (2001). Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. *Fields Virology. 4th.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.1787-833.

Kapikian, A. Z., Kim, H. W., Wyatt, R. G., Rodriguez, W. J., Ross, S., Cline, W. L., Parrott, R. H. & Chanock, R. M. (1974). Reoviruslike agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science* **185**, 1049-1053.

Kapikian, A. Z., Simonsen, L., Vesikari, T., Hoshino, Y., Morens, D. M., Chanock, R. M., La Montagne, J. R., and Murphy, B. R. (2005). A hexavalent human rotavirus-bovine rotavirus (UK) reassortant vaccine designed for use in developing countries and delivered in a schedule with the potential to eliminate the risk of intussusception. *J Infect Dis* **192** Suppl 1, S22-9.

Kirkwood, C. D. & Palombo, E. A. (1997). Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4. *Virology* **236**, 258-265.

Kirkwood, C. D., and Buttery, J. (2003). Rotavirus vaccines--an update. *Expert Opin Biol Ther* **3**(1), 97-105.

Kobayashi, N., Taniguchi, K., Urasawa, T., and Urasawa, S. (1991). Analysis of the neutralization epitopes on human rotavirus VP7 recognized by monotype-specific monoclonal antibodies. *J Gen Virol* **72 (Pt 8)**, 1855-61.

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

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

Labbe, M., Baudoux, P., Charpilienne, A., Poncet, D., and Cohen, J. (1994). Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J Gen Virol* **75 (Pt 12)**, 3423-30.

Lambden, P. R., Cooke, S. J., Caul, E. O., and Clarke, I. N. (1992). Cloning of noncultivable human rotavirus by single primer amplification. *J Virol* **66**(3), 1817-22.

Lanata, C. F., Black, R. E., del Aguila, R., Gil, A., Verastegui, H., Gerna, G., Flores, J., Kapikian, A. Z., and Andre, F. E. (1989). Protection of Peruvian children against rotavirus diarrhea of specific serotypes by one, two, or three doses of the RIT 4237 attenuated bovine rotavirus vaccine. *J Infect Dis* **159**(3), 452-9.

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

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

Lin, S. L., and Tian, P. (2003). Detailed computational analysis of a comprehensive set of group A rotavirus NSP4 proteins. *Virus Genes* **26**(3), 271-82.

Linhares, A. C., Pinheiro, F. P., Schmetz, C., Muller, G. & Peters, D. (1977). [Duovirus (Rotavirus) in Belem, State of Para, Brazil (preliminary report)]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **19**, 278-279.

Lu, X., McDonald, S. M., Tortorici, M. A., Tao, Y. J., Vasquez-Del Carpio, R., Nibert, M. L., Patton, J. T. & Harrison, S. C. (2008). Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure* **16**, 1678-1688.

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

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

Mascarenhas, J. D., Leite, J. P., Gabbay, Y. B., Freitas, R. B., Oliveira, C. S., Monteiro, T. A. & Linhares, A. C. (2002). Rotavirus G serotypes and P[8]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* **48**, 93-97.

Mascarenhas, J. D., Linhares, A. C., Gabbay, Y. B., de Freitas, R. B., Mendez, E., Lopez, S. & Arias, C. F. (1989). Naturally occurring serotype 2/subgroup II rotavirus reassortants in northern Brazil. *Virus Res* **14**, 235-240.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nakagomi, O., Isegawa, Y., Hoshino, Y., Aboudy, Y., Shif, I., Silberstein, I., Nakagomi, T., Ueda, S., Sears, J., and Flores, J. (1993). A new serotype of the outer capsid protein VP4 shared by an unusual human rotavirus strain Ro1845 and canine rotaviruses. *J Gen Virol* **74** (Pt 12), 2771-4.

Nakagomi, T. (2000). Rotavirus infection and intussusception: a view from retrospect. *Microbiol Immunol* **44**(8), 619-28.

Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraive WM, Mendonca-Lima L, et al. (2008). ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res.* 2008;7(3):861-71.

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

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

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

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

Perez-Schael, I., Garcia, D., Gonzalez, M., Gonzalez, R., Daoud, N., Perez, M., Cunto, W., Kapikian, A. Z., and Flores, J. (1990). Prospective study of diarrheal diseases in Venezuelan children to evaluate the efficacy of rhesus rotavirus vaccine. *J Med Virol* **30**(3), 219-29.

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

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

Poruchynsky, M. S., and Atkinson, P. H. (1991). Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J Virol* **65**(9), 4720-7.

Prasad, B. V., Rothnagel, R., Zeng, C. Q., Jakana, J., Lawton, J. A., Chiu, W., and Estes, M. K. (1996). Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* **382**(6590), 471-3.

