

Detecção do gene codificante da proteína NSP4 de Rotavírus A de amostras provenientes da cidade de Goiânia – GO.

Ítalo de Araújo Castro¹, Marielton dos Passos Cunha², Tâmera Nunes Vieira Almeida³,
Menira Dias e Souza⁴, Ana Maria Tavares Borges⁴, Fabíola Souza Fiaccadori⁵
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG, 74605050, Brasil
e-mail: italo_araujo9@yahoo.com.br, fabiola@iptsp.ufg.br

PALAVRAS-CHAVE: Rotavírus A, NSP4, Detecção.

1 INTRODUÇÃO

Os rotavírus têm sido considerados importantes agentes associados à gastroenterite aguda infantil (GAI) (CHEN et al., 2009; JOHARGY et al. 2010), doença comum entre crianças menores de cinco anos de idade com elevados índices de mortalidade em países em desenvolvimento (OH et al., 2003). Estima-se que cerca de 125 milhões de episódios diarréicos anuais sejam em decorrência da infecção por estes vírus, causando em média 611.000 óbitos (PARASHAR et al., 2006; ESTES & KAPIKIAN, 2007). A forma de transmissão mais comum do vírus é pela rota fecal-oral, por meio da ingestão de água e/ou alimentos contaminados, ou pelo contato direto (INOUYE et al., 2000).

Segundo a classificação taxonômica, pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus* (ICTVdb 2009). Possuem simetria icosaédrica, são não envelopados e medem cerca de 100 nm. A partícula viral apresenta um triplo capsídeo protéico envolvendo o genoma, o qual constitui-se de 11 segmentos de RNA de fita dupla (*dsRNA*) codificante para seis proteínas estruturais (VP1-4, VP6 e VP7) e seis proteínas não estruturais (NSP1-6) (GREENBERG & ESTES, 2009). O capsídeo interno é composto pela proteína VP2, associada internamente às proteínas VP1 e VP3, o capsídeo intermediário pela proteína VP6 e o capsídeo externo pelas proteínas VP7 e VP4 (GREENBERG & ESTES, 2009).

Com base na variabilidade antigênica da proteína VP6, os rotavírus são classificados em sete grupos (A–G). Destes, os grupos A, B e C estão associados à infecção em humanos, sendo os Rotavírus do grupo A (RVA), de maior importância epidemiológica em todo o mundo (ESTES & KAPIKIAN, 2007). Em 2008, o *Rotavirus Classification Working Group* (RCWG) propôs um sistema de classificação para os RVA baseado na

Revisado pela orientadora

1 - Orientando; 2 – Aluno de iniciação científica; 3 – Aluna de mestrado; 4 – Pesquisadora colaboradora; 5 - Orientadora

identificação de genótipos para cada um dos onze segmentos genômicos (MATTHIJNSSENS et al., 2008). Neste sentido, a partir da caracterização dos genes codificantes das proteínas VP7, VP4, VP6 e NSP4, são atualmente reconhecidos 27 genótipos G (G1-G27), 35 genótipos (P[1]-P[35]), 16 genótipos I (I1-I16) e 14 genótipos E (E1-E14), respectivamente (MATTHIJNSSENS et al., 2011).

Considerando a importância dos RVA no quadro da GAI, os últimos anos foram marcados pelo desenvolvimento de diferentes estratégias vacinais, no intuito de reduzir a morbi-mortalidade infantil. Neste contexto, atualmente são consideradas promissoras sete vacinas, quatro estão licenciadas em diferentes países (RotaTeq®, Rotarix®, Rhesus tetravalente e LLR) e três ainda em fase de testes (RV3, vacina bovina recombinante Uk e a vacina indiana neonatal) (GLASS et al., 2005; KANG, 2006).

No Brasil, em julho de 2005, foi licenciada pela ANVISA, a vacina Rotarix®, a qual é constituída de uma cepa monovalente G1P[8] de rotavírus humano atenuado. A vacina foi incorporada ao Programa Nacional de Imunizações (PNI) Brasileiro e sua aplicação teve início em março de 2006, sendo denominada Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH) (BRASIL, 2006).

