

Thalita Lopes Ferreira

Avaliação da ação neutralizante e da reatividade
de anticorpos IgA e IgG anti-rotavirus SA-11
em soros de adultos saudáveis

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

São Paulo
2011

Thalita Lopes Ferreira

Avaliação da ação neutralizante e da reatividade
de anticorpos IgA e IgG anti-rotavirus SA-11
em soros de adultos saudáveis

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Milene Tino De
Franco

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ferreira, Thalita Lopes.

Avaliação da ação neutralizante e da reatividade de anticorpos IgA e IgG anti-rotavírus SA-11 em soros de adultos saudáveis / Thalita Lopes Ferreira. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Profª Dra. Milene Tino De Franco.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Imunologia viral.

Versão do título para o inglês: Evaluation of neutralizing ability and reactivity of anti-rotavirus SA-11 IgA and IgG antibodies in serum samples from healthy adults

Descritores: 1. Rotavirus 2. SA-11 3. Anticorpos Séricos 4. IgA 5. IgG 6. Neutralização I. Franco, Profª Dra. Milene Tino De II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB031/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Thalita Lopes Ferreira.

Título da Dissertação: Avaliação da ação neutralizante e da reatividade de anticorpos IgA e IgG anti-rotavírus SA-11 em soros de adultos saudáveis .

Orientador(a): Profª Dra. Milene Tino De Franco.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../.....,

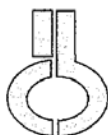
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 10 de julho de 2008.

PARECER 847/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 86ª reunião realizada em 08.07.08, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Avaliação da reatividade e ação neutralizante de anticorpos séricos anti-rotavírus*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **08 de julho de 2009**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.
THALITA LOPES FERREIRA
Biotecnologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Dedico este trabalho,
Aos meus pais, pelo apoio e incentivo.
À minha orientadora, pelo grande conhecimento.
À minha parceira de laboratório Simone, pelo grande apoio e ensinamento.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força em continuar, minha família pela preocupação e apoio nas horas certas.

À Dra. Milene, por me aceitar no seu grupo de pesquisa, apesar do meu escasso conhecimento sobre o assunto, me ensinar tudo o que sei em uma bancada de laboratório e muitas vezes fora dela. A Dra. Solange pelo grande aprendizado e paciência para explicar qualquer fórmula e procedimento.

Simone, que sempre me ajudou quando necessário, numa parceria que continua até hoje!

Fernanda que apesar de todas as diferenças que tivemos, tornou-se uma pessoa na qual eu pude confiar para finalizar esse trabalho.

Ludmila que me trouxe para o laboratório, sem ela não estaria aqui hoje. Tatiane pelas longas conversas sobre trabalho ou não, na maioria das vezes.

Aos pesquisadores que fazem parte do Laboratório de Imunogenética, Andrea Borrego, José Ricardo, Marcelo De Franco, Nancy Starobinas, Orlando Garcia Ribeiro Neto, Solange Massa, Wafa Hanna e Dra. Olga C. M. Ibáñez, pela grande paciência em ajudar sempre.

A todos que fazem parte do Laboratório de Imunogenética pela amizade e companheirismo: Alessandra, Aline, Andréia, Andrea, Camila, Cristiano, Débora, Francisca, Iana, Jussara, Layra, Luciana, Mara, Patrícia, Priscila, Sandra.

Lucy, Priscila, Amanda pela companhia e ajuda nesse aprendizado.

À Dra. Maria Lúcia Racz, do Laboratório de Imunologia Viral do ICB, por ter cedido as células e amostras virais SA-11.

Silvia que forneceu as amostras de soro utilizadas nesse trabalho.

Aos funcionários e alunos do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, pela paciência e disponibilidade do uso dos equipamentos.

Mara, Marinalva, Neuza, Rosa, Ronaldo e Tânia pela manutenção e preparo de materiais necessários para execução dessa pesquisa.

Aos novos colegas de trabalho, que nos últimos meses foram importantes nessa nova fase da minha vida.

Às amigas, Débora, Jéssica, Ludmila (novamente), Natália e Renata, que são pessoas de extrema importância na minha vida, me dão apoio, ombro amigo, risos e grandes alegrias.

Ao apoio da FAPESP e CNPq, por ajudar financeiramente a pesquisa.

Enfim, todos que ajudaram em algum momento, no trabalho ou fora dele e são importantes na minha vida.

“A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas.”

Horácio

“Tudo nesse mundo tem uma resposta. O que leva é tempo para se formular as perguntas.”

José Saramago

RESUMO

Ferreira TL. Avaliação da ação neutralizante e da reatividade de anticorpos IgA e IgG anti-rotavírus SA-11 em soros de adultos saudáveis. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

O rotavírus é a principal causa de diarreia em crianças em todo o mundo. Infecta também adultos, mas não há dados completos sobre a sua incidência nesse grupo nem sobre o papel de anticorpos preexistentes na proteção contra o vírus. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação neutralizante e a presença de anticorpos IgA e IgG anti-rotavírus SA-11, por ELISA, em amostras de soro de adultos saudáveis frente ao vírus. Por *Immunoblotting* foi avaliado o reconhecimento de proteínas virais pelos anticorpos séricos. Observou-se que os títulos das amostras foram muito variáveis, sendo os de IgG superiores aos de IgA. Todas as amostras mostraram-se capazes de neutralizar o vírus em diferentes níveis, porém não foi possível estabelecer uma correlação com os títulos de anticorpos. Foi observado que anticorpos da classe IgG reconhecem mais proteínas virais que os da classe IgA. Este trabalho pode ser considerado mais um passo na elucidação do papel dos anticorpos séricos IgA e IgG anti-rotavírus na infecção em adultos.

Palavras-chave: Rotavírus. SA-11. Anticorpos séricos. IgA. IgG. Neutralização.

ABSTRACT

Ferreira TL. Evaluation of neutralizing ability and reactivity of anti-rotaviruses SA-11 IgA and IgG antibodies in serum samples from healthy adults. [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Rotavirus has been considered the leading cause of diarrhea in children worldwide. The virus also infects adults but there is no conclusive data neither on the incidence of infection on this group nor on the role of pre-existing antibodies. The aim of the work was to evaluate the serum neutralizing ability and the presence of anti-rotavirus SA-11 IgA and IgG by ELISA in serum samples of healthy adults against the virus. Immunoblotting was used to evaluate viral proteins recognition by serum antibodies. The antibody titers were extremely variable where IgG titers are higher than IgA ones. All samples were able to neutralize the virus in different levels but it was not possible to establish a correlation between antibody titers and neutralization ones. Immunoblotting assays revealed that IgG antibodies recognize more viral proteins than IgA did. This work can be considered a valuable step for elucidating the role of serum anti-rotavirus IgG and IgA antibodies in adult's infection.

Keywords: Rotavirus. SA-11. Seric antibodies. IgA. IgG. Neutralization.

LISTA DE ABREVIATURAS

BCA: ácido bicinconínico

BSA: albumina sérica bovina

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

DICT₅₀: dose infectante 50% em cultura de célula

D.O: densidade óptica

dsRNA: ácido ribonucléico de fita dupla

DS: “double shelled”

ELISA: “Enzyme Linked Immunossorbent Assay” Ensaio imunoenzimático

IB: “Immunoblotting”

IgA: imunoglobulina A

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

MA-104: célula proveniente de rim de macaco verde africano

MEM: meio mínimo essencial

NSP: proteína não estrutural (Non-Structural Protein)

OPD: Orto-feniletileno Diamina

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS: tampão salina - fosfato

RRV-TV: vacina tetravalente rhesus-rotavirus

SA-11: “simian rotavirus strain”

SDS: “Sodium Dodecyl Sulfate”

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

SIgA: imunoglobulina A secretória

SS: “Single-shelled”

TNC: tampão tris-cálcio

VP: proteína viral (“Viral Protein”)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Amostras de soro	27
3.2 Amostra viral.....	27
3.3 Cultura de células MA-104 em garrafas estacionárias.....	27
3.4 Cultura de células MA-104 em garrafas de “Roller”	28
3.5 Infecção viral em garrafas de “Roller”	28
3.6 Obtenção de antígeno viral e controle por sedimentação sobre camada de sacarose	28
3.7 Dosagem de proteína	29
3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE).....	29
3.9 Coloração de gel de poliacrilamida com prata	30
3.10 Dosagem de anticorpos pela técnica de ELISA.....	30
3.11 Titulação viral.....	31
3.12 Neutralização viral	31
3.13 “Immunoblotting” (IB).....	32
3.14 Análise estatística	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Obtenção de antígenos viral e controle	34
4.2 Concentração e rendimento das preparações de antígenos viral e controle.	34
4.3 Análise dos antígenos virais em gel de poliacrilamida	35
4.4 Padronização do ensaio de ELISA para dosagem de anticorpos anti-rotavírus	35
4.5 Titulação viral.....	36
4.6 Dosagem de anticorpos anti-rotavírus IgA e IgG em amostras de soro	36
4.7 Análise da correlação entre títulos de anticorpos IgA e IgG.....	39
4.8 Neutralização viral	39
4.9 Análise da correlação do título de anticorpos da classe IgA e título neutralizante.....	42
4.10 Análise da correlação do título de anticorpos da classe IgG e título neutralizante.....	43
4.11 Padronização de ensaio de IB	44
4.12 Análise da reatividade de anticorpos anti-rotavírus presentes em amostras de soro em ensaios de IB	45

4.12.1 Amostra individual com títulos semelhantes de IgA e IgG.	45
4.12.2 Amostra individual com título alto de IgA e baixo de IgG	46
4.12.3 Amostra com título baixo de IgA e alto de IgG	47
4.12.4 Amostras diferentes com títulos variados de IgA e IgG	48
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS*	56

1 INTRODUÇÃO

O rotavírus é um vírus pertencente à família *Reoviridae*, capaz de infectar mamíferos, como cavalos, macacos, cães, humanos e as aves.

O rotavírus foi identificado, em humanos, pela primeira vez em 1973 e tem sido considerado como a causa mais comum de gastroenterite viral que acomete crianças em todo mundo (Parashar et al., 1998; World Health Organization, 2003). No Brasil, sua identificação ocorreu apenas em 1977, no Pará, em crianças com diarreia aguda, onde duas a cada 13 amostras continham rotavírus (Linhares et al., 1977).

A transmissão ocorre de uma pessoa a outra principalmente pela via fecal-oral. Apesar desta não estar associada à urina e secreções respiratórias, foi relatada a presença de partículas virais nestes fluidos. (Vollet et al., 1981; Zheng et al., 1991).

A morfologia do rotavírus é icosaédrica sendo que a partícula viral completa mede 70 nm de diâmetro. O capsídeo é composto por duas camadas protéicas (“Double-Shelled” - DS) que envolvem o genoma composto de um RNA dupla fita (figura 1). Partículas com apenas uma destas camadas (“Single-Shelled” - SS) são geralmente achadas em fezes. Este RNA dupla fita codifica proteínas estruturais (VP1 a VP8) e cinco proteínas não estruturais (NSP1 a NSP5) (Estes e Cohen, 1989).

A cepa SA-11 foi isolada na África do Sul em 1958 por Malherbe et al (1963). Seu crescimento facilitado em cultura celular levou à sua distribuição para grupos de pesquisa em todo o mundo com aplicação em estudos de virulência, patogenia entre outros sendo considerado um vírus protótipo (Estes, 2001).

Duas proteínas estruturais, VP4 e VP7, formam o capsídeo externo e estimulam a produção de anticorpos neutralizantes no soro e nas secreções de mucosa. Anticorpos para ambas as proteínas estão envolvidos na proteção (Bishop, 2009; Li et al., 2009).

Os rotavírus são classificados sorologicamente em grupos e sorotipos, baseados nas especificidades antigênicas das proteínas dos capsídeos interno e externo. A maioria dos vírus que infectam humanos pertence aos grupos A, os pertencentes ao grupo B e C são raros. Os sorotipos são definidos pelas

duas proteínas do capsídeo externo: VP7, uma glicoproteína que define os sorotipos G e VP4 uma proteína sensível à protease, que determina o sorotipo P, ambas envolvidas na neutralização viral (Franco e Greenberg, 2002).

