

**Interação do adenovírus humano,
sorotipo 41, com células de origem
hematopoiética:**

análise da permissividade celular e da
expressão gênica viral

MISAELEONARDO SILVA

Dissertação apresentada junto ao
Departamento de Microbiologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Microbiologia

São Paulo

2007

Interação do adenovírus humano, sorotipo 41,
com células de origem hematopoiética:
análise da permissividade celular e da
expressão gênica viral

MISAELEONARDO SILVA

Dissertação apresentada junto ao
Departamento de Microbiologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Microbiologia

Área de concentração: Microbiologia
Orientadora: Charlotte Marianna Harsi

São Paulo
2007

Dedicatória

À minha família,
Meus pais e meus irmãos
Que sempre me apoiaram e
Acreditaram no meu potencial.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS.

À Profa. Dra. Charlotte Marianna Hársi

Pela orientação, pela amizade, pelas discussões sobre variados temas: inclinações políticas, cultura em geral, história da civilização, entre outras que me engrandeceram culturalmente. Para comemorar o desenvolvimento deste trabalho, que tal um mil folhas !!!! rs

À Carolina Dias Papalardo

Por sempre estar do meu lado, me ajudando e me apoiando nessa fase de minha vida.

À Joselma Siqueira Silva

Minha primeira mestre em Virologia. Agradeço por me ensinar tudo o que sabe e me inserir no mundo dos Adenovírus. Obrigado pela amizade e pelo apoio e ajuda em todas as horas de dificuldade.

À Fernanda Perez Yeda

Pela amizade, pelos conselhos, pela sabedoria, afinal irmãos são para essas coisas, rs!.

À Jaila Dias Borges

Pela amizade e pelo apoio incondicional. Suas palavras foram muito importantes para moldar este trabalho, pois me fez refletir muitas vezes sobre o caminho da minha vida profissional e pessoal. Obrigado por me considerar seu amigo. Te prezo muito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de estudo concedida para a realização deste projeto de pesquisa

Não posso deixar de agradecer as meninas do laboratório. Daniela Carvalho, Juliana Marinheiro, Patrícia completamente sem noção, Joselma e Fernanda. Vocês tornam o laboratório mais charmoso e cheiroso. Ainda bem que eu sou o único sultão deste harém, rs!

Gostaria de agradecer a Profa Dra. Dolores Ursula Mehnert por permitir a utilização de seu laboratório para a realização de parte deste trabalho. E como não poderia deixar de esquecer de suas “meninas” Patrícia Garrafa, Karina e Manuela. Obrigado pela amizade e pelos ensinamentos.

Á Dra. Magaly Gemio Teixeira, do Departamento de Gastroenterologia da Universidade de São Paulo, por acreditar e apoiar a realização deste trabalho, fornecendo o material essencial para a finalização desta pesquisa.

Á republica da Abrão Hudler. Como não poderia deixar de agradecer aos momentos descontraídos e de extrema falta do que fazer. Ao lobão, o cão mais gente boa do pedaço, ao Roberto José por ser uma cara muito legal, como ele mesmo diz, ao Rosemberg pela amizade e companheirismo. Não posso deixar de lembrar dos agregados: Thaís, Florinha e Teço pela amizade e pela peixada de toda sexta.

Agradeço a Telma e Veri, as técnicas de nível superior mais charmosas da Virologia, pelos momentos descontraídos do cafezinho de toda tarde.

Ao Sr. Carlos Augusto, pelo empenho e cuidado com o biotério do Departamento de Microbiologia.

Á Mariângela Ferreira Viviani, vulgo sogrona, por ter dado a luz a uma filha tão linda.

Aos funcionários da Secretária do Departamento de Microbiologia.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas, pela competência e dedicação ao trabalho.

Ao pessoal do laboratório do Prof. Dr. Edson Durigon, pelos almoços descontraídos na bandeirão da química.

Ao Prof. Dr. Edson Durigon, por permitir o uso dos equipamentos de seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal do laboratório do Prof Dr. Armando Moraes Ventura: Luis, Tamura, Fernando e Cassiano, por sempre estarem solícitos a ajudar.

Ao pessoal do Prof Dr. Luis Carlos Ferreira, pela ajuda

Aos meus sempre amigos de Sanca: Alessandre, Renata, Fernando, Keila, Gabriela e Poliana, que mesmo de longe ajudaram de alguma forma o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Menck, por permitir o uso do Microscópio de Fluorescência para a realização dos experimentos de IFI.

Aos técnicos do laboratório de citometria de fluxo do Departamento de Imunologia, por me auxiliar no primeiro contato com a técnica.

Ao pessoal do Instituto de Medicina Tropical: Laura, Jaila e todos os outros que sempre estão dispostos a ajudar.

Ao pessoal da Projete Liberdade Capoeira, por ser minha segunda família em São Paulo.

Epígrafe

A revolta contra o mérito é a revolta dos medíocres

(Gilberto Dimenstein)

RESUMO

De acordo com as normas da ABNT

SILVA, M. L. Interação do adenovírus humano, sorotipo 41, com células de origem hematopoiética: análise da permissividade celular e da expressão gênica viral. 2007 128f Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Para verificar a permissividade de células de origem hematopoiéticas à infecção por HAdV-41, foram infectados PBMC e IEL de voluntários. Os ensaios foram comparados com células HEK-293 infectadas. Foram analisadas as expressões dos genes virais E1A, E1B (55K), E3 (14K), VARNA, hexon e fibra curta (FC) e do gene celular GAPDH. O mRNA foi detectado por RT-PCR em tempo real e a produção de proteínas foi visualizada por IFI. Em HEK-293, a transcrição dos genes E1A, E1B e E3 iniciou-se às 11h p.i, hexon, às 13h pi., VARNA e FC às 14h p.i. Em PBMC a transcrição de E1A, E1B e VARNA iniciou-se 17h p.i e a expressão dos genes hexon e fibra curta foi detectada 18h p.i e 20 h p.i. respectivamente. O nível de expressão dos genes virais em HEK-293 foi quase 200 vezes maior em relação à PBMC. Os IELs também mostraram-se permissivos à infecção pelo HAdV-41 como mostrado pela expressão dos genes virais. Essa é a primeira evidência de que este vírus possa infectar tais células. Os resultados obtidos ajudam a elucidar os mecanismos de interação do vírus com a célula-hospedeira e fornecem subsídios para o desenvolvimento de vetores virais, baseados em sorotipos entéricos, para aplicação em terapia gênica direcionada.

Palavras chave: adenovírus, cinética de infecção, permissividade celular, PBMC e linfócitos intraepiteliais (IEL)

ABSTRACT

De acordo com as normas da ABNT

SILVA, M. L. Human adenovirus serotype 41 interaction with hematopoietic cells: cellular permissiveness and viral gene expression analysis. 2007 128f Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

In order to verify the permissiveness of hematopoietic cells to HAdV-41 infection, PBMC and IEL from volunteers were infected. The infection assays were compared with infected HEK-293 cells. We analysed the E1A, E1B (55K), E3 (14K), VARNA, hexon and short fiber (SF) viral gene expression and GAPDH cellular gene expression. The mRNA were detected by real time PCR and the viral protein synthesis were detected by IIF. In HEK-293 cells E1A, E1B and E3 gene expressions were detected 11h p.i Hexon gene expression was detected at 13h p.i, while VARNA and SF gene expressions were detected 14h p.i In PBMC, E1A, E1B and VARNA gene expressions were detected 17h p.i and the hexon and SF gene expression were detected 18h p.i and 20h p.i, respectively. The viral gene expression level in infected HEK-293 cells was 200 fold higher than infected PBMC. The IEL also were permissive to HAdV-41 infection showed by viral gene expressions. This is the first evidence that HAdV-41 is able to infect these cells types. These results help to understand the virus-cell interaction mechanisms and they bring new information to develop adenovirus vector, based in enteric serotypes, to apply in target gene therapy.

Key words: adenovirus, gene expression kinetics, cellular permissiveness, PBMC, intraepithelial lymphocytes

Lista de abreviaturas

% - Porcentagem

μg - Micrograma

μl - Microlitro

μM – Micromolar

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

Ad - adenovirus

ADP - proteínas de morte dos adenovirus (adenovirus death protein)

Adpol- DNA polimerase dos adenovirus

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired immunodeficiency Syndrome*)

APCs – células apresentadoras de antígeno (antigen-presenting cells)

Ca⁺⁺ - Íon Cálcio

CAD - enzima de síntese de pirimidina

CAR – Coxsackie Adenovirus Receptor

CD- Grupo de diferenciação (cluster of differentiation antigens)

CD28 – Molécula que provém sinais co-estimulatórios para a ativação de linfócitos T

CD3 – Marcador genérico de célula T

CD34 – Fator de adesão célula-célula expresso em células de origem hematopoética.

CD4 – Marcador de célula T *helper*

CD46 - Marcador de células nucleadas humanas

CD8 – Marcador de célula T citotóxica

CD80 - Molécula co-estimulatória em linfócitos T humanos

CD86 - Molécula co-estimulatória em linfócitos T humanos

cDNA – DNA complementar

CHO - células de ovário de hamster chinês

CO₂ – Dióxido de Carbono

CsCl – Cloreto de Césio

C_T - *threshold cycle* – ciclo inicial de detecção

CTL - Linfócito T citotóxico (cytotoxic T-lymphocyte)

DAPI - Diaminofenilindol

DBP- proteína de ligação ao DNA dos adenovírus ((Ad) DNA binding protein)

DEPC – Dietilpirocarbonato

DMEM – Meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

DNA – Ácido desoxiribonucléico

dNTP – Desoxinucleotídeos (N=A, C, G ou T) trifosfato

dsRNA – RNA dupla fita

DTT - Ditioneitol

ECP – Efeito citopático

EDTA – Ácido etilendiamina tetracético

FITC - isotiocianato de fluoresceína

g – grama

GALT – Tecido Linfóide Associado à Mucosa

GAPDH -

GPI-glicosilfosfatidilinositol

HAdV – *Human adenovirus*

HCl – Ácido Clorídrico

HEK-293 – Linhagem de célula de rim de embrião humano transformada com a região E1 do HAdV-5

HEPES – Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinil] etanosulfônico

HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida (*Human Immunodeficiency Virus*)

hsP70 - proteína de choque térmico 70

ICTV – Comitê internacional de taxonomia viral

IEL – linfócitos intraepiteliais

IFI – Imunofluorescência indireta

IFN- interferon

Ig- imunoglobulina

IGDD – Isoleucina, Glicina, Asparagina, Asparagina

IgSF- super família das imunoglobulinas

IL- interleucina

ITR- região repetitiva terminal invertida (inverted terminal repeat)

Kb - Kilobase

KCl – Cloreto de potássio

LDV- motivo Leucina, Asparagina e Valina

LTA – Leucemia de células T de adulto

M - Molar

MALT – Sistema imune da mucosa

MAPK- Proteína quinase mitogeno ativada (mitogen-activated protein kinase)

MEM – Meio mínimo de Eagle

mg - miligrama

Mg⁺⁺ - Íon Magnésio

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MHC – Complexo de histocompatibilidade principal

min - minuto

ml – mililitro

MLP- promotor tardio principal (major late promoter)

MLTU- unidade de transcrição tardia principal (major late transcription unit)

mM – Milimolar

MMLV - Virus da leucemia de murinos Moloney (*Moloney murine leukemia virus*)

MOI – Multiplicidade de infecção (*Multiplicity of infection*)

mRNA - Rna mensageiro

NaCl – Cloreto de sódio

NFκB - Fator de transcrição celular kappa B

NK - células matadoras naturais (natural killer cell)

NLS - sinal de localização nuclear (nuclear localization signal)

NPC - complexo do poro nuclear (nuclear pore complex)

°C – Grau Celsius

ORF - região aberta de leitura (open reading-frame)

pb – pares de bases

Pb - penton base

PBMC - células mononucleares do sangue periférico (peripheral blood mononuclear cells)

PBS – Solução salina fosfatada

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

pH – potencial hidrogeniônico

PHA – fitohemaglutinina

PI3K - phosphoinositide-3- kinase

PKA - proteína quinase dependente de cAMP

PKC - proteína quinase C

PKR – Proteína quinase dependente de dsRNA

PML – corpos de leucemia promielocítico

pmoles - picomoles

POD – PML oncogênico

pTP - proteína pré-terminal

RE – retículo endoplasmático

RGD – Arginina, Glicina e Asparagina

RGDA – Arginina, Glicina, Alanina, Asparagina

RID - Receptor de internalização e degradação

RPM – Rotações por Minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

SHAB – Soro humano AB

siRNA – RNA silenciador

SNC – Sistema Nervoso Central

TAE – Tris acetato EDTA

TBE – Tris-HCl/Borato/EDTA

TCR – Receptor de células T

TE – Tris-HCl/EDTA

Th – Linfócito T auxiliares (*Helper T cells*)

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TP- proteína terminal

TRIS – Tris (hidroximetil) aminometano

Tth - *Thermus thermophilus*

U – Unidade

UFF – Unidade Formadora de Foco

USB – Tampão carbonato-bicarbonato

UTP - trifosfato de uracila

UV - Ultravioleta

V - Volts

VA RNA- RNA associado a vírus

VSG – Glicoproteína Variante Específica

x g – unidade de gravidade

Lista de Figuras

	pg
Figura 1 – Relação filogenética dos <i>Adenoviridae</i>	02
Figura 2 – Microscopia eletrônica de adenovírus	05
Figura 3 – Esquema estrutural da partícula adenoviral	06
Figura 4 – Mapa genético dos adenovírus	08
Figura 5 – Organização da região E3 de adenovírus	13
Figura 6 – Esquema da estrutura da fibra dos adenovírus	17
Figura 7 – Inserção da fibra na penton base	23
Figura 8 – Processo de entrada viral	25
Figura 9 –Esquema estrutural do TCR	33
Figura 10 - Métodos de separação e purificação de IEL	41
Figura 11 – Resultados da purificação viral	57
Figura 12 – Resultado da padronização da PCR	58
Figura 13 – Resultado dos alinhamentos	59
Figura 14 – Resultado dos alinhamentos	59
Figura 15 – Resultado dos alinhamentos	59
Figura 16 – Resultado da padronização da PCR genérica	60
Figura 17 – Resultado da padronização da PCR espécie-específico	60
Figura 18 – Resultado da padronização da <i>Nested</i> PCR	60
Figura 19 – Resultado da padronização da PCR em tempo real	61
Figura 20 – Resultados curva padrão	62
Figura 21 – Resultados da separação de IEL	65
Figura 22 – Resultados da detecção de DNA viral, em HEK 293, por PCR	65
Figura 23 – Resultados da padronização da detecção de DNA viral por PCR	66
Figura 24 – Padronização da detecção de DNA viral por PCR em tempo real	67
Figura 25 – Resultados da detecção de DNA viral, em PBMC, por PCR	68
Figura 26 – Detecção de DNA viral, em PBMC, por PCR em tempo real	68
Figura 27 – Resultados da expressão do gene E1A em HEK 293	71
Figura 28 – Resultados da expressão do gene E1B em HEK 293	71
Figura 29 – Resultados da expressão do gene E3 em HEK 293.....	71

	pg
Figura 30 – Resultados da expressão do gene VARNA em HEK 293	71
Figura 31 – Resultados da expressão do gene <i>hexon</i> em HEK 293	71
Figura 32 – Resultados da expressão do gene fibra curta em HEK 293	71
Figura 33 – Cinética de expressão de HAdV-41 em HEK 293	72
Figura 34 – Resultados da expressão do gene E1A em PBMC	74
Figura 35 – Resultados da expressão do gene E1B em PBMC	74
Figura 36 – Resultados da expressão do gene VARNA em PBMC.....	74
Figura 37 – Resultados da expressão do gene <i>hexon</i> em PBMC.....	74
Figura 38 – Resultados da expressão do gene fibra curta em PBMC	74
Figura 39 – Cinética de expressão de HAdV-41 em PBMC	74
Figura 40 – Cinética de expressão de HAdV-41 em IEL-1	75
Figura 41 - Cinética de expressão de HAdV-41 em IEL-2	75
Figura 42 – Mapa gênico dos adenovírus	89
Figura 43 – Temperatura de denaturação dos produtos amplicados por E1A	117
Figura 44 – Temperatura de denaturação dos produtos amplicados por E1B	117
Figura 45 – Temperatura de denaturação dos produtos amplicados por E3	117
Figura 46 – Temperatura de denaturação dos produtos amplicados por VARNA	118
Figura 47 – Temperatura de denaturação dos produtos amplicados por <i>hexon</i>	118
Figura 48 - Temperatura de denaturação dos produtos amplicados por fibra curta	118