A proteína não estrutural NSP4 tem sido descrita como enterotoxina viral, a qual tem a capacidade de mobilizar cálcio intracelular, aumentando sua concentração citoplasmática, alterando a permeabilidade iônica da membrana dos enterócitos e contribuindo com o processo diarréico (GREENBERG & ESTES, 2009). Considerando o potencial imunogênico desta proteína e sua associação como fator de virulência, a identificação de variantes genéticas de RVA, com base nos genótipos de NSP4 é de fundamental importância, uma vez que poderá contribuir para um melhor entendimento da infecção, fornecendo subsídios a estudos futuros, com impacto nas estratégias de prevenção (ZHANG et al., 1998; LEE et al., 2000; VIZZI et al., 2005).

2 OBJETIVOS

Este plano de trabalho é parte integrante de um projeto de pesquisa que objetivou proceder a caracterização molecular de amostras RVA positivas, identificadas em crianças vacinadas e não vacinadas pela VORH, provenientes da cidade de Goiânia-GO. Neste contexto, o presente estudo procedeu a detecção do gene codificante da proteína NSP4 de amostras RVA positivas, para posterior identificação dos genótipos de NSP4.

3 METODOLOGIA

3.1 Material de estudo

O material de estudo consistiu de espécimes fecais obtidos de crianças menores de cinco anos de idade com quadro de gastroenterite aguda, que receberam ou não a Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH), atendidas em dois hospitais da cidade de Goiânia, Goiás (Hospital Materno Infantil – HMI e Pronto Socorro Infantil), no período de julho de 2008 a dezembro de 2009. Mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pais ou responsáveis, procedeu-se a coleta do material e o preenchimento de um formulário contendo informações referentes a dados pessoais e fatores de risco relacionados às gastroenterites virais.

Após a coleta, o material foi encaminhado ao Laboratório de Virologia Humana IPTSP/UFG, onde as fezes foram processadas e estocadas a -20°C até a realização dos ensaios.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Materno Infantil (Protocolo N° 006/08).

3.2 Preparo das Suspensões Fecais

As amostras fecais foram inicialmente processadas para a obtenção de uma suspensão fecal a 20% em tampão salina fosfato (PBS) pH 7,4. As suspensões foram homogeneizadas e clarificadas por centrifugação a $3000 \times g$ por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e estocado a -20°C .

3.3 Extração do Ácido Nucléico Viral

O *dsRNA* viral foi extraído seguindo metodologia descrita por Boom et al. (1990), com modificações (CARDOSO et al. 2002). Para extração do *dsRNA* foram utilizados $400\mu\text{L}$ de suspensão fecal acrescidos de 1mL de tampão L6 e $15\mu\text{L}$ de sílica (agitação/30min). Posteriormente, ao sedimento, foram realizadas lavagens sucessivas com tampão L2, etanol 70% e acetona P.A., e ao final, este foi acrescido de $40\mu\text{L}$ de água *Milli-Q/DEPC* ($62^{\circ}\text{C}/15\text{min}$).

3.4 Detecção NSP4

Para detecção de uma região do gene codificante da proteína NSP4, as amostras RVA positivas foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase pós transcrição reversa (RT-PCR), seguindo protocolo descrito por Lee et al. 2000, resumidamente: 3,0µL do dsRNA extraído foram adicionados a 3,5µL de DMSO (dimetilsulfóxido) e incubados a 97 °C por 10 min. para desnaturação, com posterior incubação em banho de gelo por 5 min. Em cada tubo de reação foi então adicionada a mistura de *RT-PCR* para um volume final de 50µL: tampão de reação 1X (Tris-HCl 10mM pH 9,0 e KCl 50mM), gelatina 0,01%, MgCl₂ 1,5mM, 0,2mM de cada dNTP, 40U da enzima transcriptase reversa, 3U de *Taq-DNA* polimerase e 20U de inibidor de ribonuclease e 0,8µM de cada iniciador específico (Tabela 1). Após incubação a 42°C/60min, as amostras foram amplificadas em termociclador (*Eppendorf Mastercycler personal*) em 30 ciclos de: 95°C/45seg, 49°C/30seg e 72°C/90seg, ciclo final de 72°C/10min.