O rotavírus apresenta tropismo pela superfície de enterócitos maduros do epitélio colunar na superfície dos vilos do intestino delgado, os quais têm uma função digestiva e absorviva, porém as partículas virais podem ser detectadas no citoplasma (Estes, 2001).

Após a ingestão, as partículas de rotavírus são transportadas para o intestino delgado onde penetram diretamente nos enterócitos maduros ou por meio de endocitose dependente de cálcio. A proteína VP4 é a principal proteína envolvida na ligação do vírus com a célula hospedeira, sofrendo clivagem pela tripsina pancreática, dando origem às proteínas VP5 e VP8. A VP5 é uma proteína ácido-siálico independente que interage na ligação com os enterócitos humanos. A entrada do vírus na célula é mediada por VP5 e também por VP7, através das integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 4\beta 1$ respectivamente (Fleming et al., 2007).

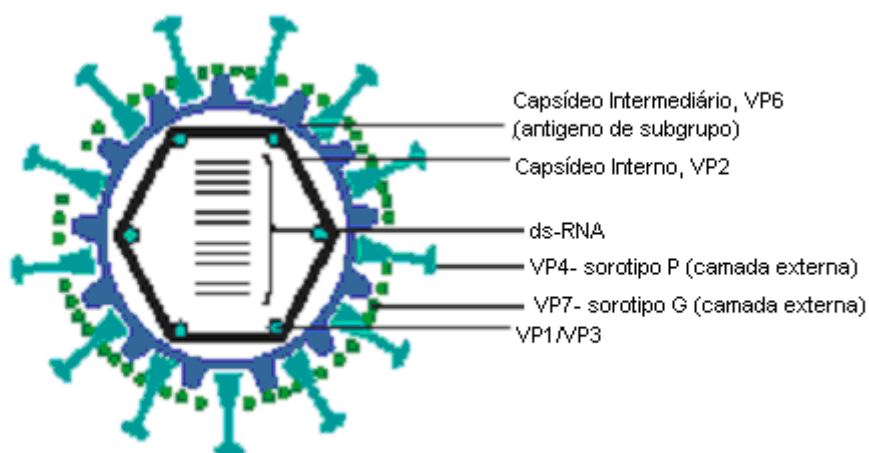


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do rotavírus
Fonte: Cunliffe et al. (2002).

A distribuição dos rotavírus de diferentes sorotipos varia geograficamente. Enquanto G1P[8] representa 70% das infecções na América do Norte, Europa e Austrália, estes vírus representam apenas cerca de 30% das infecções na América do Sul e Ásia, e 23% na África (Santos e Hoshino, 2005).

No Brasil, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, de 2006 a 2007, foram confirmados 2.087 casos de diarreia por rotavírus em crianças, entre 8.895 amostras testadas. As regiões Norte e Nordeste possuem mais casos, 30,8% e 30,1%, respectivamente. O número de amostras coletadas diminuiu de aproximadamente 4.000 em 2006 para 2.500 em 2008, porém a positividade aumentou de 16,8% para 35,9% respectivamente (Ministério da Saúde, 2008). Esses dados podem ser subestimados, nem todas as crianças são levadas ao hospital quando estão com diarreia e quando vão muitas vezes as fezes não são testadas para doenças virais.

Embora as fezes de pacientes adultos com doença gastrointestinal sejam rotineiramente testadas quanto à presença de bactérias, fornecendo um número baixo de positividade, o mesmo não é feito em relação aos vírus causadores de gastroenterites (Anderson e Weber, 2004).

Trabalhos até 2006 apresentam uma grande diversidade de sorotipos circulantes no Brasil, apontando os sorotipos G1, G2, G3, G4 e G5 como predominantes e responsáveis pela maioria dos casos da doença (Santos et al., 2003; Linhares, 1997; Mascarenhas et al., 2002; Souza et al., 2003; Carmona et al., 2004). O sorotipo G9 foi identificado em espécimes obtidas de 9 áreas do Brasil, inclusive São Paulo (Carmona et al., 2006).

Segundo revisão realizada por Gurgel et al. (2008) há diferenças dos sorotipos circulantes no Brasil, o G1 foi apontado como o sorotipo mais freqüente, porém cepas incomuns como G5 e G9 estão emergindo, principalmente no Rio de Janeiro, São Paulo, Salvador e Recife.

Outro trabalho epidemiológico realizado no período de 2005-2006 reforçou a presença significativa de G9 e G1, mas a predominância foi do sorotipo G2. Os sorotipos G3 e G4 que já foram importantes epidemiologicamente não apareceram em nenhuma cidade estudada (Munford et al., 2009).

Um levantamento da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo mostrou que, no Estado, do período de 2003 a 2005 (anterior à vacinação) e de 2006 a 2008 (após-vacinação), não ocorreu um declínio no número de surtos notificados, mas no número de casos envolvidos nos mesmos. No período anterior à vacinação houve ocorrência de 16.279 casos, após a vacinação ocorreram 2.775 de casos notificados em surtos, esse declínio se repete

também na positividade das amostras de 24,4% antes da vacina, para 14%, após vacina. No período anterior à vacinação predominaram os genótipos circulantes G9P[8] e G1P[8] e após, o genótipo G2P[4] passou a predominar (São Paulo- Secretaria da Saúde, 2009). Em São Paulo, no período 2006-2008, os sorotipos, G1P[4], G1P[8], G9P[8], G9P[6], G2P[4], G3PnT foram predominantes. (Ministério da Saúde, 2008).

Assim, pelos dados relatados e pelas características da infecção por rotavírus, uma importante forma de controle se dá através da vacinação. Uma vacina ideal contra o rotavírus deve reproduzir a resposta imune que é gerada durante a infecção natural, prevenindo os casos de maior gravidade.

Os primeiros esforços para o desenvolvimento de uma vacina anti-rotavirus começaram em 1980, com a vacina oral monovalente que continha vírus atenuados de uma cepa bovina (RTI-4237) (Vesikari et al., 1983). Com o objetivo de se ampliar o espectro antigênico, foi desenvolvida uma vacina oral tetravalente, contendo partículas virais rearranjadas de bovinos e humanos, a Rotashield (Wyeth Laboratories INC/Pfizer- New York, Estados Unidos). Esta vacina seria capaz de imunizar contra os sorotipos G1, G2, G3 e G4, porém sua utilização foi suspensa devido a casos de intussuscepção atribuídos a ela (Muñoz et al., 2006).

Recentemente outras duas vacinas entraram no mercado, a Rotateq (Merck Sharp & Dohme - New Jersey, EUA) que é uma vacina pentavalente bovino-humana eficaz contra os sorotipos G1, G2, G3, G4 e P8; e a Rotarix (RIX4414-GlaxoSmithKline Biologicals- Brentford- Reino Unido), que é uma vacina monovalente com vírus atenuado, derivado de uma cepa humana G1 (Muñoz et al., 2006).

Uma vacina contra rotavírus está sendo formulada pelo Instituto Butantan com foco nos sorotipos virais que aparecem com mais frequência no país. A vacina é pentavalente, isto é, composta por cinco sorotipos virais com genes rearranjados de bovinos e humanos (G1, G2, G3, G4 e G9). Além da vantagem de fornecer um produto mais adequado para a realidade nacional, o Instituto tem como meta baratear os custos da vacina (Glass, 2006).

Os mecanismos responsáveis pela imunidade contra o rotavírus, especialmente em humanos, não são totalmente compreendidos. Sabe-se que os anticorpos produzidos em uma primeira infecção são sorotipo-específicos

com produção limitada de anticorpos capazes de reagir cruzadamente. Infecções subseqüentes aumentam a produção de anticorpos que reagem cruzadamente com outros sorotipos (Jiang et al., 2002).

Muitas vacinas licenciadas conferem imunidade protetora elicitando anticorpos séricos IgG que inativam o inóculo. Embora as vacinas possam induzir mais de um componente imune, elas são padronizadas apenas pela medida dos anticorpos séricos (Robbins et al., 1995, Westerman et al., 2005).

Franco et al., (2006) baseados em uma extensa bibliografia sobre o assunto, propuseram um modelo simplificado para os mecanismos imunes contra este vírus. Antígenos de rotavírus estimulariam dois compartimentos da resposta imune, um sistêmico e outro de mucosa. No compartimento sistêmico, os antígenos de rotavírus estimulariam células B de memória no baço que, mediados por receptores de “homing”, recirculariam no sangue e voltariam ao baço. Além disso, essas células produtoras de anticorpos se dirigiriam também para a medula óssea onde podem secretar IgA e IgG monoméricas, principal fonte de anticorpos do soro. Nas mucosas, os antígenos de rotavírus apresentados nas placas de Peyer gerariam células B de memória com receptores de “homing” que permitiriam a saída delas para a circulação e a volta para as mucosas. Neste caso, essas células produtoras de anticorpos se alojariam na lâmina própria das mucosas e secretariam IgA dimérica. Esses anticorpos poderiam impedir a infecção do enterócito neutralizando o vírus no lúmen e também atuando dentro dessas células, inativando os vírus que já penetraram.

Aproximadamente 70 a 80% das imunoglobulinas no soro é da classe IgG, devido à sua alta produção e a meia-vida longa (cerca de 20 a 25 dias) em relação as outras classes. Essa imunoglobulina está envolvida na memória imunológica e tem um grande papel na defesa contra infecções extracelulares. Pela ligação dos receptores Fc, a IgG medeia a fagocitose, o *clearance* de complexos imunes e outras funções. Ainda é a única classe de anticorpo que atravessa a membrana placentária, protegendo o recém nascido enquanto seu sistema imune se desenvolve (Furst, 2008).

A IgA é encontrada na superfície de mucosas, como olhos, trato respiratório, gastrointestinal e genitourinário sendo a principal forma de imunoglobulina secretada. Sua meia vida é relativamente curta, com duração

de aproximadamente 6 dias (Furst, 2008). Age como uma primeira linha de defesa contra microrganismos invasores nessas rotas. Tem papel fundamental na proteção das superfícies mucosas contra toxinas, vírus e bactérias por meio da neutralização direta ou prevenção de ligação com a superfície epitelial (Schroeder e Cavacini, 2010).

A IgA sérica encontra-se sob a forma de monômero. Já a IgA (slgA) secretora é encontrada em mucosas e secreções na forma de dímeros ligados pela cadeia J, unida na sua porção Fc no componente secretor (Brandtzaeg e Prydz, 1984).

Há duas subclasses de IgA, IgA1 e IgA2, com diferenças antigênicas, bioquímicas e biológicas ligadas as diferenças estruturais, ocorridas principalmente na região da dobradiça. Essas duas subclasses também se distribuem de forma diferenciada nos tecidos e fluidos corporais. A IgA1 é predominante no soro enquanto a IgA2 é mais freqüentemente encontrada nas secreções, responsável por até 48% da IgA presente no leite. Foi demonstrado em um estudo que a IgA2 foi encontrada em maior quantidade no leite, porém foram dosadas também quantidades significantes de IgA1. Essa presença de IgA2 na glândula mamária pode ser vantajosa para a superfície de mucosa, pois esse isotipo não é sensível à protease específica, mesmo aquelas produzidas pelas bactérias comensais da microflora, fornecendo ao lactente uma proteção contra microrganismos (Trégoat et al., 2001)

Deficiência na produção de IgA pode resultar em sintomas clínicos relacionados a vários órgãos. Grumach et al. (1998) relataram em um trabalho com 60 pacientes deficientes de IgA onde 50% deles possuíam níveis de IgM e IgG superiores ao normal. Outro trabalho (Istrate et al., 2008), com pacientes deficientes em IgA demonstrou que a IgA sozinha não soluciona a doença diarréica por rotavírus.

Anticorpos de um compartimento podem passar para o outro por mecanismos ainda não bem estudados, assim, anticorpos sistêmicos poderiam neutralizar rotavírus no intestino e a IgA do soro poderia ser correlacionada com a IgA intestinal. (Franco et al., 2006).

Hjelt et al. (1985) mostraram que, pelo menos até quatro meses após a infecção, a IgA anti-rotavírus presente no soro pode apresentar o componente

secretor, indicando sua origem intestinal. Entretanto não foi possível demonstrar até que período seria possível encontrá-la.

