

Detecção do gene codificante da proteína VP6 de Rotavírus A de amostras provenientes da cidade de Goiânia – Goiás

Marielton dos Passos Cunha¹, Ítalo de Araújo Castro², 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: marieltondospassos@hotmail.com, fabiola@iptsp.ufg.br

PALAVRAS-CHAVE: Rotavírus A, VP6, Detecção.

1 INTRODUÇÃO

Gastroenterite aguda é doença freqüente em crianças de até cinco anos de idade sendo uma das principais causas de hospitalização com elevados índices de mortalidade em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (OH et al., 2003). Os vírus têm sido reconhecidos como importantes agentes etiológicos da gastroenterite infantil com predominância dos rotavírus, adenovírus entéricos, calicivírus e astrovírus (KAPIKIAN, 1996; de WIT et al., 2001; WILHELM I et al., 2003). Estes vírus são transmitidos pela rota fecal-oral, sendo a ingestão de alimentos e água contaminada ou o contato pessoa-pessoa os principais mecanismos da transmissão (INOUYE et al., 2000; KAPIKIAN et al., 1996).

Os rotavírus, gênero *Rotavirus*, família *Reoviridae*, possuem simetria icosaédrica, são não envelopados e medem em torno de 100nm (ICTVdB 2006). O capsídeo viral é organizado em três camadas concêntricas de proteínas que envolvem o genoma viral: capsídeo interno (VP1-3), intermediário (VP6) e o externo (VP4 e VP7). O genoma é composto por 11 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA), apresentando 18.550 pares de base (pb), e tamanho dos segmentos variando entre 667pb (segmento 11) e 3.302pb (segmento 1). Cada segmento é dividido em três regiões: duas regiões não codificantes, 5' e 3', e uma região de leitura aberta (RLA), a qual codifica para no mínimo uma proteína. No conjunto, o genoma codifica 12 proteínas, sendo seis delas estruturais (VP1-4, 6-7) e seis não estruturais (NSP1-6). O segmento 11 é bicistrônico e codifica duas proteínas, NSP5 e NSP6 (ESTES & KAPIKIAN, 2007; FAUQUET et al., 2007).

Revisado pela orientadora

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

A variação antigênica da proteína VP6, constituinte do capsídeo intermediário, tem sido utilizada para caracterizar os sete grupos de rotavírus (A–G), 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 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).

Os RVA são apontados como a principal causa de doença diarréica severa em lactentes e crianças durante a primeira infância, sendo responsáveis por cerca de 125 milhões de episódios diarréicos anuais, causando entre 600 mil a 870 mil óbitos (LINHARES, 2000; VILLENA et al., 2003; COSTA et al., 2004; KANE et al., 2004; PARASHAR et al., 2003, 2006). Em países desenvolvidos, observam-se menores índices de mortalidade em comparação aos países em desenvolvimento, mesmo assim, estima-se que todas as crianças até cinco anos de idade já tenham apresentado pelo menos um episódio de diarreia causada por esse vírus (PARASHAR et al., 2003). Esses dados indicam que apenas medidas profiláticas de higiene e saneamento básico não são suficientes para evitar o contágio.

Neste sentido, o impacto mundial da infecção por RVA tem conduzido ao desenvolvimento de estratégias vacinais no intuito de reduzir a sua morbi-mortalidade (MASCARENHAS et al., 2002; VIZZI et al., 2005). No Brasil, em julho de 2005, foi licenciada pela ANVISA, a vacina Rotarix®, constituída de uma cepa monovalente G1P[8] de rotavírus humano atenuado e a sua aplicação teve início em março de 2006, sob a denominação de Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH) (BRASIL, 2006).

Estudos têm sugerido que a adoção da vacinação como forma de controle das rotavirose, poderá interferir no padrão de circulação das amostras de rotavírus. Não obstante, a caracterização molecular do gene codificante da proteína VP6, têm demonstrado a ocorrência de variantes genéticas (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002). Este fato, somado ao papel imunogênico que esta proteína apresenta, destaca a importância de estudos a cerca da identificação dos genótipos de VP6, com vistas a analisar o impacto destes nas estratégias de vacinação.

2 OBJETIVOS

Este plano de trabalho é parte integrante de um projeto de pesquisa que objetivou proceder à 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 à detecção do gene codificante da proteína VP6 de amostras RVA positivas, para posterior identificação dos genótipos de VP6.

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.

O material coletado 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 estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Materno Infantil (Protocolo No 006/08).