Lista de Tabelas

	pg
Tabela 1 – propriedades biológicas dos adenovírus	04
Tabela 2 – Funções das proteínas adenovirais	07
Tabela 3 – Seqüência do par de oligonucleotídeo da PCR genérica para Ads	48
Tabela 4 – Temperatura de anelamento dos pares de oligonucleotídeos para Ads	53
Tabela 5 – Resultados da padronização da PCR em tempo real	62
Tabela 6 – pares de oligonucleotídeos elaborados para cinética de infecção	63
Tabela 7 – Resultado do método de extração de IEL	64
Tabela 8 – Resultados da IFI de PBMC inoculados com HAdV-41	76
Tabela 9 – Média dos CTs de expressão gênica de HAdV-41 em HEK- 293	119
Tabela 10 - Δ CT da cinética de HAdV-41 em HEK -293	120
Tabela 11 - $\Delta\Delta$ CT da cinética de HAdV-41 em HEK -293	121
Tabela 12 - Quantificação relativa da expressão gênica de HAdV-41 em HEK 293	122
Tabela 13 - Média dos CTs de expressão gênica de HAdV-41 em PBMC	123
Tabela 14 - Δ CT da cinética de HAdV-41 em PBMC	124
Tabela 15 - $\Delta\Delta$ CT da cinética de HAdV-41 em PBMC	125
Tabela 16 - Quantificação relativa da expressão gênica de HAdV-41 em PBMC	126
Tabela 17 - Média dos CTs de expressão gênica de HAdV-41 em IEL- 1	127
Tabela 18 - Δ CT da cinética de HAdV-41 em IEL – 1	127
Tabela 19 - $\Delta\Delta$ CT da cinética de HAdV-41 em IEL-1	127
Tabela 20 – Quantificação relativa da expressão gênica de HAdV-41 em IEL-1	127
Tabela 21 – Média dos CTs de expressão gênica de HAdV-41 em IEL-2	127
Tabela 22 – Δ CT da cinética de HAdV-41 em IEL – 2	128
Tabela 23 – $\Delta\Delta$ CT da cinética de HAdV-41 em IEL-2	128
Tabela 24 - Quantificação relativa da expressão gênica de HAdV-41 em IEL-2	128

Sumário

	pg
1. INTRODUÇÃO	
1.1- Os adenovírus	01
1.2- Composição da partícula viral	05
1.3- Organização do genoma	08
1.4- Proteína fibra e seu papel na infectividade.....	16
1.5 – Receptores da fibra de adenovírus	18
1.6- <i>Penton</i> base	22
1.7- Tropismo celular	23
1.8- Biossíntese viral	24
1.9- <i>Human adenovirus F</i>	28
1.10- O receptor das células T (TCR)	30
1.11- O sistema Imune de mucosa	31
1.12- A origem das células T $\gamma\delta$	32
2- JUSTIFICATIVA	34
3- OBJETIVO	35
4- MATERIAL E MÉTODOS	
4.1- Linhagens celulares e condições de cultivo	36
4.2-Ética em experimentação humana	37
4.3- Criopreservação dos tipos celulares	37
4.4- Obtenção de fragmentos de mucosa intestinal	38
4.5- Métodos de separação de IEL	38
4.6- Purificação da cepa padrão	42
4.7- Extração do DNA genômico de HAdV-41	45
4.8- Elaboração de oligonucleotídeos	47
4.9- Reação de PCR.....	47
4.10- <i>Nested</i> PCR	48
4.11- PCR em tempo real	49
4.12- Estimativa do número de cópias de HAdV-41 detectáveis	50
4.13- Ensaio prévio de infecção de linfócitos com HAdV-41	50
4.14- Análise da infecção do HAdV-41 em PBMC e IEL	51
4.15- Quantificação relativa da expressão gênica viral.....	54
4.16- IFI de PBMC infectados	55
5- RESULTADOS	
5.1 – Produção e purificação e titulação de HAdV-41	57
5.2 – Limiar de detecção de HAdV-41	58
5.3 – Estimativa do número de cópias de HAdV-41 detectáveis.....	62
5.4 - Elaboração de oligonucleotídeos.....	63
5.5 – Obtenção de IEL	64
5.6 – Determinação da permissividade de linfócitos com HAdV-41	65
5.7 – IFI de PBMC infectados.....	76
6- DISCUSSÃO	78
7- CONCLUSÕES FINAIS	96
8- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	97
9- ANEXOS	117

INTRODUÇÃO

1.1 OS ADENOVÍRUS

Os adenovírus (Ads) foram, primeiramente, isolados e caracterizados como agentes virais por dois grupos de pesquisadores que estudavam a etiologia de infecções respiratórias agudas. Em 1953, Rowe e colaboradores observaram a degeneração de culturas de células primárias de adenóides humanas, resultante da replicação de um vírus desconhecido presente no tecido. Em 1954, Hilleman e Werner, estudando a epidemia de uma doença respiratória em recrutas americanos, isolaram de secreções respiratórias um agente que induzia alterações citopáticas em culturas de células humanas. Esses vírus foram logo relacionados e inicialmente chamados de agentes da degeneração da adenóide, da infecção respiratória, da doença da adenóide-faringe-conjuntiva ou da doença respiratória aguda. Apenas em 1956, foram denominados adenovírus, devido ao tecido no qual foram descobertos (HORWITZ, 2001).

De acordo com o comitê internacional de taxonomia viral (ITCV- *Internacional on Taxonomy of Viruses*), os Ads constituem a família *Adenoviridae*, a qual pode ser filogeneticamente distinta em quatro gêneros: *Mastadenovirus*, que agrupa vírus de mamíferos; *Aviadenovirus*, que compreende somente vírus de aves; *Siadenovirus*, representado por vírus de aves, de peixes e reptéis e *Atadenovirus*, que agrupa vírus que infectam somente ruminantes e peixes (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTdb). A criação de um novo gênero tem sido discutida, pois as características de um novo adenovírus, isolado em esturjão, não se enquadra em nenhum dos gêneros existentes. Este quinto gênero seria denominado *Fishadenovirus*. No entanto, outros estudos são necessários para que se formalize a criação deste novo gênero (Figura 1) (DAVISON, BENKO e HARRACH, 2003).

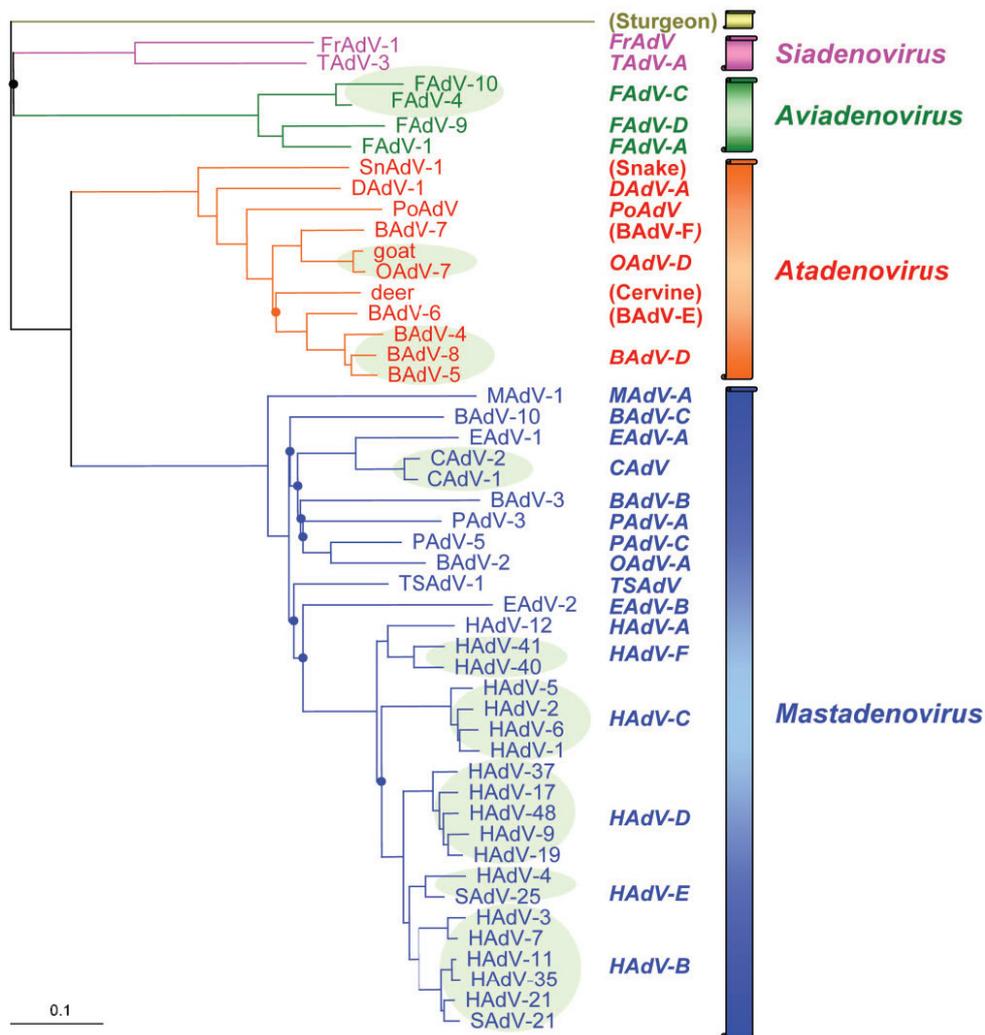


Figura 1. Distância filogenética entre membros da família *Adenoviridae*. Membros de vários gêneros são representados com cores diferentes e vírus que pertencem à mesma espécie são agrupados em círculos ovais. As abreviações dos nomes dos vírus, acrônimos, são indicadas no final de cada ramificação, com o nome da espécie em itálico. A primeira letra indica o animal do qual foi isolado o vírus: B (bovino); C (canino); D (pato); E (eqüino); F (galinha); Fr (rã); H (humano); M (murino); O (ovino); P (suíno); Po (gambá); Sn (cobra); T (peru) e TS (primata primitivo). A distância filogenética foi calculada a partir da seqüência nucleotídica do gene *hexon* disponível no GenBank.

Fonte: DAVISON, BENKO E HARRACH, 2003.

O gênero *Mastadenovirus* é formado por mais de 90 sorotipos, dos quais 51 infectam humanos. Estes estão distribuídos em seis espécies (A a F) definidas com base em características antigênicas, morfológicas e moleculares (TIEMESSEN & KIDD, 1995). Recentemente, foi isolado um novo sorotipo de adenovírus humano (HAdV-52) que não se encaixa nas características de nenhuma espécie até hoje

descrita, sendo sugerida sua classificação em uma nova espécie, G (JONES II et al, 2007).

A designação de uma espécie depende de pelo menos dois dos fatores a seguir: hibridização do DNA, porcentagem de G+C no genoma, oncogenicidade em roedores, hospedeiro, neutralização cruzada, possibilidade de recombinação, número de genes VA RNA, padrão de hemaglutinação e organização genética da região E3 (BENKÖ et al, 1999).

Os sorotipos são determinados em ensaios de neutralização da infecção em cultura celular. São considerados sorotipos distintos aqueles que não apresentarem reações cruzadas com outros sorotipos, ou apresentarem uma razão entre títulos neutralizantes maior que 16. Alguns adenovírus apresentam reações cruzadas, mas nestes casos, a inibição de hemaglutinação e as diferenças no padrão de restrição do DNA podem fazer as distinções (WINGANG e ADRIAN, 1986). Nos ensaios de neutralização, os anticorpos neutralizantes reconhecem epítomos específicos na proteína *hexon*. O determinante *alfa hexon* é comum a todos os Ads do mesmo gênero e é chamado de gênero-específico. O determinante *epsilon hexon* induz a resposta de anticorpos neutralizantes e é chamado de tipo-específico.

Os testes de hemaglutinação revelam a capacidade dos Ads de se adsorver ou não às hemácias. Essa habilidade relaciona-se à capacidade da fibra viral de reconhecer macro-moléculas específicas nas membranas das hemácias e, revela diferenças nas propriedades de adsorção da fibra (WADELL, 2000).

Outro sistema de classificação dos Ads baseia-se na taxa de similaridade e homologia genômica intra e intertípicas. Essa classificação pode revelar relações entre as diferentes espécies, sorotipos e genótipos de Ads e também fornecer mais subsídios para um maior entendimento da biologia viral como: tropismo, patogênese, mecanismos de evasão e dispersão entre outros aspectos (Tabela 1) (ADRIAN et al., 1986).

Os Ads têm a capacidade de infectar uma vasta gama de tipos celulares, inclusive aqueles associados a tecidos altamente diferenciados como: músculo esquelético, pulmão, cérebro, rim e coração (RUSSEL, 2000). No entanto, os Ads apresentam um certo grau de especificidade tecidual. Uma série de síndromes é associada a grupos específicos de Ads. Os sorotipos 2 e 5 da espécie C, por exemplo, são responsáveis por 5-10% das síndromes respiratórias em crianças. Em contrapartida, a espécie F é tipicamente associada com infecções do trato

gastrintestinal, enquanto vários sorotipos da espécie D (HAdV-8, 9 e 37) são associados a ceratoconjuntivite epidêmica (GONÇALVES et al, 2006). Normalmente as infecções adenovirais são autolimitadas, mas recentemente tem aumentado a taxa de casos fatais causados por Ads, devido ao aumento do número de pacientes imuno-comprometidos, em razão da epidemia da AIDS e de indivíduos transplantados (GONÇALVES et al, 2006) (Tabela 1).

Tabela 1: Propriedades fenotípicas e genotípicas dos *Human adenovirus*.

	Espécie A	Espécie B	Espécie C	Espécie D	Espécie E	Espécie F
Sorotipos	12,18,31	3, 7, 11 14, 16, 21, 34, 35, 50.	1, 2, 5, 6	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-47, 51	4	40, 41
Similaridade (%)^a	48-69	89-94	99-100	94-99	4-23	62
G+C (%)	48	51	58	58	58	-
Números Fragmentos Com <i>SmaI</i>	4-5	8-10	10-12	14-18	16-19	9-12
Padrão Hemaglutinante^b	IV	I	III	II	III	IV
Oncogenicidade	Alta	Fraca	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Receptor da fibra^c	CAR	CD 46, CD80 e CD86	CAR VCAM 1 Heparan sulfato	CAR Ácido siálico	CAR	CAR ? ^c
Nº genes VARNA	1	2 (B1) 1 (B2)	2	2	2	1
Nº de ORF em E3	6	9 (B1) 8 (B2)	7	8	9	5
Motivos de ligação da penton-base^d	RGD e LDV	RGD e LDV	RGD e LDV	RGD e LDV (menos 9, 19 e 37)	RGD e LDV	LDV e RGAD
Comprimento da fibra (em motivos repetitivos)	22	6 (B1) 6 (B2)	22	8	12	Longa : 21-22 Curta: 12
Tropismo	Entérico	Respiratório (B1) Renal (B2)	Respiratório	Ocular	Ocular respiratório	Entérico
Síndromes	gastroenterites	Respiratória aguda Infecções renais persistentes	Respiratória aguda	Ceratoconjuntivite Inaparente	Conjuntivite Respiratória aguda	Gastroenterite infantil

a: Porcentagem de homologia entre os subgêneros.

b: I – aglutinação completa em eritrócitos de macaco; II – aglutinação completa em eritrócitos de rato; III – aglutinação parcial em eritrócitos de rato, IV – aglutinação em eritrócitos de ratos após a adição de anti-soro heretotípico.

c: a fibra longa da espécie F se liga ao CAR, mas a fibra curta não tem receptor conhecido.

d: motivos expostos na penton-base através dos quais ocorre o reconhecimento dos receptores secundários, integrinas.

FONTE: Modificado de Segerman, 2004.

1.2- COMPOSIÇÃO DA PARTÍCULA VIRAL

Os adenovírus são vírus de 70 a 90nm de diâmetro, de simetria icosaédrica, não envelopados e com genoma de DNA de fita dupla, contendo em média 36Kb. Sua densidade varia de 1,33 a 1,34 g/cm³, medido em gradiente de cloreto de cério (CsCl). O vírion é constituído de, pelo menos, 11 proteínas (Tabela 2). Sete das quais estão no capsídeo, que é formado por 252 subunidades chamadas capsômeros. Destes, 240 são constituídos pela proteína *hexon*, que formam as faces do icosaedro e os 12 restantes são compostos pelas proteínas *penton*-base e fibra, que formam os vértices (Figura 2) (HORWITZ,2001).

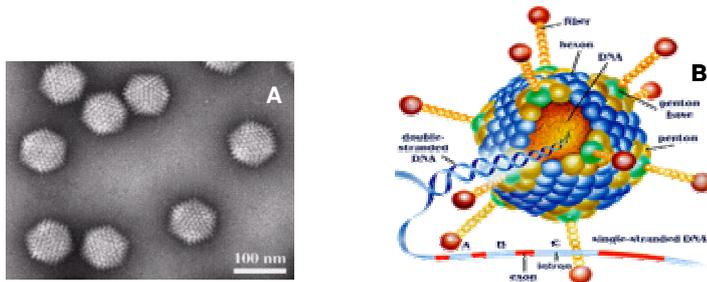


FIGURA 2: (A) - Microscopia eletrônica do HAdV-41 em coloração negativa com molibdato de amônio (FAVIER et al, 2002). (B) - Representação esquemática da partícula do adenovírus humano e localização de suas proteínas .
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Images/index2.htm>)

O capsômero *hexon* é um trímero do polipeptídeo II (pII), unido por ligações covalentes. O capsômero *penton* consiste de duas estruturas distintas: a base, responsável por ancorar o *penton* ao capsídeo, e a fibra, que forma uma estrutura alongada que se estende a partir do vértice da partícula viral. A fibra é um trímero do polipeptídeo IV (pIV), e a base do *penton* é um pentâmero do polipeptídeo III (pIII).

O nome *penton* e *hexon* refere-se à relação geométrica existente na partícula viral entre essas duas proteínas, visto que cada *penton* é rodeado por cinco capsômeros *hexon*, enquanto cada *hexon* é rodeado por outros seis capsômeros *hexons* (HORWITZ, 2001).