Examinando o nível de anticorpos anti-rotavírus preexistentes no soro de crianças com gastroenterite ou infecção assintomática, Hjelt et al. (1987) observaram níveis de IgA mais elevados em crianças com sintomas mais brandos da doença, correlacionando IgA com algum nível de proteção. Clemens et al. (1992), compararam títulos de IgG anti-rotavírus preexistentes no soro de crianças que desenvolveram diarreia com os títulos encontrados no soro de crianças saudáveis e verificaram títulos de anticorpos IgG significativamente menores nas crianças que desenvolveram diarreia por rotavírus.

Anticorpos IgA contra rotavírus foram identificados tanto no soro como em secreções locais. Foi demonstrado por Johansen e Svensson (1997), que a IgA sérica possui a capacidade de neutralizar rotavírus *in vitro* e que uma infecção natural estimula a produção de anticorpos IgA, bem como anticorpos IgG que reconhecem epítomos imunologicamente importantes como VP4 e VP7.

Sabe-se também que IgA anti-rotavírus no soro, induzida pela infecção natural, pode se correlacionar com proteção, podendo ser explicado pelo fato de a IgA no soro ser de origem intestinal (Hjelt et al., 1987; O’Ryan et al., 1994; Velázquez et al., 2000; Gonzalez et al., 2005).

Embora a infecção por rotavírus em crianças esteja mais em evidência, adultos também são alvos de infecções por este vírus, ainda que em menor escala. Muitas vezes a infecção pode ser epidêmica, acometendo comunidades isoladas ou ocorrer em hospitais, afetando pacientes e funcionários. Pode ainda ser transmitida de crianças doentes para adultos próximos. O diagnóstico de doenças por rotavírus pode trazer muitos benefícios, inclusive possibilitando o isolamento do paciente e evitando infecções nosocomiais (Anderson e Weber, 2004).

Em 1987 uma epidemia de rotavírus atingiu uma cidade da China, Qinhuangdao, afetando mais de 200 pessoas, a maioria adultos, de forma grave. A predisposição à diarreia é similar ao padrão observado em outras viroses entéricas, como aquelas causadas pelo vírus Norwalk. Neste mesmo estudo, infecções assintomáticas e o contato pessoa a pessoa foram também

identificados (Fang et al., 1989). No Brasil também foi descrito o aparecimento de um surto de infecção por rotavírus que acometeu crianças e também adultos, na cidade de Mirasol em São Paulo (Timenetsky et al., 1996).

Echeverria et al. (1983) demonstraram que a diarreia em adultos pode ser grave, porém o nível de susceptibilidade é desconhecido. Neste trabalho realizado na Tailândia, 15% dos adultos infectados por rotavírus tinham títulos de anticorpos séricos menores que 200, podendo explicar sua alta susceptibilidade. Entretanto, 25% dos pacientes atendidos possuíam títulos de anticorpos séricos de 3200 na fase aguda, e ainda assim estes pacientes se tornaram sintomáticos, indicando uma possível re-infecção com outro sorotipo de rotavírus que não aquele ao qual foram primariamente expostos.

Para demonstrar o papel dos anticorpos do soro de adultos Kapikian et al. (1983) administraram uma cepa humana virulenta em 18 adultos voluntários e observaram que quatro deles desenvolveram diarreia. Após 19 meses dois adultos foram desafiados, dentre os quatro que apresentaram diarreia, com a mesma cepa viral e não desenvolveram sintomatologia. Neste trabalho, altos títulos de anticorpos neutralizantes no soro, analisados por imunofluorescência e testes de neutralização, foram correlacionados com resistência à doença diarreica por rotavírus. Ward et al. (1989) conduziram um estudo semelhante, também com adultos voluntários, os quais foram injetados com duas doses da cepa CJN de rotavírus humano com subsequente avaliação de anticorpos IgA e IgG anti-rotavirus no soro. Eles demonstraram que os adultos que não tinham desenvolvido a doença possuíam altos títulos de IgA e IgG no soro em relação aos adultos sintomáticos e que somente IgG foi associada significativamente à proteção contra a infecção.

Muitos grupos têm trabalhado para a definição de um marcador de proteção contra o rotavírus. Apesar de a IgA anti-rotavírus encontrada nas fezes ter sua eficácia comprovada na proteção, sua medida é tecnicamente difícil e no caso de bebês, anticorpos provenientes da amamentação poderiam dificultar a interpretação dos resultados. Por esse motivo a dosagem de IgA das fezes não tem sido encorajada para ser um fator de correlação com proteção.

Dosagem de anticorpos anti-rotavírus no soro pode ser realizada para estudos soro-epidemiológicos, como o realizado na cidade de Avellaneda,

distrito de Buenos Aires. Fezes foram colhidas de pessoas de todas as idades com sintomas gastrintestinais, para diagnóstico, além de soro de todos os membros da família desses pacientes. Os autores concluíram que os indivíduos adultos poderiam funcionar como reservatórios da infecção rastreando-se os níveis de IgG no soro e identificando re-infecções. Também constataram que a ocorrência da infecção não diferia em relação à idade, com altos níveis de re-infecção, e que altos títulos de anticorpos tinham pouca duração e, conseqüentemente, não promoviam proteção duradoura (Gómez et al., 1990).

Não existem dados completos sobre a incidência de infecção por rotavírus em adultos e, menos ainda, dados sobre anticorpos anti-rotavírus preexistentes que poderiam sugerir um papel na proteção contra o vírus e também ser um indicativo de re-exposição ao vírus.

2 OBJETIVOS

- Analisar a presença de anticorpos das classes IgA e IgG anti-rotavírus SA-11 em amostras de soro humano de adultos saudáveis.
- Estudar a ação neutralizante dessas amostras frente ao rotavirus SA-11.
- Analisar a correlação entre níveis de anticorpos séricos e ação neutralizante.
- Analisar a reatividade dos anticorpos séricos anti-rotavirus contra proteínas virais do SA-11.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de soro

As amostras que foram utilizadas no projeto, em um total de 50, são remanescentes do controle de qualidade do banco de sangue do Hospital Albert Einstein. Os doadores têm idade entre 18 e 69 anos, saudáveis, de ambos os sexos, com reações negativas para HIV, HTLV I/II, hepatites B e C, Doença de Chagas e sífilis. As amostras foram separadas e acondicionadas em freezer a -20 °C. Um “pool” formado por 50 amostras de soro, diferentes daquelas dosadas individualmente, também foi preparado para ser utilizado como controle no ensaio de ELISA.

3.2 Amostra viral

Foi utilizado como antígeno viral o protótipo símio SA-11, contendo a proteína VP7, semelhante ao sorotipo G3 humano.

3.3 Cultura de células MA-104 em garrafas estacionárias

Foi utilizada cultura de células MA-104, em monocamadas, mantidas em garrafas de 25 cm² e 75 cm². As células foram repicadas a cada 3 ou 4 dias, utilizando PBS (0,14M NaCl; 4,0mM KCl; 0,5mM Na₂HPO₄; 0,15mM KH₂PO₄; 10,0 mM Glicose Anidra) para lavagem e tripsina (ATV- associação tripsina/versene; ; sol. tripsina 0,4%, sol. versene 0,2%, verm. fenol 0,15%) para o seu descolamento. A cultura foi mantida em Meio Essencial Mínimo (MEM – CULTILAB) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina (SIGMA) e 10 mg/mL de gentamicina (SIGMA) sendo chamado MEM completo, em estufa de CO₂ a 37 °C.

3.4 Cultura de células MA-104 em garrafas de “Roller”

A quantidade inicial de células para cultura em garrafas de “Roller”, proveniente das garrafas estacionárias, foi estabelecida em $2-5 \times 10^6$ células/mL. Foi determinado que para a adesão é necessário deixar em uma rotação mínima de aproximadamente 0,3 rpm por 6 horas e após esse período aumentar para 2 rpm. As garrafas foram mantidas em estufa 37 °C sem CO₂ para a obtenção de um tapete completo em 48 horas de cultivo.

3.5 Infecção viral em garrafas de “Roller”

Após o crescimento das células na garrafa de “Roller” foi realizada a infecção viral com o rotavírus SA-11. As células foram lavadas 3 vezes com PBS. A suspensão viral contendo o vírus SA-11 foi diluída para obtenção de 0,5 m.o.i (multiplicity of infection) em meio MEM sem soro fetal bovino e adicionado tripsina para uma concentração final de 10µg/mL. A suspensão foi incubada por 30 minutos em estufa 37 °C, para ativação do vírus. Após sua ativação a suspensão viral foi adicionada à garrafa de “Roller” e mantida por 1 hora em estufa a 37 °C. Após a incubação o meio foi dispensado e substituído por MEM sem soro contendo 1µg/mL de tripsina, permanecendo na garrafa por 48 horas, tempo suficiente para a observação do efeito citopático em aproximadamente 90% das células. O mesmo procedimento foi realizado sem o inóculo viral. Esses sobrenadantes foram utilizados para a obtenção de antígenos viral e controle usados nos ensaios de Elisa e “Immunoblotting”.

3.6 Obtenção de antígeno viral e controle por sedimentação sobre camada de sacarose

Após 48 horas de infecção das garrafas de “Roller”, as garrafas foram congeladas e descongeladas por 3 vezes. O meio das garrafas foi retirado e clarificado a 1500g (3000 rpm) a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante viral

resultante da clarificação foi colocado sobre camada de sacarose 40% e ultracentrifugado a 100.000g, por 3 horas a 4 °C. Este sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as partículas virais foi ressuspenso com tampão tris-cálcio (10 mM Tris, 100 mM NaCl e 2 mM CaCl₂, pH 7,4) contendo 20µg/ mL de aprotinina.

Para obtenção do antígeno controle purificado, os sobrenadantes das culturas celulares não infectadas foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos acima.

3.7 Dosagem de proteína

Utilizou-se o kit do método colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA) (SIGMA). Uma solução de albumina sérica bovina (BSA) com diluições seriadas de 1000 a 62,5 µg/ml foi utilizada como padrão.

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)

Para a avaliação do antígeno utilizado nos ensaios de Elisa e Immunoblotting foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS–PAGE) conforme descrito por Zingales (1984), em mini-gel com 12,5% de acrilamida com gel de empilhamento. A corrida foi realizada utilizando pente de 10 cavidades para análise do antígeno viral. O padrão de peso molecular utilizado foi o Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare) com pesos moleculares entre 10KDa e 250KDa. As corridas foram realizadas em voltagem constante de 110 volts por cerca de 90 minutos e interrompidas quando a linha de frente do corante azul de bromofenol distasse cerca de 0,5 cm do final do gel.

3.9 Coloração de gel de poliacrilamida com prata

Inicialmente o gel foi colocado em uma solução fixadora (40% de Etanol e 10% de Ácido Acético) por 2 horas. Em seguida, o gel foi lavado com uma solução de etanol 30% e após mais 2 lavagens com água, o gel foi sensibilizado com tiosulfato de sódio 0,02% por 1 minuto. Retirada essa solução, o gel foi lavado 3 vezes rapidamente com água e acrescentou-se uma solução de nitrato de prata (0,2% AgNO_3 e 0,002% Formaldeído 37%) por 20 minutos. Após novo ciclo de lavagens, foi colocada a solução reveladora até a visualização das bandas antigênicas. A reação foi bloqueada com glicina 0,5%.