Rennels, M. B., Losonsky, G. A., Young, A. E., Shindlecker, C. L., Kapikian, A. Z., and Levine, M. M. (1990). An efficacy trial of the rhesus rotavirus vaccine in Maryland. The Clinical Study Group. *Am J Dis Child* **144**(5), 601-4.

Rodriguez-Baez, N., O'Brien, R., Qiu, S. Q. & Bass, D. M. (2002). Astrovirus, adenovirus, and rotavirus in hospitalized children: prevalence and association with gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **35**, 64-68.

Ruiz-Palacios, G. M., Perez-Schael, I., Velazquez, F. R., Abate, H., Breuer, T., Clemens, S. C., Chevart, B., Espinoza, F., Gillard, P., Innis, B. L., Cervantes, Y., Linhares, A. C., Lopez, P., Macias-Parra, M., Ortega-Barria, E., Richardson, V., Rivera-Medina, D. M., Rivera, L., Salinas, B., Pavia-Ruz, N., Salmeron, J., Ruttimann, R., Tinoco, J. C., Rubio, P., Nunez, E., Guerrero, M. L., Yarzabal, J. P., Damaso, S., Tornieporth, N., Saez-Llorens, X., Vergara, R. F., Vesikari, T., Bouckenoghe, A., Clemens, R., De Vos, B. & O'Ryan, M. (2006). Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* **354**, 11-22.

Salinas, B., Perez Schael, I., Linhares, A. C., Ruiz Palacios, G. M., Guerrero, M. L., Yarzabal, J. P., Cervantes, Y., Costa Clemens, S., Damaso, S., Hardt, K. & De Vos, B. (2005). Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. *Pediatr Infect Dis J* **24**, 807-816.

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

Santos, N., Volotao, E. M., Soares, C. C., Campos, G. S., Sardi, S. I. & Hoshino, Y. (2005). Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. *J Clin Microbiol* **43**, 4064-4069.

Santosham, M., Letson, G. W., Wolff, M., Reid, R., Gahagan, S., Adams, R., Callahan, C., Sack, R. B., and Kapikian, A. Z. (1991). A field study of the safety and efficacy of two candidate rotavirus vaccines in a Native American population. *J Infect Dis* **163**(3), 483-7.

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

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.

Taniguchi, K. & Urasawa, S. (1995). Diversity in rotavirus genomes. *Seminars in Virology* **6**, 123 - 131.

Taniguchi, K., Urasawa, T., and Urasawa, S. (1994). Species specificity and interspecies relatedness in VP4 genotypes demonstrated by VP4 sequence analysis of equine, feline, and canine rotavirus strains. *Virology* **200**(2), 390-400.

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

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

Tian, P., Ball, J. M., Zeng, C. Q., and Estes, M. K. (1996). Rotavirus protein expression is important for virus assembly and pathogenesis. *Arch Virol Suppl* **12**, 69-77.

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

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

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

Tort, L.F.L. Caracterização molecular dos genes não estruturais NSP1,NSP3, NSP5, e estruturais VP4 e VP7 de Rotavírus A genótipo G9P[8] de diferentes estados do Brasil, 1998-2007 (2009). 128f. (Dissertação de Mestrado)- Mestrado em Biologia Parasitária-Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz.

Tsugawa, T. & Hoshino, Y. (2008). 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* **380**, 344-353.

Varghese, V., Ghosh, S., Das, S., Bhattacharya, S. K., Krishnan, T., Karmakar, P., Kobayashi, N., and Naik, T. N. (2006). Characterization of VP1, VP2 and VP3 gene segments of a human rotavirus closely related to porcine strains. *Virus Genes* **32**(3), 241-7.

Vasquez-del Carpio, R., Morales, J. L., Barro, M., Ricardo, A., and Spencer, E. (2006). Bioinformatic prediction of polymerase elements in the rotavirus VP1 protein. *Biol Res* **39**(4), 649-59.

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

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

Vesikari, T., Isolauri, E., D'Hondt, E., Delem, A., Andre, F. E., and Zissis, G. (1984). Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet* **1**(8384), 977-81.

Vesikari, T., Ruuska, T., Delem, A., Andre, F. E., Beards, G. M., and Flewett, T. H. (1991). Efficacy of two doses of RIT 4237 bovine rotavirus vaccine for prevention of rotavirus diarrhoea. *Acta Paediatr Scand* **80**(2), 173-80.

Volotao, E. M., Soares, C. C., Maranhao, A. G., Rocha, L. N., Hoshino, Y., and Santos, N. (2006). Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J Med Virol* **78**(2), 263-72.

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

World Health Organization [online]. 2005. World Health Report 2005. [capturado 10 dic. 2005]. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2005/en/>.

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

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