As proteínas IIIa, VI, VIII e IX são constituintes do capsídeo e estão associadas ao *hexon*. Estas são importantes na estabilização da estrutura do vírion e no aumento da flexibilidade necessária para o ancoramento da partícula à célula e

o desnudamento durante a infecção viral. (GREBER, 1998; SAN MARTIN E BURNETT, 2003).

A proteína IIIa está presente no vértice do icosaedro onde, junto com o *hexon*, formam faces triangulares que penetram no capsídeo, determinando o formato do vírion. Isto é necessário para que ocorra a montagem correta da partícula viral (STEWART, FULLER e BURNETT, 1993).

A proteína IX é responsável pela estabilização da partícula viral, através da formação de trímeros que se associam ao *hexon*, formando estruturas nonoméricas mais estáveis (FURCINITTI, VAN OOSTRUM e BURNETT, 1989). Essas unidades formam as faces triangulares do icosaedro (Figura 3)

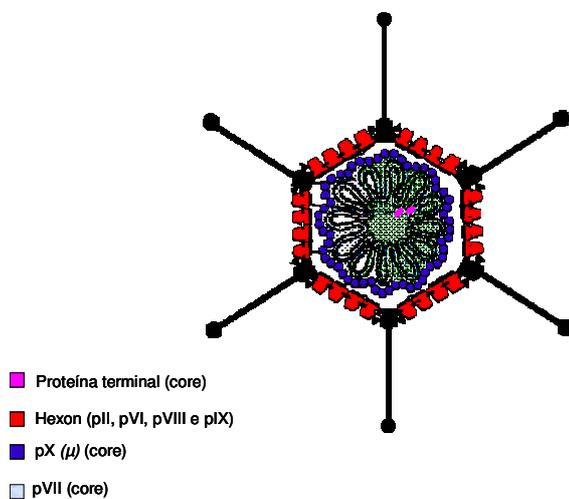


Figura 3: Figura esquemática do vírion de adenovírus, mostrando a posição de cada proteína estrutural na composição da partícula viral.

As proteínas VI e VIII estão associadas com a superfície interna do capsídeo. A proteína VI forma um anel ao redor de 5 *hexons* e mantém contato com o core (STEWART, FULLER E BURNETT, 1993; SAN MARTIN E BURNETT, 2003).

O core é composto pela molécula de DNA, associada às proteínas V, VII, X e à proteína terminal (TP) covalentemente ligada à terminação 5' do genoma.

A proteína X é clivada na proteína μ , a qual está presente somente em partículas maduras. As proteínas V, VII e μ são proteínas básicas de ligação ao DNA que são importantes para o empacotamento e posicionamento correto da molécula de DNA dentro do capsídeo.

A proteína VII é a principal proteína do core, onde se encontram mais de 800 cópias da proteína por partícula. Ela é responsável pela compactação e organização do DNA viral dentro do capsídeo.

A proteína V está presente com aproximadamente 160 cópias por vírion. Forma um complexo com o DNA viral e provém a ligação estrutural entre o capsídeo e o genoma viral através da interação com as proteínas *penton* base (pIII) e pVI, onde ancora o core ao vértice do capsídeo (SAN MARTIN E BURNETT, 2003; MATHEWS E RUSSEL, 1995).

Tabela 2: Proteínas estruturais do adenovírus e suas respectivas localizações e funções na partícula.

Proteína	Localização	Funções conhecidas
II	Monômero do <i>hexon</i>	Majoritária no capsídeo (estrutural)
III	Base do <i>penton</i>	Penetração
IIIa	Associada à base do <i>penton</i>	Penetração
IV	Fibra	Ligação ao receptor, hemaglutinação
V	Core: associado ao DNA e à base do <i>penton</i>	Histona-like, empacotamento?
VI	Peptídeo associado ao <i>hexon</i>	Estabilização, montagem de partícula?
VII	Core	Histona-like
VIII	Peptídeo associado ao <i>hexon</i>	Estabilização, montagem da partícula?
IX	Peptídeo associado ao <i>hexon</i>	Estabilização, montagem da partícula?
X (μ)	Core	Desconhecida
TP	Genoma	Replicação do DNA

Além dessas proteínas estruturais, a pVIa2 e a protease 23K também são encontradas associadas com partículas de vírus maduras (GREBER et al, 1996; WINTER E D'HALLUIN, 1991). Esta protease é necessária no processamento de algumas proteínas estruturais no processo de entrada do vírus na célula (WEBER, 1976; WEBSTER et al, 1989).

A priori, apenas três proteínas do capsídeo são expostas ao ambiente: o *hexon*, a *penton base* e a fibra. Juntas, essas proteínas constituem a interface adenovírus-ambiente, as quais mediam a interação e/ou comunicação dos adenovírus com o hospedeiro durante os passos iniciais da infecção. E por consequência, elas também são alvos dos anticorpos neutralizantes.

1.3- ORGANIZAÇÃO DO GENOMA

Junto com os poliomavírus, papilomavírus e parvovírus, os adenovírus são classificados dentro da família de vírus pequenos de DNA, com genoma de dupla fita linear, tamanho entre 34 a 36 Kb e aproximadamente 40 proteínas (HORWITZ, 2000).

Os genomas, dos sorotipos representativos de todas as espécies de adenovírus, já foram seqüenciados: Ad12 (SPRENGEL et al, 1994), Ad7 (AC AY495969), Ad11 (MEI et al, 2003; STONE et al, 2003), Ad35 (GAO et al, 2003; VOGELS et al, 2003); Ad2 (ROBERTS, 1985), Ad5 (CHROBOCZEK et al, 1992), Ad17 (CHILLON et al, 1999) e Ad40 (DAVISON et al, 1993). O estudo desses genomas mostra que os adenovírus apresentam uma organização gênica similar, onde são identificadas oito unidades de transcrição dependentes da RNA polimerase II (E1A, E1B, E2, E3, E4, pIX, pIVa e a unidade de transcrição tardia principal (MLTU)) e 1 ou 2 pequenos RNAs dupla fita não traduzidos (VA RNA), transcritos pela RNA polimerase III (Kidd et al, 1995) (Figura 4).

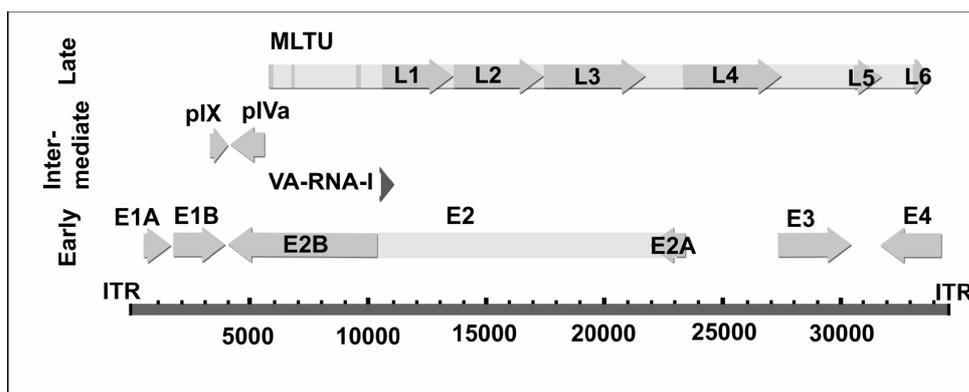


Figure 4: Organização do genoma de adenovírus sorotipo 11

FONTE: MEI et al., 2003.

A expressão dessas diferentes unidades é sincronizada, e pode ser dividida nas fases de expressão precoce, intermediária e tardia. A fase precoce é caracterizada pela expressão dos genes modulam as funções celulares, facilitando a replicação do DNA e a transcrição dos genes tardios. Esta fase dura aproximadamente 6-8h em células permissivas, enquanto a fase tardia é normalmente mais rápida ocorrendo em torno de 4-6h (RUSSEL, 2000).

1.3.1- Regiões de expressão precoce

Existem cinco unidades de transcrição precoce, localizadas em ambas as fitas de DNA do genoma: E1A, E1B, E2, E3 e E4. Sua organização e expressão temporal evitam que sejam formados mRNAs complementares durante a fase precoce da infecção. A formação desses mRNAs complementares podem levar a formação de dsRNA, que são reconhecidos pela PKR (proteína quinase dependente de dsRNA) e RNase L que ativam o sistema de defesa induzida por IFN, levando a célula a um “estado anti-viral”. O primeiro transcrito (L1) da unidade principal de transcrição tardia (MLTU) e RNA associado a vírus (VA RNA) também tem sua expressão iniciada na fase precoce (SEGERMAN, 2004).

A expressão dos genes precoces dos Ads inicia-se com a transcrição de E1A que estimula a transcrição de outras regiões como E1B e VARNA (BERK et al., 1979; JONES E SHENK, 1979).

As unidades precoces de transcrição codificam mais de 20 proteínas regulatórias do metabolismo celular e viral. Essas proteínas garantem um ambiente favorável para a transcrição dos genes tardios e a posterior formação de novos vírions. Em células permissivas, cada vírus é capaz de gerar 10^5 novos vírions (SEGERMAN, MEI E WADELL, 2000).

1.3.1.1- E1A

E1A codifica duas proteínas: E1A-289R e E1A-243R. Essas proteínas possuem 2 a 3 domínios que são altamente conservados em todos os adenovírus humanos (BROCKMANN E ESCHE, 2003).

O início da expressão de E1A é induzido por fatores de transcrição celulares (Kirch et al, 1993) como o E2F (KOVESDI, REICHEL E NEVINS, 1987), mas outras interações DNA-proteína, presentes em extrato de células HeLa infectadas, também já foram identificadas (YOSHIDA, NARITA E FUJINAGA, 1989).

Ao ativar a expressão de E1A, seus produtos são capazes de aumentar a expressão de E2F, em um mecanismo de auto-alimentação. Assim, E1A é capaz de transativar uma variedade de genes celulares que possuem sítios de ligação para E2F, como o *N-myc* e DHFR (Dihidrofolato redutase) (HIEBERT et al., 1991). Além desses, E1A é capaz de ativar os promotores dos genes celulares que expressam as proteínas do choque térmico 70 (hsP70) e β globulina (KIRCH et al, 1993; KOVESDI,

REICHEL E NEVINS, 1987). Entretanto, E1A também é capaz de inibir a transcrição de outros genes celulares (ZHAO et al, 2003).

No início da infecção E1A induz a célula a entrar na fase S do ciclo celular, e por isso é, por muitos (NEVELS, DOBNER, 2007; TAKAHASHI et al, 2007; CAO et al, 2007; BALUCHAMY et al, 2007; JENNINGS-GEE et al, 2006), considerado um oncogene. Para isso, E1A interage com proteínas da família pRB, que liberam E2F, que por sua vez, promove a entrada da célula na fase S (HIEBERT et al., 1991; SIDLE et al., 1996). Em resumo, proteínas codificadas por E1A têm duas funções principais: ativar o ciclo replicativo do vírus e criar um ambiente celular permissivo para a síntese de DNA e a replicação viral, através do direcionamento da célula à fase S do ciclo celular.

1.3.1.2- E1B

A região E1B codifica duas proteínas: 19K e 55K que têm a capacidade de bloquear a apoptose de forma distinta. A proteína 55K inibe a apoptose mediada por p53, ligando e seqüestrando p56 no citoplasma (ZHAO E LIAO, 2003). A proteína p53 é um supressor tumoral que regula a transcrição de uma variedade de genes envolvidos no ciclo celular e na apoptose. Em células normais, p53 está presente em pequenas quantidades, mas seu nível aumenta em resposta a genotóxicos e outros fatores de estresse celular (Russel, 2000).

Para inibir a apoptose, 55K junto com E4ORF6 formam um complexo que promove a degradação de p53 nos proteossomos (HARADA et al, 2002). A proteína 19K é um análogo funcional do Bcl-2 (CHIOU et al,1994). Este é um potente inibidor da apoptose induzida por estímulos variados como: Fas, (HASHIMOTO, ISHII, E YONEHARA, 1991), fator de necrose tumoral (TNF- α) (GOODING et al.,1991; HASHIMOTO, ISHII, E YONEHARA, 1991) e apoptose dependente de p-53 (CHIOU, RAO, WHITE, 1994) (WHITE et al., 1994).

Ambas as proteínas de E1B são requeridas para conter o programa de apoptose ativado pelas proteínas de E1A e E4. Os vírus que não contêm E1B só podem replicar-se em células transformadas.

1.3.1.3- E2

A região E2 codifica 3 proteínas necessárias para a replicação do DNA viral: a DNA polimerase (Adpol), a proteína pré-terminal (pTP) e a proteína de ligação ao DNA (DBP) (LIU, NAISMITH E HAY, 2003).

A Adpol é uma das proteínas mais bem conservada em todos os adenovírus (IKEDA, ENOMOTO, E URWITZ, 1981) e pertence à família Pol (DNA polimerases que tem atividade 3'-5' exonuclease) (FIELD, GRONOSTAJSKI, E HURWITZ, 1984).

A DBP é uma proteína ATP independente de alta afinidade por ssDNA (DNA fita simples). Possui a função de desestabilizar a estrutura de hélice do DNA, para permitir a elongação e a replicação do DNA (LIU, NAISMITH, E HAY, 2003).

A pTP se liga ao DNA viral, através de uma seqüência-específica de ligação, onde atua como origem de replicação. Esta forma um heterodímero com a Adpol, necessário para o início da replicação do DNA viral (ROOVERS et al., 1993; WEBSTER, LEITH, E HAY, 1994). O processamento de pTP pela protease 23K, origina a proteína terminal (TP), que se liga covalentemente às ambas terminações 5' do genoma dos adenovírus. Isto provavelmente protege DNA viral de exonucleases, previne efeito inibitório das proteínas *end-binding* como a NFIV/Ku (de VRIES et al., 1989) e media a ligação do DNA viral à matrix nuclear (SCHAACK et al., 1990).

1.3.1.4 – E3

Dependendo da espécie do adenovírus, a região E3 pode codificar 5-9 polipeptídeos, que possuem funções imunorregulatórias (Figura 5). Essa região não é necessária para a replicação do vírus *in vitro*, razão pela qual, muitos dos vetores adenovirais têm essa região deletada (LICHTENSTEIN et al, 2004; WINDHEIM, HILGENDORF E BURGERT, 2004). Com exceção das proteínas 14.7K, 12.5K e 4-6.3K, todas as outras proteínas codificadas pela região E3 possuem domínios transmembranas (WINDHEIM, HILGENDORF E BURGERT, 2004).

Algumas proteínas de E3 possuem características funcionais conservadas em todos os Ads como: 10.4K, 14.5K e 14.7K. No entanto, outras proteínas estão presentes somente em algumas espécies, por exemplo, a 12.5K e 19K são encontradas na espécie B-E, mas não na espécie F (Figura 5).

Muitas das proteínas de E3 possuem funções sobrepostas ou suplementares. A proteína 14.7K protege as células da morte celular mediada por TNF α e FasL

(PERSSON, OBERG E PHILIPSON, 1978; TOLLEFSON E WOLD, 1988; WANG, SCOTT E RICCIARDI, 1988). As proteínas 10.4K e 14.4K formam um complexo chamado RID (*receptor internalization and degradation*) que induz a internalização e degradação dos receptores de morte celular situados na membrana plasmática, tais como: Fas, TRAIL-R1 e R2, impedindo assim a ligação de seus ligantes (TOLLEFSON et al, 1990). As espécies B, D e E codificam proteínas relacionadas ao RID de 16K, 22K e 23K, no entanto suas funções ainda precisam ser estudadas.

A glicoproteína 19K (gp19K) liga-se e retém MHC-I no RE, interrompendo a exposição de peptídeos virais na superfície celular e conseqüentemente o reconhecimento e lise de células infectadas pelos linfócitos T citotóxicos (PERSSON, JORNVALL E ZABIELSKI, 1980).

A proteína 11.6K ou ADP (*adenovirus death protein*) é a única proteína de E3 que é predominantemente tardia, sendo expressa principalmente pela ação do MLP (*major late promoter*) (TOLLEFSON et al 1992). ADP induz a lise celular e é necessária para a dispersão viral *in vivo* (TOLLEFSON et al., 1996a; TOLLEFSON et al., 1996b).

A transcrição de E3 pode ser ativada por NF- κ B, pois os Ads possuem um sítio de ligação de NF- κ B bem conservado em todos os Ads. Onde, quando e como NF- κ B media a transcrição adenoviral precisa ser melhor determinado.