3.10 Dosagem de anticorpos pela técnica de ELISA

Metade de uma placa de ELISA com 96 escavações foi sensibilizada com 100 μL de uma preparação contendo 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno viral e a outra metade com 100 μL de uma preparação contendo 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno controle, preparado a partir de sobrenadantes celulares não infectadas, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,0. A placa foi incubada por 18 horas a 4 °C. Os volumes foram descartados e os poços foram então bloqueados com 150 μL de tampão de bloqueio (PBS- 1,12M Na_2HPO_4 e 0,15M NaCl; com 10% de leite desnatado) por 90 minutos. A placa foi lavada com tampão de lavagem (PBS com 0,05% Tween 20). Diluições seriadas das amostras individuais e do pool (razão 2) diluídas em tampão de amostra e conjugado (PBS, leite desnatado 10%, NaCl 2% e Tween 20 0,25%) foram adicionadas à placa no volume de 100 μL , em duplicata. Novamente ela foi incubada a 37 °C por 90 minutos e lavada. Os conjugados anti-IgG ou anti-IgA foram diluídos a 1:10.000 no tampão de diluição de amostra e conjugado e distribuídos na placa, a qual foi novamente incubada a 37°C por 60 minutos. Um novo ciclo de lavagem foi realizado e após o mesmo foi adicionado 100 μL do substrato OPD, (0,4 mg/mL) com 0,01% de H_2O_2 em tampão citrato-fosfato (40mM Ácido Cítrico; 70mM Na_2HPO_4 , pH 5). A placa foi novamente incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e em seguida adicionou-se 50 μL de

H₂SO₄ 2,5N, em cada poço para interromper a reação. A placa foi lida em leitor de ELISA com filtro de 492 nm. O “pool” foi titulado em todos os ensaios de ELISA. Os resultados foram expressos em títulos relativos que é a razão entre o título da amostra e o título do “pool” multiplicado por 100.

3.11 Titulação viral

A técnica para obtenção dos títulos virais foi realizada baseada nos métodos descritos por Payment e Trudel (1989) e Wyatt et al. (1983).

Em uma placa de 96 escavações foram distribuídos 100µL por poço de uma suspensão com células MA-104 contendo 1×10^5 células/ml e cultivada por 48 horas. O vírus SA-11 foi diluído em meio MEM sem soro com 10µg/mL de tripsina 0,25% na razão 10 (10^{-1} a 10^{-12}), mantido em estufa de 5% de CO₂ a 37 °C. A placa foi então lavada duas vezes com PBS e as diluições do vírus foram distribuídas em quadruplicata na placa, que foi incubada por mais uma hora. Após essa incubação o meio foi trocado por MEM sem soro contendo 1µg/mL de tripsina 0,25%. O efeito citopático foi observado em microscópio invertido após 48 horas, sendo considerado o título viral a recíproca da diluição que resultou em 50% do efeito. Em todos os ensaios foram colocados poços de controle celular e de tripsina. O cálculo da DICT₅₀ foi feito pelo método de Reed-Muench (1938).

3.12 Neutralização viral

A capacidade neutralizante das amostras de soro foi avaliada pelo ensaio de neutralização. Em placas de cultura com 96 escavações foram distribuídos 100 µL de uma suspensão de células MA-104 contendo 1×10^5 células/mL. As placas foram cultivadas por 48 horas em atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C. A amostra viral foi diluída segundo sua titulação prévia, fornecendo 100DICT₅₀ em meio MEM sem SFB, e ativado com tripsina 0,25% em concentração final de 10 µg/mL por 30 minutos. As amostras individuais de soro foram diluídas seriadamente, em razão 2, a partir da diluição 1:10, em

uma placa de cultura sem célula, onde volumes iguais de de vírus diluído e das diluições das amostras foram misturados e incubados por 30 minutos a 37 °C. A placa cultivada foi lavada com PBS a 37 °C duas vezes e 100 µL de cada mistura amostra/vírus foi transferida para uma de suas escavações. Após 1 hora a 37 °C as misturas foram retiradas e adicionado meio MEM sem SFB contendo 1 µg/mL de tripsina. Após 48 horas em atmosfera de 5% de CO₂ e 37 °C as placas foram analisadas quanto ao aparecimento de efeito citopático. Os resultados foram apresentados como a recíproca da maior diluição na qual mais de 60% do efeito citopático foi neutralizado.

3.13 “Immunoblotting” (IB)

A padronização do IB foi realizada utilizando-se o “pool” de soro. As preparações viral e controle foram utilizadas como antígenos e os polipeptídios nelas contidos foram separados em gel de SDS-PAGE. A partir do gel foi preparado um “sanduíche” com os papéis de filtro, o gel e a membrana de nitrocelulose embebidos em tampão de transferência (25mM Trizma Base, 0,2M C₂H₅O₂N, 20% metanol). A transferência foi realizada em sistema semi-seco, fixando-se a voltagem em 14 volts durante 40 minutos em aparelho Trans-Blot Semi-Dry (BioRad). Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau S 0,5% por 30 minutos, descorada, seca e cortada em tiras de 4mm de largura. Cada tira foi colocada em uma canaleta da cuba de IB, bloqueadas com tampão de bloqueio (tris-salina 10 mM com 10% de leite desnatado) e mantidas em agitador basculante por 2 horas à temperatura ambiente. O tampão de bloqueio foi desprezado e as amostras individuais ou “pool” foram adicionados na diluição 1:2 em tampão de diluição (tris-salina 10 mM com 0,05% de tween 20 e 10% de leite desnatado), sendo incubadas “overnight” à temperatura ambiente em agitador basculante. Após este período, as tiras foram submetidas a seis lavagens de dez minutos cada, com tampão de lavagem (tris-salina 10 mM com 0,1% de tween 20). As membranas foram em seguida tratadas com anticorpos anti-IgA marcados com fosfatase alcalina na diluição 1:200 ou anti-IgG na diluição 1:2.000. Uma incubação de

2 horas foi realizada e, em seguida, mais um ciclo de lavagens. As fitas foram reveladas com NBT/BCIP (5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato/nitro-blue tetrazolio) até o aparecimento completo das bandas. A reação foi bloqueada com água.

3.14 Análise estatística

Para a análise das amostras não pareadas foi utilizado o teste Mann-Whitney (não paramétrico) $P < 0,05$.

Os títulos de ELISA e neutralização de amostras pareadas foram correlacionados utilizando o teste de Wilcoxon (não paramétrico). Os valores dos coeficientes são negativos quando não há correlação entre os grupos de dados. Se há correlação, os coeficientes são positivos, e quanto mais próximos de 1 maior a correlação entre os grupos de dados. Um $P < 0,05$ indica correlação estatisticamente significativa.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de antígenos viral e controle

Foram cultivadas células em garrafas de “Roller” e estacionárias que nos forneceram 810 mL de sobrenadante controle e 421 mL de sobrenadante viral. Esses sobrenadantes foram submetidos à ultracentrifugação sobre camada de sacarose, resultando em aproximadamente 1,38 mL de antígeno viral e 2,9 mL de antígeno controle purificados.

4.2 Concentração e rendimento das preparações de antígenos viral e controle

A tabela 1 apresenta as concentrações de proteínas dos sobrenadantes viral e controle realizados pelo método BCA, que serviram de base para o cálculo do rendimento das preparações.

Tabela 1- Concentração de proteínas e rendimento dos antígenos viral e controle.

Antígeno	Volume de sobrenadante (mL)	Volume após ultracentrifugação (mL)	Concentração de proteínas (µg/ml)	Rendimento (µg/ml)*
Viral	421	1,38	2216,4	7,26
Controle	810	2,9	631,56	2,7

* Rendimento: quantidade de proteína obtida por mL de sobrenadante de cultura.

4.3 Análise dos antígenos virais em gel de poliacrilamida

O perfil eletroforético das preparações virais foi analisado em SDS-PAGE. No gel apresentado na figura 2 foi possível reconhecer bandas com pesos moleculares compatíveis com as proteínas VP4, VP6 e VP7, que são as de maior interesse em nosso trabalho, devido o seu papel na indução dos anticorpos.

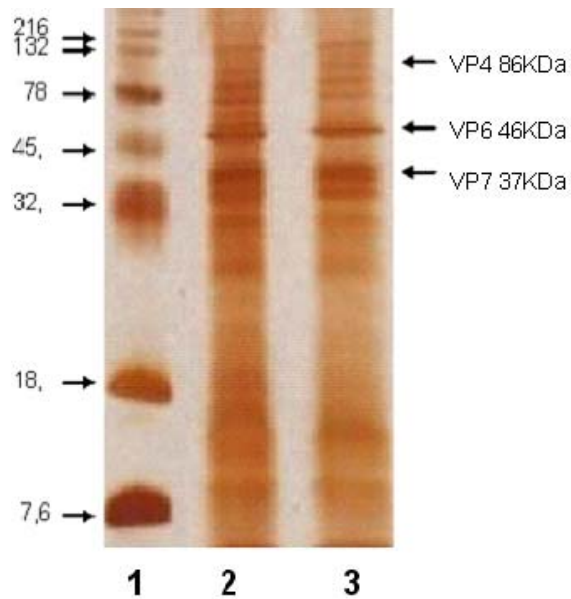


Figura 2: SDS-PAGE das preparações de antígenos virais SA-11. **1:** peso molecular; **2:** Antígeno SA-11 50µg/ml; **3:** Antígeno SA-11 25µg/ml.

As duas diluições do antígeno foram utilizadas para obtenção de uma concentração de proteínas que resultasse num gel com maior nitidez das bandas protéicas.

4.4 Padronização do ensaio de ELISA para dosagem de anticorpos anti-rotavírus

A diluição do conjugado anti-IgG foi padronizada, e os valores de D.O. obtidos estão apresentados na figura 3. A diluição do conjugado anti-IgA já havia sido previamente padronizado em 1:10.000 (Vieira, 2005).

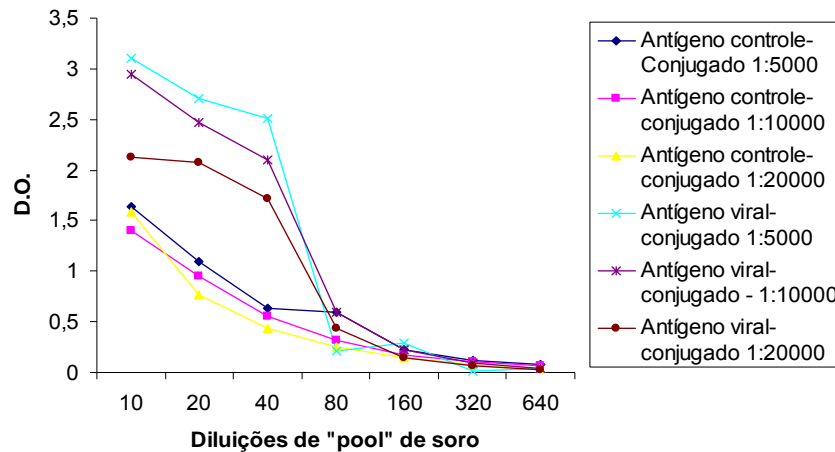


Figura 3: Valores de D.O obtidos no teste de ELISA com o “pool” de soro e três diluições de conjugado anti-IgG (1:5.000, 1:10.000 e 1:20.000).

A diferença entre os valores de D.O. do antígeno viral e do antígeno controle foi semelhante tanto na diluição do conjugado 1:5.000 como na diluição 1:10.000. Sendo assim, por uma questão de economia, estabeleceu-se a diluição 1:10.000 do conjugado para ser usada nos próximos ensaios.

4.5 Titulação viral

A titulação viral obtida pelo método de Reed-Muench (1938) forneceu o título da amostra de rotavírus SA-11 de $10^{5,3}$, o que equivale a 1 DICT₅₀. Para os ensaios de neutralização viral foi utilizado 100DICT₅₀.

4.6 Dosagem de anticorpos anti-rotavírus IgA e IgG em amostras de soro

Foram titulados anticorpos das classes IgA e IgG anti-rotavírus nas 50 amostras de soro, os resultados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2- Títulos relativos individuais das amostras de soro.

Amostra	Título relativo IgA	Título relativo IgG
1	58,11	48,60
2	17,41	6,45
3	103,11	62,65
4	30,40	44,33
5	93,97	349,50
6	128,92	20,83
7	104,15	103,83
8	17,98	76,73
9	129,20	221,83
10	276,75	69,13
11	48,50	214,59
12	30,04	85,00
13	49,81	117,07
14	13,17	60,71
15	58,82	95,60
16	108,25	105,22
17	5,17	103,14
18	201,44	79,73
19	78,00	54,93
20	64,86	213,96
21	135,30	145,80
22	116,70	457,69
23	12,64	52,14
24	55,27	390,36
25	98,24	118,10
26	33,74	71,64
27	55,15	27,85
28	58,14	274,51
29	6,60	103,81
30	45,48	258,98
31	4,12	59,77
32	184,85	252,00
33	100,10	64,85
34	9,60	167,83
35	133,50	468,80
36	99,12	97,90
37	81,92	130,65
38	65,80	316,80
39	13,55	171,60
40	43,77	64,26
41	77,04	119,52
42	160,90	58,70
43	52,87	773,90
44	45,13	171,70
45	37,25	84,80
46	31,50	305,60
47	20,50	85,30
48	123,30	69,00
49	17,36	30,60
50	341,70	130,90

Observamos que a variação dos títulos de anticorpos IgG e IgA é bem grande, e que os títulos de IgG são em sua maioria superiores aos de IgA.