Tabela 1. Iniciadores empregados na detecção de NSP4.

Iniciadores	Sequência 5' – 3'	Posição dos nucleotídeos (pb)	Tamanho do fragmento
10BEG.16	TGTTCCGAGAGAGCGCGTG	16 – 34	725 pb
10END.722c	GACCATTCCTCCATTAAC	722 - 740	

(LEE et al. 2000)

3.5 Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%), corado com brometo de etídeo, para visualização de fragmentos de DNA de tamanho esperado (725pb).

3.6 Sequenciamento e análise filogenética

Adicionalmente, as amostras NSP4 positivas foram submetidas ao processo de caracterização molecular por uma aluna de pós-graduação responsável por esta etapa do projeto, da qual tive a oportunidade de participar em algumas atividades. Resumidamente, os

produtos de amplificação foram purificados pelo *kit* QIAquik[®] PCR (Qiagen, São Paulo, Brasil) seguindo instruções do fabricante. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando os mesmos iniciadores previamente descritos para a reação de amplificação e kit de reação BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit em Sequenciador Automático ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As seqüências de nucleotídeos obtidas foram submetidas a análises pelos programas Clustal X (THOMPSON et al., 1997) e PAUP v.4.10b (SWOFFORD, 1998).

4 RESULTADOS

4.1 População estudada

No período de julho de 2008 a dezembro de 2009, foram coletadas 65 amostras fecais, das quais 11 foram positivas para RVA (16,9%).

Das crianças participantes do estudo, 53,9% eram do gênero feminino, 49,3% eram menores de um ano de idade, 53,9% apresentaram comprovação de vacinação prévia para rotavírus e a maioria (66,2%) relatou a ocorrência de diarreia associada à febre e vômito (Tabela 2).

Tabela 2. Características da população estudada de 65 crianças com gastroenterite aguda, atendidas em dois hospitais da cidade de Goiânia – Goiás.

CARACTERÍSTICAS	Nº	%
Gênero		
Masculino	30	46,1
Feminino	35	53,9
Idade		
≤ 6 meses	12	18,5
7 – 12 meses	20	30,8
13 – 24 meses	20	30,8
25 – 36 meses	10	15,3
> 36 meses	3	4,6
Vacina		
Comprovação pelo Cartão	35	53,9
Sem comprovação	17	26,1
Não	13	20
Sintomas		
Diarreia/ Febre/ Vômito	43	66,2
Diarreia/ Febre	6	9,2
Diarreia/ Vômito	8	12,3
Diarreia	8	12,3

4.2 Detecção de NSP4

Todas as amostras positivas para RVA foram submetidas à extração e amplificação de uma região do gene codificante da proteína NSP4, sendo observado um índice de detecção de 90,9%, (10/11) (Figura 1).

