

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

TALISSA DE MORAES TAVARES

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE NSP4 E VP6 DE AMOSTRAS DE
ROTAVÍRUS DO GRUPO A PROVENIENTES DE CRIANÇAS DA REGIÃO
CENTRO-OESTE DO BRASIL**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Divina das Dôres de Paula Cardoso

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Wilia Marta Elsner Diederichsen de Brito

Tese de Doutorado

GOIÂNIA-GO, 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

TALISSA DE MORAES TAVARES

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE NSP4 E VP6 DE AMOSTRAS DE
ROTAVÍRUS DO GRUPO A PROVENIENTES DE CRIANÇAS DA REGIÃO
CENTRO-OESTE DO BRASIL**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Divina das Dôres de Paula Cardoso

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Wilia Marta Elsner Diederichsen de Brito

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Tropical, na área de concentração de Microbiologia.

Auxílio Financeiro: CNPq Processo nº 478615/2006-0

GOIÂNIA-GO, 2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

T231c Tavares, Talissa de Moraes.
Caracterização dos genes de NSP4 e VP6 de amostras de rotavírus do grupo A provenientes de crianças da região Centro-Oeste do Brasil [manuscrito] / Talissa de Moraes. – 2008.
xiv, 85 f. : il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Divina das Dôres de Paula Cardoso e co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Wilia Marta Elsner Diederichsen de Brito

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2008.

Bibliografia
Inclui anexo

1. Gastroenterite – Crianças – Brasil, Centro-Oeste 2. Rotavírus A 3. NSP4 4. VP6 I. Cardoso, Divina das Dôres de Paula II. Brito, Wilia Marta Elsner Diederichsen de III. Universidade Federal de Goiás. **Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública** IV. Título.

CDU : 616.34-002-053.2(817.3)

DEDICATÓRIA

Aos meus adoráveis avôs, Francisco e Natália de Moraes, Raul e Beatriz Tavares, por me presentarem com duas pessoas que dedicam suas vidas à família, e que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, me dando força necessária para superar os obstáculos e continuar lutando para alcançar os meus objetivos, meus queridos pais: Cláudio Raul e Maria Elizabeth Tavares.

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar este estudo agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para sua realização, e, de maneira especial:

“A Deus por sempre me dar força, e me guiar durante toda esta caminhada”.

Aos meus pais, Cláudio Raul e Maria Elizabeth, pelo constante amor, confiança, compreensão e apoio nas dificuldades enfrentadas e vitórias alcançadas.

Ao meu marido Alfredo, pela paciência, companheirismo, solidariedade, cumplicidade, compreensão, incentivo e principalmente, amor.

Ao meu irmão Gustavo, minha cunhada Érica e meu tio Paulo, pelo carinho, incentivo e apoio nos momentos difíceis.

À Prof^a. Dr^a. Divina das Dôres de Paula Cardoso, que com sabedoria, dedicação e profissionalismo me orientou na realização deste estudo, e como pessoa e amiga, me apoiou e ensinou a crescer.

À Prof^a. Dr^a. Wilia Marta Elsner Diederichsen de Brito, pela amizade e solidariedade em todos os momentos, profissional e pessoal, e pela confiança e credibilidade depositada em mim desde o princípio.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Humana do IPTSP/UFG, Fabíola, Ana Maria, Rodrigo e Erika, pela amizade, paciência, ensinamentos, convívio e colaboração neste trabalho.

Às amigas do Laboratório de Virologia Animal do IPTSP/UFG, Letícia, Denise, Suzana e Keili, pela força, paciência, convivência harmoniosa e companheirismo em todos os momentos alegres e tristes, durante estes anos.

Ao Prof. Dr. Álvaro Bisol Serafini, meu “paizão” e amigo, pela confiança, valiosos ensinamentos e palavras de incentivo.

Ao Laboratório de Biologia Molecular/ICB/UFG, em especial a Prof^ª. Dr^ª. Célia Maria Almeida Soares e Juliana Alves Parente, pela colaboração, suporte técnico e científico no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos professores do departamento de Microbiologia do IPTSP/UFG, pela constante colaboração e aprendizado.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, Prof^ª. Dr^ª. Regina Maria Bringel Martins, Prof^ª. Dr^ª. Maria do Rosário Rodrigues Silva, Prof^ª. Dr^ª. Maristela Pereira, Prof^ª. Dr^ª. Maria Lúcia Barbosa de Oliveira Rácz, Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite e Prof^ª. Dr^ª. Célia Maria de Almeida Soares, pelas importantes sugestões que possibilitaram a melhoria deste trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG, em especial ao Fernando Koslowski, José Clementino da Silva, Kariny Vieira Soares e Maria Socorro, pela atenção, agradável convivência e auxílio sempre que necessário.

Às crianças e aos seus responsáveis que participaram deste estudo, a minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	viii
Lista de Figuras, Quadros e Tabelas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	1
1.1. Considerações Gerais	1
1.2. Classificação dos Rotavírus	3
1.3. Rotavírus do Grupo A	3
1.3.1. Estrutura da Partícula Viral	4
1.3.2. A Proteína VP6	9
1.3.3. A Proteína NSP4	14
1.3.4. Diagnóstico Laboratorial	21
1.3.5. Epidemiologia Molecular	23
1.3.5.1. Genogrupos de VP6	24
1.3.5.2. Genótipos de NSP4	26
1.3.6. Antígenos de VP6 e NSP4 em Relação à Vacina de Rotavírus do Grupo A	29
1.4. Justificativa	33
2. Objetivos	35
2.1. Objetivo Geral	35
2.2. Objetivos Específicos	35
3. Artigo I	36
4. Artigo II	44
5. Conclusões	65
6. Referências Bibliográficas	66

Anexo	86
Carta de Aceite do Artigo II	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A – alanina

aa – aminoácido

Ala – alanina

Arg – arginina

Asn – asparagina

bp – “base pair” (pb – par de base)

BRA – Brasília

C – cisteína

Ca – íon cálcio

CaCo-2 – células de adenocarcinoma de cólon humano

CG – Campo Grande

Cl – íon cloro

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

C-terminal – terminal carboxílico

D – ácido aspártico

Da – Dalton

DF – Distrito Federal

DNA – “deoxyribonucleic acid” (ácido desoxirribonucléico)

dsRNA – “double strand ribonucleic acid” (RNAfd – RNA de fita dupla)

E – ácido glutâmico

EIARA – “combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus” (EIARA – ensaio imunoenzimático combinado para rotavírus e adenovírus)

ER – “endoplasmic reticulum” (RE – retículo endoplasmático)

F – fenilalanina

Fig. – figura

G – glicina

Gln – glutamina

Glu – ácido glutâmico

GO – Goiânia, Goiás

H – histidina

H₂O – água

HP – haplótipo

I – isoleucina

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICTV – “International Committee on Taxonomy of Viruses” (Comitê Internacional de Taxonomia Viral)

IgA – imunoglobulina da classe A

IgG – imunoglobulina da classe G

IP₃ – inositol 1,4,5-trifosfato

IPTSP – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

K – lisina

kDa – kiloDalton

L – leucina

Leu – leucina

LTa – toxina termolábil atenuada

M – metionina

MA-104 – células de rim de macaco *Rhesus*

MAbs – “monoclonal antibodies” (AcsM – anticorpos monoclonais)

ME – microscopia eletrônica

min – minuto

MS – Mato Grosso do Sul

N – asparagina

n – número

Na – íon sódio

nm - nanômetro

NSP – “non-structural protein” (proteína não estrutural)

N-terminal – terminal amino

NTPase – proteína nucleosídeo trifosfatase

ORF – “open reading frame” (quadro de leitura aberta)

P – prolina

p – probabilidade de significância

P – probabilidade de significância

PAGE – “polyacrylamide gel electrophoresis” (EGPA – eletroforese em gel de poliacrilamida)

PCR – “polymerase chain reaction” (reação em cadeia pela polimerase)

Phe – fenilalanina

PLC – fosfolipase C

Q – glutamina

R – arginina

RER – retículo endoplasmático rugoso

RFLP – “restriction fragment length polymorphism” (análise de polimorfismo dos fragmentos de DNA após restrição)

RNA – “ribonucleic acid” (ácido ribonucléico)

RNAm – RNA mensageiro

RT – “reverse transcription” (transcrição reversa)

S – serina

SGs – subgrupos de VP6

SNE – sistema nervoso entérico

T – treonina

Tyr – tirosina

UFG – Universidade Federal de Goiás

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

UK – “the United Kingdom” (Reino Unido)

UNB – Universidade de Brasília

USA – “the United States of America” (EUA – Estados Unidos da América)

V – valina

VP – “viral protein” (proteína viral)

W - triptofano

Y – tirosina

α – alfa

β – beta

$^{\circ}\text{C}$ – grau Celsius

χ^2 – qui-quadrado

> – maior que

< – menor que

% – porcentagem

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Microscopia eletrônica de partículas de rotavírus humanos isolados de espécimes fecais por Büchen-Osmond C, 1996.	4
Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando os 11 segmentos do RNAfd que formam o genoma dos rotavírus e as proteínas codificadas por cada um desses segmentos.	4
Figura 3. Estrutura de um segmento genômico do RNAfd de rotavírus do grupo A.	5
Quadro 1. Proteínas codificadas pelos segmentos genômicos de rotavírus do grupo A.	8
Figura 4. A subunidade protéica de VP6.	10
Figura 5. Dendrograma esquematizando a caracterização molecular de rotavírus do grupo A baseada na análise do gene codificante de VP6.	13
Figura 6. Representação esquemática da proteína NSP4 de rotavírus do grupo A: detalhes de sua localização no RE.	15
Figura 7. Estrutura da NSP4 mostrando a proteína de 175 aminoácidos.	16
Figura 8. Modelo proposto da ação da enterotoxina NSP4.	18
Quadro 2. Genótipos de rotavírus do grupo A com base na NSP4.	20

ARTIGO I

Table I. Distribution of nonstructural protein (NSP4) genotypes of group A rotaviruses samples from infected children from three cities of West Central region of Brazil.	39
---	----

Table II. Distribution of NSP4 genotypes of group A rotaviruses samples from infected children from West Central region of Brazil considering the year of collection. 39

Fig.1. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of group A rotavirus nonstructural protein (NSP4) gene. 40

Table III. Combinations of NSP4 and G and P genotypes of group A rotaviruses samples obtained from children at West Central region of Brazil considering the years of sample collection. 40

Fig.2. Multiple alignment of the partial deduced amino acid sequence of the NSP4 protein of 15 human rotaviruses samples with human prototype strains grouped in genotypes A, B and C. 41

ARTIGO II

Table I. Percentage nucleotide sequences identity between the VP6 genogroups of group A rotaviruses samples obtained from children in the Central West region of Brazil and those of other rotaviruses reference strains representing the VP6 genogroups I and II. 62

Fig.1. Phylogenetic analysis of VP6 nucleotide sequences of group A rotavirus samples. 63

Fig.2. Multiple alignment of the partial deduced amino acid sequences (aa 246 to 335) of the VP6 protein of 30 human group A rotaviruses samples with prototype strains grouped in genogroups I and II. 64

RESUMO

Os rotavírus do grupo A são considerados como os principais agentes de gastroenterite em crianças em todo o mundo. Investigações de vigilância epidemiológica e molecular são importantes para o controle e prevenção da doença. Nesse sentido, destacam-se os estudos utilizando VP6, proteína estrutural que se tem mostrado como a mais imunogênica, e NSP4, uma glicoproteína não estrutural transmembrana envolvida na morfogênese e patogênese viral. No presente estudo, 330 amostras de rotavírus coletadas de 1987 a 2003, provenientes de espécimes fecais de crianças com ou sem diarreia, em três cidades da Região Centro-Oeste do Brasil (Goiânia, Brasília e Campo Grande), foram caracterizadas em relação aos genes que codificam as proteínas VP6 e NSP4. Inicialmente, foi feita a amplificação dos genes de VP6 e NSP4 pela reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa, seguida do seqüenciamento genômico e de análise filogenética. Os genes de VP6 e NSP4 foram detectados em 84,8% e 78,5% das amostras, respectivamente. Dois genótipos de NSP4 foram identificados (A e B). Foi observado que as amostras G9P[6] associaram-se ao genótipo A e as amostras G1P[6], G1P[8], G2P[8], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] associaram-se ao genótipo B. A análise do gene VP6 permitiu a identificação de dois genogrupos distintos (I e II). As amostras G2P[4], G3P[4] e G9P[6] foram caracterizadas como genogrupo I, enquanto as amostras G1P[6], G1P[8], G2P[8], G4P[6], G4P[8] e G9P[8] foram caracterizadas como genogrupo II. Ainda foi evidenciado que as amostras genogrupo I de VP6 estavam associadas com genótipo A de NSP4, e as amostras genogrupo II de VP6 estavam associadas com genótipo B de NSP4. A presente investigação identificou diferentes variantes genéticas, mostrando a diversidade dos rotavírus do grupo A circulantes na Região Centro-Oeste do Brasil.

ABSTRACT

Group A rotaviruses are the major cause of gastroenteritis in children throughout the world. Epidemiological surveys and molecular analysis of rotavirus strains are required for gastroenteritis control and prevention. Studies using VP6, an important immunogenic structural protein, and NSP4, a transmembrane nonstructural glycoprotein which is critical to rotavirus morphogenesis and pathogenesis, have been performed. In this study, 330 rotavirus-positive fecal samples previously obtained from children with or without diarrhea, between 1987 and 2003, in three cities of Central West Region of Brazil (Goiânia, Brasília and Campo Grande), were characterized for VP6- and NSP4-encoding genes. The VP6 and NSP4 genes were amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction followed by sequencing and phylogenetic analysis. Detection rates of 84.8% and 78.5% were observed for VP6 and NSP4 genes, respectively. Two distinct genotypes could be recognized for NSP4 (A and B). It was observed that the G9P[6] samples were associated with genotype A, whereas the G1P[6], G1P[8], G2P[8], G3P[8], G4P[8] and G9P[8] samples were associated with genotype B. The analysis of VP6 gene allowed genogrouping of samples in two clusters, genogroups I and II. The G2P[4], G3P[4] and G9P[6] samples were identified as genogroup I, whereas the G1P[6], G1P[8], G2P[8], G4P[6], G4P[8] and G9P[8] samples were identified as genogroup II. In addition, it was showed that samples identified as VP6 genogroup I were associated with NSP4 genotype A and samples identified as VP6 genogroup II were associated with NSP4 genotype B. This investigation described different genetic groups representing diversity of group A rotavirus samples circulating in the Central West Region of Brazil.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

A gastroenterite infecciosa aguda é uma doença comum em todo o mundo e considerada causa significativa de mortalidade infantil em países em desenvolvimento (Lorgelly et al. 2007, Reither et al. 2007). Anualmente, na África, Ásia e América Latina ocorrem mais de um bilhão de casos de diarreia com 2,4 a 3,3 milhões de óbitos, acometendo principalmente crianças com até cinco anos de idade (Linhares & Bresee 2000, O’Ryan et al. 2005).

Bactérias, vírus e protozoários possuem o potencial de causar gastroenterite em humanos, sendo os vírus os mais comuns (Gutierrez et al. 2006, Reither et al. 2007). Mais de 20 vírus têm sido reconhecidos como agentes causadores da síndrome, dos quais rotavírus, calicivírus, adenovírus entéricos e astrovírus são considerados os mais importantes (Iturriza-Gómara et al. 2007).

Os rotavírus são classificados em sete grupos, designados de A a G, sendo os do grupo A os mais comumente associados à gastroenterite humana em todo o mundo (Gutierrez et al. 2006, Estes & Kapikian 2007, Lorgelly et al. 2007).

Os rotavírus do grupo A foram isolados de humanos pela primeira vez em 1973, na cidade de Melbourne na Austrália (Bishop et al. 1973), pela análise por microscopia eletrônica (ME) de células epiteliais de mucosa duodenal de crianças com diarreia aguda não bacteriana. Flewett et al. (1973), na Inglaterra, detectaram vírus semelhantes em extratos fecais submetidos à ME. No ano seguinte, partículas de rotavírus foram detectadas em espécimes fecais de crianças com gastroenterite aguda (Bishop et al. 1974), e desde então, os mesmos têm se configurado como os principais agentes

etiológicos de gastroenterite aguda infantil em nível mundial (Estes & Kapikian 2007, Lorgelly et al. 2007).

Globalmente, os rotavírus do grupo A são responsáveis por cerca de 111 milhões de episódios diarréicos anuais, 25 milhões de consultas médicas, dois milhões de hospitalizações e mais de 600 mil óbitos em crianças com até cinco anos. Aproximadamente 85% desses óbitos ocorrem em países em desenvolvimento, onde cerca de 1.200 crianças morrem de rotavirose a cada dia (Parashar et al. 2003, 2006).

No Brasil, os achados pioneiros associando rotavírus do grupo A com gastroenterite aguda em crianças ocorreram em Belém, Pará (Linhares et al. 1977). Nos últimos anos, variações na prevalência de gastroenterite aguda associada a esse patógeno em crianças brasileiras atendidas em ambulatórios ou hospitais foram demonstradas na ordem de 12% a 48%. As crianças na faixa etária de seis a 24 meses são as mais susceptíveis à infecção, que pode ocorrer em todos os meses do ano, havendo picos nos meses mais frios/secos do ano, nas Regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste (Linhares 2000, Cardoso et al. 2003, Costa et al. 2004, Luz et al. 2005, Magalhães et al. 2007, Montenegro et al. 2007, Munford et al. 2007).

Nos últimos anos, várias investigações acerca da epidemiologia molecular das infecções por rotavírus do grupo A foram realizadas no Brasil, demonstrando a diversidade de genótipos G e P, resultantes dos segmentos codificantes para as proteínas VP7 e VP4, respectivamente (Linhares 2000, Cardoso et al. 2001, 2003, Souza et al. 2003, Costa et al. 2004, Luz et al. 2005, Araújo et al. 2007a, Montenegro et al. 2007, Munford et al. 2007). No entanto, poucos relatos existem no Brasil sobre a diversidade genômica de genes codificantes para outras proteínas supostamente envolvidas na patogênese e/ou na imunogênese da infecção por rotavírus do grupo A, como as proteínas VP6 e NSP4, consideradas recentemente como alvos importantes para

estratégias de prevenção e controle da rotavirose infantil em todo o mundo (Choi et al. 2003, Ball et al. 2005, Vizzi et al. 2005, Corthésy et al. 2006, Deepa et al. 2007).

1.2. Classificação dos rotavírus

Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. A família *Reoviridae* é composta por quinze gêneros (*Aquareovirus*, *Cardoreovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Dinovernavirus*, *Fijivirus*, *Idnoreovirus*, *Mimoreovirus*, *Mycoreovirus*, *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Oryzavirus*, *Phytoreovirus*, *Rotavirus* e *Seadornavirus*). Os gêneros *Aquareovirus*, *Cardoreovirus*, *Coltivirus*, *Mycoreovirus*, *Seadornavirus*, *Orbivirus*, *Orthoreovirus* e *Rotavirus* infectam animais, sendo que os dois últimos infectam também humanos. Os demais gêneros infectam plantas (*Fijivirus*, *Phytoreovirus* e *Oryzavirus*) ou insetos (*Cypovirus*, *Dinovernavirus* e *Idnoreovirus*). Os representantes do gênero *Mimoreovirus* infectam bactérias (“International Committee on Taxonomy of Viruses” - ICTV 2008).

O gênero *Rotavirus* é classificado em grupos antigênicos, com base na sua composição antigênica protéica. Foram identificados sete grupos designados de A a G, baseado na especificidade antigênica da proteína VP6, que forma a camada intermediária do vírus. Os grupos A, B e C são encontrados em humanos e animais, e os demais somente em animais (Estes & Kapikian 2007). Recentemente, tem sido sugerida a classificação em espécies, de A a E, para representantes desse gênero (ICTV 2008).

1.3. Rotavírus do grupo A

Os representantes do grupo A são os rotavírus mais amplamente dispersos na natureza, sendo a doença diarréica causada em humanos, predominantemente associada a esse grupo (Gutierrez et al. 2006, Estes & Kapikian 2007, Lorgelly et al. 2007).

1.3.1. Estrutura da partícula viral

As partículas completas de rotavírus do grupo A medem em torno de 100 nm e, quando observadas pela microscopia eletrônica, não possuem envelope e apresentam capsídeo de simetria icosaédrica (Figura 1), composto por três camadas protéicas distintas, que formam os denominados capsídeos interno, intermediário e externo. O genoma viral é constituído de 11 segmentos genômicos de RNA de fita dupla (RNAfd) (Figura 2) (Estes & Kapikian 2007).

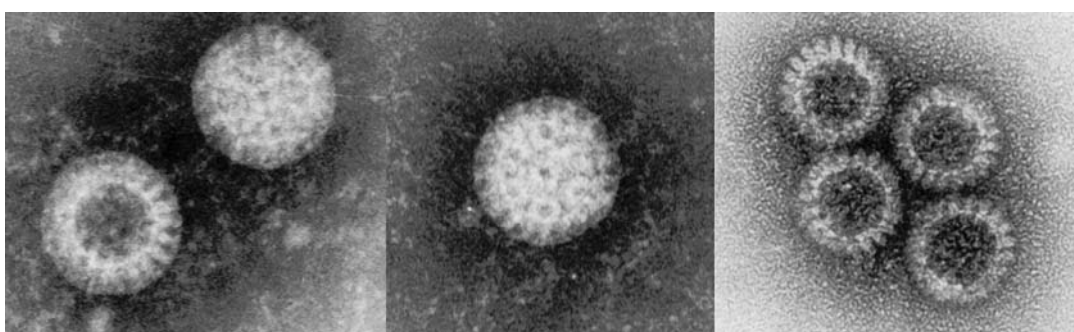


Figura 1. Microscopia eletrônica de partículas de rotavírus humanos isolados de espécimes fecais por Büchen-Osmond C, 1996 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WIntkey/Images/em_reovi.htm).