Na figura 4 estão representados no gráfico “Box-plot” onde se observa uma análise descritiva dos dados.

O menor valor de IgA foi igual a 4,12 e o maior 341,7 com média de 77,58, para a IgG o menor valor foi 6,45 e o maior 773,9 com média de 155,42. Observamos que a média de IgA tem valor bem inferior à de IgG e as medianas também apresentam grandes diferenças: a IgA possui mediana de 58,12 e a IgG 97,9.

Além das amostras de adultos saudáveis apresentadas acima, foi realizada a dosagem de anticorpos IgG anti-rotavirus em uma única amostra de soro de um paciente deficiente de IgA, que forneceu um título igual a 156,2, valor próximo à média de IgG. Para confirmar a ausência de IgA foi realizado a sua titulação, cujo resultado foi negativo.

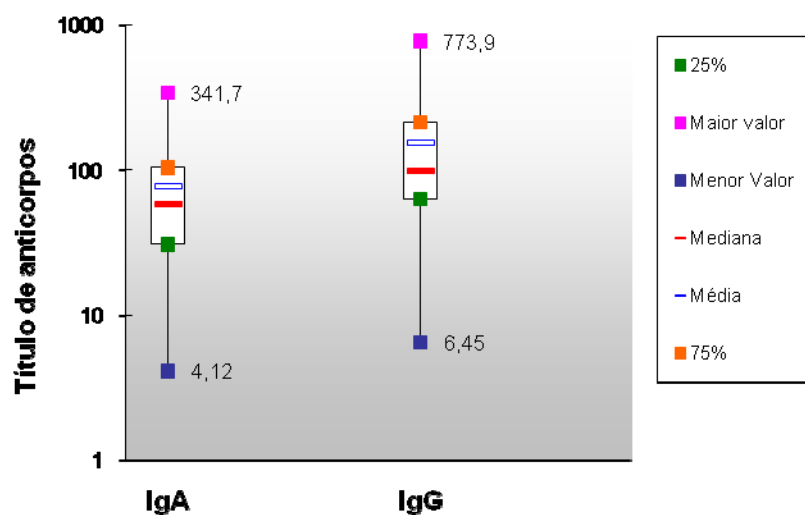


Figura 4: Títulos relativos de IgA e IgG anti-rotavirus distribuídos em gráfico “box plot”.

4.7 Análise da correlação entre títulos de anticorpos IgA e IgG

Os títulos de anticorpos IgA e IgG anti-rtavirus foram colocados em um gráfico de correlação (figura 5) para analisarmos se altos títulos de uma subclasse corresponderia a altos títulos da outra.

A análise estatística realizada pelo teste de Wilcoxon revelou não haver correlação ($r= 0,1994$) sendo o valor de $P= 0,1650$. Observamos amostras com altos títulos de IgG e títulos de IgA inferiores, assim como a relação contrária.

As amostras foram analisadas pareadamente.

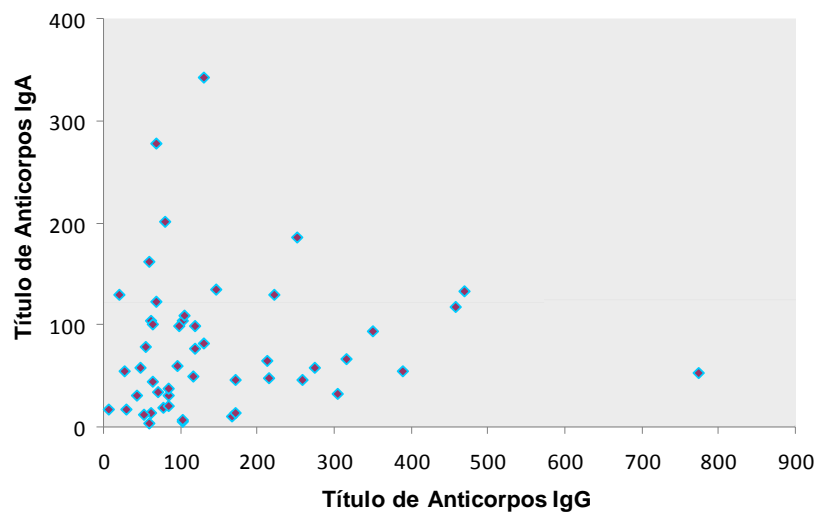


Figura 5: Correlação entre os títulos dos anticorpos das classes IgG e IgA.

4.8 Neutralização viral

A tabela 3 apresenta os títulos neutralizantes das 50 amostras individuais de soro, onde o menor título obtido foi 320 e o maior 20.480.

Tabela 3- Títulos neutralizantes individuais das amostras de soro.

Amostra	Neutralização
1	1280
2	20480
3	10240
4	20480
5	5120
6	20480
7	10240
8	1280
9	2560
10	5120
11	10240
12	5120
13	1280
14	2560
15	5120
16	20480
17	10240
18	10240
19	2560
20	5120
21	5120
22	2560
23	640
24	1280
25	2560
26	20480
27	10240
28	640
29	1280
30	2560
31	640
32	1280
33	5120
34	1280
35	5120
36	1280
37	320
38	5120
39	10240
40	10240
41	2560
42	20480
43	10240
44	2560
45	640
46	2560
47	1280
48	640
49	640
50	20480

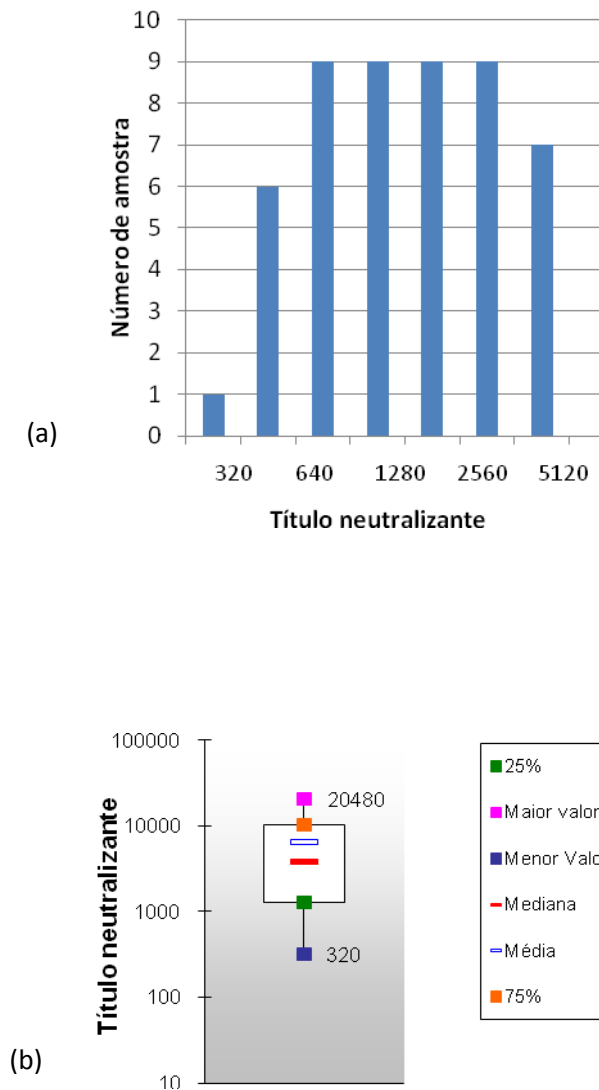


Figura 6: (a) Número de amostras de soro relacionadas aos títulos neutralizantes.

(b) Títulos neutralizantes das amostras de soro distribuídos em gráfico *Box Plot*.

A maior parte dos títulos neutralizantes (figura 6-a) se concentra nas diluições intermediárias. Os títulos neutralizantes foram colocados em um gráfico *Box Plot* (figura 6-b) onde podemos observar uma análise descritiva da distribuição desses títulos. A média obtida foi de 6406,4 e a mediana 3840.

A amostra proveniente de um paciente deficiente de IgA também foi avaliada em um ensaio de neutralização e seu título neutralizante foi igual a 640, ficando muito abaixo da mediana, da média e do primeiro quartil.

4.9 Análise da correlação do título de anticorpos da classe IgA e título neutralizante

Os títulos de anticorpos IgA anti-rotavírus e os títulos neutralizantes foram colocados em um gráfico de correlação (figura 7) para analisarmos se altos títulos de IgA corresponderia a um maior título neutralizante.

A análise estatística foi realizada pelo teste de Wilcoxon (Spearman) e revelou não haver correlação entre os resultados ($r = 0,2662$) sendo o valor de $P = 0,0808$. As amostras foram analisadas pareadamente.

Observou-se que várias amostras com títulos baixos possuem alta ação neutralizante.

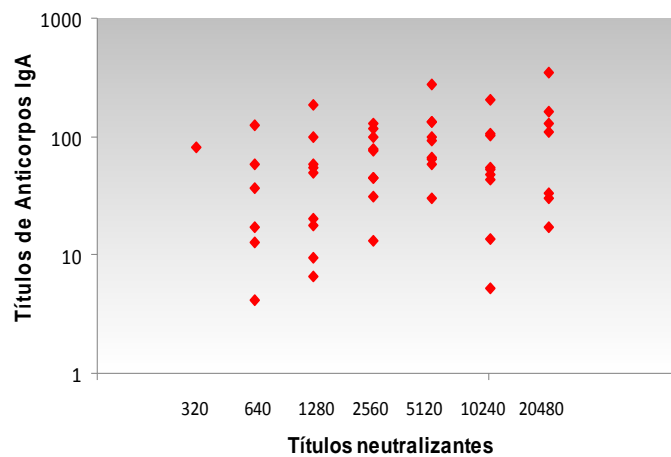


Figura 7: Correlação entre títulos de anticorpos IgA e título neutralizante das amostras de soro.

4.10 Análise da correlação do título de anticorpos da classe IgG e título neutralizante

Os títulos de anticorpos IgG anti-rotavirus e títulos neutralizante, foram colocados em um gráfico de correlação (figura 8) para analisarmos se um alto título dessa imunoglobulina poderia corresponder a um alto título neutralizante.

A análise estatística entre os títulos de anticorpos IgG e atividade neutralizante foi realizada pelo teste de Wilcoxon (Spearman) que revelou não haver correlação entre esse resultados ($r = -0,1136$) sendo $P = 0,4263$. As amostras foram analisadas pareadamente.

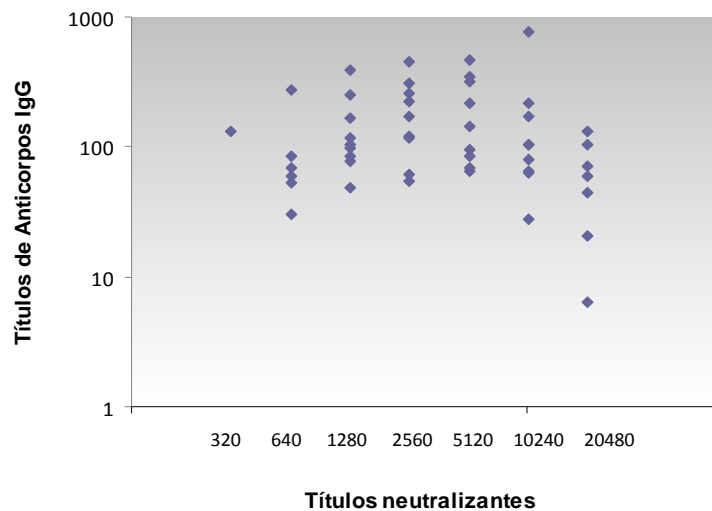


Figura 8: Correlação entre títulos de anticorpos IgG anti-rotavírus e título neutralizante das amostras de soro.