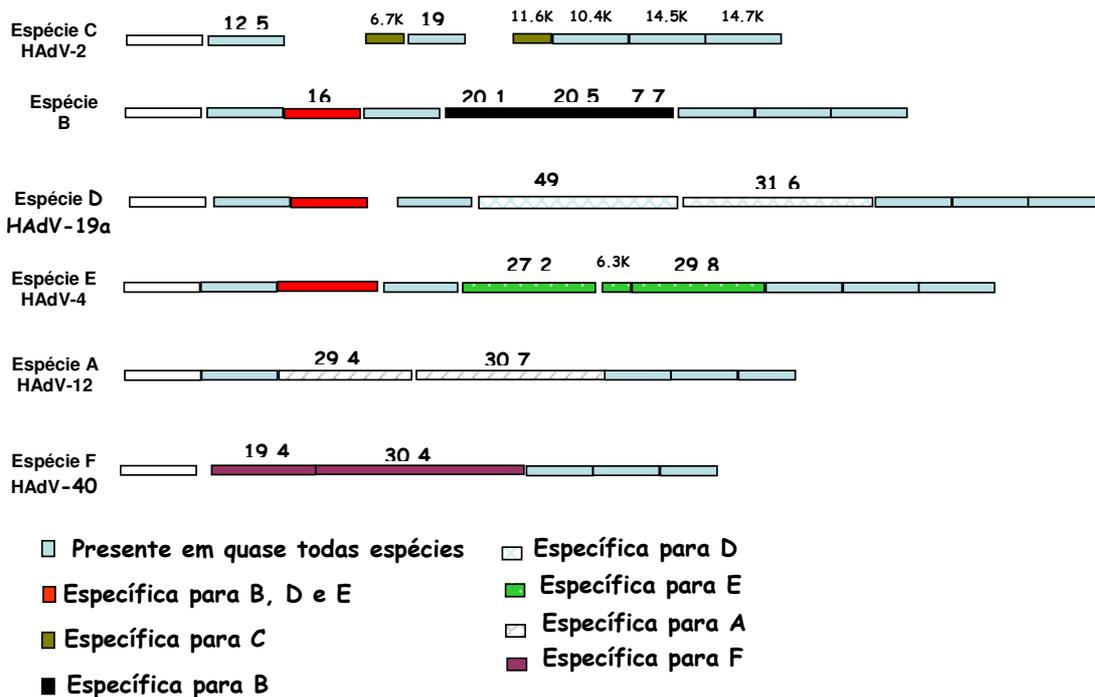


Figura 5: Organização da região E3 de diversas espécies de adenovírus humanos

1.3.1.5- E4

A região E4 é altamente conservada e possui similaridade organizacional em todos os Ads. Isso é um indício de que suas proteínas devem ser funcionalmente conservadas. A região E4 produz no mínimo 6 polipeptídeos, denominados de acordo com sua ORF (*open reading frame*) correspondente ORF 1-6/7. Somente a deleção das ORF3/6 produz uma multiplicação defectiva em cultura celular (BRIDGE E KETNER, 1989; HUANG E HEARING 1989) e conseqüentemente são as mais estudadas.

As ORFs 3 e 6 formam um complexo com a E1B-55K e aumentam a taxa de replicação do DNA viral e a síntese de proteínas virais tardias (LEPPARD E EVERETT, 1999). Inicialmente, ORF3-E1B-55K associa-se com diferentes subestruturas da matrix nuclear, tais como: corpos da leucemia promielocítico (PML), domínios PML-oncogênicos (PODs) ou ND10, onde mediam a sua reorganização e/ou interrupção (DOUCAS et al 1996, LEPPARD E EVERETT, 1999). Essa

atividade da ORF3 está relacionada ao aumento da replicação do DNA (EVANS E HEARING, 2003).

A ORF6/E1B-55K também aumenta a expressão dos genes tardios e desliga seletivamente a expressão celular, facilitando a exportação nuclear dos mRNAs virais, enquanto simultaneamente inibe a exportação da maioria dos transcritos celulares (FLINT E GONZALEZ, 2003). Esse complexo também desestabiliza a p53 (ROTH E DOBBELSTEIN 2003; ROTH et al,1998).

As proteínas das ORF3 e 6 também inibem a atividade da proteína quinase DNA dependente (DNA-PK), que é essencial para o sistema de reparo de DNA (NICOLAS et al, 2000) e parece que essa função é importante para evitar a concatenação do DNA viral durante a replicação (EVANS, 2003; WEIDEN E GINSBERG, 1994).

O papel das ORFs1-2 permanece desconhecido. A ORF 4 parece inibir a transdução de sinal genes virais e celulares (KLEINBERGER E SHENK, 1993; MANNERVIK et al., 1999) e também induz a apoptose p53 independente, principalmente em células transformadas (KLEINBERGER, 2000).

1.3.1.6- RNAS ASSOCIADOS AOS VÍRUS (VA RNA)

Os VA RNAs são pequenos RNAs transcritos pela RNA polimerase III que formam estruturas dsRNA (KIDD, GARWICZ, E OBERG, 1995). Eles se ligam a PKR, de forma tão intensa que criam um efeito abortivo do mecanismo de defesa antiviral induzido por IFN (KATZE et al., 1987; KITAJEWSKI et al., 1986).

Ao se ligar a PKR, os dsRNAs ativam a enzima Dicer (RNase III dsRNA específica) que os cliva em pequenos ssRNA, chamados RNA silenciadores ou siRNA. Esses siRNAs se ligam ao RISC (*RNA induced silence complex*) que cliva RNAs complementares ao siRNA. Dessa forma, qualquer dsRNA formado no citoplasma terá seus RNAs complementares destruídos. No entanto, os VA RNA são produzidos em quantidade suficiente para sobrecarregar o sistema de defesa via PKR e dessa forma, os VA RNA impedem que haja a degradação do mRNA virais, permitindo que ocorra uma tradução eficiente nas células dos mRNA virais tardios (THIMMAPAYA et al., 1982).

As espécies A, F e B2 possuem apenas um gene VA RNA, enquanto as espécie B1, C, D e E possuem dois (KIDD,GARWICZ, E OBERG, 1995). VARNA 1 está presente em todas as espécies e tem sua função bem estabelecida, como

descrito acima. No entanto, VARNA2 não tem sua função bem estabelecida e a importância e relevância de possuir um ou dois genes VA RNA precisa ser melhor estudada.

1.3.2- Região de transcrição intermediária

Os genes intermediários são expressos imediatamente após a replicação do DNA e antes do início da expressão dos genes tardios. Essa região expressa 2 proteínas multifuncionais (pIX e pIVa2) transcritas por promotores independentes (BINGER E FLINT, 1984).

1.3.2.1- pIX

Além de seu papel estrutural no capsídeo, a proteína IX auxilia no empacotamento do DNA viral (GHOSH-CHOUDHURY, HAJ-AHMAD E GRAHAM, 1987). Esta também contribui na reorganização nuclear celular e media o seqüestro da proteína PML dentro de inclusões nucleares, provavelmente para facilitar a proliferação viral (ROSA-CALATRAVA et al, 2003).

1.3.2.2- pIVa2

A proteína IVa2 é conhecida por ter propriedades transativadoras para MLP (TRIBOULEY et al, 1994). A pIVa2 parece ser necessária para o início da montagem viral, pois partículas defectivas vazias ou incompletas podem ser isoladas de células infectadas com Ad *knock out* para gene *pIVa2*, embora as proteínas tardias tenham sido expressas (ZHANG E IMPERIALE, 2003).

1.3.3- Região de transcrição tardia

A unidade de transcrição tardia é controlada pela MLP. Ocupa aproximadamente 40% do genoma do vírus e codifica todas as proteínas estruturais, menos a pIX, e mais quatro proteínas auxiliares (52/55K, 23K, 100K e 33K) que são importantes para uma montagem correta, encapsidação e maturação dos vírions. A MLP transcreve um único transcrito, o MLTU (*major late transcript unit*). Este recebe de 5 a 6 diferentes sítios de poliadenilação e em combinação com *splicing* alternativo, gera 5 ou 6 famílias de mRNA (L1-L5 ou L6) (MEI et al, 2003; YOUNG, 2003).

A expressão do MLTU é induzida logo após a replicação do DNA viral, mas a transição da expressão dos genes precoces e tardios é um processo complexo e em células permissivas o início da fase tardia ocorre 14 p.i. (BINGER E FLINT 1984).

A ativação da MLP parece requerer fatores de transativação *cis* e *trans* (Young, 2003) como, por exemplo, as proteínas pIVa2 e pIX (BINGER E FLINT 1984). Isto foi demonstrado em estudos envolvendo superinfecção de células permissivas, com sorotipos distintos em combinação com fatores que inibem a síntese de DNA. Este trabalho mostrou que a expressão dos genes tardios somente foi detectável depois que a síntese de DNA viral tivesse ocorrido e que o acúmulo de produtos dos genes precoces não foi suficiente para ativar a MLP. Isto indica que esta regulação, provavelmente é exercida em nível transcricional, em detrimento ao controle de processamento ou estabilização seletiva do mRNA tardio (Thomas e Mathews, 1980). Entretanto, a replicação do DNA não precisa estar completa para iniciar a expressão dos genes tardios e se a replicação do DNA for interrompida a expressão desses genes pode continuar (Carter e Ginsberg, 1976).

Além do mais, uma alta expressão das proteínas pIVa2 e pIX parece ser necessária para a replicação do DNA (Binger e Flint, 1984). Curiosamente, um inibidor celular (IVa2-RF) (Chen, Vinnakota e Flint, 1984) parece controlar a transcrição do promotor de pIVa2 (Huang et al, 2003). Porém, como o número de cópias de DNA aumenta, depois do início da replicação, seu efeito inibidor tende a diminuir (Lin e Flint, 2000). O mecanismo de regulação da expressão de pIX precisa ser elucidado.

O processo de replicação do DNA viral parece necessitar de mudanças estruturais *cis*-atuantes no *template* de DNA e a expressão dos transativadores MLP, pIVa2 e pIX. Esse modelo ajuda explicar como os adenovírus conseguem sincronizar a replicação do genoma com a transcrição MLP-direcionada (Young, 2003). Ademais, fatores *trans*-atuantes também parecem estar envolvidos na transição transcricional precoce-tardia, entretanto, outros trabalhos indicam o papel da proteína 33K e uma proteína de L4 (ainda não definida), neste processo (Farley, Brown e Leppard, 2004).

1.4- A PROTEÍNA FIBRA E SEU PAPEL NA INFECTIVIDADE

A fibra é um trímero estável da proteína IV e é subdividida em três regiões: porção globular (*knob*), haste e cauda (Figura 6).

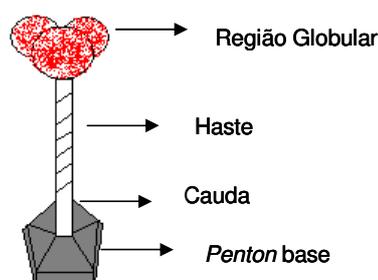


Figura 6: Figura esquemática da estrutura da fibra dos adenovírus

A infecção adenoviral é iniciada pela adsorção do vírion à célula através da porção globular da fibra (PHILIPSON, LONBERG-HOLM E PETTERSSON, 1968) e a ligação do vírion à célula pode ser, eficientemente, inibida por competição com outras fibras recombinantes (MEI, LINDMAN E WADELL, 2002; SEGERMAN et al, 2003). A importância de uma interação de alta afinidade entre a região globular da fibra e o receptor celular, para a infectividade viral, pode ser ilustrada pelo fato de que mudanças na fibra incapacitam a infecção e/ou transfecção em células previamente permissivas (HAVENGA et al, 2002, REA et al, 2001, SHAYAKHMETOV et al, 2000), e partículas sem fibras têm sua infectividade drasticamente reduzida (LEGRAND et al, 1999; VON SEGGERN et al, 1999).

A fibra sofre grande pressão seletiva, devido a sua importância na determinação do tropismo viral, e a troca de fibras é um dos eventos naturais mais comuns de recombinação entre Ads, indicando que este é um fato benéfico na emergência de novas cepas (DE JONG et al, 1983; FLOMENBERG et al, 1987; HATCH E SIEM, 1966; KAJON et al, 1996; MATUMOTO, UCHIDA E HOSHIKA, 1958).

A região da haste possui unidades, de aproximadamente 15 aminoácidos, que se repetem ao longo da haste da fibra. O número dessas unidades varia dependendo da espécie, originando Ads com fibras de tamanhos diferentes. O tamanho da haste parece ter sido otimamente selecionado pelo ambiente. Estudos com HAdV-5 e vetores baseados em HAdV-5, com diferentes tamanhos de haste, indicaram que o seu tamanho pode influenciar na infectividade viral, nas etapas de adsorção e em alguns casos em passos pós internalização como desnudamento e lise do endossomo (AMBRIOVIC-RISTOV, MERCIER E ELIOT, 2003; SEKI et al, 2002; SHAYAKHMETOV E LIEBER, 2000).

A região da cauda é conservada em todas as espécies de adenovírus humanos e tem a função de ancorar a fibra à *penton* base do capsídeo.

Estudos de partículas virais desprovidas de fibras mostram que além do papel no início da infecção, a fibra pode ter uma função biológica adicional durante a maturação de várias proteínas estruturais (LEGRAND et al, 1999). A fibra produzida em excesso, durante a replicação viral, é exportada complexada com a *penton*-base (TROTMAN et al, 2003). Esse mecanismo, aparentemente, facilita a liberação dos Ads C no trato respiratório, ao permitir que as junções do epitélio pulmonar sejam rompidas pela interação da fibra com receptores e proteínas da matriz celular (WALTERS et al, 2002).

1.5- RECEPTORES DA FIBRA DOS ADENOVÍRUS

1.5.1- CAR

Desde o início da década de 70, já era sabido que os Coxsackievirus e os Ads competiam pelo mesmo receptor (LONBERG-HOLM, CROWELL E PHILIPSON, 1976). No entanto, apenas em 1997 foi identificada uma proteína reconhecida por ambos os vírus. Essa proteína de 40kDa foi denominada CAR (receptor para adenovírus e coxsackievirus) e pertence à categoria das proteínas transmembranas tipo I e à superfamília das imunoglobulinas (BERGELSON et al, 1997; TOMKO, XU E PHILIPSON, 1997). Posteriormente, verificou-se que a proteína CAR possuía 2 ectodomínios distintos, D1 e D2, e que os Ads interagem com D1 enquanto os Coxsackievirus interagem com D2 (RUSSEL, 2000).

Porém, até recentemente, nada se sabia sobre a função de CAR na célula. Em 2001, sua presença foi detectada nas *tight junction*, onde teria a função de manter a integridade juncional do epitélio (COHEN et al, 2001).

Os sorotipos mais representativos de todas as espécies de Ads humanos, exceto a espécie B, se ligam à proteína CAR solúvel (ROELVINK et al, 1998) e os Ads C usam CAR como receptor funcional *in vivo* (HUTCHIN, PICKLES E YARDBROUGH, 2000; TALLONE et al, 2001; WALTERS et al, 2001), porém as diferentes espécies de Ads que se ligam a CAR o fazem com diferentes graus de afinidade (ROELVINK et al, 1998).

CAR é principalmente expressa em linhagens epiteliais. É detectada no fígado, rim, pulmão, cérebro, coração, cólon, intestino grosso, testículo, próstata e pâncreas, mas não em músculo esquelético, baço, ovário, timo ou placenta. Sua expressão também é detectada em células hematopoiéticas, porém em baixos níveis (PHILIPSON E PETTERSON, 2004). Dentre as células de medula óssea humana,

40% de células não linfóides e 15% de células CD34+ parecem expressar CAR e podem ser infectadas por alguns Ads (NILSSON, KARLSSON E FAN, 2004; REBEL et al, 2000). Os monócitos também são parcialmente susceptíveis à infecção por Ads C (HUANG et al, 1997). No entanto, as células linfóides que expressam baixos níveis de CAR são, ineficientemente infectados por Ads C (CHE et al, 2002; HORVATH E WEBER, 1988; HUANG, ENDO E NEMEROW, 1995; MENDEL et al, 1997; REBEL et al, 2000; SILVER E ANDERSON, 1988.).

Estudos feitos com linhagens celulares de diversas origens mostraram que a suscetibilidade à infecção por Ads C é correlacionada com uma alta expressão de CAR (ASAOKA et al, 2000; FECHNER et al, 2000; HEMMI et al, 1998). No entanto, alguns Ads com fibras defectivas e que se ligam ineficientemente à CAR são capazes de infectar células do trato respiratório intacto (GRUBB et al, 1994; PICKLES et al, 1998; WALTERS et al, 1999; ZABNER et al, 1997). Algumas questões relacionadas à interação CAR-Ads ainda precisam ser esclarecidas

O principal obstáculo à infecção parece ser a expressão basolateral de CAR em células epiteliais polarizadas, onde, teoricamente, o receptor celular estaria inacessível ao vírus no lúmen (HUTCHIN, PICKLES E YARBROUGH, 2000; WALTERS et al., 1999). Ademais, o glicocálice parece afetar negativamente a infecção dos Ads C (PICKLES et al., 2000).

Alguns grupos de pesquisa têm especulado que uma ruptura transiente no epitélio exporia CAR para a infecção. Por outro lado, interações de baixa afinidade com outros receptores abundantes, tais como o sulfato de heparana, poderiam mediar ou, no mínimo, facilitar a adsorção inicial dos vírions às células hospedeiras. (DECHECCHI et al, 2000).

Outra hipótese, onde uma nova função da interação Ads-CAR é descrita, foi recentemente apresentada. Nas fases tardias da infecção, quando ocorre a liberação de vírions (WALTER et al, 2002) e possivelmente fibras (TROTMAN et al, 2003), que são direcionadas para a região basolateral, essas estruturas interagiriam com CAR e dependendo dessa interação, acarretariam a ruptura das *tight junctions* e por conseqüência, a integridade juncional do epitélio respiratório seria desfeita. Essa estratégia facilitaria o escape apical dos vírus na barreira do epitélio (WALTERS et al, 2002). Assim, a interação fibra-CAR pode ser mais importante, não somente para a entrada nas células hospedeiras, mas provavelmente para promover a dispersão entre hospedeiros (WALTERS et al, 2002).