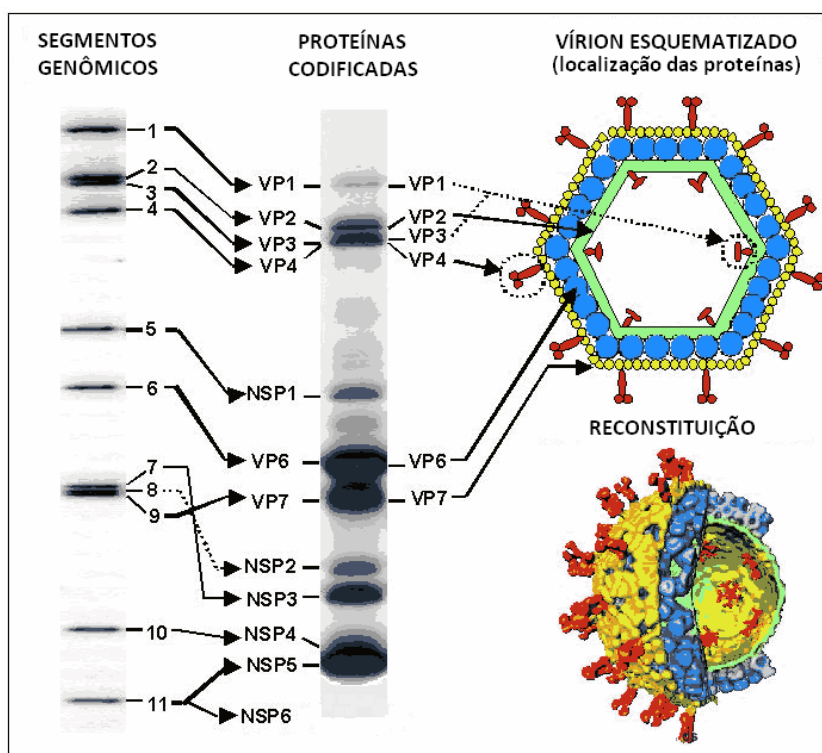
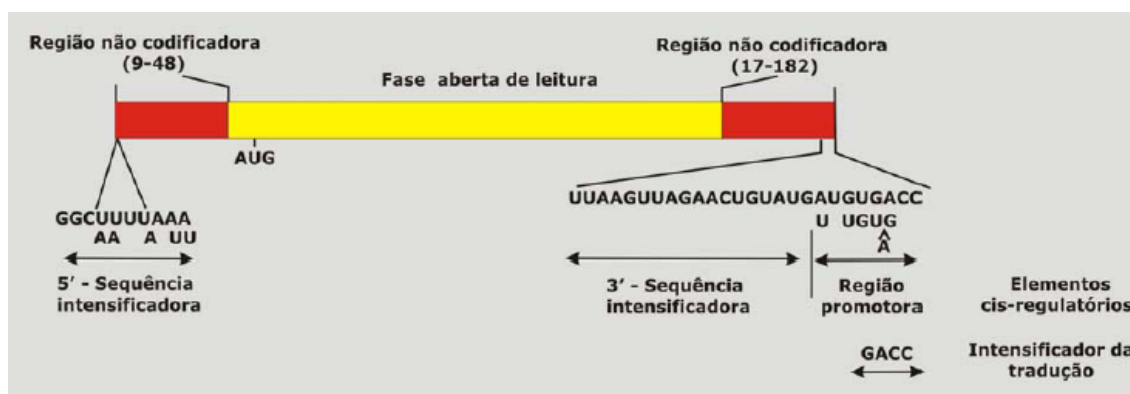


Figura 2. Eletroforese em gel de poliácridamida mostrando os 11 segmentos do RNAfd que formam o genoma dos rotavírus (neste exemplo, o rotavírus símio SA11) (esquerda) e as proteínas codificadas por cada um desses segmentos (centro). A partícula de rotavírus representada esquematicamente (direita)

acima) e sua estrutura determinada por eletromicroscopia associada ao processamento de imagem por computador (direita abaixo) (Adaptada de Estes & Kapikian 2007).

O genoma completo apresenta 18.550 pares de base (pb), com tamanhos dos segmentos variando entre 667 pb (segmento 11) e 3.302 pb (segmento 1), e massa molecular de $2,0 \times 10^5$ a $2,2 \times 10^6$ daltos (Da). Cada segmento do RNAfd  dividido em três regiões: uma região 5' não codificadora, um quadro de leitura aberta (ORF, “open reading frame”), o qual codifica no mínimo uma proteína, e uma região 3' não codificadora (Figura 3). No conjunto, o genoma codifica 12 proteínas, sendo seis delas estruturais (VP1-4, 6-7) e seis não estruturais (NSP1-6). O segmento 11  bicistrnico e codifica duas proteínas, NSP5 e NSP6 (Figura 2) (Estes & Kapikian 2007).



- Regiões não codificadoras (conservadas)
- Quadro de leitura aberta (ORF)
- AUG - Códon de inciao para síntese protéica
- 5' - seqncia intensificadora, extremidade guanidina
- 3' - seqncia intensificadora, extremidade citosina

Figura 3. Estrutura de um segmento genômico do RNAfd de rotavírus do grupo A (Adaptada de Estes & Kapikian 2007).

O capsídeo interno ou “core”  formado pela proteína VP2, codificada pelo segmento 2 do RNAfd, que possui 94 quilodltos (kDa) e parece estar envolvida na organizao do genoma viral. VP1 (125 kDa- codificada pelo segmento 1) e VP3 (88 kDa- codificada pelo segmento 3) associam-se a VP2 e ligam-se ao genoma. VP1 e VP3 apresentam, respectivamente, atividades de RNA polimerase RNA-dependente e guanililtransferase (Berois et al. 2003, Arnoldi et al. 2007, Estes & Kapikian 2007).

O capsídeo intermediário é formado por 780 moléculas da proteína VP6, organizadas em 260 unidades trímeras. VP6 (41 kDa) é codificada pelo segmento genômico 6, sendo uma proteína dotada de caráter hidrofóbico com elevado potencial antigênico e imunogênico. Essa proteína exerce um papel importante na estrutura conformacional da partícula viral, devido à interação com as proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7) e a VP2, do “core” (Charpilienne et al. 2002, Greig et al. 2006, Estes & Kapikian 2007). VP6 apresenta variabilidade antigênica, sendo responsável por grupos de rotavírus e subgrupos de rotavírus A (Estes & Kapikian 2007).

A proteína VP7 (37 kDa) compõe o capsídeo externo do vírion, sendo codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 do RNAfd, dependendo da amostra. Essa proteína é glicosilada, tem papel na internalização do vírus na célula, sendo considerada como antígeno maior de neutralização. VP7 apresenta variabilidade antigênica, sendo responsável pelos sorotipos e genótipos G do vírus (Estes & Kapikian 2007).

A partir da camada de VP7, emerge a VP4 (88 kDa) na forma de espícula. Essa proteína é codificada pelo segmento 4 do RNAfd, sendo responsável pela ligação do vírus à célula. VP4 possui atividade de hemaglutinina e de restrição de replicação viral em cultura celular, apresentando ainda sítio de clivagem a proteases e *in vivo*, após adsorção e clivagem por proteases celulares, ou mesmo *in vitro*, gera dois produtos, VP5* (60 kDa) e VP8* (247 aa), o que permite a adsorção e entrada do vírus na célula. A VP4 é também altamente imunogênica e possui variabilidade antigênica, da qual resultam os sorotipos e genótipos P (Dormitzer et al. 2002, Pesavento et al. 2003, Yuan et al. 2004b, Liu et al. 2005, Estes & Kapikian 2007).

Das seis proteínas não estruturais, cinco, NSP1 (53 kDa, codificada pelo segmento 5), NSP2 (35 kDa, codificada pelo segmento 7, 8 ou 9- dependendo da amostra), NSP3 (34 kDa, codificada pelo segmento 7, 8 ou 9- dependendo da amostra),

NSP5 (26 kDa, codificada pelo segmento 11) e NSP6 (11 kDa, codificada também pelo segmento 11), estão envolvidas na replicação viral e interagem com o ácido nucléico (Estes & Kapikian 2007). A NSP4 (28 kDa), codificada pelo segmento 10 do RNAfd, é uma glicoproteína transmembrana, localizada especificamente no retículo endoplasmático (RE) e desempenha importante papel na morfogênese e patogênese viral. Estudos realizados em camundongos caracterizaram tal proteína como a primeira enterotoxina viral, desde que foi capaz de induzir diarreia secretora sem lesão de mucosa de caráter semelhante ao da enterotoxina lábil produzida pela *Escherichia coli* (Ball et al. 1996, Huang et al. 2004, Ball et al. 2005, Deepa et al. 2007, Estes & Kapikian 2007). O quadro 1 sumariza as características gerais das proteínas dos rotavirus do grupo A.

Quadro 1. Proteínas codificadas pelos segmentos genômicos de rotavírus do grupo A (Adaptado de Estes & Kapikian 2007).

Gene ⁽¹⁾	Tamanho (pb)*	Proteína	Aminoácidos	Massa molec.(kDa)	Localização nas partículas	nº. de cópias	Funções
1	3.302	VP1	1.088	125	“core”	12	RNA polimerase – RNA – dependente
2	2.690	VP2	881	94	“core”	120	União ao RNA, formação do nucleocapsídeo
3	2.591	VP3	835	88	“core”	12	Guanililtransferase, metiltransferase, proteína básica
4	2.362	VP4	776	88	capsídeo externo	120	União à célula, interage com VP6, hemaglutinina, sensível à proteólise, antígenos neutralizantes P-tipo Possui epítomos associados às reações cruzadas de VP4 Têm epítomos associados às reações tipo-específicas
		VP5 ⁽²⁾	529	60	produto clivagem de VP4		
		VP8 ⁽²⁾	247	28	produto clivagem de VP4		
5	1.581	NSP1	491	53	proteína não estrutural	0	Ligação ao RNA, associação com citoesqueleto
6	1.356	VP6	397	41	capsídeo intermediário	780	Maior proteína estrutural, hidrofóbica, formação de trímeros, antígeno de grupo e subgrupo, imunogênica
7	1.104	NSP3 ⁽³⁾	315	34	proteína não estrutural	0	Ligação ao RNA, regulação da tradução
8	1.059	NSP2 ⁽³⁾	317	35	proteína não estrutural	0	Acumula-se em viroplasmas, ligação ao RNA, atividade NTPase, liga NSP5 e VP1
9	1.062	VP7 ⁽³⁾	326	38	capsídeo externo	780	Glicoproteína estrutural, antígenos neutralizantes G-tipo, integração do RER
10	751	NSP4	175	28	proteína não estrutural	0	Glicoproteína transmembrana do RER, receptor para partícula com duplo capsídeo no RE, enterotoxina viral, imunogênica
11	667	NSP5	198	26	proteína não estrutural	0	Ligação ao RNA, rica em serina e treonina, possível cinase autolítica, interage com VP2, NSP2 e NSP6 Produto de ORF2 do gene 11, localizada em viroplasmas, interage com NSP5
		NSP6	92	11	proteína não estrutural	0	

NOTA: *Outras espécies dentro do gênero podem ter proteínas com diferenças significativas de tamanho.

(1) Segmentos numerados baseados na migração do genoma da estirpe SA11 em gel de poliácridamida.

(2) Produto da clivagem de VP4.

(3) Proteína codificada pelos segmentos gênicos 7, 8 ou 9.

1.3.2. A proteína VP6

A proteína VP6 (41 kDa, 397 aa) é codificada pelo sexto segmento (1.356 pb) do genoma viral, sendo considerada como o maior componente protéico estrutural do vírion, e representando mais de 50% da massa viral (Lepault et al. 2001, Estes & Kapikian 2007). Como referido, forma o capsídeo intermediário do vírus, o qual é constituído de 780 cadeias polipeptídicas de VP6, que estão distribuídas como 260 trímeros. O domínio de trimerização dessa proteína situa-se entre os aminoácidos 246 e 314 (Mathieu et al. 2001, Charpilienne et al. 2002, Estes & Kapikian 2007).

A VP6 forma trímeros e túbulos espontaneamente, sendo extremamente estável, e mantendo, assim, sua conformação independente da presença de outras proteínas (Charpilienne et al. 2002, Greig et al. 2006, Estes & Kapikian 2007). Essa proteína exerce ainda papel estrutural importante por apresentar dois domínios distintos, um proximal de hélices- α (domínio B) e outro distal de folhas- β (domínio H) (Figura 4), os quais permitem sua interação com a proteína do “core” (VP2) e ambas as proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7) (Mathieu et al. 2001, Charpilienne et al. 2002). Essas interações fazem ainda com que VP6 participe da organização do vírion, atuando como um intermediário físico entre duas funções biológicas distintas, sendo a primeira, a entrada do vírus na célula hospedeira (capsídeo externo), e a segunda, o empacotamento do RNA genômico viral (capsídeo interno) (Estes & Kapikian 2007). Resíduos de aminoácidos no domínio B de VP6 nas posições 32 (Q), 65 (L), 70 (L) e 71 (L) favorecem interações hidrofóbicas entre as proteínas VP6 e VP2, que são responsáveis pela estabilidade do capsídeo duplo (Charpilienne et al. 2002).

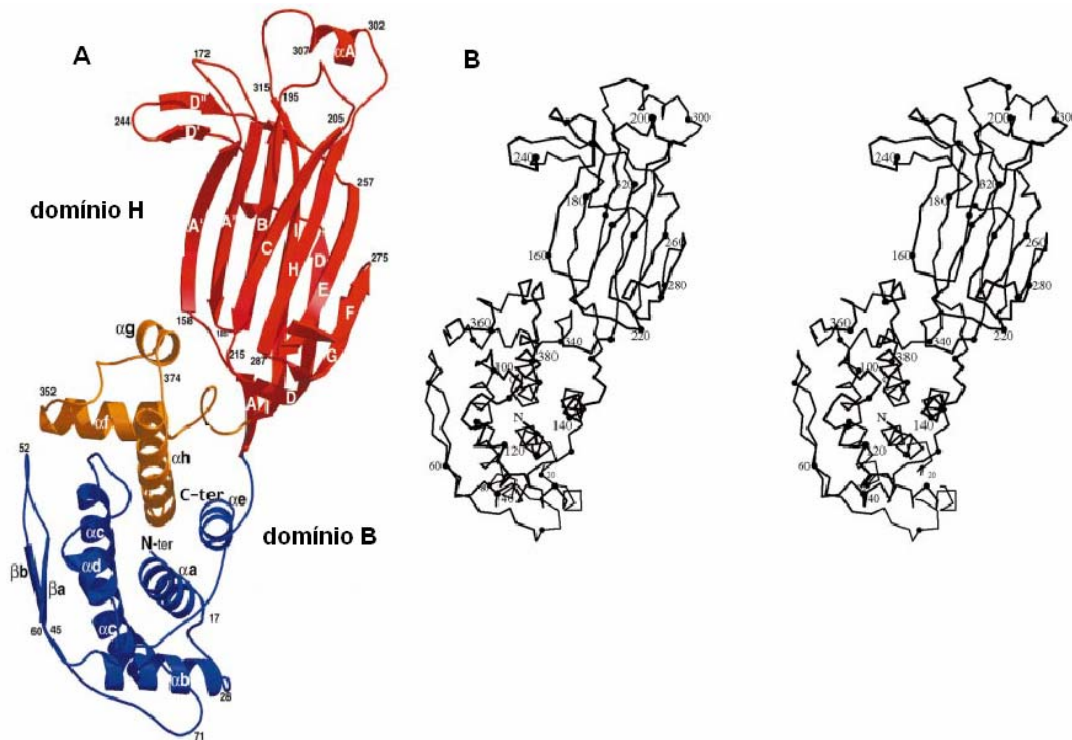


Figura 4. A subunidade proteica de VP6. (A) Domínio H (resíduos 151-331) em vermelho e os dois segmentos que formam o domínio B em azul (resíduos 1-150) e em laranja (resíduos 331-397). Elementos estruturais secundários predominantemente em hélice- α são visualizados no domínio B. São observadas hélices- α tanto no primeiro segmento do domínio B (α -a a α -e) como no segundo segmento (α -f a α -h). Para o domínio H, folhas- β em “jelly-rolls” representadas por letras de A a I. Adicionalmente, folhas- β (ausentes no “jelly-roll” padrão) estão indicadas por letras pareadas (β a e β b). (B) Traço C α estéreo da subunidade de VP6 mostrando resíduos de aminoácidos enumerados de 20 em 20 (Adaptada de Mathieu et al. 2001).

Durante a replicação viral, admite-se que a proteína VP6 participe do processo de transcrição (Charpilienne et al. 2002, Greig et al. 2006, Estes & Kapikian 2007). Assim, após a entrada do vírus na célula, o capsídeo externo é removido e o vírion torna-se uma partícula de capsídeo duplo. A síntese de RNA mensageiro (RNAm) viral, como também de replicação do RNAfd, é mediada por VP1, que para exercer sua atividade de RNA polimerase RNA-dependente necessita da presença de VP6. Provavelmente, VP6 tem interação conformacional com VP1, pois sua remoção leva a uma alteração de VP1, que deixa de ser funcional (Charpilienne et al. 2002, Arnoldi et al. 2007, Estes & Kapikian 2007). Adicionalmente, foi observado que partículas de rotavírus que apresentaram trímeros de VP6 no quinto eixo de simetria do icosaedro

produziam até cinco vezes mais quantidades de RNAm do que as partículas que não possuíam os trimeros de VP6 (Greig et al. 2006). Entretanto, uma simples mutação pontual no aminoácido 32 dessa proteína (Q→E) pode comprometer a síntese do RNAm correto (Charpilienne et al. 2002).

Os transcritos nascentes têm sido visualizados por criomicroscopia eletrônica emergindo através de um sistema de canais que penetram as camadas de VP6 e VP2 em cada vértice do capsídeo duplo (Lawton et al. 1997). Parte das fitas de RNAm formadas serve como molde para síntese do genoma de RNAd e o restante é traduzida em proteínas (Estes & Kapikian 2007).

A montagem das partículas de capsídeo duplo ocorre no citoplasma, inicialmente dentro de estruturas eletrodensas perinucleares, denominadas de viroplasmas, sendo o domínio necessário para a formação deste capsídeo localizado entre os aminoácidos 281 e 397 (Tosser et al. 1994, Estes & Kapikian 2007). Posteriormente, as partículas de capsídeo duplo imaturas, liberadas dos viroplasmas, ligam-se à extremidade carboxílica hidrofílica da glicoproteína transmembrana NSP4, que atua como um receptor intracelular capaz de mediar a maturação final das partículas no interior do RE (O'Brien et al. 2000, Huang et al. 2004, Parr et al. 2006, Estes & Kapikian 2007).

Em experimentos realizados em animais de laboratório utilizando a proteína VP6, tem sido reconhecido o potencial imunogênico dessa proteína, que apesar de não induzir a produção de anticorpos neutralizantes, como as proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7), domínios bem conservados de VP6 podem funcionar como alvos para anticorpos heterotípicos e homotípicos e conferir imunidade protetora (Feng et al. 2002, Corthésy et al. 2006, Wei et al. 2006).

Anticorpos monoclonais (AcsM) da classe IgA 7D9, formados contra epitopos antigênicos de VP6, podem inibir a ativação de transcrição induzida por essa proteína,

ocasionando modificações na conformação dos trímeros de VP6 (Feng et al. 2002, Greig et al. 2006). Adicionalmente, tem sido demonstrado que estes anticorpos competem com a proteína VP7 na ligação com VP6, comprometendo assim a formação do capsídeo externo, além de interferirem no alongamento dos transcritos nascentes pelo menos em seis ou sete bases. Esses achados sugerem que anticorpos IgA anti-VP6, ao promoverem inibição da transcrição viral no início do ciclo da replicação intracelular, podem ser uma importante estratégia de imunização na prevenção da infecção por rotavírus (Feng et al. 2002).

A eficácia de proteção de diferentes epitopos antigênicos de VP6 localizados entre os resíduos de aminoácidos 197 e 397 do terminal carboxílico de amostras de rotavírus de camundongo tem sido analisada (Choi et al. 2000, 2003). Foi observado que um peptídeo sintético de 14 aminoácidos (aa 289-302), denominado P6-14, quando administrado por via intra-nasal ou oral em camundongos associado à toxina R192, uma toxina termolábil atenuada (LTa) da bactéria *E. coli*, induziu uma significativa resposta protetora (> 97,0%). Considerando a natureza conservada de VP6 nos rotavírus do grupo A, esses resultados sugerem que se VP6 também confere imunidade em humanos, ela pode vir a ser utilizada como uma vacina universal capaz de proteger indivíduos contra infecção por todas variantes de rotavírus A (Choi et al. 2003).