Foram encontradas amostras com títulos neutralizantes de 20.480, porém com título de anticorpo IgG baixo. Por outro lado outras amostras com títulos de IgG altos possuíam uma menor atividade neutralizante (figura 8).

4.11 Padronização de ensaio de IB

Para a realização do IB, foi necessária primeiramente a padronização da diluição dos conjugados. Os conjugados marcados com fosfatase alcalina foram testados em diversas diluições com o *pool* de soro, como mostra a figura 9.

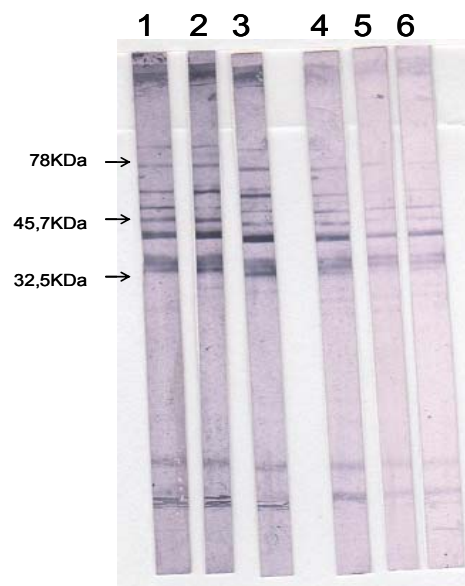


Figura 9: Padronização da diluição do conjugado anti-IgA e anti-IgG para ensaios de IB com o *pool* de soro e antígeno viral. Membranas 1, 2 e 3, conjugado anti-IgG diluído 1:500, 1:1000 e 1:2.000 respectivamente. Membranas 4, 5 e 6, conjugado anti-IgA diluído 1:200, 1:800 e 1:1.000, respectivamente.

Após essa padronização, os ensaios subseqüentes foram realizados utilizando as diluições 1:200 do conjugado anti-IgA e 1:2.000 para o conjugado anti-IgG. Não se verificou o aparecimento de bandas em ensaio do pool com antígeno controle (dados não mostrados).

4.12 Análise da reatividade de anticorpos anti-rotavírus presentes em amostras de soro em ensaios de IB

A análise das amostras de soro em ensaios de IB foi realizada levando-se em consideração os títulos de anticorpos avaliados por Elisa de cada uma delas

4.12.1 Amostra individual com títulos semelhantes de IgA e IgG.

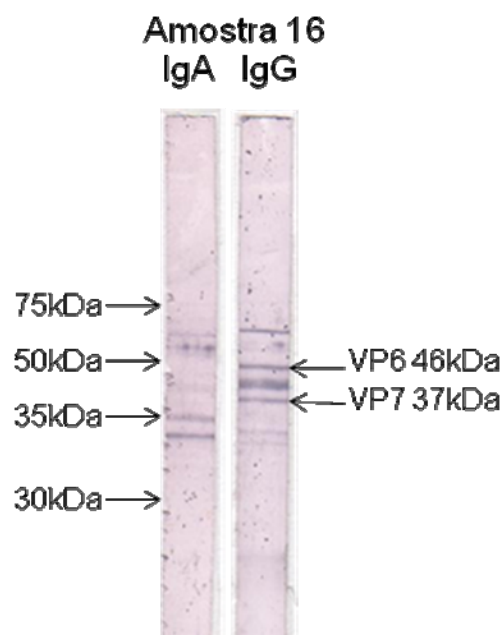


Figura 10: IB com antígenos de rotavírus SA-11da amostra nº 16 com conjugados anti-IgA e anti-IgG.

Pudemos observar que o reconhecimento das bandas protéicas se concentra na faixa de aproximadamente 30 a 75 KDa.

Nesse ensaio de IB foi utilizada uma única amostra, número 16, que possui títulos semelhantes de IgA (108,25) e IgG (105,22) (figura 10). Observou-se que o reconhecimento realizado pelas duas imunoglobulinas foi diferenciado. O padrão e o número de bandas evidenciadas pela IgA é menor que o de IgG. Como exemplo, uma banda protéica muito bem marcada foi evidenciada pela IgG na região da VP7 que não foi reconhecida pela IgA.

4.12.2 Amostra individual com título alto de IgA e baixo de IgG

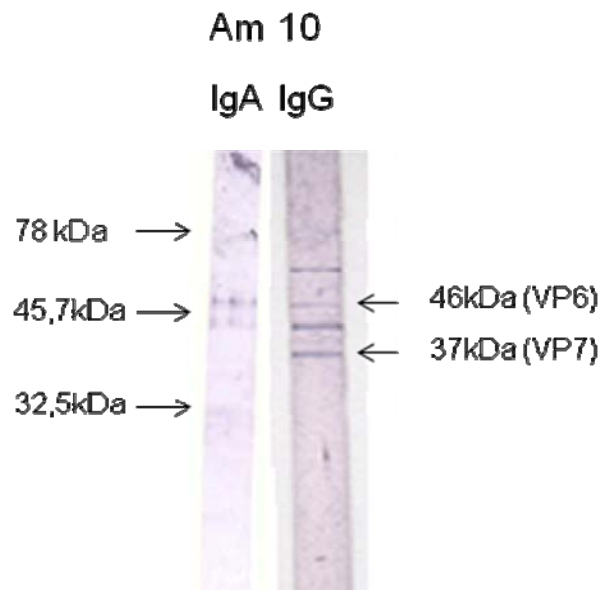


Figura 11: IB com antígenos de rotavírus SA-11 da amostra de soro número 10 reveladas com conjugados anti-IgA e anti-IgG

Nesse ensaio de IB foi também utilizada uma única amostra, número 10 (figura 11) que possui título de IgA (276,75) muito superior ao título de IgG (69,13). Apesar dessa diferença as bandas protéicas são evidenciadas de forma mais nítida pela IgG. Nessa amostra observamos um reconhecimento por ambas as imunoglobulinas de uma banda onde possivelmente se encontra a VP6, porém apenas a IgG reconheceu uma banda na região da VP7.

4.12.3 Amostra com título baixo de IgA e alto de IgG

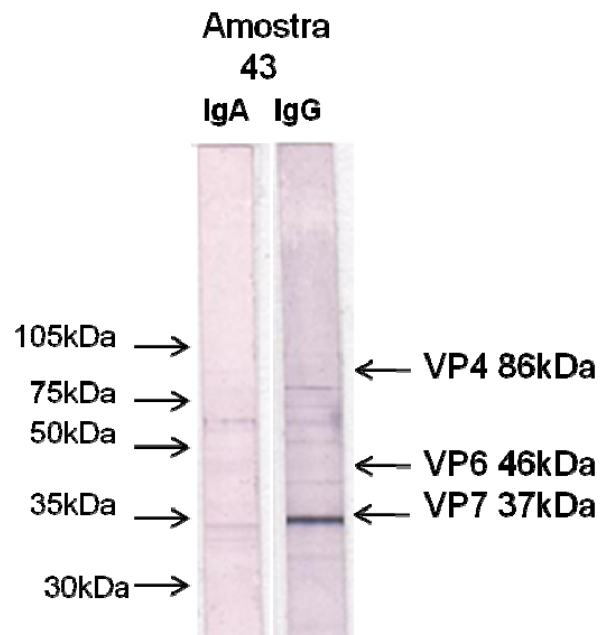


Figura 12: IB com antígenos de rotavírus SA-11 da amostra de soro número 43 reveladas com conjugados anti-IgA e anti-IgG.

Nesse ensaio de IB foi utilizada uma única amostra, número 43 (figura 12) que possui título de IgA (52,87) bem inferior ao de IgG (773,9). Observamos que o reconhecimento das bandas pelos anticorpos das amostras se mostra melhor pela IgG.

Quando analisamos a membrana revelada para IgA notamos a presença bem fraca de uma banda no local provável da VP4, que não está evidenciada pela IgG. Na membrana IgG nota-se a presença de uma banda na região de 35 kDa muito bem marcada porém na IgA ela se mostra mais clara.

4.12.4 Amostras diferentes com títulos variados de IgA e IgG

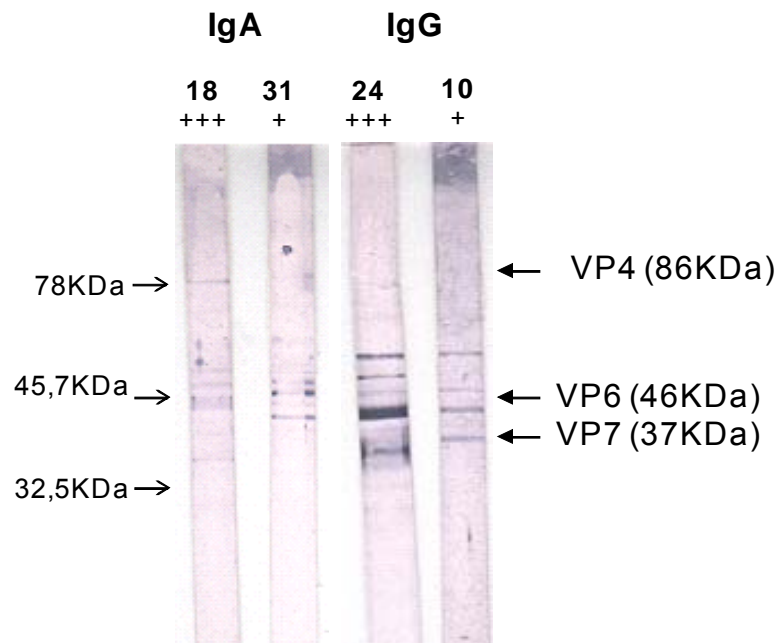


Figura 13: IB com antígenos de rotavírus SA-11 e amostras de soro reveladas com conjugados anti-IgA e anti-IgG. +++, alto título no ELISA; +, baixo título no ELISA.

Nesse ensaio de IB, foram utilizadas várias amostras com títulos variado de IgA e/ou IgG no teste de Elisa. A amostra 18 apresenta um alto título de IgA (201,44), e reconhece várias bandas proteicas. Apesar de não apresentar muita intensidade, foi possível reconhecer bandas na região da VP6 e VP4. A amostra 31 possui título de IgA baixo (4,12), mesmo assim reconheceu várias bandas protéicas incluindo bandas na região de VP4 e VP6. Com título de Elisa alto para IgG, temos a amostra 24 (390,36), das quatro amostras mostradas na figura, foi a amostra que apresentou bandas com melhor nitidez, demonstrando seu reconhecimento de bandas na região de VP7 e VP6, e uma banda muito bem marcada na região de 45 kDa. Pela amostra 10, cujo título de IgG é baixo (69,13), temos um reconhecimento superior àquele visto pelas amostras reveladas com IgA mas com marcação de um menor número de bandas apresentando reconhecimento das bandas nas prováveis regiões de VP6 e VP7.

5 DISCUSSÃO

O rotavírus é um agente etiológico que acomete mais de 600.000 crianças em todo o mundo, podendo também infectar adultos de por várias vezes durante a vida de forma assintomática ou apresentando sintomatologia grave. As pesquisas sobre a infecção em adultos são escassas, mas poderiam ser relevantes no estudo do papel dos anticorpos pré-existentes no controle da infecção.

Muitos trabalhos experimentais fazem uso do vírus protótipo símio SA-11, sorotipo atenuado correspondente ao G3 humano, por possuir um bom efeito citopático e ser de fácil manipulação (Estes et al., 1979), sendo esse o motivo para sua utilização nesse estudo.

A primeira etapa do trabalho consistiu na preparação dos antígenos virais e controle a partir de cultura de células em garrafas de “Roller”, que comportam um maior número de células, conseqüentemente a produção desses antígenos fica facilitada. O antígeno viral foi produzido a partir de 421 mL de sobrenadante de células infectadas, apresentando rendimento satisfatório para a realização deste trabalho. O antígeno controle foi produzido a partir de 810 mL de sobrenadante de cultura de células não infectadas, seu rendimento inferior ao viral e sua dosagem de proteínas também, necessitando assim de um volume maior para a realização de todas as metodologias propostas.