Poucos resíduos da interação CAR-porção globular da fibra são estritamente conservados (ROELVINK et al, 1999). Estudos de cristalografia, da porção globular da fibra de diferentes sorotipos de Ads, revelaram que a porção globular é formada por diferentes alças conectadas por *loops* (BEWLEY et al., 1999; DURMONT et al, 2001). Esses *loops* são importantes na ligação da fibra à CAR (KIRBY et al, 2000; ROELVINK et al, 1999). No entanto, a fibra sofre grande pressão seletiva negativa produzida pelo sistema imune do hospedeiro. Como os adenovírus conseguem manter a especificidade do receptor e evadir do sistema imune? Aparentemente, o sítio de ligação à CAR fica protegido das pressões seletivas por uma cobertura feita pelas outras alças e *loops* da região globular, que não participam do processo de reconhecimento do receptor (HOWITT, ANDERSON E FREIMUTH, 2003).

1.5.2- ÁCIDO SIÁLICO

Alguns sorotipos da espécie D (HAdV-8, HAdV-19a e HAdV-37), que causam ceratoconjuntivite epidêmica, parecem se ligar à célula hospedeira através do ácido siálico em alternativa ao CAR (ARNBERG et al, 2000; ARNBERG, PRING-AKERBLOM E WADELL, 2002). A porção globular da fibra desses vírus apresenta um alto ponto isoelétrico incomum (9.0-9.1) (ARNBERG, MEI E WADELI, 1997), o que torna sua superfície positivamente carregada, como demonstrado em modelos de predição de homologia. Dessa forma, essa interação parece ser carga-dependente (ARNBERG et al, 2002).

1.5.3- CD46

Como dito anteriormente, todas as espécies de adenovírus humanos se ligam à CAR, exceto a espécie B, que não tinha nenhum receptor descrito até o momento. Recentemente, uma proteína cofator de membrana foi identificada como receptor de entrada para os Ads B, o CD46: HAdV-3 (SIRENA et al, 2004), HAdV-11 (SEGERMAN et al, 2003) e HAdV-35 (GAGGAR, SHAYAKHMETOV E LIEBER, 2003). Além desses, HAdV-37 (espécie D) também se liga ao CD46 (WU et al, 2004). CD46 é uma glicoproteína de membrana tipo I expressa em todas as células nucleadas. Pertence a uma família de proteínas reguladoras de ativação de complemento e seus ligantes naturais são C3b e C4b (BARILLA-LABARCA et al, 2002). Uma de suas funções centrais é proteger a célula hospedeira do ataque de complementos homólogos (LISZEWSKI E AYKINSON, 1992).

Diversos patógenos interagem com CD46, provavelmente devido às suas funções imuno-regulatórias, pois o CD46 é capaz de bloquear o sistema complemento (CATTANEO, 2004). Sendo assim, muitos patógenos o utilizam como mecanismo de evasão do sistema imune: o vírus do sarampo (MV) (*Measles virus*) (DORIG et al, 1993), Hespesvirus humano 6 (HHV6) (SATORO et al, 1999), vírus da diarreia viral bovina (BVDV) (MAURER et al, 2004), Ads espécie B (GAGGAR, SHAYAKHMETOV E LIEBER, 2003; SEGERMAN et al, 2003; SIRENA et al, 2004), bem como *Streptococcus pyogenes* (OKADA et al, 1995) e *Neisseria (gonorrhoeae e meningitides)* (KALLSTROM et al, 1997).

1.5.4- VCAM -1

Como CAR, a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) é um membro da super família das imunoglobulinas. VCAM é principalmente expressa em células endoteliais em resposta a um estímulo inflamatório e media a adesão de leucócitos e sua migração para os sítios inflamatórios.

VCAM-1 aparentemente facilita a adsorção do vírus à célula. Na transfecção de células não permissivas, NIH 3T3 (embrião de camundongo), com VCAM-1 foi observado o aumento da ligação de HAdV-5 em aproximadamente 3 vezes e a expressão do transgene de 6 a 10 vezes (CHU et al, 2001). No entanto, até o momento os pesquisadores foram incapazes de demonstrar a ligação direta de HAdV-5 com a proteína VCAM-1 purificada (CHU et al, 2000).

1.5.5- CD80 (HLA B7-1) E CD86 (HLA B7-2)

CD80 e CD86 são moléculas co-estimulatórias que estão presentes em células dendríticas maduras e linfócitos B. CD80 também é expressa em macrófagos ativadas. Estão envolvidas na estimulação e ativação de linfócitos T, através da interação com CD28 (BARCLAY et al, 1997). HAdV-3 e HAdV-7 interagem com CD80 e CD86 e os utilizam como via de entrada na célula hospedeira, mas não são os seus receptores principais. Esses achados sugerem um mecanismo de exploração de moléculas acessórias do sistema imune, que poderiam auxiliar tanto na entrada da célula hospedeira quanto na evasão do sistema imune (SHORT et al, 2004),.

1.5.6- SULFATO DE HEPARANA

HAdV-2 e HAdV-5 se ligam ao sulfato de heparana, um glicosaminoglicano, em células CAR negativas como CHO (células de ovário de hamster chinês – *chinese hamster ovary cells*), porém com baixa eficiência. Sua função *in vivo*, como no início da infecção do trato respiratório permanece indeterminada (DECHECCHI et al, 2000).

1.6- PENTON BASE (Pb)

A Pb é um pentâmero da pIII agrupado em uma estrutura de anel simétrico (van OOSTRUM E BURNETT, 1985). A fibra é situada em cada um dos 12 vértices da partícula viral e se liga, não covalentemente, ao centro deste anel (Figura 7). A Pb media a internalização (WICKMAN et al, 1993) e parece promover o escape endossomal dos Ads (MÉIER et al, 2002; SETH, 1994).

As atividades da *penton* base durante a internalização são mediadas por dois motivos distintos, dependendo da espécie de adenovírus: o motivo RGD (Arg-Gly-Asp) (RUOSLAHTI E PIERSCHBACHER, 1987) ou motivo LDV (Leu, Asp, Val) (KOMORIYA et al, 1991), que interagem com os co-receptores (WICKHAM et al, 1993), através de ligações cátions divalentes dependentes (XIONG et al, 2003a).

Co-receptores são moléculas existentes na superfície celular que atuam como auxiliares no processo de entrada dos vírus nas células. Nos Ads são as integrinas que desempenham este papel. Na espécie C, as integrinas responsáveis por este processo já foram identificadas: $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ (WICKHAM et al, 1993) e $\alpha\beta1$ (DAVISON et al, 2001; LI et al, 2001). No entanto, alguns Ads, como o da espécie F, não reconhecem essas integrinas na etapa de entrada na célula (TIEMESSEN e KIDD, 1995).

Integrinas são um grupo heterodimérico de moléculas de adesão celular que mediam o contato da célula com os componentes da matrix extracelular como: fibronectina, vitronectinas e contatos célula-célula como na adesão leucocitária (ALBERTS et al, 1994. *In: MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL*).

O reconhecimento das integrinas pelo motivo RGD, presente na *penton* base dos Ad da espécie C, induz o agrupamento dessas integrinas na membrana celular (CHIU et al, 1999). Esse agrupamento é importante para potencializar a sinalização intracelular, via integrinas, para iniciar o processo de internalização das partículas virais (LI et al, 1998a e 1998b).

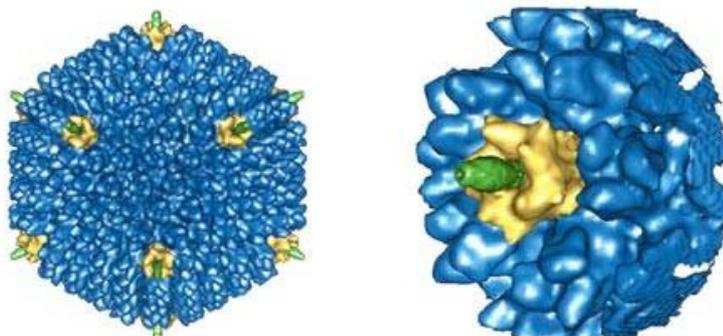


Figura 7: Imagem reconstruída a partir de Crioletromicroscopia de *Human adenovirus B*. Na imagem o capsômero *hexon* está em azul, a *penton* base em amarelo e a fibra em verde. Imagem de Phoebe Stewart, Vanderbilt University.

FONTE: (www.scripps.edu/~e_20040517/nemerow.html)

1.7- TROPISMO CELULAR

Em geral, o tropismo tecidual e os padrões patogênicos dos Ads variam de acordo com a espécie, embora membros de diferentes espécies também possam causar sintomas similares. Os padrões patogênicos dos Ads podem ser agrupados em 5 grupos: infecções assintomáticas (espécie A e D), infecções respiratórias agudas (espécie C, B1 e E), infecções gastrintestinais (espécie A e F) (ALLARD, ALBINSSON, E WADELL, 1992), infecções do trato urinário (espécie B2) e infecções oculares na forma de ceratoconjuntivite (Ad8, Ad19 e Ad37 da espécie D) e conjuntivite (espécie D, B1 e E) (WADELL, 1984; WADELL, 2000).

A maioria das infecções sintomáticas por Ads afeta crianças ou adultos jovens (WADELL, 1984; WADELL, 2000), embora indivíduos imunocomprometidos também possam ser afetados. Neste caso, quando a infecção é generalizada pode ocasionar a morte. Geralmente, as infecções adenovirais sistêmicas são oportunistas, relacionadas aos sorotipos capazes de desenvolver infecções persistentes (HIERHOLZER, 1992; KOJAOGLANIAN, FLOMENBERG, E HORWITZ, 2003).

O tropismo adenoviral é influenciado pelos receptores celulares reconhecidos pela fibra e pelo *penton*. Dessa forma, é de se esperar que os adenovírus não apresentem tropismo definido, visto que seu receptor principal é expresso em quase todas as células epiteliais (SHORT et al, 2004).

No entanto, algumas células, tais como as de origem hematopoiéticas, parecem ser susceptíveis à infecção produtiva por HAdV-2 e HAdV-5, mesmo não

apresentando o receptor CAR em suas membranas (MENTEL et al, 1997). Isto sugere que o reconhecimento de receptor pode ser um dos passos, de vários fatores envolvidos no tropismo celular (RUSSEL, 2000). Alguns autores tentaram modificar o tropismo celular através da construção de adenovírus sem fibras. No entanto, essas partículas virais se mostraram muito instáveis e tiveram sua infectividade drasticamente reduzida, possivelmente devido a via integrina dependente utilizada por essas partículas (HUANG et al, 1996).

1.8- BIOSÍNTESE VIRAL

A biossíntese viral ocorre no núcleo celular e é dividida em duas fases, separadas pelo início da replicação do DNA. Os eventos iniciais compreendem as etapas de adsorção, penetração, transcrição e tradução dos genes precoces.

Concomitantemente com o início da replicação do DNA, ocorre o início da fase tardia do ciclo com a expressão de um novo grupo de genes virais, controlados por um único promotor, o *major late promotor* (MLP) (HORWITZ, 2001). Todos os genes, controlados pela MLP, expressam proteínas que apresentam sinalização nuclear. Isto ocorre, porque embora a etapa inicial da morfogênese se dê no citoplasma, a montagem da partícula ocorre no núcleo.

Os polipeptídeos recém sintetizados são transportados para o núcleo, onde ocorre a formação dos capsômeros pela junção de subunidades monoméricas dos diferentes polipeptídeos. Após a formação das faces do icosaedro, pelo agrupamento das proteínas *hexon* e pIX em unidades nonoméricas e estabilização da estrutura viral pelas proteínas pIIIa, pVI e pVIII, ocorre a trimerização da fibra que se insere na base. O DNA genômico é inserido dentro do capsídeo e por fim este é fechado com a colocação dos *pentons* nos vértices. A liberação da progênie viral da célula ocorre por excitose ou por lise celular (HORWITZ, 2001).

1.8.1- O PROCESSO DE ENTRADA DOS ADENOVÍRUS

O processo de reconhecimento celular foi descrito para o protótipo do gênero, (HAdV-2), e sua eficácia é dependente de múltiplas etapas. A ligação do vírus à superfície celular é iniciada pela interação primária entre a porção C-terminal da fibra do vírus e CAR (BERGELSON et al., 1997; TOMKO et al., 1997).

Assim que a fibra se adsorve ao receptor primário, ocorre a aproximação da partícula viral à membrana celular (CHROBOCZEK et al., 1995; LOUIS et al., 1994).

A seguir, a *penton*-base, através do motivo RGD, interage com co-receptores celulares, especialmente as integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha_M\beta2$, $\alpha5\beta1$ e $\alpha\beta5$ presentes na membrana celular, levando os Ads a sítios especiais recobertos por clatrina presentes na membrana plasmática (BAI et al, 1993; BERGELSON et al, 1997; CHIU et al, 1999; DAVISON et al, 1997). Como resultado desta interação, ocorre a internalização da partícula viral, por mecanismo de endocitose (Figura 8) (MATHIAS et al., 1994). A entrada do vírus requer eventos de sinalização mediados por fosfatidilinositol 3- OH quinase (PI3K) e de pequenas GTPases da família Rho (LI et al., 1998).

A entrada viral pode ser dividida em duas fases: internalização e escape dos endossomos ou lisossomos. A ativação de PI3K afeta a actina no citoesqueleto e as GTPases (Rac e CDC42) induzem a polimerização da actina, resultando na formação de várias protusões de membrana (LI et al 1998a; LI et al, 1998b). A penetração nos endossomos é um processo ácido dependente (PRCHLA et al, 1995; SETH, 1994; SVENSSON, 1985) que parece ser mediado pela Pb (SETH, 1994; SVENSSON, 1985) ou pela fibra (MIYAZAWA, CRYSTAL E LEOPOLD, 2001).

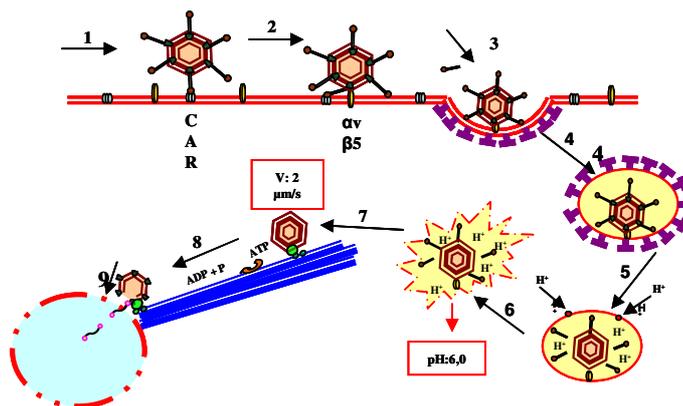


Figura 8: Figura esquemática do processo de entrada do adenovírus até a liberação do genoma viral no núcleo da célula. (1) Reconhecimento de CAR pela porção globular da fibra. (2) Reconhecimento da integrinas pela *penton* base. (3) Formação de uma fossa revestida por clatrina. (4) Entrada do adenovírus na célula por endocitose mediada por clatrina. (5) Liberação das fibras do capsídeo, devido ao meio redutor. (6) Lise da vesícula endocítica pela interação da *penton* base com a membrana do endossomo. (7) Transporte do capsídeo até o núcleo, por proteínas celulares motoras (8) Interação do capsídeo com proteínas do complexo do poro nuclear. (9) Liberação do core viral na matriz nuclear.

1.8.2- TRANSPORTE INTRACELULAR

A entrada e o desnudamento são processos simultâneos e interdependentes. Com a interação Pb-integrina, a partícula perde as fibras (NAKANO et al, 2000) e reativa a protease viral 23K que cliva a pVI (GREBER et al, 1996) e dissocia o DNA viral do capsídeo. Depois da entrada no citossol, o vírion libera outras proteínas associadas ao capsídeo: pIIIa, pVIII e pIX (Figura 8) (GREBER et al, 1993).

A passagem dos Ads, através do citoplasma até o núcleo, é mediada pela associação do core (DNA viral covalentemente ligado à TP junto com a pVII, pV e o peptídeo *mu*) com a proteína celular p32 (MATHEWS E RUSSEL, 1998). A p32 é localizada na mitocôndria, mas também pode ser encontrado no núcleo, o que sugere que ela é um componente do sistema celular de transporte entre a mitocôndria e o núcleo (RUSSEL, 2000). Dessa forma, os vírus podem se apropriar desse sistema para ganhar acesso ao núcleo, pois essa passagem é relativamente rápida e também envolve a participação das proteínas motoras, dineínas e microtúbulos (LEOPOLD et al, 2000; SUOMALAINEN et al, 1999), que são utilizadas no transporte intracelular dos Ads, como demonstrado no estudo do transporte do HAdV-2 até o núcleo (DALES E CHARDONNET, 1973; SUOMALAINEN et al, 1999).

A entrada no poro nuclear é mediada pela interação da proteína *hexon* com proteínas do complexo do poro nuclear (NPC) e CAN/Nup214 que ancoram a partícula no poro, onde ocorrem os últimos passos de desnudamento (TROTMAN et al, 2001). A interação do capsídeo com as histonas nucleares H1, importam fatores como a proteína Hsc70 que inicia a liberação do DNA viral do capsídeo para a entrada no núcleo (SAPHIRE et al, 2000; TROTMAN et al, 2001). Em seguida, o genoma do Ads associado às proteínas do core é translocado dentro do nucleoplasma através do NPC (GREBER et al, 1997; TROTMAN et al, 2001).