A presença de epitopos conservados entre diferentes amostras de rotavírus sustenta ser a proteína VP6 o antígeno de eleição para os ensaios diagnósticos (Mascarenhas 2006, Estes & Kapikian 2007). Por meio de métodos sorológicos, tem sido demonstrado que VP6 não só especifica os antígenos de grupo (A-G), como já anteriormente mencionado, mas também possui variação antigênica para os rotavírus do grupo A que permite a classificação em subgrupos (SGs), os quais são denominados SG I, SG II, SG I + II e SG não-I e não-II (Estes & Kapikian 2007).

Os resíduos de aminoácidos 296 a 299 e 305 são importantes no reconhecimento pelos AcsM 255/260 de SG I, mais comumente encontrados em animais, ao contrário de resíduos na posição 315, que são indicativos de especificidade com o SG II humano (Iturriza-Gómara et al 2002a, Estes & Kapikian 2007).

A reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR) associada ao seqüenciamento genômico, ou análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), tem sido utilizada também para a classificação dos rotavírus do grupo A. A análise de uma região do fragmento gênico amplificado de VP6 de 379 pb por seqüenciamento genômico e/ou RFLP permite a classificação desse gene em dois genogrupos (I e II), com inclusão de duas linhagens genéticas no genogrupo I (IA e IB) e três outras linhagens (IIA, IIB e IIC) no genogrupo II (Figura 5) (Iturriza-Gómara et al. 2002a, b, Araújo et al. 2007b).

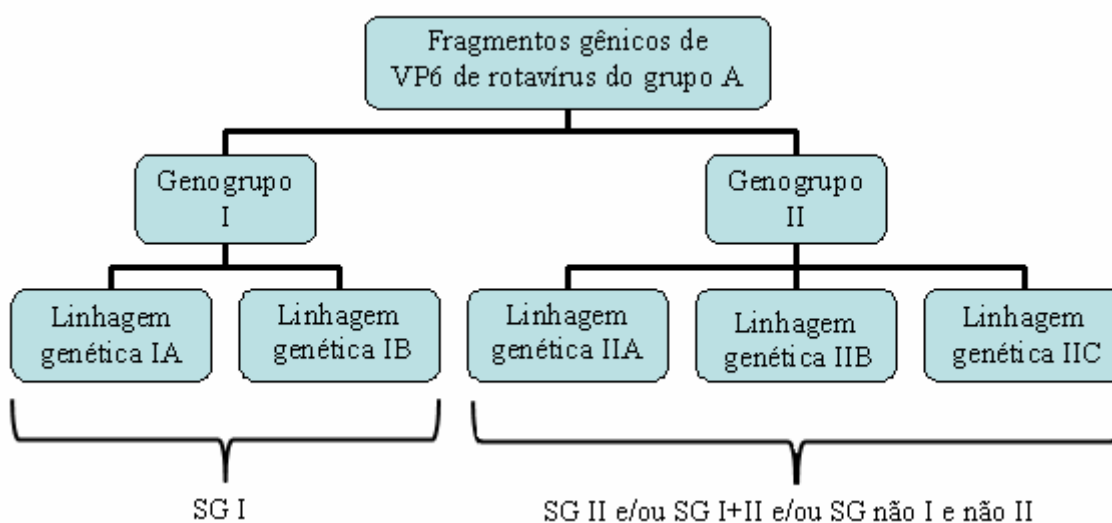


Figura 5. Dendrograma esquematizando a caracterização molecular de rotavírus do grupo A baseada na análise do gene codificante de VP6. As chaves abaixo apontam os subgrupos-específicos com base em epitoplos de VP6 dos rotavírus do grupo A, determinados por ensaios sorológicos, identificados nas diferentes linhagens genéticas caracterizadas (Adaptado de Iturriza-Gómara et al. 2002a).

Por meio de análises filogenéticas desse fragmento de VP6 amplificado, foi ainda possível constatar que todas as amostras determinadas por ensaios sorológicos como SG I, agrupadas nas duas linhagens genéticas IA e IB, formaram o genogrupo I.

As demais variantes sorologicamente definidas (SG II, SG I + II e SG não-I e não-II) formaram o segundo genogrupo (genogrupo II) (Figura 5). Apesar da similaridade genética entre as variantes pertencentes aos SG II, SG I + II e SG não-I e não-II determinadas por testes sorológicos, nenhuma correlação foi estabelecida entre essas variantes e as linhagens genéticas do genogrupo II. A não correlação tem sido admitida em função das possíveis alterações antigênicas de VP6, que assim como as de VP4 e VP7, acabam contribuindo na co-circulação de diferentes variantes de rotavírus (Iturriza-Gómara et al. 2002a).

A comparação de seqüências de aminoácidos da proteína VP6 de diferentes amostras de rotavírus do grupo A revelaram significantes variações entre os genogrupos I e II. As amostras do genogrupo I apresentaram resíduos conservados nas posições 172 (A), 296 (R), 299 (N) e 305 (A), enquanto em amostras do genogrupo II resíduos conservados foram observados nas posições 248 (F), 305 (N), 306 (A), 310 (Q) e 315 (Q) (Tang et al. 1997, Iturriza-Gómara et al. 2002a, Greig et al. 2006).

Os grupos de rotavírus designados B a G compreendem, em geral, amostras que infectam animais, com a proteína VP6 diferente daquela comum aos rotavírus do grupo A (Mawatari et al. 2004, Tsunemitsu et al. 2005). Tais amostras não são detectadas por técnicas sorológicas convencionais, sendo sua identificação em geral efetuada por imunomicroscopia eletrônica, eletroforese do RNAfd em gel de poliacrilamida (EGPA) e ensaios moleculares (Estes & Kapikian 2007).

1.3.3. A proteína NSP4

A proteína NSP4 (28 kDa, 175 aa), codificada pelo décimo segmento genômico (751 pb) do RNAfd, foi inicialmente denominada de NS28 (Au et al. 1989, Bergmann et

al. 1989) e identificada como uma glicoproteína transmembrana, de localização no RE (Figura 6) (Estes & Kapikian 2007).

A NSP4 possui três domínios hidrofóbicos, H1, H2 e H3, localizados na porção amino(N)-terminal. H1, evidenciado no lúmen do RE, apresenta dois sítios de glicosilação situados em uma pequena alça nas posições dos aminoácidos 8 e 18. H2 corresponde ao domínio transmembrana, que ancora NSP4 na bicamada lipídica do RE. H3 é um domínio de oligomerização (resíduos 63-80) localizado no citoplasma. A seqüência de aminoácidos 85 a 123 parece ser responsável pela retenção da proteína na membrana. A cauda de localização citoplasmática de aproximadamente 131 aa exibe todas as seqüências responsáveis pelas funções biológicas conhecidas dessa proteína, como o domínio de oligomerização (resíduos 95-135) organizado de forma tetramérica em hélice- α , que corresponde ao sítio de ligação com o cátion Ca^{++} e que confere estabilidade à proteína. Os resíduos 112-146 e 156-175 são sítios de ligação com VP4 e VP6, respectivamente, importantes para a morfogênese viral (Figuras 6 e 7) (Bowman et al. 2000, O'Brien et al. 2000, Huang et al. 2004, Estes & Kapikian 2007).

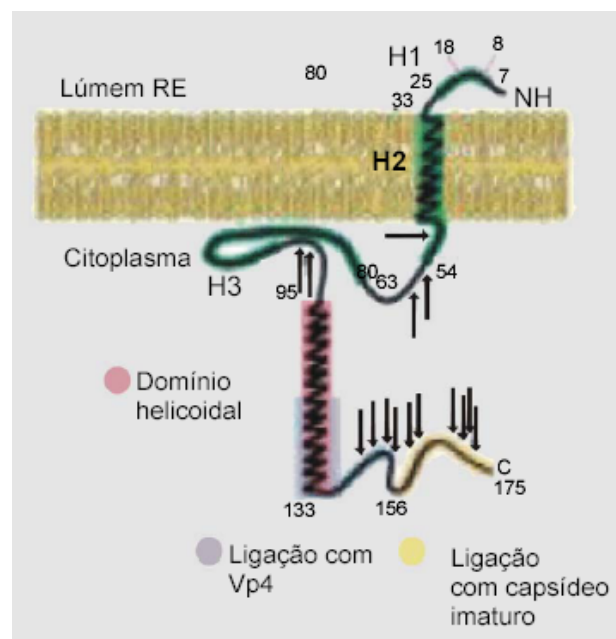
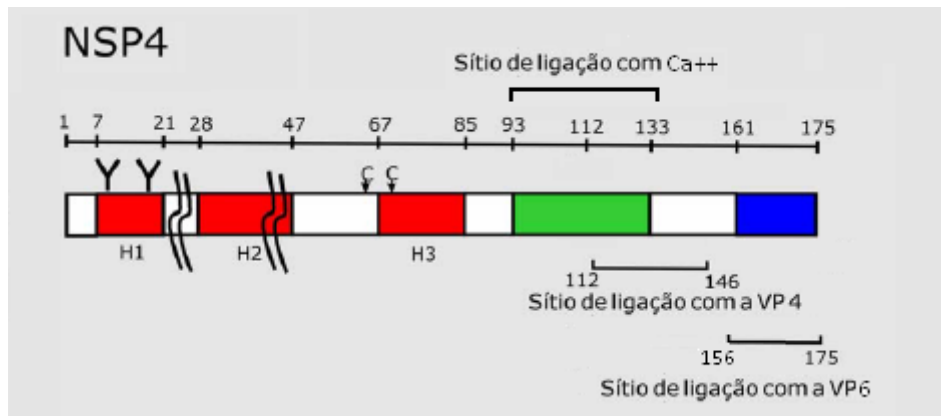


Figura 6. Representação esquemática da proteína NSP4 de rotavírus do grupo A: detalhes de sua localização no RE (Adaptada de Bowman et al. 2000).



H1, H2 e H3 - domínios hidrofóbicos;
 Y - sítios de glicosilação (aa 8 e 18);
 C - cisteínas conservadas.

Figura 7. Estrutura da NSP4 mostrando a proteína de 175 aminoácidos.
 (Adaptada de Estes & Kapikian 2007).

Essa proteína tem sido observada em forma de dímeros, tetrâmeros e como estruturas multiméricas altamente organizadas nos complexos oligoméricos com VP4 e VP7 nas partículas envelopadas, durante o processo de maturação do vírus (Maass & Atkinson 1990, Jagannath et al. 2006, Deepa et al. 2007).

Na morfogênese viral, a NSP4 funciona como um receptor intracelular capaz de mediar conversão de partículas imaturas de dupla camada protéica no citoplasma para partículas maduras de tripla camada no RE. A maturação ocorre em um processo dependente de elevada concentração de íons Ca⁺⁺ para a estabilização das proteínas do capsídeo externo. A proteína VP6 das partículas imaturas liga-se a 20 aa localizados na região C-terminal da NSP4 (resíduos de aa 156-175) e brotam para dentro do RE, ganhando transitoriamente, um envelope formado pela membrana do RE. Dentro dessa organela, esse envelope é removido, num processo coordenado pela NSP4, com a proteína VP4 associada aos resíduos de aminoácidos 112 a 146 dessa proteína. A VP7 é também adicionada à partícula completando a morfogênese (O'Brien et al. 2000, Huang et al. 2004, Parr et al. 2006, Estes & Kapikian 2007). O entendimento desse modelo

pode ajudar na compreensão de como vírus desprovido de envelope lipoprotéico transita entre os compartimentos intracelulares (Bowman et al. 2000).

Estudos conduzidos por Ball et al. (1996) demonstraram que a NSP4 tem sido considerada como enterotoxina viral, como já referido. Foi observado que o peptídeo sintético correspondente aos resíduos de aminoácidos 114 a 135 dessa proteína, derivado do rotavírus SA11, quando administrado por via intra-peritonial ou intraluminal, induziu diarreia com ausência de lesões na mucosa epitelial em camundongos jovens (6 a 10 dias), mas não em camundongos adultos, sugerindo que tal processo seja idade-dependente. O resíduo de tirosina na posição 131 foi considerado como o possível aminoácido associado à atividade toxigênica dessa proteína.

Admite-se que nesse processo, a NSP4 induza a liberação de Ca^{++} do interior do RE, favorecendo o aumento da concentração intracelular dos níveis de Ca^{++} , possivelmente após a ativação de uma via de transdução de sinal, a via fosfoinositol, que abre canais de Ca^{++} na membrana. Conseqüentemente, ocorre aumento da permeabilidade da membrana plasmática e a liberação de íons Cl^- para fora da célula. Isto diminui a entrada de íons Na^+ e H_2O , como também a absorção de dissacarídeos intestinais, causando diarreia secretora (Ball et al. 1996, Ramig 2004, Estes & Kapikian 2007, Lorrot & Vasseur 2007) (Figura 8).

Ao contrário da NSP4, que quando adicionada de forma exógena às células aumenta a concentração de Ca^{++} , foi demonstrado que a ativação da fosfolipase C (PLC) e, na condição de expressão endógena da NSP4, a própria PLC promove elevações dos níveis de Ca^{++} intracelular independente da estimulação de fosfolipase C- inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) (Zhang et al. 2000, Ramig 2004) (Figura 8).

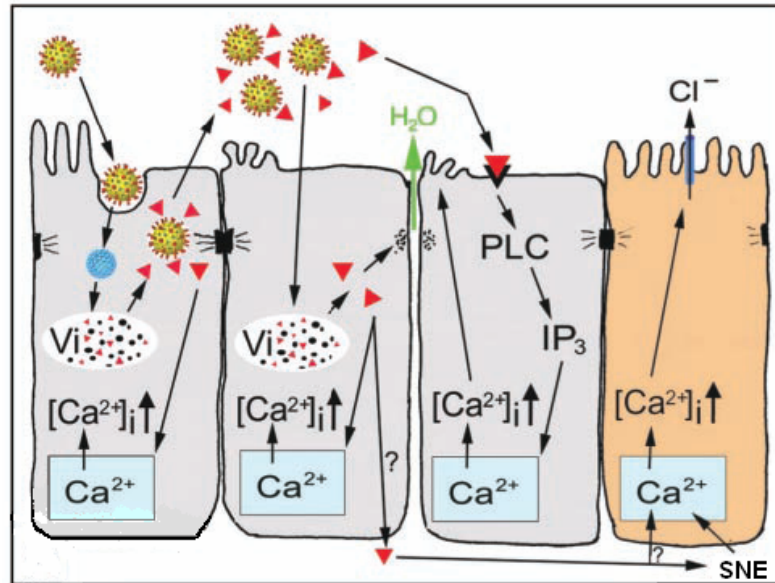


Figura 8. Modelo proposto da ação da enterotoxina NSP4. (i) Infecção do enterócito por rotavírus, mostrando a entrada, desnudamento, formação do viroplasma (Vi) e liberação do vírus e das proteínas virais. Intracelularmente, a NSP4 (setas vermelhas) induz uma via secretória não clássica. A NSP4 estimula a liberação de Ca^{++} do RE (azul), aumentando a concentração de $[\text{Ca}^{++}]_i$. (ii) Uma célula secundariamente infectada após liberação do vírus da célula inicial. A NSP4, produzida pela infecção, rompe as firmes junções, permitindo fluidez de água e eletrólitos entre as células (seta verde). (iii) A NSP4 se liga a um receptor específico na célula e ativa a via de transdução de sinal. Por meio da PLC e IP_3 , íons Ca^{++} são liberados, aumentando $[\text{Ca}^{++}]_i$. A expressão intracelular da NSP4 não estimula a PLC. O aumento de $[\text{Ca}^{++}]_i$ intracelular rompe o citoesqueleto microvilar. (iv) A célula marrom representa uma célula da cripta. Esta pode ser ativada diretamente pela NSP4, ou esta proteína pode estimular o sistema nervoso entérico (SNE), que ativa o sinal para aumentar $[\text{Ca}^{++}]_i$ que induzirá a secreção de Cl^- (Adaptado de Ramig 2004).

Efeitos toxigênicos da NSP4 semelhantes ao modelo descrito por Ball et al. (1996), associados ao aumento e mobilização de Ca^{++} intracelular, foram também potencializados por um fragmento de NSP4 (aa 112-175) adicionado por via exógena em células intestinais (Zhang et al. 2000) e por um peptídeo correspondente aos resíduos de aminoácidos 48 a 91 de NSP4 expresso endogenamente em culturas infectadas por *E. coli* recombinante. O peptídeo sintético de aminoácidos 48-91 foi ainda capaz de promover a desestabilização da membrana do RE com conseqüente lise do mesmo (Browne et al. 2000). Comprovando ainda o efeito toxigênico da proteína NSP4, Newton et al. (1997) mostraram que uma região de hélice- α anfipática localizada entre os aminoácidos 55 e 72 provocou a perda da integridade da membrana em células de mamíferos, sendo sugerida como indutora da atividade citotóxica da NSP4.

Parr et al. (2006) demonstraram que durante a infecção viral, peptídeos de NSP4 (aa 114-135) associam-se à proteína caveolina-1 de pinossomos, que são vesículas ricas em lipídeos, curvas, aniônicas, encontradas em células intestinais e que apresentam componentes moleculares reguladores e sinalizadores de Ca^{++} intracelular. Esse complexo NSP4-caveolina-1 contribui para o deslocamento intracelular de NSP4 do RE para superfície celular. Esses autores ainda sugeriram que se a NSP4 for adicionada por via exógena poderia possivelmente estimular moléculas sinalizadoras de pinossomos a liberarem Ca^{++} dentro das células.

Embora a NSP4 venha sendo também considerada determinante de virulência na infecção por rotavírus, relatos contraditórios têm sido descritos no que diz respeito às alterações nas seqüências dessa proteína relacionadas às infecções sintomáticas e assintomáticas (Zhang et al. 1998, Lee et al. 2000, Mascarenhas et al. 2006). Zhang et al. (1998) descreveram que alterações entre os aminoácidos 131 e 140 da NSP4 são importantes na virulência de rotavírus, considerando que amostras avirulentas diferiam das virulentas por apresentarem mutações nos resíduos de aminoácidos 135, 136 e 138. Chang et al. (1999) observaram pequenas diferenças entre os aminoácidos de NSP4 de variantes virulentas e atenuadas de rotavírus Wa (aa 13, 16 e 34) e rotavírus M (aa 53 e 104), e admitiram que, possivelmente, estas poderiam influenciar na patogênese dessa proteína. Pager et al. (2000), por sua vez, relataram que seqüências da NSP4 de rotavírus do grupo A obtidas de crianças assintomáticas apresentavam divergências nos resíduos de aminoácidos 82, 114, 138 e 169, quando comparadas com amostras de crianças sintomáticas. No entanto, outros autores não observaram diferenças nas seqüências dos aminoácidos, quando compararam amostras de crianças sintomáticas e assintomáticas (Horie et al. 1997, Kirkwood & Palombo 1997, Ward et al. 1997, Lee et al. 2000, Cunliffe et al. 2002, Mascarenhas et al. 2006, 2007b).

Vários estudos têm sido conduzidos no sentido de avaliação do potencial imunogênico da NSP4, uma vez que imunoglobinas da classe IgA e IgG NSP4-específicas foram detectadas em amostras de crianças e de animais infectados por rotavírus (Josef et al. 2002, Ray et al. 2003, Yuan et al. 2004b, Vizzi et al. 2005). Vizzi et al. (2005) constataram ainda que algumas crianças assintomáticas apresentavam anticorpos séricos contra NSP4, além de soroconversão, o que sugeriu que a presença desses anticorpos poderia estar relacionada com a redução da atividade de NSP4 na indução da diarreia em pacientes infectados, e que a exposição prévia ao vírus não interferiria na taxa de soroconversão.

Pela análise de seqüências de nucleotídeos do produto amplificado referente ao segmento 10 do RNAfd, codificante da proteína NSP4, foram identificados cinco diferentes genótipos (A-E) entre os rotavírus do grupo A de origens humana e animal (Ciarlet et al. 2000, Mori et al. 2002, Lin & Tian 2003). Os genótipos de NSP4 foram agrupados de acordo com as espécies de hospedeiros de rotavírus, sugerindo um padrão de evolução conservado para essas espécies (Ciarlet et al. 2000). As amostras de mamíferos foram caracterizadas como genótipos A, B, C ou D, e as de origem aviária como genótipo E (Quadro 2) (Kirkwood & Palombo 1997, Ciarlet et al. 2000, Mori et al. 2002, Lin & Tian 2003). Em humanos, foram identificados os genótipos A, B ou C, sendo A e B os mais prevalentes (Iturriza-Gómara et al. 2003).

Quadro 2. Genótipos de rotavírus do grupo A com base na proteína NSP4.