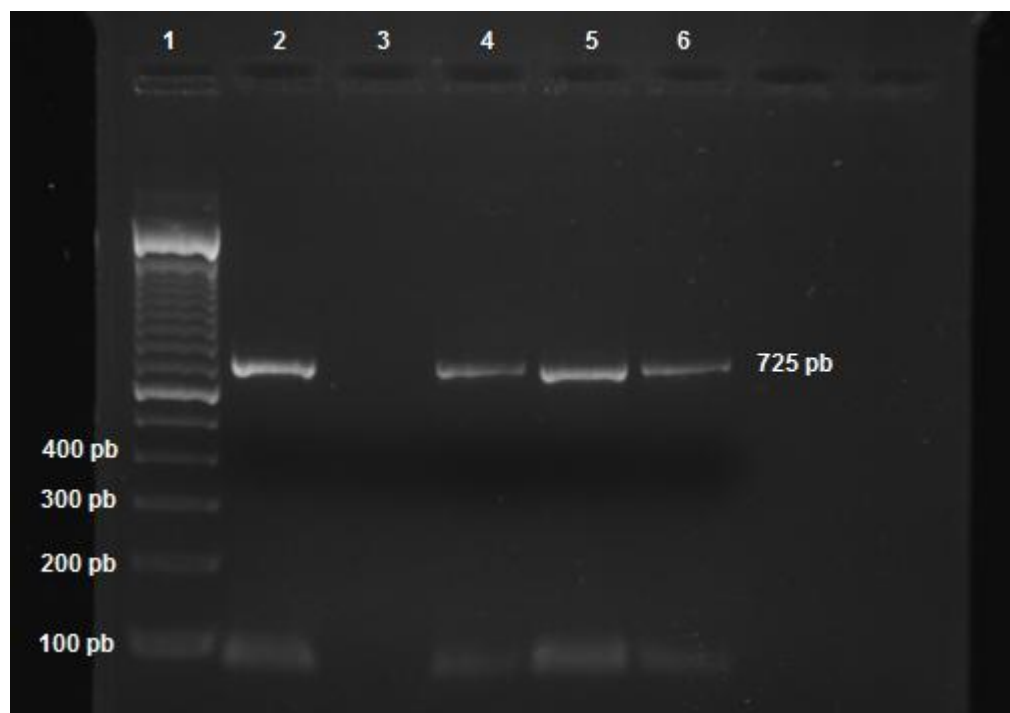


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose (2%). Linha 1- Peso molecular 100 pb; Linha 2 – Amostra controle positivo; Linha 3 – Amostra controle negativo; Linhas 4, 5 e 6 – Amostras teste positivas para NSP4.

4.3 Caracterização molecular

A reação de seqüenciamento genômico foi realizada para as dez amostras NSP4 positivas, sendo obtidas seqüências de qualidade em sete destas. A análise filogenética de uma região do gene codificante da proteína NSP4 destas amostras permitiu a caracterização de todas como genótipo E2.

5 DISCUSSÃO

Dados da literatura corroboram o índice de detecção do gene NSP4 encontrado no presente estudo, uma vez que, estudo anterior desenvolvido na cidade de Goiânia relatou índice de 82,7% (TAVARES et al., 2008) e, em outras regiões do país, os valores variam de 62,3 a 100% (ARAÚJO et al., 2007; NOZAWA et al., 2010).

Com relação à caracterização molecular e à genotipagem das amostras os dados encontrados estão de acordo com estudo realizado no Brasil com amostras do período de 2005 a 2009 o qual contemplou estados das cinco regiões do país e, cujas análises mostraram prevalência de amostras com genótipo E2 (GÓMEZ et al., 2011). Por outro lado, investigações conduzidas no Rio de Janeiro e na região Centro-Oeste no período pré-vacina observaram uma predominância de amostras com genótipos E1 (TAVARES et al., 2008; BENATI et al., 2010), o que pode sugerir uma possível alteração no padrão de amostras de RVA circulantes na região, após a introdução da vacina.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo observou um índice de detecção do gene codificante da proteína NSP4 de 90,9%, sendo todas as amostras caracterizadas como genótipo E2. A identificação de uma possível alteração no padrão de amostras RVA circulantes no período pós-vacinal demonstra a necessidade de estudos adicionais, com vistas a obter informações que definam o real papel da implantação da vacina na circulação dos RVA.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, I. T.; HEINEMANN, M. B.; MASCARENHAS, J. D. P.; et al. Molecular analysis of the NSP4 and VP6 genes of rotavirus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil. **J Med Microbiol**, v. 56, p. 854-859, 2007.