1.8.3 – REPLICAÇÃO DO DNA DOS ADENOVÍRUS

Uma vez dentro do núcleo, o genoma viral é direcionado à matrix nuclear (NM), onde a TP forma um complexo com a proteína celular CAD (enzima de síntese de pirimidina) e possivelmente com outros componentes da NM (ANGELETTI E ENGLER, 1998; FREDMAN E ENGLER, 1993). É interessante ressaltar que a laminina nuclear B, a qual é um componente da NM, se liga avidamente à p32 (SIMOS E GEORGATOS, 1994), o que seria importante para a dissociação da p32 do genoma viral recém-chegado ao núcleo (RUSSEL, 2000).

Depois de induzir a célula a entrar na fase S do ciclo celular e expressar E2, inicia-se a replicação do DNA pela Adpol (de JONG, VAN DER VLIET, E BRENKMAN, 2003). O DNA dos Ads contém regiões terminais repetitivas (ITRs) associadas à TP, que está ligada covalentemente à terminação 5' da dupla fita de DNA (REKOSH et al, 1977). A replicação do DNA viral começa em ambas as terminações 5' e reconhece seqüências dentro dessas ITRs como origem de replicação (HAY et al, 1995). *In vitro*, os fatores mínimos necessários para o início da replicação e alongação do DNA viral são as proteínas virais pTP, Adpol, DBP (DNA *binding protein*) e os fatores celulares (NF) I,II e III (Oct-1). Os fatores celulares NFI e NFIII ligam-se a Adpol e a pTP e recrutam o complexo pTP-Adpol para o core de origem.

Próximo às terminações do DNA está o local de ligação do complexo pTP-Adpol e adjacente a este há o sítio de ligação para fatores de transcrição celulares. A Adpol então adiciona o nucleotídeo citocina diretamente à pTP, por um mecanismo dependente de *template* chamado *jump back*. Por esta razão, a primeira base adicionada corresponde a seqüência da terminação 5'- do genoma. A Adpol adiciona mais dois nucleotídeos aos aminoácidos da pTP seguintes, até formar a seqüência CAT. O complexo pTP-Adpol se liga a esta recém sintetizada seqüência CAT e então retorna ao final da fita *template* onde CAT atua como *primer* para alongação da resto da fita de DNA. O DNA é, então, estendido a partir desta proteína *primer* continuamente, até o final do genoma (Di MAIO E COEN, 2001).

Para que haja a replicação, a DBP e a TP que são ligadas ao genoma, estabilizam o complexo pré-iniciação no core de origem. Para a alongação do DNA, a DBP e a topoisomerase celular NFIII são necessárias para mediar e manter o dsDNA desenrolado, passo importante para que a Adpol possa iniciar a síntese de outro genoma viral (DOUCAS et al., 1996; EVANS E HEARING, 2003).

1.8.4 – MONTAGENS DE NOVAS PARTÍCULAS VIRAIS

A montagem de novos vírions parece ocorrer nos corpos de inclusão nucleares e está relacionada à expressão de proteínas estruturais. Acredita-se que os vírions de Ad formem-se a partir de capsídeos vazios onde são inseridas as moléculas de DNA (OSTAPCHUK E HEARING, 2003). De modo geral, a região repetitiva (que constitui o sinal de empacotamento) deve estar localizada bem próxima ao final do genoma para mediar a encapsidação do DNA (HEARING et al,

1987). Entretanto, o encapsidamento do DNA de Ads não parece ser dependente das ITRs, o que sugere que o sinal de encapsidação ocorre em regiões heterólogas do DNA (OSTAPCHUK E HEARING, 2003).

A montagem de novos vírions é acompanhada por grandes mudanças na arquitetura nuclear e da permeabilidade da membrana nuclear (RAO et al, 1996; TOLLEFSON et al, 1996). Isto ocorre para facilitar a saída dos vírions para o citoplasma e, em seguida há a desintegração da membrana plasmática para que haja a liberação dos vírions da célula (RUSSEL, 2000). Este processo de lise celular para a liberação dos Ads das células é bem caracterizado para a espécie C, mas isso não ocorre em outras espécies, como a F, onde não há lise celular durante todo o ciclo viral.

1.9- Human adenovirus F

Os adenovírus da espécie F (*Human adenovirus F*), sorotipos 40 e 41 (HAdV-40 e HAdV-41), apresentam características biológicas, moleculares e estruturais diferentes dos demais adenovírus humanos. Foram descobertos, ao acaso, em microscopia eletrônica, diferentemente dos outros adenovírus que foram descobertos em cultura celular (FLEWETT, et al, 1974). A primeira cepa isolada foi designada Tak (TAKIFF, 1981), mas só foi caracterizada anos depois (de JONG et al, 1983).

Os *Human adenovirus F* possuem tropismo entérico e são considerados de grande importância na etiologia da gastroenterite infantil aguda (TIEMESSEN & KIDD, 1995; TIEMESSEN & KIDD, 1994). Em relação ao protótipo do gênero, o HAdV-2, os adenovírus F são de difícil cultivo *in vitro*, apresentam modificações nos genes que codificam as proteínas precoces (E1A; E1B; E2; E3 e E4) e contêm dois tipos de fibras, uma longa e outra curta. Essas estão distribuídas de forma alternada, uma em cada base, característica estrutural que é exclusiva do *Human adenovirus F* (FAVIER et al, 2002).

As diferenças estruturais dos HAdV-40 e HAdV-41 refletem no mecanismo de adsorção e penetração da partícula viral. As fibras (longa e curta) são codificadas por dois genes distintos, sendo que a fibra longa se adsorve ao receptor CAR, mas a fibra curta não o faz (ROELVINK et al, 1998). Estes dados sugerem que apenas a fibra longa destes vírus seja utilizada na fase de adsorção viral. Outra diferença estrutural dos HAdV-40 e HAdV-41 é a ausência da seqüência RGD na *penton*-base,

responsável pela interação com as integrinas, importante na etapa de penetração do vírus na célula. O HAdV-40 carrega a sequência RGDA e o HAdV-41 carrega a sequência IGDD (ALBINSSON & KIDD, 1999).

Os Ads F embora não contenha o motivo RGD, carrega o motivo LDV. Este motivo, está presente em quase todos os Ads, indicando que a Pb pode utilizar a sequência LDV no reconhecimento de integrinas, tais como $\alpha 4\beta 1$ (KOMORIYA et al, 1991) expressa em linfócitos e monócitos, os quais expressam poucas integrinas que estejam no estado inativo (HUAND, ENDO E NEMEROW, 1995).

1.9.1 – A região precoce 3 dos HAdV-41

A maioria dos estudos sobre a função das proteínas de E3 se restringe à espécie C. Muitos genes da região E3, tais como 10.4K, 14.5K e 14.7 K (Figura 5, barras em azul), existem em todas as espécies de adenovírus humanos e as proteínas 12.5K e 19K estão presentes na maioria das espécies, com exceção da espécie F que não possui ambas proteínas e da espécie A que não possui a proteína 19K (BURGET et al, 1999).

A região E3 do HAdV-41 consiste de 3373 nucleotídeos e contém seis ORFs, designadas de RL1 a RL6 (YEH et al, 1995). Destas, as seqüências de RL1 a RL3 são exclusivas dos adenovírus da espécie F (HAdV-40 e HAdV-41). Elas codificam uma proteína de 173 aminoácidos (19.4K), outra de 276 aminoácidos (30,4K) e uma proteína de 59 aminoácidos (6.7K) (Figura 18- barras roxas) (BURGET et al, 1999). R L4 codifica uma proteína de 90 aminoácidos (10,1K), que possui 40% de homologia com a proteína 10,4K da E3 da HAdV-2. RL5 codifica uma proteína de 107 aminoácidos (12.3K) que é análoga da proteína 14,5K de HAdV-2 e RL6 codifica uma proteína de 122 aminoácidos (14,7K) análoga à proteína 14,7K de HAdV-2.

RL1, RL2 e RL3, por serem únicos, podem ser uma das explicações porque os adenovírus da espécie F se diferem substancialmente de outros adenovírus humanos na interação com o hospedeiro, os quais são predominantemente entéricos em detrimento dos outros que são preferencialmente respiratórios (YEH et al, 1995).

Entre as funções das proteínas de E3, umas das mais estudadas é a da proteína 19K. Ela é a proteína mais abundante expressa pela E3 dos adenovírus da espécie C. Ela se liga ao MHC de classe I no retículo endoplasmático e o impede de transportar novas moléculas de MHC sintetizadas para a superfície celular

(ANDERSON et al, 1985; BURGETT et al, 1987). Conseqüentemente, o reconhecimento de células infectas por linfócitos T citotóxico é drasticamente suprimido (RAWLE et al, 1991).

Como dito anteriormente, com exceção da espécie A e F, todas as outras expressam uma proteína 19K-*like* (WOLD et al, 1995). Dessa forma, esses adenovírus são incapazes de reter moléculas de MHC no RE. No entanto, células transformadas com HAdV-12 (espécie A) apresentam subexpressão de MHC-I comandada pelas proteínas de E1A (SCHRIER et al, 1983). O mecanismo molecular dessa regulação ainda não está claro, mas parece envolver processamento diferencial do fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB). Outros componentes do padrão de apresentação de antígenos, como transportadores TAP e subunidades proteossomais também têm suas transcrições suprimidas, o que também contribui para a redução do MHC na superfície celular (ROTEM-YEHUDAR et al, 1994). Até o momento, não é claro se esses mecanismos operam durante a fase aguda ou na persistência em células humanas. É claro que a função de E3/19K não é necessária para a sobrevivência das espécies F e A no ambiente intestinal, onde esses vírus preferencialmente se replicam. Entretanto, E3/19K pode ser benéfica durante a replicação no trato respiratório e outros tecidos, o que favoreceria as outras espécies de adenovírus.

1.10- O RECEPTOR DAS CÉLULAS T (TCR)

Os linfócitos T reconhecem uma grande quantidade de antígenos polimórficos por meio do uso de um complexo protéico altamente diverso, que atua como receptores de antígenos, o TCR. Existem duas classes de receptores de antígenos de células T (TCR): o mais comum, do tipo $\alpha:\beta$, está presente na maioria das células T, as quais podem possuir função reguladora ou efetora. A segunda classe apresenta um fenótipo de superfície mais raro, o TCR $\gamma:\delta$ (Figura 9) (SAITO et al., 1984).

Diferentemente das células T convencionais, as células T $\gamma\delta$ não sofrem seleção positiva ou negativa no timo e não se ligam ao complexo MHC-antígeno (HASS et al., 1993). As células T portadoras de receptores $\gamma\delta$ são abundantes na mucosa do intestino, quando comparadas com outros tecidos linfóides e suas funções no sistema imune ainda não estão claras (GOODMAN e LEFRANCOIS, 1988). Estudos com camundongos deficientes em linfócitos $\alpha\beta$ e/ou $\gamma\delta$ mostraram haver diferenças qualitativas e quantitativas no modo como as infecções são clareadas. Ademais, porcentagens anormais de células T $\gamma\delta$ infiltrantes têm sido relatadas em tecidos alvos de doenças auto-imunes e pacientes com infecção viral ou bacteriana. Normalmente, nestes casos, também ocorre um aumento destas células no sangue periférico (HASS et al., 1993). Esses resultados indicam que as células T $\gamma\delta$ respondem e contribuem para a resposta imune de maneira distinta das células T $\alpha\beta$, mas não explicam a natureza e os mecanismos moleculares das funções das células T $\gamma\delta$ (CHIEN E BONNEVILLE, 2006).

1.11-O SISTEMA IMUNE DE MUCOSA

As superfícies epiteliais das mucosas que revestem a boca e os tratos respiratório, digestório e reprodutivo possuem seus próprios sistemas imunes especializados, chamados de tecidos linfóides associados à mucosa (MALT). No intestino, esses tecidos são chamados de GALT e no sistema respiratório de BALT (JANEWAY et al, 2007). Assim como a pele, as superfícies mucosas são colonizadas por linfócitos e APCs que iniciam as respostas imunológicas contras os antígenos ingeridos e inalados. (ABBAS E LICHTMAN, 2005).

No GALT os linfócitos estão presentes em grandes quantidades em três regiões principais: na camada epitelial (IEL); espalhados pela lâmina própria e em coleções organizadas chamadas de placas de Peyer. As células de cada região apresentam propriedades fenotípicas e funcionais distintas (ABBAS e LICHTMAN, 2005),

Nas placas de Peyer, os antígenos são capturados pelas células M que os transferem, por mecanismo de transcitose, ao espaço subcelular onde os expõem aos linfócitos localizados logo abaixo. Os linfócitos, nas placas de Peyer, formam um folículo, onde a grande área central é colonizada por linfócitos B que estão cercados por uma pequena quantidade de linfócitos T (JANEWAY et al, 2007).

A lâmina própria intestinal contém uma população mista de células, que inclui os linfócitos T (em sua maioria CD4+ ativados), uma grande quantidade de linfócitos B, plasmócitos ativados, bem como macrófagos, células dendríticas, eosinófilos e mastócitos. (ABBAS E LICHTMAN, 2005).

A maioria dos IELs é constituída de linfócitos T, e existem entre 10 e 20 IEL para cada 100 enterócitos no intestino delgado humano (JANEWAY et al, 2007). As células T do intestino podem ser divididas em dois tipos. O tipo "A" possui TCR $\alpha\beta$ duplo positivas (CD4 e CD8) e o tipo "B" compreende as células T $\gamma\delta$ duplo negativas, TCR $\gamma\delta$ CD8 $\alpha\alpha$ e TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$.(JANEWAY et al, 2007).

Nos camundongos, aproximadamente 50% dos IELs expressam a forma $\gamma\delta$ de TCR. Nos seres humanos, somente cerca de 10% dos IELs são $\gamma\delta$, mas essa proporção ainda é maior do que a quantidade de células $\gamma\delta$ encontradas entre as células T de outros tecidos (CHIEN E BONNEVILLE, 2006). Os IELs, tanto os que expressam TCR $\alpha\beta$ quanto os que expressam TCR $\gamma\delta$, apresentam uma diversidade limitada de receptores de antígenos quando comparados com outros linfócitos T (ABBAS E LICHTMAN, 2005).

Em humanos, cerca de 70% dos IEL são CD8+ e a grande maioria deles expressa CD8 $\alpha\alpha$. Este homodímero liga-se ao MHC de classe I que não apresenta antígenos, chamado antígeno de leucemia tímica (TL). O antígeno TL é expresso quase que exclusivamente por células epiteliais do intestino. A interação do TL com o CD8 $\alpha\alpha$ parece modular a atividade das IELs, reduzindo sua atividade citotóxica direta e aumentando sua produção de citocinas. Essa atividade dos IELs é importante no controle do reparo do epitélio mucoso lesado. (JANEWAY et al, 2007).

1.12- ORIGEM DAS CÉLULAS T $\gamma\delta$

Quando as células progenitoras entram pela primeira vez no timo, vindas da medula óssea, elas não expressam a maioria dos marcadores de células T maduras (CD3:TCR, CD4 e CD8). Esses timócitos são então chamados duplo-negativos. Essas células desenvolver-se-ão, através de duas vias distintas, em linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$. Na via TCR $\alpha\beta$, os timócitos duplo negativos começam a expressar CD44, Kit, CD25 (que é transiente) e receptor para SCF. Com a expressão das citocinas específicas: IL-2, IL15 e principalmente IL-7, inicia-se a expressão do CD3:TCR, CD4 e CD8 e então, esses timócitos são chamados de duplo positivos. Através de

seleção positiva por reconhecimento de MHC próprio, as células param de expressar um ou outro co-receptor, tornando-se tímócitos unipositivos, isto é CD4 ou CD8 positivos. Por sua vez, na via TCR $\gamma\delta$, se os tímócitos duplo-negativos receberem sinal para expressão do TCR $\gamma\delta$, eles amadurecem e migram para fora do timo (JANEWAY et al, 2007)

Existem dois conjuntos altamente distintos de linfócitos T $\gamma\delta$. As células T $\gamma\delta$, que são encontradas no tecido linfóide de todos os vertebrados, apresentam receptores altamente diversos. Em contraste, as células T $\gamma\delta$ intraepiteliais, somente são encontradas em alguns vertebrados, e comumente apresentam receptores de diversidade muito limitada (CHIEN E BONNEVILLE, 2006). Com base nessa diversidade limitada e na ausência de circulação, foi proposto que as células T $\gamma\delta$ intraepiteliais possam reconhecer ligantes derivados do epitélio em que residem, mas que são expressos apenas quando as células são infectadas: como as proteínas de choque térmico, MHC de classe I *like*: MICA e MICB (WU, GROH E SPIES, 2002), MHC de classe Ib (SCHILD et al, 1994; CROWLEY et al, 2000) e nucleotídeos e fosfolípeos raros, para os quais existem evidências de reconhecimento pelas células T $\gamma\delta$ (CHIEN E BONNEVILLE, 2006).

Diferentemente das células T $\alpha\beta$, as células T $\gamma\delta$ não reconhecem antígenos apresentados por MHC, em vez disso, elas parecem reconhecer os seus antígenos-alvo diretamente (CHIEN, JORES E CROWLEY, 1996).