Protótipo de origem	Genótipo	Hospedeiros	Referências
KUN	A	Humano, bovino, eqüino, símio e lapino	Kirkwood & Palombo (1997), Ciarlet et al. (2000)
Wa	B	Humano, eqüino, suíno	Kirkwood & Palombo (1997), Ciarlet et al. (2000)
AU-1	C	Humano, símio, canino, felino, ovino	Kirkwood & Palombo (1997), Ciarlet et al. (2000)
EW	D	Murino	Ciarlet et al. (2000)
CH-1	E	Aves	Mori et al. (2002), Lin & Tian (2003)

Estudos filogenéticos ainda distinguem os genótipos A e B de NSP4 em linhagens genéticas. Três linhagens genéticas foram identificadas a partir do genótipo A (A-I, A-II e A-III), e duas a partir do genótipo B (B-I e B-II). Na linhagem A-I foram identificadas apenas seqüências derivadas de rotavírus humanos, enquanto que nas linhagens A-II e A-III foram identificadas seqüências de rotavírus animais (bovinos, eqüinos e lapinos). A exceção foi uma única amostra humana isolada na Austrália agrupada na linhagem A-II. A linhagem B-I apresentava somente seqüências derivadas de amostras humanas, e a linhagem B-II compreendia seqüências de amostras de origem animal (eqüinos e suínos) (Iturriza-Gómara et al. 2003).

Variações entre os genótipos A e B foram observadas principalmente nos resíduos de aminoácidos localizadas no domínio variável inter-espécies (aa 131-141) (Horie et al. 1997) e na região de ligação com a proteína VP6 (aa 156-175) (O'Brien et al. 2000). O domínio variável inter-espécie possui uma maior diversidade entre os genótipos A e B nos resíduos 131, 133 e 136-141, enquanto que na região de ligação com o capsídeo duplo cinco substituições de aminoácidos foram identificadas nos resíduos 157, 161, 167, 169 e 174 (Iturriza-Gómara et al. 2003, Araújo et al. 2007b).

1.3.4. Diagnóstico laboratorial

Dentre os vários procedimentos laboratoriais, utilizados no diagnóstico das infecções causadas por rotavírus do grupo A (Arens 1999, Ciarlet & Estes 2001, Estes & Kapikian 2007), estão incluídos:

1. Isolamento viral em culturas de células preferencialmente MA-104 (células de rim de macaco *Rhesus*) e CaCo-2 (células de carcinoma de cólon humano);

2. Visualização da partícula viral através da microscopia eletrônica direta em amostras de fezes coletadas na fase aguda da doença;
3. Detecção de antígenos virais por métodos sorológicos, como o ensaio imunoenzimático, teste de aglutinação passiva e imunofluorescência;
4. Pesquisa de anticorpos neutralizantes por testes de neutralização e imunomicroscopia eletrônica de fase sólida utilizando AcsM sorotipo-específicos de VP7 e VP4;
5. Detecção do ácido nucléico viral por EGPA, que possibilita a identificação de diferentes perfis genômicos;
6. Detecção do ácido nucléico viral por métodos moleculares.

A partir da década de 1990, foram desenvolvidos diferentes métodos moleculares, visando identificar os segmentos genômicos que codificam as diferentes proteínas de rotavírus do grupo A (Estes & Kapikian 2007). Para a detecção do genoma viral tem sido utilizada principalmente a reação em cadeia pela polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR), e hibridização a partir de sondas moleculares. A RT-PCR exibe alta sensibilidade e especificidade, fundamentando-se normalmente na amplificação enzimática dos genes 9 e 4, que codificam as proteínas VP7 e VP4 responsáveis pelos genótipos G e P, respectivamente, utilizando-se iniciadores consensuais específicos (Gouvea et al. 1990, Gentsch et al. 1992, Das et al. 1994). Para a amplificação dos genes 6 e 10 codificantes das proteínas VP6 e NSP4, respectivamente, são também usados iniciadores e protocolos específicos (Lee et al. 2000, Iturriza-Gómara et al. 2002a).

Uma variação da técnica RT-PCR é a PCR em tempo real, que é mais sensível e permite quantificar a carga viral durante uma infecção (Kang et al. 2004, Logan et al. 2006). Adicionalmente, uma alternativa recente de hibridização é a de microrranjo

que visa tanto detecção quanto genotipagem de rotavírus. Esse método combina a alta sensibilidade da PCR com a seletividade da hibridização DNA-DNA (Chizhikov et al. 2002, Honma et al. 2007).

Para a confirmação dos genótipos determinados por RT-PCR, ou mesmo para definição daqueles que não puderam ser identificados por outras metodologias, tem sido usado o seqüenciamento genômico, o qual pode ser feito diretamente utilizando o produto da RT-PCR ou após clonagem desse produto. Esse método permite também discriminar a origem da amostra, além de permitir a identificação de novas variantes genéticas do vírus (Arens 1999, Mascarenhas et al. 2006, Araújo et al. 2007a, b).

Outro procedimento presentemente utilizado é a análise do polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos a partir da clivagem com enzimas de restrição (RFLP) pós-RT-PCR, que possui aplicabilidade principalmente voltada à investigação epidemiológica. Pela RFLP podem ser identificadas mutações em amostras virais que resultam em diferentes padrões de migração de fragmentos do DNA quando esses são separados em gel de agarose (Arens 1999, Rodríguez-Castillo et al. 2006).

1.3.5. Epidemiologia molecular

Estudos envolvendo a caracterização de genogrupos de VP6 e genótipos de NSP4 de rotavírus do grupo A que infectam humanos não são muito freqüentes. Normalmente, se estabelece a caracterização molecular das variantes de rotavírus circulantes em todo o mundo com base na correlação entre os eletroferotipos e genótipos G e P resultantes dos segmentos codificantes para as proteínas VP7 e VP4, respectivamente (Gentsch et al. 2005, Santos & Hoshino 2005, Mascarenhas 2006, Estes & Kapikian 2007, Munford et al. 2007).

Até o momento, foram reconhecidos 16 diferentes genótipos G e 27 genótipos P (Estes & Kapikian 2007, Gulati et al. 2007, Martella et al. 2007). Pelo menos 10 genótipos G e 11 genótipos P já foram descritos de amostras humanas, sendo que importância epidemiológica foi verificada para cinco genótipos G (G1-G4 e G9) e três genótipos P (P[4], P[6] e P[8]). As combinações G e P mais comumente observadas são G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[6] e G9P[8]. Entretanto, outros genótipos como G5, G8, G11 e G12, e mesmo novas combinações de G e P têm sido identificadas na América Latina e em outras regiões do mundo (Gentsch et al. 2005, Santos & Hoshino 2005, Munford et al. 2007).

Geralmente é observada uma associação entre os eletroferotipos, SGs de VP6 e genótipos G e P de rotavírus do grupo A (Estes & Kapikian 2007). A combinação de eletroferotipo longo e SG I são típicas de rotavírus animal, enquanto que o eletroferotipo longo associado ao SG II (G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8]), e o eletroferotipo curto associado ao SG I (G2P[4] e G9P[6]) é comumente encontrado em rotavírus humanos (Iturriza-Gómara et al. 2002a, Estes & Kapikian 2007, Kerin et al. 2007).

1.3.5.1. Genogrupos de VP6

Como referido, a diversidade dos genes que codificam a proteína VP6 está restrita a dois genogrupos (I e II) (Iturriza-Gómara et al. 2002a), sendo que o genogrupo II destaca-se como o mais prevalente (Iturriza-Gómara et al. 2003, Araújo et al. 2007b, Kerin et al. 2007, Wang et al. 2007).

O genogrupo I agrupa as amostras sorologicamente definidas como SG I, enquanto que o genogrupo II é composto por amostras de SG II, SG I+II e SG não-I e não-II (Iturriza-Gómara et al. 2002a). Em estudo realizado recentemente na China foi

identificada uma amostra não usual (R479), que formou um terceiro genogrupo de VP6, juntamente com amostras de rotavírus de suínos, eqüino (H-1) e humano não usual (RMC321), sugerindo um provável novo genogrupo para VP6 (Wang et al. 2007).

Como para os subgrupos de VP6, também tem sido evidenciada uma correlação entre os genogrupos de VP6 de rotavírus de humanos com algumas combinações de genótipos G e P. O genogrupo I está mais associado às amostras usual G2P[4] e não usual G9P[6], enquanto o genogrupo II apresenta-se normalmente associado às amostras usuais G1P[8], G3P[8], G4P[8] ou G9P[8] (Iturriza-Gómara et al. 2002a, Kerin et al. 2007).

Na Itália, em amostras de crianças com rotavirose coletadas entre 1987 e 1990, foi observada a caracterização de amostras G2P[4] como pertencente ao genogrupo I e de amostras G1P[8] ao genogrupo II, sendo ainda identificadas amostras G1+G2P[4] como genogrupo I e amostras G1, G1P[4]+P[8] e G1P[6]+P[8] como genogrupo II (Medici et al. 2007).

Em estudos realizados na Inglaterra, foi evidenciado para as amostras positivas de rotavírus coletadas de crianças de 1995 a 2002 no Reino Unido e na Índia, que amostras G1P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] foram identificadas tanto como genogrupo I ou II. Adicionalmente, amostras G2P[4], G4P[4] e G9P[6] foram caracterizadas como genogrupo I e amostras G1P[8], G1P[9] e G8P[8] como genogrupo II (Iturriza-Gómara et al. 2002a, b, 2003).

No período de 1996 a 2002, nos Estados Unidos da América (EUA), o seqüenciamento do gene de VP6 das amostras usuais G1P[8], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] de rotavírus de humanos caracterizou-as como genogrupo II, enquanto as amostras G2P[4] e G9P[6] foram caracterizadas como genogrupo I (Kerin et al. 2007).

Na Tailândia, a maioria das amostras G9 de crianças hospitalizadas com rotavirose entre 2000 e 2001 estava associada ao genogrupo II, exceto uma amostra que foi associada ao genogrupo I e outra que não foi associada a nenhum dos dois genogrupos identificados (Khamrin et al. 2006a). Ainda naquele país, uma amostra não usual G3P[3] isolada de uma criança de dois anos infectada durante esse mesmo período apresentou maior identidade com uma amostra de rotavírus símio de SG I, sendo caracterizada como genotipo I (Khamrin et al. 2006b). Em 2004, foram ainda identificadas na Tailândia duas amostras não usuais G3P[9] (CMH120/04 e CMH134) de rotavírus humanos, caracterizadas como genogrupo I (Khamrin et al. 2007).

A caracterização do gene VP6 em amostras de crianças com rotavirose em Teerã, Irã, em 2003 e 2004, identificou amostras G1P[8] como genogrupos I e II, G1P[10] e G2P[4] como genogrupo I, e G1P[4], G4P[8], G9P[8] e G12P[8] como genogrupo II (Farahtaj et al. 2007).

Na China, foram identificadas amostras G2P[4] obtidas de humanos, entre 2000 e 2006, associadas ao genogrupo I, e amostras G1P[8], G3P[8] e G9P[8] ao genogrupo II (Wang et al. 2007).

No Brasil, foi observado que amostras G1P[8], G5P[8] e G9P[8] coletadas entre 1986 e 2004 de crianças hospitalizadas no Rio de Janeiro associaram-se ao genogrupo II, enquanto que as amostras G2P[4] associaram-se ao genogrupo I (Araújo et al. 2007b). Em Belém, foi ainda evidenciado que uma amostra mista G1+G4 de neonato com rotavirose foi identificada como genogrupo II (Mascarenhas et al. 2007a).

1.3.5.2. Genótipos de NSP4

Embora existam cinco genótipos de NSP4 (A-E), os mais prevalentes dentre os rotavírus que infectam humanos são os genótipos A e B (Ciarlet et al. 2000, Mori et al.

2002, Iturriza-Gómara et al. 2003). Raramente são evidenciadas amostras de humanos caracterizadas como genótipo C, como o rotavírus AU-1, que possui maior identidade com amostras de rotavírus de felinos e caninos (Iturriza-Gómara et al. 2003), ou que não se associa com nenhum dos genótipos descritos até o momento (Cho et al. 2006).

Dentre os genótipos A e B de NSP4, tem sido observada uma maior prevalência do genótipo B em todo o mundo (Kirkwood et al. 1999, Lee et al. 2000, Iturriza-Gómara et al. 2003, Cho et al. 2006). No Brasil, o genótipo B é prevalente na Região Sudeste (Araújo et al. 2007b), enquanto o genótipo A predomina na Região Norte (Mascarenhas et al. 2006, 2007b).

Associação de 100% entre os genótipos A e B de NSP4 e genogrupos I e II de VP6 tem sido geralmente observada em diferentes amostras de rotavírus humanos, inclusive nas procedentes do Brasil, estando o genótipo A normalmente associado ao genogrupo I, e o genótipo B ao genogrupo II (Iturriza-Gómara et al. 2003, Araújo et al. 2007b). Apesar de não existir uma associação bem estabelecida entre os genótipos de NSP4 e de G e P, geralmente as amostras G2P[4] e G9P[6] estão associadas ao genótipo A e as amostras G1P[8], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] ao genótipo B (Iturriza-Gómara et al. 2003, Araújo et al. 2007b, Wang et al. 2007).

Em um estudo realizado na Itália por Medici et al. (2007), analisando amostras de crianças com rotavirose coletadas entre 1987 e 1990, foi identificada a associação de amostras G2P[4] com o genótipo A de NSP4 e de G1P[8] com o genótipo B. Adicionalmente, foi evidenciado que amostras G1+G2P[4] também estavam associadas ao genótipo A, e G1P[4]+P[8] e G1P[6]+P[8] ao genótipo B.

Kudo et al. (2001), analisando amostras G4 de rotavírus isoladas de crianças com diarreia entre 1988 e 1990 no Japão e entre 1993 e 1994 no Quênia, constataram que essas amostras foram caracterizadas como genótipo B de NSP4.

Nos EUA, o gene de NSP4 foi investigado em amostras G1P[8], G2P[4], G9P[8] e G9P[6] de rotavírus isoladas em 1996 e 1997. Foi observado que as amostras G2P[4] e G9P[6] foram identificadas como genótipo A de NSP4, e as amostras G1P[8] e G9P[8] como genótipo B (Kirkwood et al. 1999).

Na Tailândia, em 22 amostras G1P[6] de crianças com rotavirose coletadas de 1993 a 1995 e em 22 amostras, reunindo as combinações usuais G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8], coletadas entre 1981 e 1997, a maioria foi caracterizada como genótipo B, exceto as amostras G2P[4] que foram identificadas como genótipo A (Lee et al. 2000). Nesse mesmo país, em 2000 e 2001, a maioria das amostras G9 de crianças hospitalizadas com rotavirose, onde o gene de NSP4 foi investigado, estava associada ao genótipo B, exceto uma amostra que se associou aos genótipos B e C (Khamrin et al. 2006a). Além disso, foi também observado que uma amostra não usual G3P[3] isolada de uma criança de dois anos infectada nesse mesmo período apresentou maior identidade com uma amostra de rotavírus isolado de caprino, sendo caracterizada como genótipo C (Khamrin et al. 2006b). Em 2004, o genótipo C foi ainda identificado em duas amostras não usuais, G3P[9] (Khamrin et al. 2007).

Em um estudo conduzido na Inglaterra, foi evidenciado para as amostras de rotavírus de diferentes combinações de G e P, coletadas de crianças de 1995 a 2002 no Reino Unido e na Índia, que amostras G1P[4], G4P[8], G3P[8] e G9P[8] foram caracterizadas tanto como genótipo A ou B de NSP4. Além disso, observou-se que as amostras G2P[4], G4P[4] e G9P[6] estavam associadas ao genótipo A, e as amostras G1P[8] ao genótipo B (Iturriza-Gómara et al. 2003).

Na Argentina, amostras G9P[6] de crianças com rotavirose coletadas entre 1996 e 1999 foram identificadas como genótipo A, enquanto que amostras G9P[8] coletadas de 2002 a 2004 foram caracterizadas como genótipo B (Stupka et al. 2007).

Entre 2000 e 2006, amostras G2P[4] obtidas de humanos associadas ao genótipo A, e amostras G1P[8], G3P[8] e G9P[8] associadas ao genótipo B foram identificadas na China (Wang et al. 2007).

No Brasil, no estudo conduzido por Araújo et al. (2007b) no Rio de Janeiro em amostras de crianças hospitalizadas com rotavirose obtidas entre 1986 e 2004 também foram identificados os genótipos A e B. As amostras G1P[8], G5P[8] e G9P[8] estavam associadas ao genótipo B, e as amostras G2P[4] ao genótipo A. Na cidade de Belém, foi observado que as amostras G2P[6] e G9P[6] de neonatos e crianças com rotavirose associaram-se ao genótipo A, e amostras G4P[6] ao genótipo B (Mascarenhas et al. 2006, 2007b). Além disso, estes autores evidenciaram que as amostras do genótipo B formaram dois grupos distintos, um mais relacionado com amostra protótipo humana e outro mais relacionado com amostra protótipo suína, sugerindo uma provável transmissão inter-espécie envolvendo humanos e animais (Mascarenhas et al. 2007b).

1.3.6. Antígenos de VP6 e NSP4 em relação à vacina de rotavírus do grupo A

O papel do sistema imune em relação à infecção natural ou vacinal por rotavírus é complexo e controverso. O ponto de partida para que se compreenda a imunidade entre os rotavírus é a demonstração de que tanto a infecção pelo vírus selvagem quanto aquela ocorrida pelo vírus vacinal induz uma resposta imune e protege contra as formas mais graves da doença em infecções sucessivas (Hoshino & Kapikian 2000, Linhares & Breese 2000, Costa et al. 2005, Mascarenhas & Linhares 2005, Linhares & Villa 2006).

Nesse sentido, múltiplas estratégias têm sido empreendidas no desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz anti-rotavírus do grupo A, de forma a oferecer uma ampla cobertura antigênica principalmente em relação aos tipos importantes de G e/ou P que circulam globalmente (Hoshino & Kapikian 2000, Linhares & Breese 2000, Gentsch et

al. 2005, Mascarenhas 2006). Os anticorpos séricos específicos para as proteínas VP4 e VP7, se presentes em níveis críticos, possuem efeito protetor contra a doença causada por rotavírus (Hoshino & Kapikian 2000, Linhares & Breese 2000, Costa et al. 2005).

A vacina monovalente contra rotavírus humano G1P[8] (RIX4414), licenciada no Brasil em março de 2006, mostrou diminuição na incidência de gastroenterite grave associada a rotavírus já após a primeira dose, e quando administrada as duas doses foi altamente eficaz contra a doença grave e hospitalização, além de oferecer proteção à diarreia causada pelo sorotipo G9 (Linhares et al. 2006a, b).

Adicionalmente, existem outros fatores de defesa, como os anticorpos anti-NSP4 e anti-VP6 e imunidade celular, além de fatores locais da mucosa que podem também estar implicados na prevenção de episódios de gastroenterite causados por rotavírus (Costa et al. 2005, Vizzi et al. 2005, Corthésy et al. 2006).

A imunidade de mucosas, mediada pela IgA secretora, parece desempenhar importante papel na proteção contra os rotavírus. Essa imunoglobulina é anticorpo não-neutralizante dirigido contra a proteína VP6, que bloqueia os rotavírus dentro das células epiteliais durante o processo de transcitose. Tem sido demonstrado que altos níveis de IgA secretora nas superfícies mucosas oferecem proteção completa contra a reinfecção sintomática (Feng et al. 2002, Corthésy et al. 2006).

Considerando que AcsM da classe IgA direcionados contra a proteína VP6 são capazes de proteger camundongos da infecção por rotavírus (Feng et al. 2002, Corthésy et al. 2006), várias tentativas têm sido realizadas no sentido de determinar epitopos antigênicos de VP6 que induzam imunidade protetora e que sejam importantes para o desenvolvimento de novas vacinas contra o vírus (Choi et al. 2000, 2003). Peptídeos sintéticos de VP6 (aa 289-302) têm se mostrado extremamente protetores (97-99%) quando administrados por via intra-nasal em camundongos associados com LTa, mesmo

em baixas doses (Choi et al. 2003). Estudos realizados em suínos e murinos com as proteínas virais recombinantes do capsídeo duplo (VP2 e VP6), expressas em baculovírus, denotam também resultados preliminares satisfatórios no tocante à resposta imune e à eficácia (Bertolotti-Ciarlet et al. 2003, Shuttleworth et al. 2005).

A NSP4 tem sido considerada uma proteína mais conservada que as proteínas alvos da vacina (VP7 e VP4) e que apresenta também características imunogênicas. Anticorpos adquiridos passivamente anti-NSP4 parecem reduzir tanto frequência quanto gravidade da diarreia em ratos jovens infectados por rotavírus, o que sugere que a resposta imune a essa proteína possa também modular a doença diarreica em humanos (Ball et al. 1996). Entretanto, o exato papel da NSP4 na proteção contra a rotavirose em humanos não é completamente elucidado (Vizzi et al. 2005). Estudos realizados em humanos revelaram níveis variáveis da imunogenicidade dessa proteína após a infecção natural ou vacinação, provavelmente devido aos diferentes ensaios ou antígenos empregados (Ray et al. 2003, Yuan et al. 2004b).

Borgan et al. (2003) observaram que um fragmento de NSP4 (aa 136-150) induziu a formação de AcsM contra diferentes genótipos dessa proteína, sugerindo que a região localizada entre os aminoácidos 136 a 150 da NSP4 seja altamente conservada entre os rotavírus de origem humana e animal. Além disso, a resposta à NSP4 parece ser heterotípica, significando que anticorpos anti-NSP4 reconhecem um ou mais dos genótipos identificados (Ray et al. 2003, Yuan et al. 2004b, Vizzi et al. 2005).