Com a análise do perfil eletroforético do rotavírus SA-11 por SDS-PAGE pudemos reconhecer bandas com pesos moleculares de aproximadamente 86, 46 e 37 KDa, que são compatíveis com os pesos moleculares das proteínas VP4, VP6 e VP7, consideradas as mais imunogênicas (Parashar et al., 1998) e mais importantes para esse trabalho.

O primeiro passo para a avaliação dos níveis de anticorpos séricos anti-rotavírus pelo teste de ELISA foi a padronização da diluição do conjugado anti-IgG, visto que a concentração de antígeno de sensibilização e a diluição do conjugado anti-IgA já haviam sido feitas previamente (Vieira, 2005). Fixou-se assim a diluição 1:10.000 do conjugado anti-IgG. Estabelecemos também que o título de anticorpos seria descrito como título relativo, que é a porcentagem em relação ao título de um pool de soro, usado em todos os ensaios. Esse pool foi feito com 50 amostras de soro, diferentes daquelas dosadas individualmente. A sua utilização foi necessária

devido à falta de um controle positivo da reação. Ao misturarmos um número elevado de amostras haveria um aumento da chance de positividade contra o rotavírus.

Na pesquisa de anticorpos nas amostras de soro encontramos uma grande variação dos seus títulos que pode ser interpretada como um reflexo do grau de exposição ao vírus e a diferentes sorotipos pela população estudada. Neste trabalho não possuímos o histórico desses doadores visto que essas amostras foram obtidas em banco de sangue, não sendo possível obter informações sobre infecções anteriores.

Após análise estatística não foi observada correlação entre os títulos de anticorpos IgG e IgA, ou seja, altos títulos de uma imunoglobulina não corresponderam a altos ou baixos títulos da outra.

Nos ensaios de neutralização viral com 100 DICT50, foi observado que todas as amostras individuais apresentaram alguma capacidade neutralizante, com títulos variados, onde 52% deles possuem valor superior a 2560, que é o valor mediano encontrado nos nossos resultados. Porém não existe um parâmetro de proteção contra a infecção por rotavírus, como no caso da infecção rábica, onde a WHO recomenda um título de 0,5 IU/mL de anticorpos séricos como sendo um nível protetor (Stantić-Pavlinić, 2006).

Como foi mostrado, estatisticamente não foi possível encontrar uma correlação entre os níveis de anticorpos séricos, tanto de IgA quanto de IgG e título neutralizante. Porém há na literatura trabalhos que demonstram essa correlação. Kapikian et al. (1983) demonstraram uma correlação entre anticorpos séricos e proteção contra diarreia em adultos após desafio com uma cepa de rotavírus D, onde anticorpos neutralizantes foram capazes de minimizar a doença. Mais recentemente (Yuan et al., 2009), foi realizado um estudo com os mesmos soros dos adultos desafiados no trabalho citado anteriormente, complementando a metodologia proposta. Para identificar uma possível correlação entre proteínas virais que geram a resposta heterotípica e homotípica foram utilizados baculovirus que expressam as principais proteínas virais e observaram que a presença de altos títulos de IgG gerados pela resposta homotípica tem um papel importante na resistência à infecção. Outro estudo (Ward et al., 1989) também mostrou essa correlação entre proteção e anticorpos séricos, nesse caso da classe IgG, em adultos desafiados com a cepa CJN. Em crianças essa correlação também foi

encontrada como mostrado por Hjelt et al. (1987) que examinaram níveis pré-existentes de anticorpos anti-rotavirus das classes IgA e IgG em amostras de soro, e observaram que níveis elevados da IgA estavam correlacionados com proteção, pela diminuição da severidade da infecção.

Ward et al. (1986) realizaram um estudo com adultos voluntários para o quais foram dadas diferentes doses de uma preparação viral (cepa CJN) para se determinar o número de partículas infecciosas capazes de causar a infecção e a doença. Esses voluntários já possuíam anticorpos pré-existentes em níveis variáveis para o vírus desafio, fato que foi levado em consideração no estudo ao avaliarem o efeito deste anticorpo na proteção contra a infecção ou doença. Observaram que a dose necessária para causar infecção e doença é pequena e não houve uma correlação entre proteção e títulos altos de anticorpos.

Nos trabalhos citados acima, os voluntários foram desafiados com cepas diferentes em ambientes controlados, ao contrário do presente trabalho onde apenas anticorpos pré-existentes foram avaliados. A falta de correlação encontrada pode indicar que não apenas as imunoglobulinas possuem importância na imunidade. Aliado ao resultado da amostra deficiente de IgA, que possui um título de IgG próximo da média e neutralização baixa, podemos sugerir um possível papel da IgA na neutralização do vírus.

Porém, Istrate et al. (2008) observou que títulos de IgG anti-rotavirus no soro possuíam valores elevados altos, como um mecanismo compensatório pela falta de IgA, contrariando Kuklin et al. (2001) que tinha demonstrado em ratos deficientes de IgA e desafiados com rotavírus, que essa imunoglobulina não é necessária para resolver a infecção.

Anticorpos formados no intestino são os melhores marcadores da imunidade de mucosa, porém sua coleta é difícil e também sua dosagem devido à degradação pelas bactérias da microflora e presença da IgA transmitida pelo leite materno para bebês (Gorrel e Bishop, 1999; Parreño et al., 1999). Para se estabelecer uma relação entre a produção local e a produção sistêmica de anticorpos, Jetborn et al. (1986) examinaram o quanto da resposta dos anticorpos no intestino, contra cólera e *Escherichia coli*, após vacinação ou infecção se refletia no título de anticorpos em outros fluidos. Selecionaram voluntários que haviam tomado a vacina oral contra o cólera e pacientes que tiveram infecção por *E. coli*. Observaram que há uma correlação entre a resposta da mucosa e os títulos de imunoglobulinas no soro.

Coulson et al. (1992) demonstraram em um estudo com crianças de 3 a 39 meses que em infecções subseqüentes a severidade da doença diminui, aliada à presença de anticorpos IgA intestinais que são capazes de proteger contra re-infecção, entretanto sua coleta é difícil e seus resultados podem ser confundidos pela presença da IgA recebida através do leite materno.

Há trabalhos que correlacionam a IgA sérica com proteção. Velazquez et al. (2000) demonstraram num estudo com 200 crianças analisadas desde o nascimento até completarem 2 anos, que a presença da IgA sérica se correlacionava melhor com proteção do que a IgG sérica, sendo essa IgA um bom marcador da proteção contra re-infecção. Observaram também que as crianças estavam melhor protegidas após a segunda infecção, pois seria esta a responsável por induzir títulos maiores de anticorpos protetores.

Apesar de a IgA sérica ser apontada por alguns autores como um marcador de proteção anti-rotavírus, Gonzales et al. (2005) relataram a falta de correlação entre os níveis de IgA em crianças vacinadas com RRV-TV e infecção natural. Este trabalho sugere que a proteção gerada pela IgA pode ser dependente do imunógeno, que em certas ocasiões não compartilha epítomos capazes de mediar a proteção. Mais ainda, a falta de correlação nas crianças vacinadas sugere que a resposta vacinal é diferenciada da resposta natural.

Crianças menores de 18 meses, que estiveram envolvidas em dois surtos, de G1 e G3, durante o período da pesquisa realizada por O’Ryan et al. (1994) apresentaram um grande aumento dos anticorpos IgG e IgA no soro, tanto em infecções sintomáticas como assintomáticas. Observaram também que a resposta gerada numa re-infecção por um mesmo sorotipo gera anticorpos heterotípicos que estão associados com proteção contra a diarreia.

Westerman et al. (2005) demonstraram em um modelo primata não humano que a proteção contra o rotavírus pode ser conferida pela imunização passiva com IgG sérica. Macacos foram imunizados com soro contendo diversas titulações de IgG anti-rotavirus, após essa imunização passiva os macacos foram desafiados com a cepa YK-1 (sorotipo G3P[4]). Observaram que após o desafio, macacos que receberam titulações altas ou médias de IgG passivamente excretaram o vírus em quantidades bem pequenas e por poucos dias, porém aqueles que receberam imunização com baixos títulos excretaram vírus em altas concentrações e por uma

tempo maior duração. Observaram ainda que os níveis de IgG nas fezes dos macacos após a imunização se correlacionava com os títulos dos soros.

A duração dos anticorpos anti-rotavirus em adultos ainda não está bem esclarecida, mas foi demonstrado por McNeal e Ward (1995) que em camundongos recém-nascidos, imunizados com uma cepa murina EDIM os níveis de anticorpos da mucosa e do soro se mantiveram elevados após 14 meses da infecção experimental. Outros trabalhos também demonstram em modelos animais que anticorpos adquiridos após a infecção são protetores e podem durar até um ano na ausência de re-exposição, estando os animais protegidos durante esse período. (Conner e Estes, 1994; Burns et al., 1995)

No presente trabalho, para analisar o reconhecimento de proteínas virais pelos anticorpos séricos, foi necessária a padronização do teste de *Immunoblotting*, para determinação da diluição ótima dos conjugados anti-IgA e anti-IgG.

Observou-se que as bandas reconhecidas pela IgG são mais nítidas e mais numerosas. Begue et al. (1998) utilizando soros de crianças de até 1 ano testados para os sorotipos G1 e G4, detectou por *Immunoblotting* o reconhecimento de proteínas virais pela IgA e IgG, porém essa última apresentou reatividade contra um maior número de proteínas virais e com maior intensidade. Da mesma forma, nos ensaios realizados aqui algumas amostras de soro apresentaram uma banda com peso molecular compatível ao da VP7, que se mostrou mais evidenciado quando utilizado o conjugado anti-IgG, se comparado ao anti-IgA.

Os anticorpos presentes na maioria das amostras testadas reconheceram bandas compatíveis com a proteína VP6. Já foi sugerido que sua presença pode ter um efeito protetor contra a infecção por rotavírus (Burns et al., 1996; Hermann et al., 1996).

Foram identificadas bandas protéicas relacionadas às principais proteínas virais, e que são reconhecidas por proteínas responsáveis pela estimulação da produção de anticorpos neutralizantes. Apesar de algumas bandas protéicas estarem mais evidenciadas pelos anticorpos IgG, outras se apresentam mais evidenciadas pela IgA. Porém não se conseguiu observar um padrão constante entre o isotipo do anticorpo e alguma proteína viral específica.

A detecção de anticorpos capazes de reconhecer antígenos virais é uma ferramenta útil em estudos epidemiológicos e também em estudos de proteção

cruzada. Além disso, abre perspectivas para a avaliação da imunidade de mucosas e para a elucidação dos mecanismos envolvidos na proteção contra o rotavírus.

6 CONCLUSÕES

- Todas as amostras analisadas de soro de adultos saudáveis apresentaram anticorpos anti-rotavirus, sendo que em sua maioria os títulos de IgG são superiores aos da classe IgA.
- Todas as amostras de soro apresentaram capacidade neutralizante frente ao rotavírus SA11.
- Não foi observada correlação entre os títulos de anticorpos anti-rotavirus da classe IgA com os da classe IgG.
- Não foi observada correlação entre os títulos de anticorpos IgA ou IgG anti-rotavirus com o poder neutralizante das amostras. Outros fatores do soro podem estar interferindo nesse processo.
- As diferenças entre os padrões de reconhecimento das proteínas virais pelos anticorpos IgA e IgG de uma mesma amostra sugere que esses dois isotipos podem ser originados por mecanismos independentes.

REFERÊNCIAS*

Anderson EJ, Weber SG. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis.* 2004;4:91-9.

Begue RE, Martin P, Dennehy PH. Serologic responses by immunoblot following natural infection with rotavirus serotypes G1 and G4 in children. *J Med Virol.* 1998;56:52-7.

Bishop R. Discovery of rotavirus: Implications for child health. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24 (3):81–5.

Brandtzaeg P, Prydz H. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulin. *Nature.* 1984;311-71.

Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science.* 1996; 272:104-7.

Burns JW, Krishnaney AA, Vo PT, Rouse V, Anderson LJ, Greenberg HB. Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model. *Virology.* 1995; 207:143-53.