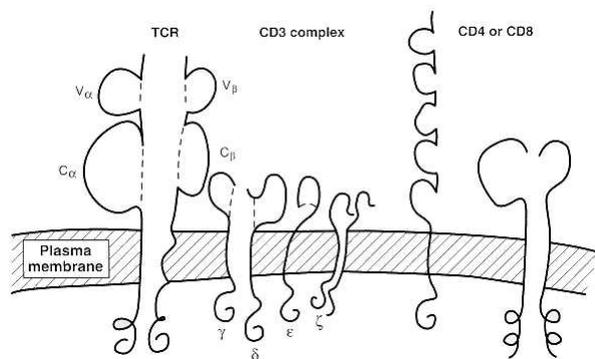


Figura 9: Figura esquemática do receptor de célula T do tipo $\alpha\beta$ com dois domínios extracelulares: a porção variável (V) e a porção constante (C), associada com o complexo CD3 e com moléculas acessórias CD4 ou CD8.

2- JUSTIFICATIVA

A utilização de receptores alternativos por adenovírus pode ser uma estratégia de evasão do sistema imune. Vários grupos já reportaram o estabelecimento de infecções persistentes por *Human adenovirus C* em linhagens celulares de linfócitos (GARNETT et al, 2002). Nestes, o genoma viral é mantido e pequenas quantidades de partículas infecciosas são produzidas enquanto a célula mantém sua cinética de crescimento normal (CHU et al, 1992; FLOMENBER et al, 1996; SILVER, 1998). Essas observações sugerem que os adenovírus C podem ser capazes de realizar um ciclo infeccioso alternativo nas populações de linfócitos, com uma replicação não lítica e apresentando persistência. Para os adenovírus, o receptor primário CAR parece inacessível no epitélio colunar intacto. Isto leva a supor que outros receptores ou mecanismos de invasão do tecido devem ser utilizados para permitir a infecção das mucosas. Walters e colaboradores, em 2002, demonstraram que, no início do processo infeccioso, células da camada basal do epitélio respiratório estão repletas de adenovírus. Estes, quando liberados destas células, assim como o excesso de fibra produzido no início da multiplicação viral, são transportados no sentido baso-apical, interagindo com CAR e desmembrando o epitélio colunar. Desta forma, os vírus atingem as células epiteliais e passam de uma célula à outra. O que não é conhecido é como os adenovírus chegam até as células da camada basal. O entendimento de como os vírus infectam a célula exige novas informações sobre os mecanismos de adsorção e a entrada, além de informações precisas sobre quais tipos celulares e tecidos são infectados *in vivo*.

Em nosso grupo de pesquisa foi revelada uma interação, em sistema duplo-híbrido, da fibra curta do HAdV-41 com um peptídeo correspondente a um domínio presente no TCR $\gamma\delta$ de linfócitos T intestinais. Assim, visamos verificar e comprovar a interação do HAdV-41 com linfócitos TCR $\gamma\delta$ por meio de ensaios de infecção em cultura de linfócitos.

3- OBJETIVO:

Estudar a interação dos HAdV-41 com linfócitos humanos extraídos de sangue periférico e de mucosa intestinal.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.1.1 -Células HEK-293

Células, de linhagem estabelecida, oriundas de rim de embrião humano, transformadas pela região E1A de HAdV-5 (GRAHAM e SMILEY, 1977), foram cultivadas em garrafas de 75 cm² em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) (Cultilab, Campinas, Brasil), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab). Estas células foram mantidas em incubadora a 37 °C, em atmosfera de 5 % de CO₂ e repicadas na proporção de 1:4, a cada 7 dias, com solução de tripsina 0,25 % (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos) em solução tamponada de fosfato (PBS) pH 7,4.

4.1.2 - Células mononucleares de sangue periférico

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram colhidas de voluntários saudáveis isoladas em gradiente de densidade de Ficoll (Amersham Bioscience, Piscataway, Estados Unidos) por centrifugação a 700 x *g* por 30 minutos. A fração celular foi coletada, lavada em PBS pH 7,4 e mantida em meio essencial mínimo de Dulbecco (DMEM), contendo alta concentração de glicose (4500 mg/L) (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos), e suplementado com 10% de SFB e 25U/mL de interleucina 2 (IL-2). O meio foi enriquecido com 1 mL de L-glutamina (2 mM), 1 mL de aminoácidos não essenciais (0,1 mM), 1 mL de vitaminas (0,1mM), 1 mL de piruvato de sódio (1mM) e 100µL de 2-mercaptoetanol (10⁻⁵M), todos da Invitrogen. Para garantir um melhor controle microbiano foi acrescido ao meio de cultivo: 4 µg de fungizona/mL, 500 U/mL de penicilina e 2,5 mg de estreptomicina/mL. Este meio de cultivo, com todos esses suplementos, foi denominado DMEM -alta glicose, suplementado, contendo antibióticos. O meio de cultivo foi trocado a cada dois dias, e as culturas foram repicadas com 100 % de confluência celular. As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C e atmosfera de 5 % de CO₂.

4.1.3 - Linfócitos intraepiteliais

Linfócitos intraepiteliais (IEL), obtidos da mucosa intestinal de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos, foram cultivados da mesma forma que PBMC.

4.2- ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO HUMANA.

Os voluntários que cederam sangue para a colheita dos linfócitos periféricos ou os pacientes que cederam fragmentos de intestino foram informados dos procedimentos científicos e assinaram o termo de consentimento pré-informado. O projeto foi aprovado pelos comitês de ética em experimentação humana, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo (Nº 0120/07), e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Nº 674/CEP)

4.3.- CRIOPRESERVAÇÃO DOS TIPOS CELULARES UTILIZADOS

4.3.1- IEL e PBMC

Cada suspensão celular obtida foi centrifugada a 500 x g, durante 10 minutos a 18 °C. Após a sedimentação celular, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em meio de congelamento (85 % de SFB e 15 % de glicerol estéril). As células foram distribuídas em criotubos previamente refrigerados a -20 °C. O congelamento foi realizado gradualmente por resfriamento a -20 °C por 24 horas a, seguido por mais 24 horas a -80 °C e, por fim, transferência para nitrogênio líquido (-185°C).

4.3.2 - Células HEK-293

Para obtenção dos estoques da linhagem celular HEK-293, as células foram cultivadas em frascos de 150 cm². No quarto dia, as células foram lavadas com PBS, pH 7,4, dispersas em tripsina 0,25 %, suspensas em meio MEM e centrifugadas a 500 x g, durante 10 minutos a 18 °C. Após a sedimentação celular, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em meio de congelamento (MEM suplementado com 20 % de SFB e 15 % de glicerol estéril). As células foram distribuídas em criotubos previamente refrigerados a -20°C. O congelamento foi realizado gradualmente por resfriamento a -20 °C por 24 horas a, seguido por mais 24 horas a -80 °C e, por fim, transferência para nitrogênio líquido (-185°C).

4.4- OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS DE MUCOSA INTESTINAL HUMANA.

Os fragmentos intestinais foram obtidos de procedimentos cirúrgicos, realizados no Centro Cirúrgico 1 do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HCUSP), em colaboração com a Dra. Magaly Gemio Teixeira do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os fragmentos intestinais, depois de coletados, foram transportados até o Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), em salina tamponada de Hank contendo 8 µg de fungizona/mL, 1000 U de penicilina/mL e 5 mg de estreptomicina/mL.

Os fragmentos intestinais foram lavados em PBS pH 7,4 com 100 mM de Dithiotreitol (DTT), para a retirada do muco presente na amostra. Após a lavagem, o tecido foi transferido para uma placa de Petri estéril, contendo meio DMEM com alta glicose, para a retirada da serosa e da camada muscular. O epitélio intestinal foi cortado em pedaços de 1-20 mm e, para uma melhor retirada do muco intestinal, estes foram suspensos em PBS pH 7,4 com 100 mM de DTT. Em seguida, os fragmentos foram decantados e ressuspensos em PBS pH 7.4. Para um melhor controle microbiano foram acrescentados, em todos os reagentes utilizados na extração dos linfócitos, 4µg de fungizona/mL, 500U/mL de penicilina e 2,5 mg de estreptomicina/mL.

4.5- MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE IEL DA MUCOSA INTESTINAL HUMANA

Para a obtenção de linfócitos intraepiteliais de mucosa intestinal humana, foram testados cinco métodos de extração celular: tripsinização a frio, tripsinização a quente, cultura de explante, o protocolo de extração de células intrapiteliais desenvolvido por Mosley e Klein, (1992) e o protocolo de Mosley e Klein (1992) modificado.

4.5.1 – Método de Tripsinização a quente (Freshney, R.I, 2000)

O tecido (epitélio intestinal), após ser fragmentado e lavado para a retirada do muco, foi submetido ao método de tripsinização a quente. Os fragmentos foram transferidos para um frasco contendo 20 mL de tripsina a 0,25 % em PBS pH 7,4, pré-aquecida a 37 °C. A suspensão foi agitada a 100 RPM, a 37 °C, durante 30 minutos, em uma incubadora com plataforma de agitação (Minitron-INFORMS,

Inglaterra). Os fragmentos foram decantados e o primeiro sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados mais 20 mL de tripsina e a suspensão foi novamente incubada com agitação de 100 RPM. Após 30 minutos, as células desagregadas foram colhidas em um tubo de 50 mL contendo SFB, para a neutralização da tripsina, e mantidas a 4 °C. Este processo foi repetido várias vezes durante a tripsinização (aproximadamente 4 horas ou até a desagregação total do tecido). As células desagregadas foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento celular foi ressuscitado em meio DMEM com alta glicose, suplementado e contendo antibióticos (verificar item 1.2).

As células foram contadas e transferidas para uma microplaca de 96 cavidades (40.000 células por cavidade) com meio DMEM com alta glicose, suplementado e contendo antibióticos. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂.

4.5.2 – Método de Tripsinização a frio (Freshney, 2000)

Os fragmentos de epitélio intestinal foram transferidos para um frasco contendo 20 mL de tripsina 0,25 % em PBS e em 5 mL de DMEM com alta glicose, para nutrição celular. Estas células foram incubadas a 4 °C por 24 horas para a penetração da tripsina no tecido. Após este período, os frascos foram aquecidos a 37 °C por 1 hora, os fragmentos celulares foram decantados e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, nova solução de tripsina 0,25 % a 37°C foi acrescentada aos fragmentos intestinais e a suspensão foi incubada em uma plataforma de agitação a 100 RPM, a 37 °C, durante 30 minutos (Minitron- INFORMAN, Inglaterra). As células desagregadas foram colhidas e transferidas para um tubo contendo SFB a 4 °C, para a inativação da tripsina. Após estes processos, foram repetidos os procedimentos citados no item 4.1.

4.5.3- Método de cultura de explante de tecido intestinal.

Para a cultura de explante de tecido intestinal, o órgão foi primeiramente lavado em PBS pH 7,4 contendo 1 mM de DTT para a retirada do muco intestinal. O tecido foi posto sobre uma placa de Petri, contendo SFB, para a retirada da serosa e da camada muscular. A mucosa intestinal isolada foi cortada em pedaços de 1 a 5 mm e estes colocados sobre a superfície interna de um frasco de meio de cultura, previamente coberto com um filme de SFB, para facilitar a adesão tecidual. Após 2 a

3 horas de incubação, período necessário para a adesão do tecido à superfície do frasco, foi adicionado 1 mL de meio DMEM com alta glicose, suplementado e contendo antibióticos (item 1.2). Após 3 a 4 dias, os fragmentos foram retirados do frasco e as células, que migraram para fora dos fragmentos e aderiram à superfície do frasco, foram tripsinizadas e transferidas para novos frascos contendo meio DMEM com alta glicose, suplementado e contendo antibióticos.

4.5.4 – Método de isolamento de linfócitos intraepiteliais (Mosley e Klein, 1992).

Os fragmentos intestinais lavados em PBS pH 7,4 foram ressuspensos em 80 mL de PBS pH 7,4, 1 mM de ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) e 1mM de DTT, e postos em agitação magnética por 30 minutos a 37 °C. As células dissociadas foram extraídas e os fragmentos de tecidos foram retirados. Em seguida, a suspensão celular foi passada por uma camada de gaze, para a retirada de *debris* celulares, muco e de dissociação celular incompleta. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 500 x g por 5 minutos e ressuspensas em 10 mL de Percoll 40 % (GE *Healthcare*, Londres, Inglaterra). Esta suspensão celular foi sobreposta a 2 mL de Percoll 70 % em PBS pH 7,4. O gradiente descontínuo de Percoll foi centrifugado a 600 x g por 20 minutos e após a centrifugação, os enterócitos se posicionaram fora do gradiente, acima do Percoll 40%, e os linfócitos e hemácias entre o Percoll 70 % e 40 %.

As células (PBMC) foram colhidas, lavadas em PBS, contadas e transferidas para uma microplaca de 96 cavidades (40.000 células por cavidade) com meio DMEM com alta glicose, suplementado e contendo antibióticos. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂.

4.5.5- Método de Mosley e Klein modificado.

Neste método, foram introduzidas algumas modificações no protocolo original (MOSLEY e KLEIN, 1992). A primeira modificação foi a substituição da solução de EDTA e DTT utilizada na desagregação celular, pelo método de extração por tripsinização a frio, como descrito no item 4.2. O sedimento celular foi ressuspendido em 6 mL de Percoll 40 % e sobreposto a 2 mL de Percoll 70% (Figura 10A). Este gradiente descontínuo foi centrifugado a 500 x g por 30 minutos a 18 °C. Após a centrifugação, houve a formação de um anel de linfócitos e hemácias sobre o Percoll 70 % e o posicionamento dos enterócitos acima do Percoll 40 % (Figura 10B). O anel

de linfócitos e hemácias foi colhido, transferido para um tubo de centrifuga contendo 10 mL de PBS pH 7,4 e centrifugado a 500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o sedimento celular foi novamente ressuspenso em PBS pH 7,4 e centrifugado para a retirada do Percoll. Para a separação das hemácias e linfócitos foi utilizado um gradiente de Ficoll, ao invés de um tampão de lise diferencial descrito no protocolo original. Para isso, o sedimento celular foi ressuspenso em 8 mL de PBS pH 7,4, posto sobre 2 mL de Ficoll (Amersham Biosciences) em um tubo de 15 mL e centrifugado a 500 x g por 30 minutos a 18 ° C (Figura 10C). Após a centrifugação, houve a formação de um anel de linfócitos e a sedimentação das hemácias (Figura 10D).

As células foram contadas e transferidas para uma microplaca de 96 cavidades (40.000 células por cavidade) com meio DMEM com alta glicose, suplementado e contendo antibióticos. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂

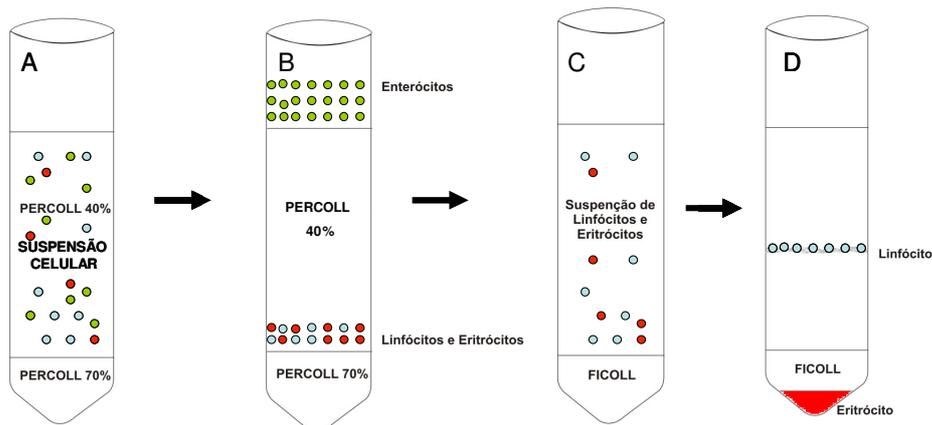


Figura 10: Método de separação de linfócitos intraepiteliais de mucosa intestinal, utilizando gradiente de Percoll e Ficoll.

4.6- PURIFICAÇÃO DA CEPA PADRÃO HADV-41(TAKIFF et al, 1981)

4.6.1 - Produção da cepa padrão HAdV-41 (TAK) em células HEK-293

Para obter um estoque viral de boa infectividade, monocamadas de células HEK-293 foram preparadas em dois lotes de frascos de 150 cm² . O primeiro lote continha 20 frascos e o segundo 42. Para testar a eficiência na concentração das

partículas virais, foi coletado somente o sobrenadante de um dos lotes. Após 2 a 3 dias, quando as culturas apresentaram 70 % de confluência celular, foi realizada a lavagem do tapete celular com PBS pH 7,4 suplementado com 1 mM de magnésio e 1 mM de cálcio. Em seguida, cada frasco foi inoculado com 500 µL de suspensão da cepa-padrão de HAdV-41 (TAK), 8ª passagem em cultura, da coleção de vírus-padrão do Laboratório de Biologia Molecular de Adenovírus, do Departamento de Microbiologia do ICB-USP. Após uma hora de adsorção, a monocamada celular foi suplementada com MEM acrescido de 0,2 % de SFB. As culturas inoculadas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂, durante sete dias, para que ocorra a formação de partículas virais completas.