Por outro lado, um estudo com proteínas recombinantes de NSP4 expressas em baculovírus representativas dos genótipos A, B, C e D identificados em cinco espécies de mamíferos (humano, bovino, suíno, símio e murino), que foram avaliadas como determinantes antigênicos em leitões e bois gnotobióticos, mostrou formação de anticorpos espécies-específicos e não genótipos-específicos. Foi ainda evidenciado que

anticorpos espécies-específicos de natureza homotípica falharam na prevenção contra uma segunda infecção induzida em porcos por outro sorotipo de rotavírus suíno (Yuan et al. 2004a). Além disso, a NSP4 tem se mostrado significativamente menos imunogênica que a proteína VP6 quando as respostas são independentemente mensuradas por ensaios imunoenzimáticos (Vizzi et al. 2005).

Dessa forma, outras investigações em termos de imunidade preventiva precisam ainda ser realizadas. Técnicas moleculares que permitem a identificação de variantes genéticas de rotavírus do grupo A, codificantes dos genes de VP4 e VP7, como também de VP6 e NSP4, visando melhores parâmetros para avaliação da resposta vacinal e para o desenvolvimento de novas estratégias de imunização devem ser utilizadas.

1.4. JUSTIFICATIVA

Como exposto anteriormente, o impacto mundial da infecção por rotavírus do grupo A tem conduzido ao desenvolvimento de estratégias vacinais no intuito de reduzir a sua morbi-mortalidade (Hoshino & Kapikian 2000, Linhares & Breese 2000, Costa et al. 2005, Mascarenhas & Linhares 2005, Linhares & Villa 2006, Linhares et al. 2006a, b).

O conhecimento da circulação dos genótipos G e P de rotavírus do grupo A é crucial não só para o monitoramento da infecção por este vírus como também para o sucesso do processo vacinal. Adicionalmente, ao considerar também o papel da VP6, demonstrada em ensaios experimentais em animais como a proteína de rotavírus mais imunogênica (Iturriza-Gómara et al. 2002a, Corthésy et al. 2006, Wei et al. 2006), e da NSP4, admitida como enterotoxina viral, a qual também é imunogênica (Ball et al. 2005, Vizzi et al. 2005, Deepa et al. 2007), torna também importante a caracterização da amostra circulante em termos de VP6 e NSP4.

No Brasil, são extensas as informações acerca da epidemiologia molecular das infecções por rotavírus do grupo A em relação à diversidade dos genótipos G e P (Linhares 2000, Luz et al. 2005, Mascarenhas et al. 2006, Araújo et al. 2007a, Montenegro et al. 2007, Munford et al. 2007), inclusive na Região Centro-Oeste (Cardoso et al. 1989, 2001, 2003, Souza et al. 2003, Costa et al. 2004, Freitas 2006, Andreasi et al. 2007). Por outro lado, dados sobre a diversidade genômica dos genes codificantes para VP6 e NSP4, nesta Região, são inexistentes.

Assim sendo, o presente estudo visou caracterizar os genes codificantes para ambas as proteínas, considerando que os resultados obtidos permitirão o conhecimento de variantes genéticas de VP6 e NSP4 circulantes na Região. Esse trabalho pretende contribuir ainda para um melhor entendimento da infecção por rotavírus do grupo A,

fornecendo subsídios a pesquisas futuras relativas à profilaxia, além de permitir a continuidade do estudo de vigilância e monitoramento das rotavirose na população adulta e infantil da Região Centro-Oeste do Brasil, que vem sendo realizada pelo Laboratório de Virologia do IPTSP/UFG desde a década de 80.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Caracterização molecular dos genes codificantes das proteínas VP6 e NSP4 de rotavírus do grupo A identificados a partir de amostras fecais de crianças provenientes da Região Centro-Oeste do Brasil, no período de 1987 a 2003.

2.2. Objetivos específicos

- Detectar os genes codificantes das proteínas VP6 e NSP4 de amostras de rotavírus humanos do grupo A pela técnica RT-PCR;

- Identificar os genogrupos de VP6 e genótipos de NSP4 das amostras de rotavírus humanos do grupo A;

- Verificar associação entre os genogrupos de VP6 e genótipos de NSP4 com os genótipos G e P das amostras de rotavírus humanos do grupo A;

- Observar possíveis associações entre os genogrupos de VP6 e genótipos de NSP4 das amostras de rotavírus humanos do grupo A;

- Analisar a variação temporal/geográfica dos genogrupos de VP6 e genótipos de NSP4 das amostras de rotavírus humanos do grupo A;

- Identificar alterações nos resíduos de aminoácidos deduzidos a partir dos genes codificantes de VP6 e NSP4 das amostras de rotavírus humanos do grupo A.

3. ARTIGO I

Tavares TM, Brito WMED, Fiaccadori FS, Freitas ERL, Parente JA, Costa PSS, Giugliano LG, Andreasi MSA, Soares CMA, Cardoso DDP. Molecular characterization of NSP4 gene of human group A rotavirus samples from West Central region of Brazil. Manuscrito publicado na revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2008; 103: 288-294.

Molecular characterization of the NSP4 gene of human group A rotavirus samples from the West Central region of Brazil

Talissa de Moraes Tavares, Wíliam Marta Elsner Diederichsen de Brito, Fabíola Souza Fiaccadori, Erika Regina Leal de Freitas, Juliana Alves Parente¹, Paulo Sérgio Sucasas da Costa², Loreny Gimenes Giugliano³, Márcia Sueli Assis Andreasi⁴, Célia Maria Almeida Soares¹, Divina das Dôres de Paula Cardoso^{4*}

Laboratório de Virologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública ¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas ²Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 s/n, Setor Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brasil ³Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil ⁴Departamento de Patologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

Nonstructural protein 4 (NSP4), encoded by group A rotavirus genome segment 10, is a multifunctional protein and the first recognized virus-encoded enterotoxin. The NSP4 gene has been sequenced, and five distinct genetic groups have been described: genotypes A-E. NSP4 genotypes A, B, and C have been detected in humans. In this study, the NSP4-encoding gene of human rotavirus strains of different G and P genotypes collected from children between 1987 and 2003 in three cities of West Central region of Brazil was characterized. NSP4 gene of 153 rotavirus-positive fecal samples was amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and then sequenced. For phylogenetic analysis, NSP4 nucleotide sequences of these samples were compared to nucleotide sequences of reference strains available in GenBank. Two distinct NSP4 genotypes could be identified: 141 (92.2%) sequences clustered with NSP4 genotype B, and 12 sequences (7.8%) clustered with NSP4 genotype A. These results reinforce that further investigations are needed to assess the validity of NSP4 as a suitable target for epidemiologic surveillance of rotavirus infections and vaccine development.

Key words: group A rotavirus - NSP4 gene - genotypes - West Central region - Brazil

Group A rotaviruses are a major cause of gastroenteritis in infants and young children throughout the world. Each year, these viruses cause approximately 111 million episodes of severe diarrhea, which results in 611,000 deaths (Parashar et al. 2006). In Brazil, the frequency of group A rotavirus infection among young children was found to be between 12 and 42% (Linhares 2000, Cardoso et al. 2003, Costa et al. 2004, Cauás et al. 2006, Munford et al. 2007), and about 80,000 children are hospitalized for the infection yearly (Linhares 2000). Viral particles consist of a non-enveloped, triple-layer protein capsid structure that surrounds a genome composed of 11 segments of double-stranded RNA. The genome encodes six structural proteins (VP1-VP4, VP6 and VP7) and six nonstructural proteins (NSP1-NSP6) (Estes & Kapikian 2007).

Variability in the genes encoding VP7 and VP4 proteins forms the basis of the current strain typing of group A rotaviruses into G and P genotypes, respectively. Studies of rotavirus infections in humans have identified distinct G and P genotypes circulating simultane-

ously in different parts of the world (Santos & Hoshino 2005, Estes & Kapikian 2007, Gulati et al. 2007, Martella et al. 2007, Munford et al. 2007, Matthijnsens et al. 2008). There is currently only limited information available on the detection or genetic variability of the gene that encodes nonstructural protein 4 (NSP4) (Ciarlet et al. 2000, Mori et al. 2002, Iturriza-Gómara et al. 2003, Araújo et al. 2007, Mascarenhas et al. 2007).

NSP4, encoded by segment 10, is a transmembrane glycoprotein of 175 amino acids (aa) (Estes & Kapikian 2007). NSP4 serves as an intracellular receptor for the budding of subviral double-layered particles into the endoplasmic reticulum, a step that is critical for the acquisition of a transient viral membrane and viral particle maturation (Taylor & Bellamy 2003). In addition, NSP4 has been found to have an enterotoxin-like activity that was originally mapped between aa 114 and 135. Modifications in the toxigenic activity and virulence of rotavirus have been associated with aa changes in this region (Ball et al. 1996, Zhang et al. 1998). Finally, it has been proposed that antibodies against NSP4 might reduce both the frequency and severity of diarrhea in mice. Together with studies in human infants, these data suggest that the immune response to NSP4 could modulate rotavirus-induced diarrhea in human disease (Ball et al. 1996, Yuan et al. 2004, Vizzi et al. 2005).

The NSP4 genes of animal and human rotavirus have been sequenced and compared. Sequence analyses have revealed the existence of five distinct NSP4 genotypes: A (KUN), B (Wa), C (AU-I), D (EW) and E (avian-like).

Financial support: CNPq

* Corresponding author: dcardoso@iptsp.ufg.br

Received 28 January 2008

Accepted 8 May 2008

Genotypes A, B, C and D have been determined from mammalian rotavirus strains, while genotype E has been identified from avian rotavirus strains. Genotypes A, B and C have been detected in humans (Ciarlet et al. 2000, Mori et al. 2002, Lin & Tian 2003).

In Brazil, there are a few molecular studies of the rotavirus NSP4 gene from strains of diverse origin and various G and P genotypes (Cunliffe et al. 1997, Mascarenhas et al. 2006, 2007, Araújo et al. 2007). As yet, however, there has been no investigation into the detection rate and the genetic diversity of NSP4 genes in the West Central region of Brazil. This study presents novel epidemiological data regarding the circulation of NSP4 genotypes of rotaviruses samples recovered from children in three cities of the West Central region of Brazil.

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Samples - The NSP4 gene was investigated in 330 rotavirus A-positive fecal samples that were previously obtained from infected children during surveillance studies performed at the Laboratory of Virology of Universidade Federal de Goiás (UFG) in the city of Goiânia, Brazil. These samples were collected from children up to five years of age with ($n = 325$) or without ($n = 5$) acute gastroenteritis between August 1987 and September 2003 in three cities of West Central region, Brazil: Goiânia (GO), Campo Grande (CG) and Brasília (BRA). A total of 202 group A rotavirus samples were identified in GO from 1987 to 2001, 81 samples in CG between 2000 and 2003 and 47 samples in BRA in 2001 and 2002. All samples from GO and CG were collected "in nature", whereas, of the samples collected in BRA, only eight were collected "in nature" and 39 were collected by rectal swab. All of the collected samples had been previously identified as group A rotavirus (Cardoso et al. 2003, Souza et al. 2003, Costa et al. 2004, Andreasi et al. 2007) with a combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (Pereira et al. 1985) and/or by polyacrylamide gel electrophoresis (Pereira et al. 1983).

Specimens were collected from children after signed written consent was provided by their parents or other legal guardians. This study was approved by the Ethics Committee of the Research of UFG (Protocol nº.004/ 2000).

RNA extraction - The viral dsRNA was extracted from 20% fecal suspension by the glass powder method, using guanidine isothiocyanate buffer and silica as described by Boom et al. (1990) with modifications (Cardoso et al. 2002).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification - The RT-PCR followed the protocol described by Lee et al. (2000). The purified viral double-stranded RNA (dsRNA) was denatured at 97°C for 10 min and then used as template for the RT-PCR. The RT of dsRNA was carried out with SuperScript™ (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), and PCR amplification was performed with Taq DNA polymerase (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Fragments of the NSP4 gene of 725 bp were amplified using forward (10BEG16) and reverse (10END722) primers as described by Lee et al. (2000).

Sequencing reaction - The PCR products were purified using the QIAquick® PCR purification kit (Qiagen, São Paulo, Brazil). The PCR-purified products were sequenced by a MegaBACE 1000 automatic sequencer (GE Healthcare, Sunnyvale, USA), using a DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). The primers used were the same as for PCR amplification. The products were further purified by ethanol precipitation and resuspended in formamide.

Sequence analysis - The sequences obtained were analyzed with PHRED/PHRAP/CONSED (<http://www.phrap.org>) and pre-processed using the Phred (Ewing & Green 1998) and Crossmatch (http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysis_tools/Swat.cfm) programs. Only sequences with at least 100 nucleotides and Phred quality greater than or equal to 20 were considered for further analysis with the Blastn program (Altschul et al. 1990) in the National Center for Biotechnology Information Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). NSP4 sequences were aligned and compared to NSP4 sequences of standard reference strains [AU-1 (D89873), AU32 (D88830), Ch-1 (AB065287), EW (U96335), KUN (D88829), RV5 (U59103), OSU (D88831), Wa (AF093199)] and Brazilian strains [rj5348 (DQ498179) and rj7363 (DQ498192)] available in GenBank using Clustal X software (Thompson et al. 1997). NSP4 genotypes were determined by phylogenetic analysis using the neighbor-joining algorithm method (Saitou & Nei 1987).

Nucleotide sequence accession numbers - The NSP4 nucleotide sequence data determined in this study were deposited into the GenBank sequence database with accession numbers: EU620072-EU620111.

Statistical analysis - The statistical analysis was performed with the Epi Info version 6 program, using the chi-squared (χ^2) test for proportion comparison. Statistical significance was assessed at a p value of < 0.05 .

RESULTS

The NSP4 gene was detected in 259 (78.5%) of 330 rotavirus A-positive fecal samples. Of them, rates of 82.7% (167/202), 85.2% (69/81) and 48.9% (23/47) were observed in fecal specimens from children in GO, CG and BRA, respectively ($\chi^2 = 28.55$, $p = 0.000$).

A total of 231 samples that had an amplified NSP4 gene were submitted to sequencing. NSP4 nucleotide sequences of 153 (66.2%) samples could be analyzed and were compared to nucleotide sequences of prototype strains. Of those, 141 sequences (92.2%) clustered with NSP4 genotype B with degrees of identity ranging from 89.0% to 99.0%; and the remaining 12 sequences (7.8%) clustered with NSP4 genotype A (93.0% - 95.0% of identity). Genotype A samples were identified only in children from GO, while genotype B samples were identified in samples from all three cities (Table I). In GO, the only sample collected in 1987 was genotype B; in the 1990s, however, both genotypes A and B were detected in the 45 samples analyzed, with genotype B (73.3%) predominating. From 2000 to 2003, only genotype B samples were found to be circulating in the three cities analyzed (Table II).

TABLE I

Distribution of nonstructural protein (NSP4) genotypes of group A rotaviruses samples from infected children^a from three cities of West Central region of Brazil

Cities-States	Samples		Genotype A		Genotype B	
	n		n	%	n	%
Goiânia-GO	91		12	13.2	79	86.8
Campo Grande-MS	51		-	-	51	100.0
Brasília-DF	11		-	-	11	100.0
Total	153		12	7.8	141	92.2

a: children with (n = 151) and without (n = 2) diarrhea.

TABLE II

Distribution of NSP4 genotypes of group A rotaviruses samples from infected children^a from West Central region of Brazil considering the year of collection

Year of collection	Samples		Genotype A		Genotype B	
	n		n	%	n	%
1990-1999	45		12	26.7	33	73.3
2000-2003	107		-	-	107	100.0
Total	152 ^b		12	7.9	140 ^b	92.1

a: children with (n = 150) and without (n = 2) diarrhea; b: the only sample identified in 1987 characterized as NSP4 genotype B was not included.

Rotavirus samples P[8]G1, P[6]G1, P[8]G2, P[8]G3, P[8]G4 and P[8]G9 were more closely related to NSP4 genotype B, whereas P[6]G9 rotavirus samples were closely related to NSP4 genotype A. All of these samples that clustered into genotype A or B had human origin (Fig. 1, Table III).

NSP4 genotypes A and B were identified in children with or without acute gastroenteritis. Of the 153 samples, 151 were from children with diarrhea, and two were from children without diarrhea. No significant differences were found in the nucleotide sequences of the NSP4 genes from symptomatic and asymptomatic samples.

The deduced aa sequences of the NSP4 genes of 15 human group A rotavirus samples were aligned with aa sequences of reference prototype strains (Fig. 2). Variations between sequences of genotypes A and B were found in the H3 cytoplasmic domain (aa 63-80), amphipathic alpha-helix domain (aa 93-133), VP4 binding site (aa 112-146), interspecies variable domain (aa 131-141) and VP6 binding site (aa 156-175). Changes were also identified in aa 89, 148, 153 and 154.

Several significant aa differences were observed between distinct NSP4 genotypes, mainly in the interspecies variable domain (Fig. 2, marked in gray box) and in the VP6 binding site (Fig. 2, indicated by diamonds).

In the region proposed to be the enterotoxigenic domain (aa 114-135), the following changes were observed: (Y-H) and (K-N) at aa 131 and 133, respectively (Fig. 2, indicated by asterisks). No differences in the aa sequences of NSP4 were observed between samples from children with or without diarrhea (Fig. 2).

DISCUSSION

In this study, a detection rate of 78.5% was observed for the NSP4-encoding gene from rotavirus-positive fecal samples collected in three cities located in the West Central region of Brazil. We speculate that the NSP4 gene could not be detected in all samples due to degradation of the RNA probably as a result of: i) low number of particles present in fecal specimens from rectal swabs; ii) RNA degradation by RNAses; iii) repeated freezing and unfreezing of these samples; iv) preservation of fecal specimens at -20°C and not at -70°C; v) defective particle; presence and/or vi) eventual inhibitor persistence of the RT-PCR.

Although five rotavirus NSP4 genotypes have been identified to date (Ciarlet et al. 2000, Mori et al. 2002, Lin & Tian 2003), most of the diversity in the NSP4-encoding gene among human rotaviruses lies in genotypes A and B (Iturriza-Gómara et al. 2003). Other studies, however, have detected unusual strains. Cho et al. (2006) observed that two human rotavirus samples in Seoul had a low degree of homology with the currently described NSP4 genotypes, suggesting a possible new NSP4 genotype.

In this study, NSP4 genotypes A and B could be recognized in human group A rotavirus-positive fecal samples. These results are similar to those described by other authors in Brazil (Mascarenhas et al. 2006, 2007, Araújo et al. 2007) and in other countries (Kirkwood et al. 1999, Lee et al. 2000, Iturriza-Gómara et al. 2003, Cho et al. 2006). None of the samples analyzed in our study were closely related to the AU-1 prototype strain, which was isolated from humans and described as NSP4 genotype C (Iturriza-Gómara et al. 2003).

Our data show that genotype B was the most frequently detected (92.2%) genotype in the West Central region. Similar data were also observed in the Southeast region of Brazil (Araújo et al. 2007) as well as in other countries (Kirkwood et al. 1999, Lee et al. 2000, Iturriza-Gómara et al. 2003, Cho et al. 2006); however, different results were observed in the Northern region of Brazil, where genotype A was predominant (Mascarenhas et al. 2006, 2007). Genotype A samples were identified only in children from GO, while genotype B samples were identified in all three cities. In GO, genotype A was found only in the 1990s; however, after 2000, it seemed to be replaced by genotype B. Furthermore, the only sample identified in 1980s was genotype B, suggesting that the circulation of NSP4 genotypes changes over time. After 2000, genotype B was also found in CG and BRA. In Rio de Janeiro (RJ), it was shown that genotype B circulated during the years 1986-1988, 1990 and 2001-2004, while genotype A circulated only in 2002 (Araújo et al. 2007). Both genotypes A and B were identified during the 1990s and in 2000 from children in Belém (Mascarenhas et al. 2007).