Carmona RC, Timenetsky MC, Morilla SG, Richtzenhain LJ. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996- 2003. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(6):963-8.

Carmona RC, Timenetsky MC, Da Silva FF, Granato CF. Characterization of rotavirus strains of hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in São Paulo, Brazil. *J Med Virol.* 2004; 74(1):166- 72.

Clemens JD, Ward RL, Rao MR, Sack DA, Knowlton DR, Van Loon FPL, Huda S, McNeal M, Ahmed F, Schiff G. Seroepidemiologic evaluation of antibodies to rotavirus as correlates of the risk of clinically significant rotavirus diarrhea in rural Bangladesh. *J Infect Dis.* 1992; 165:161-5.

Conner ME, Estes MK. Determination of the duration of a primary immune response and the ID₅₀ of Ala rabbit rotavirus in rabbits. *Abstr Meeting Am Soc Virol.* 1994;W4-1:161-5.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal. Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 may 22].

Coulson BS, Grimwood K, Hudson IL, Barnes GL, Bishop RF. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol.* 1992;30(7):1678-84.

Cunliffe NA, Bresee JS, Hart AC. Rotavirus Vaccine: Development, current issues and future prospects. *J Infect.* 2002;45:1-9.

Echeverria P, Blacklow NR, Cukor GG, Vibulbandhitkit S, Changchawalit S, Boonthai P. Rotavirus as a cause of severe gastroenteritis in adults. *J Clin Microbiol.* 1983;18(3):663-7.

Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: *Fields Virology*, Philadelphia: Williams & Wilkins, p. 1747-1785, 2001.

Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.* 1989; 53 (4):410-449.

Estes MK, Graham DY, Gerba CP, Smith EM. Simian rotavirus SA-11 replication in cell cultures. *J Virol.* 1979;31 (3):810-5.

Fang ZY, Ye Q, Ho MS, Dong H, Qing S, Perananda ME, Hung T, Wen L, Glass RI. Investigation of an outbreak of adult diarrhea rotavirus in China. *J Infect Dis.* 1989;60(6):948-53.

Fleming FE, Graham KL, Taniguchi K, Takada Y, Coulson BS. Rotavirus neutralizing antibodies inhibit virus binding to integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$. *Arch Virol.* 2007;152(6):1087-101.

Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine.* 2006;24:2718-31.

Franco MA, Greenberg HB. Rotaviruses. In: Richman DD, Hayden FG, Whitley RJ, editors. *Clinical Virology*. 2nd ed. Local: Washington, Editora ASM Press; 2002. p. 743-62

Furst DE. Serum Immunoglobulins and risk of infections: How low can you go? *Semin Arthritis Rheum.* 2008;39(1):18-29.

Glass R. Combate ao rotavirus. *Scientific American Brasil.* 2006;48.

Gómez J, Bercovich A, Alvarez A, Garrido D, Grinctein S. Seroepidemiology of human rotaviruses in a community of the Avellaneda district, province of Buenos Aires. *Rev Argent Microbiol.* 1990;22(4):182-91.

González R, Franco M, Sarmiento L, Romero M, Schael IP. Serum IgA levels induced by rotavirus natural infection, but not following immunization with the RRV-TV vaccine (Rotashield™), correlate with protection. *J Med Virol.* 2005;76:608–12.

Gorrel RJ, Bishop RF. Homotypic and heterotypic serum neutralizing antibody response to rotavirus proteins following natural primary infection and reinfection in children. *J Med Virol.* 1999;57:204-11.

Grumach AS, Jacob CMA, Pastorino AC. Deficiência de IgA: avaliação clínico-laboratorial de 60 pacientes do Instituto da Criança. *Rev Ass Med Brasil.* 1998;44(4):277-82.

Gurgel RQ, Cunliffe NA, Nakagomi O, Cuevas LE. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: A review. *J Clin Virol.* 2008; 43:1-8.

Hermann JE, Chen SC, Fynan EF, Santoto JC, Greenberg HB, Wang S, Robinson HL. Protection against rotavirus infections by DNA vaccination. *J Infect Dis.* 1996;174:93-7.

Hjelt K, Graubaile PC, Paerregaard A, Nielsen OH, Krasilnikoff PA. Protective effect of preexisting rotavirus-specific immunoglobulin A against naturally acquired rotavirus infection in children. *J Med Virol.* 1987;21(1):39-47.

Hjelt K, Graubaile PC, Nielsen OH, Schiøtz PO, Krasilnikoff PA. Rotavirus antibodies in the mother and her breast-fed infant. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1985;4(3):414-20.

Istrate C, Hinkula J, Hammarström L, Svensson L. Individuals with selective IgA deficiency resolve rotavirus disease and develop higher antibody titers (IgG, IgG1) than IgA competent individuals. *J Med Virol.* 2008;80:531–5.

Jetborn M, Svennerholm, AM, Holmgren DJ. Saliva, breast milk and serum antibody responses as indirect measures of intestinal immunity after oral cholera vaccination or natural disease. *J Clin Microbiol.* 1986;24(2):203-9.

Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis.* 2002;34:1351–61.

Johansen K, Svensson L. Neutralization of rotavirus and recognition of immunologically important epitopes on VP4 and VP7 by human IgA. *Arch Virol.* 1997;142(7):1491-8.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Levine MM, Youken RH, VanKirk DH, Dolin R, Greenberg HB, Chanock RM. Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance. *J Infect Dis.* 1983;147(1):95-106.

Kuklin NA, Rott L, Feng N, Conner ME, Wagner N, Muller W, Greenberg HB. Protective intestinal anti-rotavirus B cell immunity is dependent on $\alpha 4\beta 7$ integrin expression but does not require IgA antibody production. *J Immunol.* 2001;166:1894-902.

Li Z, Baker M, Jiang W, Estes MK, Prasad BVV. Rotavirus architecture at subnanometer resolution. *J Virol.* 2009;83(4):1754–66.

Linhares AC. Rotavirus infection in Brazil: Epidemiology, immunity and potential vaccination. *Braz J Infect Dis.* 1997;1(6):284- 93.

Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, Müller G, Peters D. Duovirus (Rotavirus) in Belém, State of Para, Brazil (preliminary report). *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1977;19(4):278-9.

Mascarenhas JD, Leite JD, Gabbay YB, Freitas RB, Oliveira CS, Monteiro TA, Linhares AC. Rotavirus G serotypes and P, G genotypes identified in cases of reinfection among children participating in a trial with rhesus-human reassortant tetravalent vaccine (RRV-TV) in Belém, Brazil. *J Trop Pediatr.* 2002;48(2):93-7.

McNeal MM, Ward RL. Long-term production of rotavirus antibody and protection against reinfection following a single infection of neonatal mice with murine rotavirus. *Virology.* 1995; 211:474-80.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Vigilância epidemiológica ampliada das doenças diarreicas agudas causadas por rotavírus. Documento elaborado pela CGLAB/SVS/SM 2008. Disponível em: <<http://portalsaude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rotavirus.pdf>>. [16 mar. 2010].

Munford V, Gilio AE, Souza EC, Cardoso DM, Cardoso DDP, Borges AMT, Costa PSS, Melgaço IAM, Rosa H, Carvalho PRA, Goldani MZ, Moreira ED, Santa C, Khoury AE, Ikedo F, Rácz, ML. Rotavirus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: A hospital-based surveillance study. *J Infect Dis.* 2009; 200: 106-13.

Muñoz MA, Abarca VK, Luchsinger FV, Valenzuela BT, Jiménez JJ. Declaracion del comité consultivo de inmunizaciones (CCI) de la sociedad Chilena de infectologia respecto a vacuna anti-rotavirus. *Rev Child Infect.* 2006;23(2):124-7.

O’Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J Infect Dis.* 1994;169:504–11.

Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(4):561-70.

Parreño, V.; Hodgins, D.C.; de Arriba, L.; Kang, S.Y.; Yuan, L.; Ward, L.A.; To, T.L.; Saif, L.J. Serum and intestinal isotype antibody responses to Wa human rotavirus in gnotobiotic pigs are modulated by maternal antibodies. *J Gen Virol.* 1999;8(6):1417-28.

Payment P, Trudel M. *Manuel de Techniques Virologiques*. Québec: Presses de l'Université du Québec; 1989. p. 35-44: Concentration des virus.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am J Hyg.* 1938; 27: 493-7.

Robbins JB, Schneerson R, Szu SC. Perspective: Hypothesis: Serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious disease by inactivating the inoculum. *J Infect Dis.* 1995;171:1387-98.

Santos N, Soares CC, Volotão EM, Albuquerque MC, Hoshino Y. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3399-402.

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 2005;14: 14.

Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2):41-52.

São Paulo (Estado). Secretaria da Saúde. ROTAVÍRUS. Documento elaborado pelo Centro de Vigilância Epidemiológica Informe Técnico, 2009. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/IF09_ROTAVIRUS.pdf. [16 mar. 2010].

Souza MB, Racz ML, Leite JP, Soares CM, Martins RM, Munford V, Cardoso DD. Molecular and serological characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiânia, Brazil, 1998- 2000. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22(7):441- 3.

Stantić-Pavlinić M, Hostnik P, Levičnik-Stežinar S, Zaletel-Kragelj L. Vaccination against rabies and protective antibodies -comparison of ELISA and fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) assays. *Veterinarski Arhiv.* 2006;76(4):281-9.

Timenetsky MC, Gouvêa V, Santos N, Alge ME, Kisiellius JJ, Carmona RC. Outbreak of severe gastroenteritis in adults and children associated with type G2 rotavirus. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1996;14(2):71-4.

Trégoat V, Montagne P, Béné MC, Faure G. Increases of IgA milk concentrations correlate with IgA2 increment. *J Clin Lab Anal.* 2001;15:55–8.

Velázquez FR, Matson DO, Guerrero LM, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, Glass RG, Pickering LK, Ruiz-Palacios MG. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis.* 2000;182:1602–8.

Vesikari T, Isolauri E, Delem A, D'Hondt E, André FE, Zissis G. Immunogenicity and safety of live attenuated bovine rotavirus vaccine strain RIT 4237 in adults and young children. *Lancet.* 1983;2:807–11.

Vieira, Patrícia Dore. Padronização de metodologia para pesquisa de anticorpos da classe IgA anti-rotavirus, no leite e colostro humanos. [dissertação (Mestrado)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas - Interunidades em Biotecnologia, 2005.

Vollet 3º JJ, Dupont HL, Pickering LK. Nonenteric sources of rotavirus in acute diarrhea. *J Infect Dis.* 1981;144:495.

Ward RL, Bernstein DI, Shukla R. Effects of antibody to rotavirus on protection of adults challenged with a human rotavirus. *J Infect Dis.* 1989;159:79-80.

Ward RL, Bernstein DI, Young EC, Sherwood JR, Knowlton DR, Schiff GM. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis.* 1986;154:871-80.

Westerman LE, McClure HM, Jiang B, Almond J, Glass RI. Serum IgG mediates mucosal immunity against rotavirus infection. *PNAS.* 2005;102:7268-73.

World Health Organization. State of the art of new vaccines: research and development. Geneva (Switzerland); WHO; 2003.

Wyatt RG, James HDJr, Pittman AL, Hoshino Y, Greenberg HB, Kalica AR, Flores J, Kapikian AZ. Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *J Clin Microbiol.* 1983;18(2):310-317.

Xu J, Dennehy P, Keyserling H, Westerman LE.; Wang Y, Holman RC, Gentsch JR, Glass RI, Jiang B. Serum antibody responses in children with rotavirus diarrhea can serve as proxy for protection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;12(2):273-9.

Yuan L, Honma S, Kim I, Kapikian AZ, Hoshino Y. Resistance to rotavirus infection in adult volunteers challenged with a virulent GP1A[8] virus correlated with serum IgG antibodies to homotypic VP7 and VP4. *J Infect Dis.* 2009; 200(9):1443-51.

Zheng BJ, Chang RX, Ma GZ, Xie JM, Liu XR, Ng MH. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. *J Med Virol.* 1991;34:29–37.

Zingales B. Genes and antigens of parasites, a laboratory manual. 2nd ed. Rio de Janeiro: Ed. C.M.Morel; 1984. p. 357-63: Analysis of protein by sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.