3.2 Preparo das Suspensões Fecais

Os espécimes fecais foram inicialmente processados 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), a partir de 400µL de suspensão fecal. À suspensão foi acrescido 1mL de tampão L6 e 15µL de sílica (agitação/30min), com posterior realização de lavagens sucessivas do sedimento com tampão L2, etanol 70% e acetona P.A., e ao final, este foi acrescido de 40µL de água *Milli-Q/DEPC* (62°C/15min).

3.4 Detecção de VP6

Para detecção de uma região do gene codificante da proteína VP6, o *dsRNA* extraído foi submetido à reação em cadeia pela polimerase após transcrição reversa (RT-PCR), seguindo protocolo descrito por ITURRIZA-GÓMARA et al. (2002), dentro das seguintes condições: 5,0µL de RNA extraído foram adicionados a 1,0µL de iniciador randômico seguindo-se desnaturação a 97°C por 5min com posterior incubação a 70°C por 5min e banho de gelo por 3min. Em seguida, a cada tubo de reação foi adicionada a mistura de cDNA para um volume final de 25µL: tampão de reação 1X (Tris-HCl 50mM pH 8,3 e KCl 75mM, MgCl₂ 3mM), MgCl₂ 2,5mM, 0,2mM de cada dNTP e 100U de transcriptase reversa, sendo a reação procedida a 42°C/60min e 95°C/5min em termociclador (*Eppendorf Mastercycler personal*). Posteriormente, 6,0µL do cDNA foram submetidos à reação de amplificação em volume final de 50µL: tampão de reação 1X (Tris-HCl 20mM pH 8,4 e KCl 50mM), MgCl₂ 2mM, 0,2mM de cada dNTP, 3U de *Taq-DNA* polimerase e 0,8mM de cada iniciador específico (Tabela 1). O sistema de reação foi submetido à desnaturação inicial a 94°C/2min, seguindo-se 40 ciclos de amplificação em termociclador: 94°C/30seg, 58°C/30seg, 72°C/1min e extensão final a 72°C/7min.

Tabela 1. Iniciadores empregados na detecção de VP6.

Iniciadores	Sequência 5' – 3'	Posição dos nucleotídeos (pb)	Tamanho do fragmento
VP6-F	GACGGVGCRACTACATGGT	747 – 766	379 pb
VP6-R	GTCCAATTCATNCCTGGTGG	1126 – 1106	

ITURRIZA-GÓMARA et al. (2002)

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 (379pb).

3.6 Sequenciamento e Análise Filogenética

Adicionalmente, as amostras VP6 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 sequenciamento 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 sequências 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 Descrição da população

Foram coletadas 65 amostras fecais provenientes de crianças com doença diarréica aguda, atendidas em dois hospitais da cidade de Goiânia-Goiás. Do total de 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).

As amostras coletadas foram, em estudo anterior, submetidas a duas técnicas de detecção para RVA, Ensaio Imunoenzimático (EIE) e Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA), o que levou à identificação de 11 amostras RVA positivas (16,9%).

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		
Diarréia/ Febre/ Vômito	43	66,2
Diarréia/ Febre	6	9,2
Diarréia/ Vômito	8	12,3
Diarréia	8	12,3

4.2 Detecção de VP6

Após reação de extração do *dsRNA* e amplificação por RT-PCR das amostras RVA positivas, observou-se um índice de detecção para o gene codificante da proteína VP6 de 100% (11/11) (Figura 1).

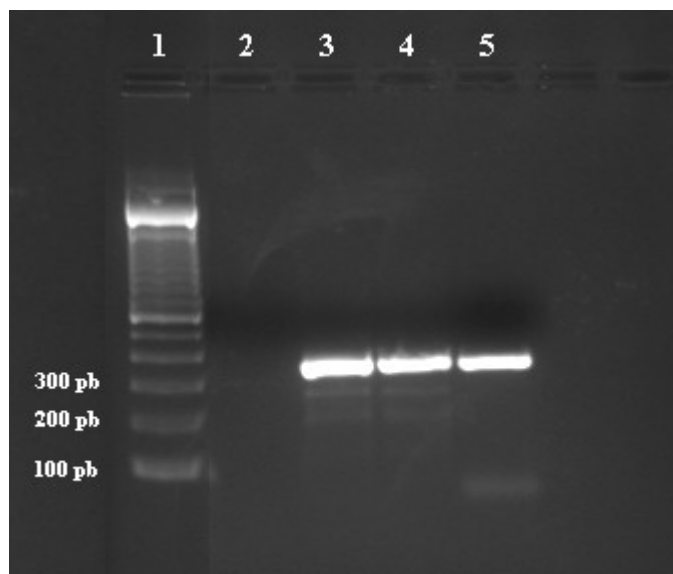


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose (2 %). Linha 1. Padrão de peso molecular (100 pb); Linha 2. Amostra controle negativo; Linha 3. Amostra controle positivo (379pb); Linhas 4 e 5. Amostras positivas para VP6.