Worldwide, several studies have compared the NSP4 genes of different rotavirus strains isolated from diarrheic and non-diarrheic children (Cunliffe et al. 1997, Lee et al. 2000, Mascarenhas et al. 2007). In this study, NSP4 genes were identified in children with or without diarrhea, but no differences were observed in the nucleotide

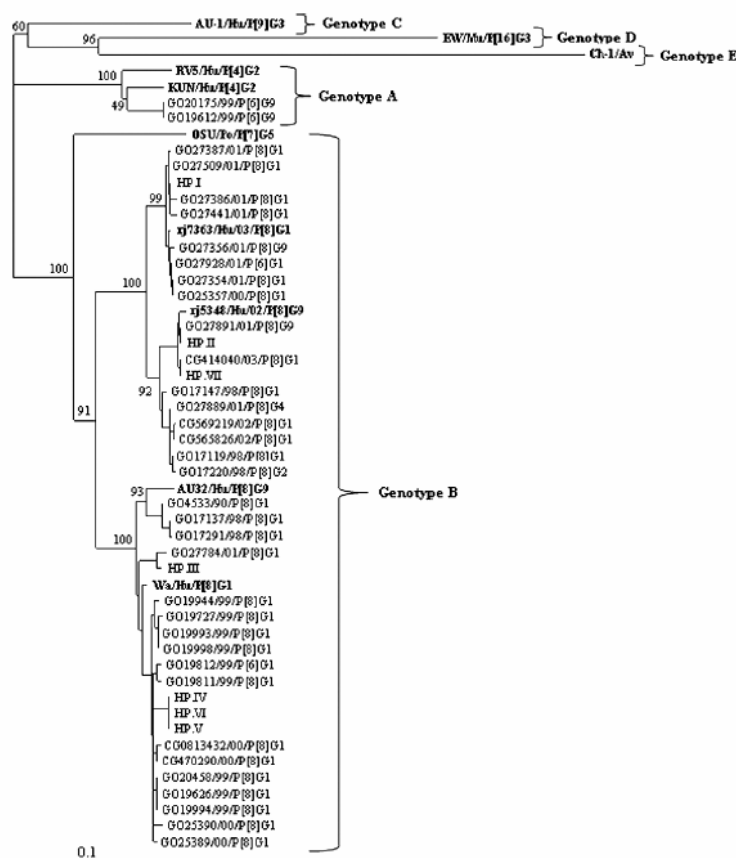


Fig. 1: phylogenetic analysis of nucleotide sequences of group A rotavirus nonstructural protein (NSP4) gene. Nucleotide sequences of prototype strains of NSP4 genotypes A-E obtained from GenBank are represented in bold. Nucleotide sequences of OSU/Po prototype, rj5348/Hu and rj7363/Hu strains obtained from GenBank were also included to better understand the phylogenetic relationships among strains. For each sample, the designation in relation to geographical location (BRA: Brasília; CG: Campo Grande; GO: Goiânia), sample number, year of collection, and G and P genotypes are shown. Group samples in which NSP4 nucleotide sequences showed 100% identity were designated as haplotypes (HP) (I-VII). HP.I: is represented by BRA266/01/P[8]G1, BRA270/01/P[8]G1, GO27440/01/P[8]G1, GO27783/01/P[8]G1 and GO27821/01/P[8]G1 samples; HP.II: is represented by BRA275/01/P[8]G1 and GO27892/01/P[8]G9 samples; HP.III: is represented by CG423535/03/P[8]G1, CG513102/03/P[8]G1, CG520839/03/P[8]G1, CG795087/03/P[8]G1, CG816414/03/P[8]G1, CG817198/03/P[8]G1 and CG827082/03/P[8]G1 samples; HP.V: is represented by CG518035/03/P[8]G1 and CG842284/03/P[8]G1 samples; HP.VI: is represented by CG785797/03/P[8]G1, CG789219/03/P[8]G1, CG794537/03/P[8]G1 and CG837155/03/P[8]G1 samples; HP.VII: is represented by CG819946/03/P[8]G3, CG826796/03/P[8]G9 and CG857222/03/P[8]G1 samples.

TABLE III

Combinations of NSP4 and G and P genotypes of group A rotaviruses samples obtained from children at West Central region of Brazil considering the years of sample collection

Genotypes ^a G and P	NSP4 genotypes	1990-1999		2000-2003	
		n	n	n	n
P[6]G9	A	2	-	-	-
P[8]G1	B	13	35	-	-
P[6]G1	B	1	1	-	-
P[8]G2	B	1	-	-	-
P[8]G3	B	-	1	-	-
P[8]G4	B	-	3	-	-
P[8]G9	B	-	4	-	-

^a: see Cardoso et al. (2003), Souza et al. (2003), Costa et al. (2004), Andreasi et al. (2007).

sequences of symptomatic and asymptomatic samples. These results are consistent with other investigations (Horie et al. 1997, Lee et al. 2000, Mascarenhas et al. 2007); however, since only two samples from children without diarrhea were analyzed, the role of NSP4 as a possible pathogenic determinant of rotavirus could not be assessed in this work.

Surveys around the world indicate that P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 and P[8]G4 are the most common G and P genotypes combinations isolated in children with diarrhea caused by group A rotavirus. More recent studies have shown the emergence of P[8]G9 and P[6]G9 genotypes in cases of severe diarrhea in children (Santos & Hoshino 2005, Estes & Kapikian 2007, Munford et al. 2007, Mathijnsens et al. 2008). In this study, rotavirus samples representing the P[8]G1, P[6]G1, P[8]G2, P[8]

analysis performed in our study provides insight into the genetic relationships between different rotaviruses samples circulating in a particular region of Brazil.

REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Andreasi MSA, Batista SMF, Tozetti IA, Ozaki CO, Nogueira MM, Fiaccadori FS, Borges AMT, Santos RAT, Cardoso DDP 2007. Rotavírus A em crianças de até três anos de idade, hospitalizadas com gastroenterite aguda em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 411-414.
- Araújo IT, Heinemann MB, Mascarenhas JDP, Assis RMS, Fialho AM, Leite JPG 2007. Molecular analysis of NSP4 and VP6 genes of rotavirus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol* 56: 854-859.
- Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK 1996. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* 272: 101-104.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME, van der Noorda J 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.
- Cardoso DDP, Soares CMA, Azevedo MSP, Leite JPG, Munford V, Rácz ML 2002. Serotypes and subgroups of rotavirus isolated from children in Central Brazil. *Med Sci Monit* 8: 624-628.
- Cardoso DDP, Soares CMA, Souza MBLD, Azevedo MSP, Martins RMB, Queiróz DAO, Brito WMED, Munford V, Rácz ML 2003. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 25-29.
- Cauás RC, Falbo AR, Correia JB, Oliveira KMM, Montenegro FMU 2006. Diarréia por rotavírus em crianças desnutridas hospitalizadas no Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP. *Rev Bras Saude Matern Infant* 6: 77-83.
- Cho SL, Ahn JH, Kim K, Chung SI, Lim I, Kim W 2006. Genetic variation in the NSP4 gene of human rotavirus isolated in Seoul. *J Bacteriol Virol* 36: 79-87.
- Ciarlet M, Liprandi F, Conner ME, Estes MK 2000. Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses. *Arch Virol* 145: 371-383.
- Costa PSS, Cardoso DDP, Grisi SJFE, Silva PA, Fiaccadori F, Souza MBLD, Santos RAT 2004. Infecções e reinfecções por Rotavírus A: genotipagem e implicações vacinais. *J Pediatr* 80: 119-122.
- Cunliffe NA, Woods PA, Leite JPG, Das BK, Ramachandran M, Bhan MK, Hart CA, Glass RI, Gentsch JR 1997. Sequence analysis of NSP4 gene of human rotavirus allows classification into two main genetic groups. *J Med Virol* 53: 41-50.
- Estes MK, Kapikian AZ 2007. Rotaviruses. In DM Knipe, PM Howley, *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1917-1974.
- Ewing B, Green P 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 8: 186-194.
- Gulati BR, Deepa R, Singh BK, Durga Rao C 2007. Diversity in Indian equine rotaviruses: identification of genotype G10.P6[1] and G1 strains and a new VP7 genotype (G16) strain in specimens from diarrheic foals in India. *J Clin Microbiol* 45: 972-978.
- Horie Y, Masamune O, Nakagomi O 1997. Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins identified by sequence analysis. *J Gen Virol* 78: 2341-2346.
- Iturriza-Gómara M, Anderton E, Kang G, Gallimore C, Phillips W, Desselberger U, Gray J 2003. Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains. *J Clin Microbiol* 41: 3566-3573.
- Kirkwood CD, Gentsch JR, Glass RI 1999. Sequence analysis of the NSP4 gene from human rotavirus strains isolated in the United States. *Virus Genes* 19: 113-122.
- Lee CN, Wang YL, Kao CL, Zao CL, Lee CY, Chen HN 2000. NSP4 gene analysis of rotaviruses recovered from infected children with and without diarrhea. *J Clin Microbiol* 38: 4471-4477.
- Lin SL, Tian P 2003. Detailed computational analysis of a comprehensive set of group A rotavirus NSP4 proteins. *Virus Genes* 26: 271-282.
- Linhares AC 2000. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. *Cad Saude Publica* 16: 629-646.
- Martella V, Ciarlet M, Bányai K, Lorusso E, Arista S, Lavazza A, Pezzotti G, Decaro N, Cavalli A, Lucente MS, Corrente M, Elia G, Camero M, Tempesta M, Buonavoglia C 2007. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in Italian swine herds. *J Clin Microbiol* 45: 577-580.
- Mascarenhas JDP, Linhares AC, Bayma APG, Lima JC, Sousa MS, Araújo IT, Heinemann MB, Gusmão RHP, Gabbay YB, Leite JPG 2006. Molecular analysis of VP4, VP7, and NSP4 genes of P[6]G2 rotavirus genotype strains recovered from neonates admitted to hospital in Belém, Brazil. *J Med Virol* 78: 281-289.
- Mascarenhas JDP, Linhares AC, Gabbay YB, Lima CS, Guerra SFS, Soares LS, Oliveira DS, Lima JC, Macedo O, Leite JPG 2007. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. *Virus Res* 126: 149-158.
- Matthijnsens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijis I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M 2008. 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.
- Mori Y, Borgan MA, Ito N, Sugiyama M, Minamoto N 2002. Sequential analysis of nonstructural protein NSP4s derived from group A avian rotaviruses. *Virus Res* 89: 145-151.
- Munford V, Souza EC, Caruzo TAR, Martinez MB, Rácz ML 2007. Serological and molecular diversity of human rotavirus in São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol* 38: 459-466.
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12: 304-306.
- Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Andrade ZP, Castro L 1985. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J Virol Methods* 10: 21-28.
- Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Candeias JAN, Rácz ML, Linhares AC, Gabbay YB, Trabulsi JR 1983. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *Am J Hyg* 90: 117-125.
- Saitou N, Nei M 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- 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.
- Souza MBLD, Rácz ML, Leite JPG, Soares CMA, Martins RMB, Munford V, Cardoso DDP 2003. Molecular and serological characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospital-

- ized children in Goiânia, Brazil, 1998-2000. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 441-443.
- Taylor JA, Bellamy AR 2003. Interaction of the rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 with the viral and cellular components. In U Desselberger, J Gray, *Viral Gastroenteritis*, Elsevier Science, Amsterdam, p. 225-235.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quantity analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
- Vizzi E, Calviño E, González R, Pérez-Schael I, Ciarlet M, Kang G, Estes MK, Liprandi F, Ludert JE 2005. Evaluation of serum antibody responses against the rotavirus nonstructural protein NSP4 in children after Rhesus rotavirus tetravalent vaccination or natural infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 1157-1163.
- Yuan L, Ishida S, Honma S, Patton JT, Hodgins DC, Kapikian AZ, Hoshino Y 2004. Homotypic and heterotypic serum isotype-specific antibody responses to rotavirus nonstructural protein 4 and viral protein (VP) 4, VP6, and VP7 in infants who received selected live oral rotavirus vaccines. *J Infect Dis* 189: 1833-1845.
- Zhang M, Zeng CQY, Dong Y, Ball JM, Saif LJ, Morris AP, Estes MK 1998. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *J Virol* 72: 3666-3672.

4. ARTIGO II

Tavares TM, Brito WMED, Fiaccadori FS, Parente JA, Costa PSS, Giugliano LG, Andreasi MSA, Soares CMA, Cardoso DDP. Molecular characterization of VP6-encoding gene of group A human rotavirus samples from Central West region of Brazil. Manuscrito submetido e aceito para publicação na revista *Journal of Medical Virology*.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF VP6-ENCODING GENE OF GROUP A HUMAN ROTAVIRUS SAMPLES FROM CENTRAL WEST REGION OF BRAZIL.

Talissa de Moraes Tavares¹, Wíliam Marta Elsner Diederichsen de Brito¹, Fabíola Souza Fiaccadori¹, Juliana Alves Parente², Paulo Sérgio Sucasas da Costa³, Loreny Gimenes Giugliano⁴, Márcia Sueli Assis Andreasi⁵, Célia Maria Almeida Soares², Divina das Dôres de Paula Cardoso^{1*}

¹Laboratório de Virologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Brazil.

²Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), UFG, Goiânia, Brazil.

³Faculdade de Medicina, UFG, Goiânia, Brazil.

⁴Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília (UNB), Brasília, Brazil.

⁵Departamento de Patologia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Brazil.

*Correspondence to: Divina das Dôres de Paula Cardoso, Laboratório de Virologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235, esquina com 1ª Avenida sem Nº, Setor Universitário, 74605-050, Goiânia, Goiás, Brasil. Tel: + 55 62 32096122; Fax: + 55 62 35211839. E-mail: dcardoso@iptsp.ufg.br

Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq).

ABSTRACT

Group A rotaviruses are the main cause of acute gastroenteritis in children worldwide. The intermediate capsid protein VP6 encoded by segment 6 of the dsRNA genome is the major structural component of the virus and it is highly antigenic and immunogenic. VP6 is responsible for group and subgroup (SG) specificities, allowing classification of group A rotavirus into SG I, SG II, SG I+II and SG non-I-non-II. VP6-encoding gene of 154 group A human rotavirus samples of different G and P genotypes recovered from children in three cities of Central West region of Brazil was amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction followed by sequencing and phylogenetic analysis. Two distinct genetic groups could be recognized: VP6 genogroups I and II. Sequences analysis also revealed that all samples identified as VP6 genogroup I were associated with NSP4 genotype A, whereas samples identified as VP6 genogroup II were associated with NSP4 genotype B. This is the first study in Central West region regarding genetic variability of the VP6 gene. Further molecular surveillance of rotavirus strains is needed to understand better the occurrence of VP6 gene diversity in Brazil and the significance of VP6 for the control and prevention of rotavirus gastroenteritis.

KEY WORDS: Group A rotaviruses, VP6 gene, genogroups, Central West region of Brazil.

INTRODUCTION

Group A rotaviruses are the main cause of gastroenteritis in infants and young children worldwide. In developing countries, these viruses are responsible for one third of all diarrhea-associated hospital admissions and approximately 600,000 infant deaths per year (Parashar et al., 2006). Rotaviruses belong to *Reoviridae* family, *Rotavirus* genus. Complete virus particles have a triple-layered protein capsid surrounding a genome consisting of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA), which encodes six structural proteins (VP1-VP4, VP6, VP7) and six nonstructural proteins (NSP1-NSP6) (Estes & Kapikian, 2007).

The segmented nature of rotavirus dsRNA allows reassortment between strains, and the extensive genome diversity results in the accumulation of point mutations in co-circulating rotavirus strains resulting in various combinations of VP7, VP4 and VP6 that can be selected from multiple genetic lineages (Kerin et al., 2007; Matthijnssens et al., 2008).

Variability in the genes encoding VP7 and VP4 proteins forms the basis of the current strain typing of group A rotaviruses into G and P genotypes, respectively. Studies of rotavirus infections in humans have identified various G and P genotypes circulating in different parts of the world (Estes & Kapikian, 2007; Martella et al., 2007; Munford et al., 2007; Matthijnssens et al., 2008), however, there is little information on the genetic variability of the gene that encodes the VP6 protein (Iturriza-Gómara et al., 2002; 2003; Araújo et al., 2007; Farahtaj et al., 2007; Kerin et al., 2007).

The VP6 structural protein is a trimeric protein of 397 amino acids (aa) encoded by the gene segment 6. This protein forms the intermediate capsid of rotaviruses and interacts with the inner capsid protein VP2 and with the two outer capsid proteins, VP7 and VP4. VP6 allows antigenic classification of rotavirus into groups (A-G) and

subgroups (SG). Within group A rotaviruses, SG I, SG II, SG I + II and SG non-I, non-II have been defined according to the reactivity with SG-specific monoclonal antibodies (MAbs) (Estes & Kapikian, 2007). The rotaviruses strains found most commonly in humans belong to SGI or SGII (Iturriza-Gómara et al., 2002).

Serological characterization of VP6 as well as of VP7 and VP4 proteins seems to be unreliable due to antigenic drift through the accumulation of point mutations which leads to amino acid changes on the epitopes recognized by the type-specific MAbs (Iturriza-Gómara et al., 2002; 2003).

Molecular analyses of a 379-bp region of the VP6 gene, which encompassed the region defined previously as encoding the SG-specific epitopes, have allowed molecular subgrouping of rotaviruses according to diversity within the VP6 gene (Iturriza-Gómara et al., 2002; 2003; Araújo et al., 2007), and revealed the existence of two distinct genogroups (I and II) (Iturriza-Gómara et al., 2002; 2003; Araújo et al., 2007; Kerin et al., 2007). Two genetic lineages have been distinguished within genogroup I, consisting of strains characterized serologically as SG I, and three genetic lineages have been distinguished within genogroup II, composed of strains characterized serologically as SG II, SG I + II and SG non-I, non-II (Iturriza-Gómara et al., 2002).

This study describes the characterization of the VP6-encoding gene of group A human rotavirus samples recovered from Brazilian children in order to determine the variability of this gene among rotavirus circulating in the Central West region of Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Samples. A total of 330 rotavirus-positive clinical samples were obtained from children up to five years of age with (n=325) or without (n=5) acute gastroenteritis between 1987 and 2003 in three cities of the Central West region of Brazil: Goiânia, Campo Grande and Brasília. Two hundred and two of the samples were collected in Goiânia from 1987 to 2001, 81 in Campo Grande from 2000 to 2003 and 47 in Brasília from 2001 to 2002. All samples collected from Goiânia and Campo Grande were faeces, whereas samples collected from Brasília were faeces (eight samples) or rectal swab (39 samples). All of the collected samples had been identified previously as group A rotavirus (Cardoso et al., 2003; Souza et al., 2003) by a combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA) (Pereira et al., 1985) and/or by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Pereira et al., 1983).

One hundred and fifty-three of these rotavirus-positive samples were also sequenced for NSP4 gene and were identified previously as NSP4 genotype A or B (Tavares et al., 2008).

Specimens were collected from children after signed written consent was provided by their parents or other legal guardians. This study was approved by the Ethics Committee on Research of Universidade Federal de Goiás (UFG), Brazil (Protocol no.004/ 2000).

RNA extraction. The viral dsRNA was extracted from 20% fecal suspension by the glass powder method, using guanidine isothiocyanate buffer and silica as described by Boom et al. (1990) with modifications (Cardoso et al., 2002).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification.

The RT and amplification reaction (PCR) followed the protocol described by Iturriza-Gómara et al. (2002). The purified viral dsRNA was denatured at 97°C for 5 min and then used as template for the RT-PCR. The RT of dsRNA was carried out with SuperScriptTM II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and PCR amplification was performed using Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Fragments of 379 bp for VP6 gene were amplified using the forward (VP6-F) and reverse (VP6-R) primers as described previously by Iturriza-Gómara et al. (2002).

Sequencing reaction. The PCR products were purified using the QIAquick[®] PCR purification kit (Qiagen, São Paulo, Brazil). The PCR purified products were sequenced by a MegaBACE 1000 automatic sequencer (GE Healthcare, Sunnyvale, USA), using a DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). The primers used were the same as those used for PCR amplification. The products were purified further by ethanol precipitation and resuspended in formamide.

Sequence analysis. The sequence data obtained were analyzed by using the Blastn program (Altschul et al. 1990) in the National Center for Biotechnology Information Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The VP6 sequences were aligned to VP6 sequences of reference strains [US1205 (AF079357), 1076 (D00325), Wa (K02086), E210 (U36240), RMC100 (AF531912), FI-14 (D00323), EW (U36474)] available in GenBank by using Clustal X software (Thompson et al., 1997). VP6 genogroups were determined by phylogenetic analysis using the neighbor-joining algorithm method (Saitou & Nei 1987).

Nucleotide sequence accession numbers. The VP6 nucleotide sequence data determined in this study were deposited into the GenBank sequence database with accession numbers: EU637855-EU637884.

Statistical analysis. Statistical analysis was carried out by the Epi Info version 6 program, using the chi-squared (χ^2) test for proportion comparison. Statistical significance was assessed at a *P*-value less than 0.05 ($P < 0.05$).

RESULTS

The VP6 gene was detected in 280 (84.8%) of 330 group A rotavirus samples. Considering the cities where the samples were collected, positivity rates of 85.6% (173/202), 90.1% (73/81) and 72.3% (34/47) were observed in specimens from children in Goiânia, Campo Grande and Brasília, respectively ($\chi^2 = 7.57$, $P = 0.023$).

Of 280 samples, 251 were submitted to sequencing and 154 (61.4%) nucleotide sequences were examined by and compared to the nucleotide sequences of prototype strains. It was observed that 145 samples (94.2%) were determined as genogroup II, showing degrees of identity ranging from 86% to 99% with genogroup II reference sequences (Wa, E210 and RMC100). The remaining 9 sequences (5.8%) were determined as genogroup I with degrees of identity ranging from 85% to 98% with genogroup I reference sequences (US1205 and 1076).

Genogroup I samples were identified only in children from Goiânia, whereas genogroup II samples were identified in samples from all three cities. Of 54 samples analyzed in Goiânia in the 1990s both genogroups I and II were detected, with the predominance of genogroup II (83.3%). From 2000 to 2003, only genogroup II was identified circulating in the three cities participating in the study.

Of the 60 samples in which G and P genotypes had been identified previously, all rotavirus samples representing the G1P[6], G1P[8], G2P[8], G4P[6], G4P[8] and G9P[8] genotypes were identified as VP6 genogroup II, whereas the G2P[4], G3P[4] and G9P[6] rotavirus samples were identified as VP6 genogroup I. It was observed that the G1P[8] samples were more closely related to the E210 strain (91-99%) or to the RMC100 strain (92-97%). The G2P[8], G4P[8] and G9P[8] samples were more associated with RMC100 strain (95-98%), whereas G1P[6] samples and one G9P[8] sample were more associated with the E210 strain (96-99%). The only G4P[6] sample

showed 91% nucleotide identity with the Wa, E210 and RMC100 strains. In contrast, the G9P[6] sample was more closely related to the US1205 strain (98%). The G2P[4] and G3P[4] samples had about 85.0% of nucleotide identity to the US1205 and 1076 strains (Table I).