BENATI, F. J.; MARANHÃO, A. G., LIMA, R. S.; et al. Multiple-gene characterization of rotavirus strains: Evidence of genetic linkage among the VP7, VP4, VP6 and NSP4 encoding genes. **J Med Virol**, v. 82, p. 1797-1802, 2010.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; DILLEN, P. M. E. W.; NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, Netherlands v. 28, p. 495-503, 1990.

BRASIL, Ministério da Saúde. Informe técnico. Doença Diarréica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus. Brasília-Brasil. Março, 2006.

CARDOSO, D. D. P. et al. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiania, Goiás, Brazil. **Med Sci Monit**, Goiânia, v. 8, p. 624-628, set. 2002.

CHEN, S. Y.; TSAI, C. N.; CHAO, H. C.; et al. Acute gastroenteritis caused by multiple enteric pathogens in children. **Epidemiol Infect**, v. 137, p. 932-935, 2009.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: **Fields Virology**, edited by D. M. Knipe and P. M. Howley, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1917-1974, 2007.

GLASS, R. I.; BRESEE, J. S.; TURCIOS, R. et al. Rotavirus vaccines: targeting the developing world. **J Infect Dis**, Atlanta, Georgia, v. 192, p. 160-166, 2005.

GÓMEZ, M. M.; MENDONÇA, M. C. L.; VOLOTÃO, E. M.; et al. Rotavirus A Genotype P[4]G2: Genetic Diversity and Reassortment Events Among Strains Circulating in Brazil Between 2005 and 2009. **J Med Virol**, v. 83, p. 1093-1106, 2011.

GREENBERG, H. B.; ESTES, M. K. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. **Gastroenterology**. v. 136, n. 06, p. 1939-1951, Stanford, California, 2009.

ICTVdB. Index of Viruses, 2006. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>>. Acesso em: 10 de junho de 2011.

INOUYE, S. et al. Surveillance of Viral Gastroenteritis in Japan: Pediatric Cases and Outbreak Incidents. **J Infect Dis**, Tokyo, v. 181, p. 270-274, mai. 2000.

JOHARGY, A.; GHAZI, H.; MUMENAH, A. Frequency of viral, bacterial and parasitic enteropathogens among young children with acute diarrhoea in Saudi Arabia. **J Pak Med Assoc.** v. 60, p. 456-459, 2010.

KANG, G. Rotavirus vaccines. **J Med Microbiol**, Indian, v. 24, p. 252-257, 2006.

LEE, C. N.; WANG, Y. L.; KAO, C. L.; et al. NSP4 gene analysis of rotaviruses recovered from infected children with and without diarrhea. **J Clin Microbiol**, v.38, p.4471-4477, 2000.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, S. M.; et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Arch Virol**, 2011.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Arch Virol**, v. 153(8), p.1621–1629, 2008.

NOZAWA, C. M.; KERNTOPF, G. F.; CZERNISZ, E. S.; et al. Detection and characterization of human rotavirus in hospitalized patients in the cities of Ponta Grossa, Londrina and Assai – Pr, Brazil. **J Infect Dis**, v. 14(6), p. 553-557, 2010.

OH, D-Y.; GAEDICKE, G.; SCHREIER, E. Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity. **J Med Virol**, Berlin, Germany, v. 71, p. 82-93, 2003.

PARASHAR, U. D.; GIBSON, C. J.; et al. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerg Infect Dis**, Atlanta, v. 12, p. 304-306, 2006.

SWOFFORD, D. L. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 1998.

TAVARES, T. M.; BRITO, W. M. E. D.; CARDOSO, D. D. P. Molecular characterization of the NSP4 gene of human group A rotavirus samples from the West Central region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103(3), p. 288-294, Rio de Janeiro, 2008.

THOMPSON J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; et al. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

VIZZI, E.; CALVIÑO, E.; GONZÁLEZ, R.; et al. 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**, v.12, p.1157-1163, 2005.

ZHANG, M.; ZENG, C. Q. Y.; DONG, Y.; et al. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. **J Virol**, v.72, p.3666-3672. 1998.