4.3 Caracterização Molecular

As amostras positivas para VP6 foram submetidas à reação de sequenciamento genômico e todas apresentaram sequencias de qualidade. Em seguida, procedeu-se a análise filogenética das sequencias obtidas, correspondentes a uma região do gene codificante da proteína VP6, o que levou à caracterização de todas como genótipo I2.

5 DISCUSSÃO

O resultado de detecção do gene codificante da proteína VP6 está de acordo com o descrito na literatura (ARAÚJO et al., 2007), embora superior ao relatado por estudo anterior desenvolvido na Região Centro-Oeste (84,8%) (TAVARES et al., 2008).

Com relação à caracterização molecular, todas as amostras foram caracterizadas como genótipo I2. Este dado é corroborado por um estudo realizado a partir de amostras provenientes das cinco regiões brasileiras coletadas no período de 2005 a 2009, o qual relatou prevalência do genótipo I2 (GÓMEZ et al., 2011). Entretanto, em período anterior à implantação da vacina, estudos desenvolvidos na Região Centro-Oeste do país e no Estado do

Rio de Janeiro, demonstraram a ocorrência do genótipo I1 (TAVARES et al., 2008; BENATI et al., 2010), o que pode sugerir uma possível alteração no padrão de amostras de RVA circulantes na período pós-vacinal.

6 CONCLUSÃO

O gene codificante da proteína VP6 foi identificado em todas as amostras RVA positivas, as quais foram caracterizadas como genótipo I2. Os dados apresentados sugerem um perfil de variação nas amostras RVA circulantes após a introdução da vacina, o que demonstra a importância do contínuo monitoramento destas infecções, com vistas a um melhor entendimento das consequências da implantação da vacina no país.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, I. T. et al. Molecular analysis of the NSP4 and VP6 genes of rotavirus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brasil. **J Med Microbiology**, v. 56, p. 854-859, 2007.

BENATI, F. J. 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. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, 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**, v. 8, p. 624-628, 2002.

COSTA, P. S. S. et al. Infecções e reinfecções por Rotavírus A: genotipagem e implicações vacinais. **J Pediatr**, v. 80, p. 119-122, 2004.

de WIT, M.A. et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. **Am J Epidemiol**, v. 154, p. 666-674, 2001.

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.

FAUQUET, C. M. et al. Virus taxonomy. Eighth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego, CA: Academic Press, p. 447-496, 2007.

GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D. The promise of new rotavirus vaccines. **N Engl J. Med**, v. 354, p. 75-77, 2006.

GÓMEZ, M. 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.

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

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

ITURRIZA-GÓMARA, M. et al. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J Virol**, v. 76, p. 6596-6601, 2002.

KANE, E. M. et al. The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavirus vaccines. **Rev Panam Salud Publica**, v. 16, p. 371-377, 2004.

KAPIKIAN, A. Z. Overview of viral gastroenteritis. **Arch Virol Suppl**, Maryland, v. 12, p. 7-19, 1996.

KAPIKIAN, A. Z.; ESTES, M. K.; CHANOCK, R. M. Norwalk group of viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizaman B. **Fields Virology**, 3 ed. Philadelphia: Raven Press. Cap.25, p. 783-810, 1996.

LINHARES, A. C.; Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para seu controle. **Cad Saúde Publica**, v. 16, p. 629-646, 2000.

MASCARENHAS, J. D. P. et al. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 113-117, 2002.

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, p. 1621–1629, 2008.

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

PARASHAR, U. D. et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg Infect Dis**, v. 9, p. 565-572, 2003.

PARASHAR, U. D. et al. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerg Infect Dis**, 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. et al. Molecular characterization of VP6-Encoding gene of group A human rotavirus samples from central west region of Brasil. **Jornal of Medical Virology**, v. 80, p. 2034-2039, 2008.

THOMPSON J. D. 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.

VILLENA, C. et al. A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. **Epidemiol Infect**, v. 131, p. 1105-1110, 2003.

VIZZI, E. et al. Evaluation of serum antibody responses against the 25 rotavirus nonstructural protein NSP4 in children after Rhesus rotavirus tetravalent vaccination or natural infection. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, p. 1157-1163, 2005.

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clin Microbiol Infect**, v. 9, p. 247-262, 2003.