A 100% linkage between VP6 genogroup and NSP4 genotype was also observed among group A rotavirus samples of different G and P genotypes. Of the 40 samples that had the VP6 genogroups and NSP4 genotypes identified, all 6 samples of NSP4 genotype A had a VP6 of genogroup I, whereas all 34 samples of NSP4 genotype B had a VP6 of genogroup II (Fig. 1).

Comparative analysis of the deduced amino acid sequences of a fragment of VP6 (aa 246 to 335) of 30 rotaviruses samples showed conserved amino acid substitutions distinguishing the samples in genogroups I and II at residues 248 (Tyr → Phe), 305 (Ala → Asn), 310 (Asn → Gln) and 315 (Glu → Gln/Leu) (Fig. 2).

DISCUSSION

A detection rate of 84.8% was obtained for VP6-encoding gene from rotavirus-positive fecal samples collected in three cities located in the Central West region of Brazil. A lower detection rate was observed in the city of Brasília, compared to the two other cities. It is speculated that this could be due to the fact that most of the samples from this location were collected using rectal swabs.

In this study, the molecular characterization of a 379 bp region of the VP6 gene that defines the SG-specific epitopes showed that genogroups I and II were identified among human group A rotavirus samples analyzed. These results are similar to those described by other investigations in Brazil (Araújo et al., 2007) and in other countries (Iturriza-Gómara et al., 2002; 2003). None of the samples clustered with samples of animal origin as well as reported by Araújo et al. (2007) in other Brazilian study.

Both genogroups samples, I and II, were identified in children from Goiânia, whereas only genogroup II was identified in samples from other cities participating of the study. The current data showed that genogroup II was the most frequent VP6 genogroup detected (83.3%) in the Central West region of Brazil. Similar data were also obtained in the Southeast region of Brazil (Araújo et al., 2007) as well as in other countries (Iturriza-Gómara et al., 2003; Farahtaj et al., 2007; Kerin et al., 2007; Wang et al., 2007).

A great variety of G and P genotypes combinations have been identified among rotaviruses infecting humans (Estes & Kapikian, 2007; Martella et al., 2007; Munford et al., 2007; Matthijssens et al., 2008), however much less diversity has been found among the VP6-encoding genes (Iturriza-Gómara et al., 2002). In general, it has been observed that the G1P[8], G3P[8], G4P[8] and G9P[8] common human rotavirus strains circulating globally appear to be associated more frequently with SG II, whereas the

G2P[4] and G9P[6] strains are associated most commonly with SG I (Iturriza-Gómara et al., 2002; Kerin et al., 2007; Wang et al., 2007). In the present study, G1P[8], G4P[8] and G9P[8] rotavirus samples associated with VP6 genogroup II were also identified, as well as G2P[4] and G9P[6] rotavirus samples associated with VP6 genogroup I. In addition, G1P[6], G2P[8] and G4P[6] uncommon rotavirus samples identified as genogroup II and G3P[4] uncommon rotavirus sample identified as genogroup I were also observed.

It was also demonstrated that variations exist in VP6 genes identity from common rotavirus samples of distinct G and P genotypes isolated during 1990-2003 from Brazil compared to reference strains isolated in different years and regions of the world. The G1 samples determined as genogroup II showed higher nucleotide identities to G2 (91-99%) or G9 (92-97%) reference strains, while the G2 samples were more associated with G9 (97%) reference strain, and a G9 sample was more associated with a G2 (99%) reference strain. The G2 sample determined as genogroup I had 85% nucleotide identity to G9 or G2 reference strains, whereas a G3 sample was more associated with a G9 (86%) reference strain.

The linkage between NSP4 genotypes and VP6 subgroups is admitted to occur as a result of NSP4 acting as a receptor VP6 into the lumen of the endoplasmic reticulum in the course of virus maturation (Estes & Kapikian, 2007) and may suggest coevolution of the genes encoding these two proteins (Iturriza-Gómara et al., 2003). In addition, the segregation of both NSP4 genotypes and VP6 subgroups according to the rotavirus host species (Ciarlet et al., 2000; Iturriza-Gómara et al., 2002) suggests that either of these two proteins or both may be important host restriction determinants (Iturriza-Gómara et al., 2003). In this study, complete linkage was observed between VP6 genogroup and NSP4 genotype in human rotaviruses, with genogroup I being

always associated with NSP4 genotype A and genogroup II with NSP4 genotype B, as also described by Iturriza-Gómara et al. (2003) and Araújo et al. (2007). These data, considering the period of the study, suggest a permanent circulation of these kinds of samples at the region and can be important for the control and prevention of rotavirus gastroenteritis.

Alignment of partial deduced amino acid sequences (aa 246 to 335) of the VP6 protein revealed four significant amino acid variations between genogroups I and II in the region recognized by SG-specific MAbs (aa 246 to 315) (Tang et al., 1997; Iturriza-Gómara et al., 2002) at residues 248, 305, 310 and 315. The VP6 residues that have been identified previously involved in the SG I epitope include Ala172, Ala305 and Arg296-Asn299, while in the SGII epitope were described Phe248, Asn305, Ala306, Gln310 and Gln315 (Tang et al., 1997; Iturriza-Gómara et al., 2002; Greig et al., 2006). Considering that all genogroup I samples showed an Ala residue at position 305 and also Arg and Asn residues at positions 296 and 299, and that genogroup II samples had Phe, Asn, Ala, Gln and Gln residues at positions 248, 305, 306, 310 and 315, respectively, the current results are also in agreement with other investigations (Tang et al., 1997; Iturriza-Gómara et al., 2002; Greig et al., 2006) and suggests that at these VP6 protein regions are distinct among genogroups.

In this study, the nucleotide sequence of the VP6 genes was determined in 154 human rotavirus samples belonging to genotypes of different G and P combinations recovered from children in the Central West region of Brazil. The VP6 gene analysis undertaken in this study provides information on the genetic relation between different rotaviruses samples circulating in a particular region of Brazil and it may also contribute for the understanding of interrelationships among different genes and different proteins

of rotaviruses. Therefore, continuous surveillance of VP6 genes may be important, considering the emergence of such unusual human and animal rotavirus-like virus.

REFERENCES

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.

Araújo IT, Heinemann MB, Mascarenhas JDP, Assis RMS, Fialho AM, Leite JPG. 2007. Molecular analysis of NSP4 and VP6 genes of rotavirus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol* 56:854-859.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME, van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495-503.

Cardoso DDP, Soares CMA, Azevedo MSP, Leite JPG, Munford V, RácZ ML. 2002. Serotypes and subgroups of rotavirus isolated from children in Central Brazil. *Med Sci Monit* 8:CR624-628.

Cardoso DDP, Soares CMA, Souza MBLD, Azevedo MSP, Martins RMB, Queiróz DAO, Brito WMED, Munford V, RácZ ML. 2003. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:25-29.

Ciarlet M, Liprandi F, Conner ME, Estes MK. 2000. Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses. *Arch Virol* 145:371-383.

Estes MK, Kapikian AZ. 2007. Rotaviruses. In DM Knipe, PM Howley, *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1917-1974.

Farahtaj F, Gallimore CI, Iturriza-Gómara M, Taremi M, Zali MR, Edalatkhah H, Fayaz A, Gray JJ. 2007. Rotavirus VP7, VP4 and VP6 genotypes co-circulating in Tehran, Iran, between 2003 and 2004. *Epidemiol Infect* 135:834-838.

Greig SL, Berriman JA, O'Brien JA, Taylor JA, Bellamy AR, Yeager MJ, Mitra AK. 2006. Structural determinants of rotavirus subgroup specificity mapped by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* 356:209-221.

Iturriza-Gómara M, Anderton E, Kang G, Gallimore C, Phillips W, Desselberger U, Gray J. 2003. Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains. *J Clin Microbiol* 41:3566-3573.

Iturriza-Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. 2002. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol* 76:6596-6601.

Kerin TK, Kane EM, Glass RI, Gentsch JR. 2007. Characterization of VP6 genes from rotavirus strains collected in the United States from 1996-2002. *Virus Genes* 35:489-495.

Martella V, Ciarlet M, Bányai K, Lorusso E, Arista S, Lavazza A, Pezzotti G, Decaro N, Cavalli A, Lucente MS, Corrente M, Elia G, Camero M, Tempesta M, Buonavoglia C. 2007. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in Italian swine herds. *J Clin Microbiol* 45:577-580.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. 2008. 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.

Munford V, Souza EC, Caruzo TAR, Martinez MB, Rácz ML. 2007. Serological and molecular diversity of human rotavirus in São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol* 38:459-466.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12:304-306.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Andrade ZP, Castro L. 1985. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J Virol Meth* 10:21-28.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Candeias JAN, Rácz ML, Linhares AC, Gabbay YB, Trabulsi LR. 1983. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J Hyg Camb* 90:117-125.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.

Souza MBLD, Rácz ML, Leite JPG, Soares CMA, Martins RMB, Munford V, Cardoso DDP. 2003. Molecular and serological characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiânia, Brazil, 1998-2000. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22:441-443.

Tang B, Gilbert JM, Matsui SM, Greenberg HB. 1997. Comparison of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup-specific epitopes using site-directed mutagenesis. *Virology* 237:89-96.

Tavares TM, Brito WMED, Fiaccadori FS, Freitas ERL, Parente JA, Costa PSS, Giugliano LG, Andreasi MSA, Soares CMA, Cardoso DDP. 2008. Molecular characterization of NSP4 gene of human group A rotavirus samples from West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:288-294.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quantity analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-4882.

Wang YH, Kobayashi N, Zhou DJ, Yang ZQ, Zhou X, Peng JS, Zhu ZR, Zhao DF, Liu MQ, Gong J. 2007. Molecular epidemiologic analysis of group A rotaviruses in adults and children with diarrhea in Wuhan city, China, 2000–2006. *Arch Virol* 152:669–685.

TABLES AND FIGURES

Table I. Percentage nucleotide sequences identity between the VP6 genogroups of group A rotaviruses samples obtained from children in the Central West region of Brazil and those of other rotaviruses reference strains representing the VP6 genogroups I and II.

No. of samples	G and P genotypes*	VP6 genogroups	Rotavirus strain				
			G and P genotypes (VP6 genogroup)				
			US1205 G9P[6] (I)	1076 G2P[6] (I)	Wa G1P[8] (II)	E210 G2P[4] (II)	RMC100 G9 (II)
32	G1P[8]	II	78-81%	78-82%	90-92%	91-99%	87-89%
11	G1P[8]	II	77-81%	77-79%	86-90%	88-90%	92-97%
3	G4P[8]	II	78%	78%	88-89%	88-89%	95-97%
1	G9P[8]	II	81%	82%	92%	99%	88%
2	G9P[8]	II	78%	78-79%	88-89%	89%	97-98%
2	G2P[8]	II	78%	78%	88%	89%	97%
5	G1P[6]	II	79-80%	79-82%	90-92%	96-99%	86-88%
1	G4P[6]	II	80%	79%	91%	91%	91%
1	G2P[4]	I	85%	85%	79%	79%	78%
1	G3P[4]	I	86%	85%	78%	80%	78%
1	G9P[6]	I	98%	87%	78%	80%	76%

*Published in Cardoso et al. (2003), and Souza et al. (2003).

The highest identity is given in bold.

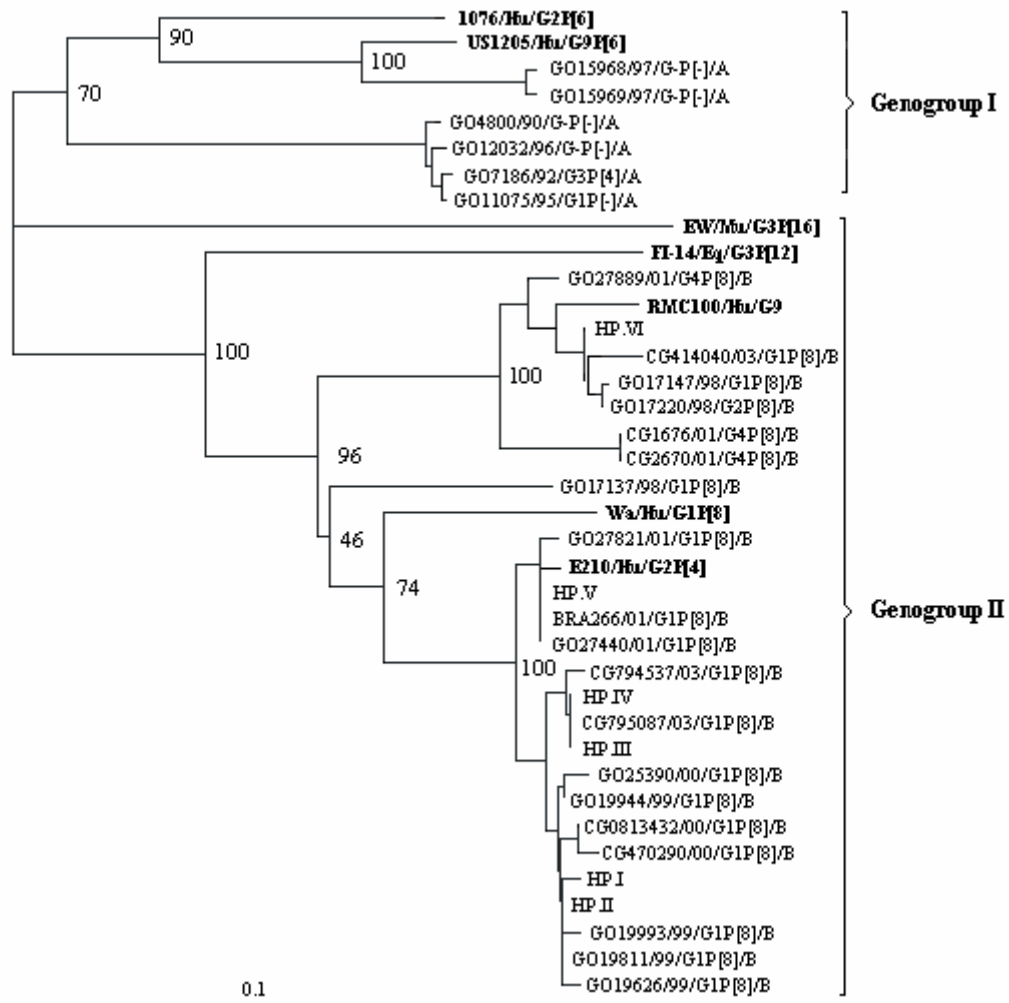


Fig.1. Phylogenetic analysis of VP6 nucleotide sequences of group A rotavirus samples. Nucleotide sequences of prototype strains of VP6 genogroups I and II obtained from GenBank are represented in bold. For each sample, the designation in relation to geographical location (BRA: Brasília; CG: Campo Grande; GO: Goiânia), sample number, year of collection, G and P genotypes and NSP4 genotype are shown. Group samples in which VP6 nucleotide sequences showed 100% identity were designated as haplotype (HP) (I-VI). HP.I: is represented by GO19994/99/G1P[8]/B and GO20458/99/G1P[8]/B samples. HP.II: is represented by GO19998/99/G1P[8]/B and GO25389/00/G1P[8]/B samples. HP.III: is represented by CG423535/03/G1P[8]/B and CG842284/03/G1P[8]/B samples. HP.IV: is represented by CG816414/03/G1P[8]/B and CG837155/03/G1P[8]/B samples. HP.V: is represented by GO27441/01/G1P[8]/B and GO27509/01/G1P[8]/B samples. HP.VI: is represented by BRA275/01/G1P[8]/B, GO17119/98/G1P[8]/B, GO27891/01/G9P[8]/B, GO27892/01/G9P[8]/B and CG569219/02/G1P[8]/B samples.

		250	260	270	280	290	300	310	320	330
US1205/Hu/SGI	I	TWYFMPVILRPNMVEVEFLNGQI	INTYQARFGTIVARNFDI	IRLSFQLMRPPMMTPSVAALFPM	AQP	FEHHMTVGLTLKIE	SAUCESUL			
G04800/90	I								R	I
G07186/92	I								R	DLLFVSQC
G011075/95	I								R	DLQFVSQC
G015968/97	I						L	A		R
G015969/97	I					L		A		R
E210/Hu/SGII	II	F		I		A	N	Q	Q	R
BRA266/01	III	F		I		A	N	Q	Q	R
BRA275/01	III	F	I			A	N	Q	Q	R
CG1676/01	III	F	I			A	N	Q	QY	R
CG2670/01	III	F	I			A	N	Q	QY	R
G017137/98	II	F		I		A	N	Q	Q	R
G017147/98	III	F	I			A	N	Q	Q	R
G017220/98	III	F	I			A	N	Q	Q	R
G019626/99	III	F		I		A	N	Q	L	R
G019811/99	III	F		I		A	N	Q	Q	R
G019944/99	III	F		I		YDT	CM	Q	Q	R
G019993/99	III	F		I		A	N	Q	Q	R
G019998/99	III	F		I		A	N	Q	Q	R
G020458/99	III	F		I		A	N	Q	Q	R
G025390/00	III	F		I		A	N	Q	Q	R
G027440/01	III	F		I		A	N	Q	Q	R
G027441/01	III	F		I		A	N	Q	Q	R
G027821/01	III	F		I		A	N	Q	Q	R
G027889/01	III	F	I			A	N	Q	Q	R
CG414040/03	III	F	I			A	N	Q	Q	R
CG423535/03	III	F		I		A	N	Q	Q	R
CG470290/00	III	F		I		A	N	Q	Q	R
CG794537/03	III	F		I		A	N	Q	Q	R
CG795087/03	III	F		I		A	N	Q	Q	R
CG837155/03	III	F		I		A	N	Q	Q	R
CG0813432/00	III	F		I		A	N	Q	Q	R
FI14/Bq/SGI+II	III	F		I		A	N	Q	Q	R
EW/Hu/SGnI, nII	III							A	T	R

Fig.2. Multiple alignment of the partial deduced amino acid sequences (aa 246 to 335) of the VP6 protein of 30 human group A rotaviruses samples with prototype strains grouped in genogroups I and II. Dots indicate identity to the US1205/Hu strain.

5. CONCLUSÕES

- Os genes codificantes de VP6 e NSP4 foram detectados nos espécimes fecais de rotavírus humanos do grupo A, havendo maior percentual de detecção para ambos os genes nas amostras provenientes de Goiânia e Campo Grande em relação às de Brasília.

- As amostras de rotavírus humanos do grupo A circulantes na Região Centro-Oeste foram caracterizadas como genogrupos I e II de VP6 e genótipos A e B de NSP4.

- Foram observadas associações usuais e não usuais entre os genótipos G e P e os genogrupos de VP6 e genótipos de NSP4 identificados.

- Associações entre os genogrupos de VP6 e genótipos de NSP4 foram também identificadas, estando sempre genogrupo I associado ao genótipo A e genogrupo II ao genótipo B.

- Houve maior circulação de amostras de genogrupo II de VP6 e genótipo B de NSP4 nas três cidades analisadas e durante todo o período do estudo.

- Foram evidenciadas substituições conservadas em resíduos de aminoácidos deduzidos a partir dos genes de VP6 e NSP4, distinguindo ambos os genogrupos de VP6 como os genótipos de NSP4 identificados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreasi MSA, Batista SMF, Tozetti IA, Ozaki CO, Nogueira MM, Fiaccadori FS, Borges AMT, Santos RAT, Cardoso DDP 2007. Rotavírus A em crianças de até três anos de idade, hospitalizadas com gastroenterite aguda em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 40:411-414.

Araújo IT, Assis RM, Fialho AM, Mascarenhas JD, Heinemann MB, Leite JPG 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.

Araújo IT, Heinemann MB, Mascarenhas JDP, Assis RMS, Fialho AM, Leite JPG 2007b. Molecular analysis of NSP4 and VP6 genes of rotavirus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Virol* 56:854-859.

Arens M 1999. Methods for subtyping and molecular comparison of human viral genomes. *Clin Microbiol Rev* 12:612-626.

Arnoldi F, Campagna M, Eichwald C, Desselberger U, Burrone OR 2007. Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. *J Virol* 81:2128-2137.

Au KS, Chan WK, Burns JW, Estes MK 1989. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J Virol* 63:4553-4562.

Ball JM, Mitchell DM, Gibbons TF, Parr RD 2005. Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin. *Viral Immunol* 18:27-40.

Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK 1996. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* 272:101-104.

Bergmann CC, Maass D, Poruchynsky MS, Atkinson PH, Bellamy AR 1989. Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *EMBO J* 8:1695-1703.

Berois M, Sapin C, Erk I, Poncet D, Cohen J 2003. Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *J Virol* 77:1757-1763.

Bertololli-Ciarlet A, Ciarlet M, Crawford SE, Conner M, Estes MK 2003. Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine* 21:3885-3900.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2:1281-1283.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ 1974. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* 1:149-151.

Borgan MA, Mori Y, Ito N, Sugiyama M, Minamoto N 2003. Antigenic analysis of nonstructural protein (NSP) 4 of group A avian rotavirus strain PO-13. *Microbiol Immunol* 47:661-668.

Bowman GD, Nodelman IM, Levy O, Lin SL, Tian P, Zamb TJ, Udem SA, Venkataraghavan B, Schutt CE 2000. Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site. *J Mol Biol* 304:861-871.

Browne ED, Bellamy AR, Taylor JA 2000. Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipathic domain. *J Gen Virol* 81:1955-1959.

Cardoso DDP, Brito WMED, Martins RMB, Kitajima EW, Souza MPM, Barbosa AJ, Oliveira SA, Rascopei SB 1989. Ocorrência de rotavírus e adenovirus em amostras fecais de crianças com gastroenterite, na cidade de Goiânia. *Rev Soc Bras Med Trop* 22:67-71.

Cardoso DDP, Rácz ML, Azevedo MSP, Martins RMB, Soares CMA 2001. Genotyping of group A rotavirus samples from Brazilian children by probe hybridization. *Braz J Med Biol Res* 34:471-473.

Cardoso DDP, Soares CMA, Souza MBLD, Azevedo MSP, Martins RMB, Queiroz DAO, Brito WMED, Munford V, Rácz ML 2003. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:25-29.

Chang KO, Kim YJ, Saif LJ 1999. Comparisons of nucleotide and deduced amino acid sequences of NSP4 genes of virulent and attenuated pairs of group A and C rotaviruses. *Virus Genes* 18:229-233.

Charpilienne A, Lepault J, Rey F, Cohen J 2002. Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. *J Virol* 76:7822-7831.

Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, Hoshino Y, Kapikian AZ, Chumakov K 2002. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 40:2398-2407.

Cho SL, Ahn JH, Kim K, Chung SI, Lim I, Kim W 2006. Genetic variation in the NSP4 gene of human rotavirus isolated in Seoul. *J Bacteriol Virol* 36:79-87.

Choi AHC, Basu M, McNeal MM, Flint J, VanCott JL, Clements JD, Ward RL 2000. Functional mapping of protective domains and epitopes in the rotavirus VP6 protein. *J Virol* 74:11574-11580.

Choi AHC, McNeal MM, Basu M, Bean JA, VanCott JL, Clements JD, Ward RL 2003. Functional mapping of protective epitopes within the rotavirus VP6 protein in mice belonging to different haplotypes. *Vaccine* 21:761-767.

Ciarlet M, Estes MK 2001. Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. *Curr Opin Microbiol* 4:435-441.

Ciarlet M, Liprandi F, Conner ME, Estes MK 2000. Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses. *Arch Virol* 145:371-383.

Corthésy B, Benureau Y, Perrier C, Fourgeux C, Perez N, Greenberg H, Schwartz-Cornil I 2006. Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. *J Virol* 80:10692-10699.

Costa PSS, Cardoso DDP, Grisi SJFE 2005. Rotavirus A e sua profilaxia vacinal. *Rev Patol Trop* 34:1-16.

Costa PSS, Cardoso DDP, Grisi SJFE, Silva PA, Fiaccadori F, Souza MBLD, Santos RAT 2004. Infecções e reinfecções por *Rotavirus A*: genotipagem e implicações vacinais. *J Pediatr* 80:119-122.

Cunliffe NA, Rogerson S, Dove W, Thindwa BDM, Greensill J, Kirkwood C, Broadhead RL, Hart CA 2002. Detection and characterization of rotavirus in hospitalized neonates in Blantyre, Malawi. *J Clin Microbiol* 40:1534-1537.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI 1994. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 32:1820-1822.

Deepa R, Rao CD, Suguna K 2007. Structure of the extended diarrhea-inducing domain of rotavirus enterotoxigenic protein NSP4. *Arch Virol* 152:847-859.

Dormitzer PR, Sun ZYJ, Wagner G, Harrison SC 2002. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J* 21:885-897.

Estes MK, Kapikian AZ 2007. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM (eds.), *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1917-1974.

Farahtaj F, Gallimore CI, Iturriza-Gómara M, Taremi M, Zali MR, Edalatkhah H, Fayaz A, Gray JJ 2007. Rotavirus VP7, VP4 and VP6 genotypes co-circulating in Tehran, Iran, between 2003 and 2004. *Epidemiol Infect* 135:834-838.

Feng N, Lawton JA, Gilbert J, Kuklin N, Vo P, Venkataram Prasad BV, Greenberg HB 2002. Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb. *J Clin Invest* 109:1203-1213.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H 1973. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2: 1497.

Freitas ERL 2006. Caracterização molecular de amostras mistas de Rotavírus A e de adenovírus humano detectados a partir de amostras fecais provenientes de crianças da região Centro-Oeste do Brasil. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, 84p.

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

Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI 2005. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis* 192:S146-S159.

Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark FH, Forrester B, Zhao-Yin F 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28:276-282.

Greig SL, Berriman JA, O'Brien JA, Taylor JA, Bellamy AR, Yeager MJ, Mitra AK 2006. Structural determinants of rotavirus subgroup specificity mapped by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* 356:209-221.

Gulati BR, Deepa R, Singh BK, Durga Rao C 2007. Diversity in indian equine rotaviruses: identification of genotype G10,P6[1] and G1 strains and a new VP7 genotype (G16) strain in specimens from diarrheic foals in India. *J Clin Microbiol* 45:972-978.

Gutierrez MF, Matiz A, Trespalacios AA, Parra M, Riaño M, Mercado M 2006. Virus diversity of acute diarrhea in tropical highlands. *Rev Latinoam Microbiol* 48:17-23.

Honma S, Chizhikov V, Santos N, Tatsumi M, Timenetsky Mdo C, Linhares AC, Mascarenhas JD, Ushijima H, Armah GE, Gentsch JR, Hoshino Y 2007. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. *J Clin Microbiol* 45:2641-2648.

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

Hoshino Y, Kapikian AZ 2000. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J Health Popul Nutr* 18:5-14.

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

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 2008. Virus Taxonomy. Virus families not assigned to an order. *Family: Reoviridae*. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> . Acesso em: 19 de junho de 2008.

Iosef C, Chang KO, Azevedo MSP, Saif LJ 2002. Systemic and intestinal antibody responses to NSP4 enterotoxin of Wa human rotavirus in a gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *J Med Virol* 68:119-128.

Iturriza-Gómara M, Anderton E, Kang G, Gallimore C, Phillips W, Desselberger U, Gray J 2003. Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains. *J Clin Microbiol* 41:3566-3573.

Iturriza-Gómara M, Simpson R, Perault AM, Redpath C, Lorgelly P, Joshi D, Mugford M, Hughes CA, Dalrymple J, Desselberger U, Gray J 2007. Structured surveillance of infantile gastroenteritis in East Anglia, UK: incidence of infection with common viral gastroenteric pathogens. *Epidemiol Infect*:1-11.

Iturriza-Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J 2002a. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol* 76:6596-6601.

Iturriza-Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J 2002b. Rotavirus subgroup characterisation by restriction endonuclease digestion of a cDNA fragment of the VP6 gene. *J Virol Methods* 105:99-103.

Jagannath MR, Kesavulu MM, Deepa R, Sastri PN, Kumar SS, Suguna K, Rao CR 2006. N- and C- terminal cooperation in rotavirus enterotoxin: novel mechanism of modulation of the properties of a multifunctional protein by a structurally and functionally overlapping conformational domain. *J Virol* 80:412-425.

Kang G, Iturriza-Gómara M, Wheeler JG, Crystal P, Monica B, Ramani S, Primrose B, Moses PD, Gallimore CI, Brown DW, Gray J 2004. Quantitation of group A rotavirus

by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction: correlation with clinical severity in children in South India. *J Med Virol* 73:118-122.

Kerin TK, Kane EM, Glass RI, Gentsch JR 2007. Characterization of VP6 genes from rotavirus strains collected in the United States from 1996-2002. *Virus Genes* 35:489-495.

Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H 2007. Molecular characterization of rare G3P[9] rotavirus strains isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis. *J Med Virol* 79:843-851.

Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H 2006b. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J Med Virol* 78:986-994.

Khamrin P, Peerakome S, Wongsawasdi L, Tonusin S, Sornchai P, Maneerat V, Khamwan C, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N 2006a. Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children admitted to hospital with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol* 78:273-280.

Kirkwood CD, Gentsch JR, Glass RI 1999. Sequence analysis of the NSP4 gene from human rotavirus strains isolated in the United States. *Virus Genes* 19:113-122.

Kirkwood CD, Palombo EA 1997. Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4. *Virology* 236:258-265.

Kudo S, Zhou Y, Cao XR, Yamanishi S, Nakata S, Ushijima H 2001. Molecular characterization in the VP7, VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 4 (G4) isolated in Japan and Kenya. *Microbiol Immunol* 45:167-171.

Lawton JA, Estes MK, Prasad BV 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature Struct Biol* 4:118-121.

Lee CN, Wang YL, Kao CL, Zao CL, Lee CY, Chen HN 2000. NSP4 gene analysis of rotaviruses recovered from infected children with and without diarrhea. *J Clin Microbiol* 38:4471-4477.

Lepault J, Petitpas I, Erk I, Navaza J, Bigot D, Dona M, Vachette P, Cohen J, Rey FA 2001. Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *EMBO J* 20:1498-1507.

Lin SL, Tian P 2003. Detailed computational analysis of a comprehensive set of group A rotavirus NSP4 proteins. *Virus Genes* 26:271-282.

Linhares AC 2000. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para seu controle. *Cad Saúde Publica* 16:629-646.

Linhares AC, Bresee JS 2000. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Panam Salud Publica* 8:305-331.

Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, Muller G, Peters D 1977. Duovirus (rotavírus) em Belém do Pará, Brasil (nota prévia). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 19:278-279.

Linhares AC, Ruiz-Palacios GM, Guerrero ML, Salinas B, Perez-Schael I, Costa Clemens SA, Innis B, Yarzabal JP, Vespa G, Cervantes Y, Hardt K, De Vos B 2006a. A short report on highlights of world-wide development of RIX4414: a Latin American experience. *Vaccine* 24:3784-3785.

Linhares AC, Verstraeten T, Wolleswinkel-van den Bosch J, Clemens R, Brewer T 2006b. Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. *Clin Infect Dis* 43:312-314.

Linhares AC, Villa LL 2006. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). *J Ped Rio de Janeiro* 82:S25-S34.

Liu X, Yang T, Sun QM, Sun MS 2005. Efficient intranasal immunization of newborn mice with recombinant adenovirus expressing rotavirus protein VP4 against oral rotavirus infection. *Acta Virol* 49:17-22.

Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N 2006. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol* 44:3189-3195.

Lorgelly PK, Joshi D, Iturriza-Gómara M, Flood C, Hughes CA, Dalrymple J, Gray J, Mugford M 2007. Infantile gastroenteritis in the community: a coast-of-illness study. *Epidemiol Infect*:1-10.

Lorrot M, Vasseur M 2007. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Virol J* 4:1-6.

Luz CRNE, Mascarenhas JD, Gabbay YB, Motta ARB, Lima TVR, Soares LS, Linhares AC 2005. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 47:287-293.

Maass DR, Atkinson PH 1990. Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *J Virol* 64:2632-2641.

Magalhães GF, Nogueira PA, Grava AF, Penati M, Silva LHP, Orlandi PP 2007. Rotavirus and adenovirus in Rondônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:555-557.

Martella V, Ciarlet M, Banyai K, Lorusso E, Arista S, Lavazza A, Pezzotti G, Decaro N, Cavalli A, Lucente MS, Corrente M, Elia G, Camero M, Tempesta M, Buonavoglia C 2007. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in Italian swine herds. *J Clin Microbiol* 45:577-580.

Mascarenhas JDP 2006. Caracterização molecular de genótipos de rotavírus do grupo A em Belém, Pará, no período de 1990 a 2003: estudo em neonatos, crianças diarréicas de

0-3 anos e ensaio clínico com vacinas. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

Mascarenhas JDP, Leite JPG, Lima JC, Heinemann MB, Oliveira DS, Araújo IT, Soares LS, Gusmão RHP, Gabbay YB, Linhares AC 2007a. Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin. *J Med Microbiol* 56:524-532.

Mascarenhas JDP, Linhares AC 2005. Rotavirus gastroenteritis and the urgent need for a vaccine in developing countries. *Postgrad Doct Caribb* 21:152-161.

Mascarenhas JDP, Linhares AC, Bayma APG, Lima JC, Sousa MS, Araújo IT, Heinemann MB, Gusmão RHP, Gabbay YB, Leite JPG 2006. Molecular analysis of VP4, VP7 and NSP4 genes of P[6]G2 rotavirus genotype strains recovered from neonates admitted to hospital in Belém, Brazil. *J Med Virol* 78:281-289.

Mascarenhas JDP, Linhares AC, Gabbay YB, Lima CS, Guerra SFS, Soares LS, Oliveira DS, Lima JC, Mâcedo O, Leite JPG 2007b. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. *Virus Res* 126:149-158.

Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, Lepault J, Kohli E, Pothier P, Venkataram Prasad BV, Cohen J, Rey FA 2001. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO J* 20:1485-1497.

Mawatari T, Taneichi A, Kawagoe T, Hosokawa M, Togashi K, Tsunemitsu H 2004. Detection of a bovine group C rotavirus from adult cows with diarrhea and reduced milk production. *J Vet Med Sci* 66:887-890.

Medici MC, Abelli LA, Martella V, Martinelli M, Lorusso E, Buonavoglia C, Dettori G, Chezzi C 2007. Characterization of inter-genogroup reassortant rotavirus strains detected in hospitalized children in Italy. *J Med Virol* 79:1406-1412.

Montenegro FM, Correia JB, Rodrigues Falbo A, Dove W, Nakagomi T, Nakagomi O, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA 2007. Anticipating rotavirus vaccines in Brazil: detection and molecular characterization of emerging rotavirus serotypes G8 and G9 among children with diarrhoea in Recife, Brazil. *J Med Virol* 79:335-340.

Mori Y, Borgan MA, Ito N, Sugiyama M, Minamoto N 2002. Sequential analysis of nonstructural protein NSP4s derived from group A avian rotaviruses. *Virus Res* 89:145-151.

Munford V, Souza EC, Caruzo TAR, Martinez MB, Rácz ML 2007. Serological and molecular diversity of human rotavirus in São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol* 38:459-466.

Newton K, Meyer JC, Bellamy AR, Taylor JA 1997. Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. *J Virol* 71:9458-9465.

O'Brien, Taylor JA, Bellamy AR 2000. Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at the extreme C terminus mediates binding to the inner capsid particle. *J Virol* 74:5388-5394

O'Ryan M, Prado V, Pickering LK 2005. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin Pediatr Infect Dis* 16:125-136.

Pager CT, Alexander JJ, Steele AD 2000. South African G4P[6] asymptomatic and symptomatic neonatal rotavirus strains differ in their NSP4, VP8*, and VP7 genes. *J Med Virol* 62:208-216.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12:304-306.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 9:565-572.

Parr RD, Storey SM, Mitchell DA, McIntosh AL, Zhou M, Mir KD, Ball JM 2006. The rotavirus enterotoxin NSP4 directly interacts with the caveolar structural protein caveolin-1. *J Virol* 80:2842-2854.

Pesavento JB, Billingsley AM, Roberts EJ, Ramig RF, Venkataram Prasad BV 2003. Structures of rotavirus reassortants demonstrate correlation of altered conformation of the VP4 spike and expression of unexpected VP4-associated phenotypes. *J Virol* 77:3291-3296.

Ramig RF 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 78:10213-10220.

Ray P, Malik J, Singh RK, Bhatnagar S, Bohl R, Kumar R, Bhan MK 2003. Rotavirus nonstructural protein NSP4 induces heterotypic antibody responses during natural infection in children. *J Infect Dis* 187:1786-1793.

Reither K, Ignatius R, Weitzel T, Seidu-Korkor A, Anyidoho L, Saad E, Djie-Maletz A, Ziniel P, Amoo-Sakyi F, Danikuu F, Danour S, Otchwemah RN, Schreier E, Bienzle U, Stark K, Mockenhaupt FP 2007. Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics. *BMC Infectious Diseases* 7:104.

Rodríguez-Castillo A, Ramírez-González JE, Padilla-Noriega L, Barrón BL 2006. Analysis of human rotavirus G1P[8] strains by RFLP reveals higher genetic drift in the VP7 than the VP4 gene during a 4-year period in Mexico. *J Virol Methods* 138:177-183.

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.

Shuttleworth G, Eckery DC, Awram P 2005. Oral and intraperitoneal immunization with rotavirus 2/6 virus-like particles stimulates a systemic and mucosal immune response in mice. *Arch Virol* 150:341-349.

Souza MBLD, Rácz ML, Leite JPG, Soares CMA, Martins RMB, Munford V, Cardoso DDP 2003. Molecular and serological characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiânia, Brazil, 1998-2000. *Euro J Clin Microbiol Infec Dis* 22:441-443.

Stupka JA, Parra GI, Gómez J, Arbiza J 2007. Detection of human rotavirus G9P[8] strains circulating in Argentina: phylogenetic analysis of VP7 and NSP4 genes. *J Med Virol* 79:838-842.

Tang B, Gilbert JM, Matsui SM, Greenberg HB 1997. Comparison of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup-specific epitopes using site-directed mutagenesis. *Virology* 237:89-96.

Tosser G, Delaunay T, Kohli E, Grosclaude J, Pothier P, Cohen J 1994. Topology of bovine rotavirus (RF strain) VP6 epitopes by real-time biospecific interaction analysis. *Virology* 204:8-16.

Tsunemitsu H, Kamiyama M, Kawashima K, Katsuda K, Kohmoto M, Saif LJ, Shouji T, Onodera T 2005. Molecular characterization of the major capsid protein VP6 of bovine group B rotavirus and its use in seroepidemiology. *J Gen Virol* 86:2569-2575.

Vizzi E, Calviño E, González R, Pérez-Schael I, Ciarlet M, Kang G, Estes MK, Liprandi F, Ludert JE 2005. Evaluation of serum antibody responses against the rotavirus nonstructural protein NSP4 in children after Rhesus rotavirus tetravalent vaccination or natural infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 12:1157-1163.

Wang YH, Kobayashi N, Zhou DJ, Yang ZQ, Zhou X, Peng JS, Zhu ZR, Zhao DF, Liu MQ, Gong J 2007. Molecular epidemiologic analysis of group A rotaviruses in adults and children with diarrhea in Wuhan city, China, 2000–2006. *Arch Virol* 152:669-685.

Ward RL, Mason BB, Bernstein DI, Sander DS, Smith VE, Zandle GA, Rappaport RS 1997. Attenuation of a human rotavirus vaccine candidate did not correlate with mutations in the NSP4 protein gene. *J Virol* 71:6267-6270.

Wei J, Li JT, Zhang XP, Tang Y, Wang JX, Zhang B, Wu YZ 2006. Identification of an HLA-A*0201-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope in rotavirus VP6 protein. *J Gen Virol* 87:3393-3396.

Yuan L, Honma S, Ishida SI, Yan XY, Kapikian AZ, Hoshino Y 2004a. Species-specific but not genotype-specific primary and secondary isotype-specific NSP4 antibody responses in gnotobiotic calves and piglets infected with homologous host bovine (NSP4[A]) or porcine (NSP4[B]) rotavirus. *Virology* 330:92-104.

Yuan L, Ishida SI, Honma S, Patton JT, Hodgins DC, Kapikian AZ, Hoshino Y 2004b. Homotypic and heterotypic serum isotype-specific antibody responses to rotavirus nonstructural protein 4 and viral protein (VP) 4, VP6, and VP7 in infants who received selected live oral rotavirus vaccines. *J Infect Dis* 189:1833-1845.

Zhang M, Zeng CYQ, Dong Y, Ball JM, Saif LJ, Morris AP, Estes MK 1998. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *J Virol* 72:3666-3672.

Zhang M, Zeng CYQ, Morris AP, Estes MK 2000. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J Virol* 74:11663-11670.

ANEXO**Carta de aceite do artigo II**

Journal of Medical Virology - Decision on Manuscript ID JMV-08-0807.R2

De: **onbehalfof@scholarone.com** em nome de **t.shennan@medsch.ucl.ac.uk**
Enviada: segunda-feira, 28 de julho de 2008 14:23:11
Para: **talissatavares@hotmail.com**

28-Jul-2008

Dear Mrs. Tavares,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "MOLECULAR CHARACTERIZATION OF VP6-ENCODING GENE OF GROUP A HUMAN ROTAVIRUS SAMPLES FROM CENTRAL WEST REGION OF BRAZIL." in its current form for publication in Journal of Medical Virology. The comments of the referee(s) who reviewed your manuscript are included at the bottom of this letter.

A signed copyright transfer agreement is needed for publication. If you have not already provided one you should do so immediately. You can access the copyright transfer agreement at <http://www3.interscience.wiley.com/homepages/central/cta/USscta.pdf>

Please print the form, complete both sides and forward to the Production Editor, Mrs Lori Hamilton at: lorimarieh@woh.rr.com or fax to Mrs Hamilton in the United States: 001 (937) 885 3289. PLEASE ENSURE THAT YOUR MANUSCRIPT NUMBER IS INCLUDED ON THE CORRESPONDENCE.

You will receive your typeset proofs in due course.

Thank you for your fine contribution.

Kind regards,

Prof. Arie Zuckerman
Editor-in-Chief, Journal of Medical Virology
t.shennan@medsch.ucl.ac.uk