Após a observação do efeito citopático (ECP) as células infectadas foram colhidas e precipitadas por centrifugação a 600 x *g* durante 15 minutos a 4 °C. Em seguida, as partículas virais foram extraídas e purificadas, em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl), de acordo com o protocolo estabelecido por KANEGAE, MAKIMURA e SAITO (1994).

No segundo lote, além da precipitação celular, os sobrenadantes das culturas inoculadas foram submetidos à ultracentrifugação a 100.000 x *g*, durante 3 horas, para a precipitação das partículas virais. Os sedimentos foram armazenados a -20 °C até o momento de uso.

4.6.2- Purificação viral em gradiente de cloreto de céσιο (Kanegae, Makimura e Saito, 1994).

Os dois lotes de sedimentos celulares foram lisados por etapas de congelamento e descongelamento e concentrados em tubos separados contendo tampão HEPES-EDTA-glicerol (10 mM HEPES pH 7,4; 1 mM de EDTA; 10 % de glicerol). A um dos tubos, foram adicionados os precipitados dos sobrenadantes das culturas inoculadas adquiridos na etapa de ultracentrifugação. Os dois lotes foram clarificados com igual quantidade de Vertrel-XF (DuPont® , Delaware, Estados Unidos) para eliminação dos lipídeos e centrifugadas a 970 x *g* durante 25 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram colhidos e aplicados sobre o primeiro gradiente de CsCl. Este era composto de uma solução de 4,0 M de CsCl em tampão 10mM de ácido hidroxietilpiperaziniletanosulfônico (HEPES) sobreposta por uma solução de 2,2 M de CsCl em tampão HEPES e por fim sobreposta pela solução da suspensão viral.

O gradiente foi submetido à ultracentrifugação de 100.000 x g durante duas horas a 4°C em ultracentrífuga L8-70M (Beckman®, Fullerton, Califórnia, Estados Unidos), utilizando o rotor TLA-110. A banda viral, contrastada contra fundo escuro sob iluminação de luz branca, foi colhida através da remoção do meio sobreposto e aplicada em um segundo gradiente.

Para a preparação do segundo gradiente de CsCl, a suspensão viral foi acrescida de igual volume de CsCl saturado em tampão 10 mM de HEPES e posta no fundo do tubo de ultracentrifugação. Este foi sobreposto por uma solução de 4 M de CsCl que por sua vez foi sobreposto por uma solução de 2,2M de CsCl. O gradiente formado foi submetido a ultracentrifugação de 230.000x g durante 3 horas a 4 °C. A banda viral foi contrastada, como dito anteriormente, coletada e acomodada em uma membrana de diálise pré-tratada em uma solução de 1 mM de EDTA e 2 % de bicarbonato de sódio. A diálise foi realizada em tampão HEPES-EDTA (10 mM HEPES; 1 mM EDTA) por 24horas em baixa agitação e por mais duas vezes contra tampão HEPES-EDTA-glicerol, com troca do meio de diálise a cada duas horas. A suspensão viral purificada foi armazenada a -20°C.

A descontaminação do estoque viral foi feita com 1000 U/mL de penicilina, 1000 µg/mL de estreptomicina e 50 µg/mL de fungizona. O estoque foi incubado à temperatura ambiente por uma hora e a seguir foram realizados testes de esterilidade nos meios líquidos: LB e YPD.

4.6.3 - Titulação do estoque viral purificado pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI)

Uma microplaca de 96 cavidades foi recoberta com 20.000 células HEK-293 por cavidade, em MEM suplementado com 10 % SFB. Após a monocamada atingir 70 % de confluência (24 horas), as células foram lavadas cuidadosamente com PBS pH 7,4 suplementado com 1 mM de Ca⁺² e 1 mM de Mg⁺². A inoculação foi realizada com diluições seriadas na base 10 do HAdV-41 purificado, aplicando-se 20 µL da suspensão viral sobre o tapete celular. Após 72 horas de incubação em câmara úmida a 37 °C, as células infectadas foram cuidadosamente lavadas com PBS pH 7,4, fixadas com 40 µL de metanol -20°C (MERCK) e armazenadas a -20 °C até a etapa seguinte. O anticorpo primário (soro policlonal anti-HAdV-41- do banco de antisoros-padrão do Laboratório de Biologia Molecular de Adenovírus, do ICB-USP) foi adicionado à placa na diluição 1/800 em PBS pH 7,2 e incubado por uma hora a

37°C. Como anticorpo secundário, foi utilizado soro anti-gama globulina (IgG) de coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Invitrogen). A reação foi incubada por uma hora a 37°C. Entre cada etapa, as células foram lavadas três vezes com PBS pH 7,2. Ao final, foi adicionado em cada cavidade 40µL de glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato pH 9,5. A visualização foi realizada em microscópio de fluorescência Olympus BX 41.

O título da cepa-padrão HAdV-41 purificada foi determinado em unidades formadoras de foco (UFF), utilizando a seguinte fórmula:

$$\boxed{\begin{array}{l} \text{N}^{\circ} \text{ médio de células} \\ \text{fluorescentes por } \mu\text{L de} \\ \text{inoculo vezes 1000} \end{array}} \times \boxed{\begin{array}{l} \text{Recíproca da} \\ \text{diluição do virus, na} \\ \text{qual a leitura foi} \\ \text{feita} \end{array}} = \boxed{\begin{array}{l} \text{N}^{\circ} \text{ de UFF por mL} \end{array}}$$

4.7 - EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DO HADV-41

Para a detecção do DNA genômico de HAdV-41 em células infectadas, foram utilizados dois métodos de extração de DNA distintos: o método de extração seletiva de DNA viral descrito por HIRT (1967) e um método de extração de DNA total, dependendo do tipo de ensaio estudado. Para a padronização das técnicas de detecção de genoma viral por reação em cadeia da polimerase (PCR), *Nested*-PCR, PCR em tempo real e para a obtenção da curva-padrão nos ensaios de quantificação absoluta, foram utilizados como *templates* DNA viral purificado pela técnica de HIRT (1967). O DNA viral extraído foi ressuspensionado em Tris EDTA (TE) e quantificado por espectrofotometria. Em seguida, foi preparada uma série de diluições deste DNA, na base 10 (10^{-1} a 10^{-10}) para aplicação como amostra na padronização desses métodos.

Para os demais ensaios, isto é, aqueles de detecção de vírus em células infectadas, foi utilizado o método de extração de DNA total.

4.7.1- Técnica de extração seletiva de DNA (HIRT, 1967)

As células inoculadas com HAdV-41 foram colhidas e centrifugadas a 500x g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com PBS pH 7,4 e novamente centrifugado. O sedimento foi ressuspensionado em 500 µL de TE (10 mM de Tris e 1mM de EDTA) e adicionado de 30 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 % (Sigma-Aldrich). A solução foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e por mais 5 minutos a 60 °C. A seguir, foram adicionados 5µL de proteinase K a 10 mg/ml (Invitrogen), incubando a solução por uma hora a 65 °C. Foram adicionados 150 µL de NaCl a 5 M e a reação foi incubada por 24 horas a 4 °C para a precipitação do DNA celular. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 21250 x g por 1 hora. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e o sedimento foi descartado. Foram adicionados 5 µL de proteinase K 10 mg/ml e a reação incubada por 2 horas a 37 °C. A extração das proteínas virais foi feita com fenol-clorofórmio (LGC, Biotecnologia, São Paulo-Brasil). Para tanto, foi adicionado igual volume de fenol-clorofórmio à suspensão viral num tubo de 1,5 mL, agitando-o até a solução ficar esbranquiçada. Em seguida, a solução foi centrifugada a 21250 x g por 1 minuto a 4 °C e o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um tubo limpo. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de éter etílico saturado (MERCK, Frankfurt, Alemanha), agitado e

centrifugado a 21250 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante (éter) foi desprezado e os tubos foram incubados a 37 °C para a evaporação total do éter. Para a precipitação do DNA viral, foram adicionados 20 µl de NaCl 5 M e 750 µL de etanol absoluto a 4°C (MERCK). A mistura permaneceu por uma hora a -70°C e após este período, a solução foi centrifugada a 21250 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi levado à estufa 35 °C por 5 minutos para a evaporação total do etanol. O sedimento (DNA viral) foi ressuscitado em 40 µl de TE contendo 30 µg/ml de RNase (Invitrogen). A solução foi incubada a 37 °C por duas horas para potencializar a ação da enzima. Finalmente, o DNA viral purificado foi armazenado a -20 °C.

4.7.2- Técnica de extração de DNA total

Para extração de DNA total foram adicionados 750 µL de Brazol (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) a cada 250 µL de suspensão celular. Em seguida, foram adicionados 100 µL de clorofórmio (MERCK), e as amostras foram homogenizadas em agitador e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados 21250 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa superior foi desprezada e à fase fenólica foram adicionados 750 µL de etanol absoluto a 4 °C e a suspensão foi incubada a -20 °C por 1 hora. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 21250 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento (DNA e proteínas) foi ressuscitado em 500 µL de TE (10 mM de Tris e 1 mM de EDTA); 10 µL de NaCl 5 M; 25 µL de SDS 10 % e 5 µL de proteinase K (10 mg/mL). Essa mistura foi incubada a 60 °C por uma hora para a digestão das proteínas. Em seguida, foram adicionados 500 µL de fenol clorofórmio. Os tubos foram centrifugados 21250 x g por 10 minutos a 4 °C. A fase superior aquosa foi coletada e transferida a um novo tubo. A este foi adicionado igual volume de éter etílico saturado e novamente centrifugado a 21250 x g por 5 minutos a 4 °C. O éter foi desprezado e totalmente retirado por evaporação e em seguida foram adicionados 500µL de isopropanol. Essa mistura foi incubada por 1 hora a -70°C e centrifugada a 21250 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de DNA foi ressuscitado em 50 µL de TE.

4.8- ELABORAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

A partir do genoma do HAdV-41-Tak, depositado no GenBank (NCBI-National Center for Biothechnology Information NIH, USA) sob o número de acesso

[DQ315364](#), foram elaborados diferentes oligonucleotídeos para os genes E1A, E1B(55K), E3(14K), fibra curta e *hexon*. Foram também elaborados oligonucleotídeos direcionados para genes constitutivos celulares, utilizados como controle extração e para a normalização da expressão gênica viral na célula. Esses oligonucleotídeos foram obtidos a partir das seqüências de seus genes depositadas no GenBank. Foi escolhido o gene GAPDH (número de acesso [AF261085](#)), como controle endógeno.

Os oligonucleotídeos foram elaborados utilizando o programa *Primer Select* do DNA Star. Esses pares de oligonucleotídeos foram contrastados, com bancos genômicos, para verificar a especificidade e similaridade dos *primers* com outras espécies de adenovírus. Nesse passo, foi utilizada a ferramenta *nucleotide-nucleotide blast* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) na página www.ncbi.nlm.nih.gov. Em seguida, para testar a eficiência dos oligonucleotídeos para GAPDH, o material genômico das células HEK 293 foi extraído para servir como *template* na reação de PCR. Esses oligonucleotídeos foram testados em termociclador de gradiente de temperatura (*Eppendorf® MasterCycler Gradient*) para verificar a temperatura que oferecia maior especificidade e eficiência de amplificação. Os oligonucleotídeos virais também foram testados, usando como *template* DNA viral extraído pela técnica de extração seletiva de HIRT (1967).

Posteriormente, o produto da amplificação de cada gene foi submetido à análise por eletroforese em gel de agarose 0,8 %, em tampão TAE, para confirmar o tamanho do produto amplificado e para a observação de possíveis reações inespecíficas.

4.9- REAÇÃO DE PCR

Nessa reação, foi utilizado um par de oligonucleotídeos gênero *Mastadenovirus* específico, descrito por XU e colaboradores (2000), direcionado para uma região conservada do gene *hexon*. (Tabela 3).

Tabela 3: Relação dos oligonucleotídeos utilizados na PCR para a detecção de HAdV-41.

Oligonucleotídeos	Posição de anelamento	Seqüência (5'-3')
XuHex1	1834-1853 (gene <i>hexon</i> do HAdV-41)	5'-TTCCCCATGGCICAYAACAC-3'
XuHex2	2315-2296 (gene <i>hexon</i> HAdV-41)	5'-CCCTGGTAKCCRATRRTTGTA-3'

Degenerações IUPAC: y (C ou T), k (G ou T) e r (A ou G)
(www.ncbi.nlm.nih.gov/class/MLAcourse/modules/MolBioReview/iupac_nt_abbreviation.html)

Na PCR foi utilizada a seguinte mistura: 10mM Tris-HCl (pH 8,3) contendo 1,5mM de MgCl₂, 50mM de KCl, 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTPs), 0,2mM de cada oligonucleotídeo, 1U de *Tth* (*Thermus thermophilus*) DNA polimerase (BIOTOOLS, Madri, Espanha) e 0,1% de Triton-X100 (Sigma-Aldrich). Como *template* foram utilizados 5µL de cada diluição seriada do DNA de HAdV-41 (descrito no item 7). As amplificações foram realizadas com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento dos oligonucleotídeos a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto. Após o término dos 30 ciclos, obteve-se a extensão final do produto a 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados (428pb) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % (Invitrogen) em tampão de Tris acetato EDTA (TAE) a 90 V e corados com solução de brometo de etídeo. A presença dos amplificados foi visualizada através de exposição à luz ultravioleta. A imagem foi obtida com o aparelho fotodocumentador Vilber Lourmat (Marne-la-Vallée, França).

4.10- *Nested-PCR*

As condições de reação foram as mesmas estabelecidas para a PCR convencional. Como *template* da reação, foram utilizados os produtos amplificados na PCR a partir da maior diluição detectada. Para confirmar a especificidade do par de oligonucleotídeos foi realizada uma PCR, utilizando como *templates* os DNAs de todas as espécies de Ads humanos, menos a espécie D.

Os produtos amplificados (218pb) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % em tampão TAE a 90 V, corados com solução de brometo de etídeo e visualizados através de exposição à luz ultravioleta.

4.11 - PCR em tempo real

Para a detecção do genoma viral por PCR em tempo real foi utilizado o equipamento ABI 7300 da *Applied Biosystem*. Para a reação de amplificação foi utilizado *Platinum SYBR-GREEN qPCR supermix UDG* (Invitrogen®) otimizado para um total de reação de 25 µL, sendo: 2,5 µL de DNA *template*; 50 mM de KCl; 20 mM de Tris-HCl pH 8,4; 0,2 mM de dNTP *mix*; 3 mM de MgCl₂; 0,2 mM de oligonucleotídeo específico e 10 mM de fluoróforo SYBR-GREEN.

As condições de reação foram as mesmas estabelecidas para a PCR convencional, utilizando como *template* as diluições seriadas do DNA de HAdV-41, previamente preparadas. Para a quantificação do *template* foi feita uma curva padrão de detecção, construída com as diluições seriadas do DNA viral, previamente quantificadas por espectrofotometria. A quantificação absoluta das amostras foi feita por comparação da quantidade de fluorescência emitida, durante a reação, pelas amostras de concentração de DNA viral conhecidas e desconhecidas. A quantidade de fluorescência emitida está associada ao ciclo de amplificação na qual foi detectada, chamado de *threshold cycle* (C_T). O C_T é considerado como o ponto a partir do qual o sistema começa a detectar o aumento de fluorescência, diretamente associada ao aumento exponencial dos produtos da PCR, durante a fase logarítmica.

A curva padrão foi construída baseada na relação entre os C_T das diluições com a mesma concentração de DNA e os desvios padrões dos C_T esperados para essas amostras.

A eficiência da reação foi calculada a partir da quantidade de DNA indicada para cada diluição testada. Dessa forma, para as amostras que tenham o dobro de DNA em relação à outra, é esperado que o C_T gerado seja 1 ciclo maior que o outro, pois a quantidade de DNA, em uma reação de PCR, dobra de um ciclo para outro. Assim, reações com 100% de eficiência apresentam esse padrão de detecção. As reações de PCR em tempo real são consideradas satisfatórias quando apresentam eficiência (R₂) maior que 0,9. O *slope* da fase *log* linear reflete a eficiência da amplificação. Para valores entre 90 e 100% de eficiência o *slope* deve variar -3.6 a -3.1. Este pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$R_2 = 10^{(-1/slope)} - 1$$

4.12- ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÓPIAS DE HADV-41 DETECTÁVEIS

Os resultados obtidos nas reações de PCR, *Nested*-PCR e PCR em tempo real foram utilizados para determinar o número de cópias de genoma de HAdV-41 detectáveis em cada método. Para isso, o DNA viral purificado e quantificado, por espectrofotometria, foi transformado em números de cópias com base no número de pares de bases e pesos moleculares dos mesmos. Para isso, foram utilizadas as seguintes fórmulas de análise:

$$\text{DNA} = (A_n \times 313,21) + (T_n \times 304,2) + (C_n \times 289,18) + (G_n \times 329,21)$$

A_n , T_n , C_n e G_n representam as quantidades dos respectivos nucleotídeos dentro de cada polinucleotídeo, seguidos pelos pesos moleculares de cada base. Após obter a molaridade do DNA alvo, o número de cópias foi determinado da seguinte forma:

$$\text{Número de cópias} = \text{mol de DNA} \times 6,02 \times 10^{23}$$

4.13- ENSAIO PRÉVIO PARA A DETERMINAÇÃO DA PERMISSIVIDADE DE LINFÓCITOS À INFECÇÃO POR HADV-41.

Como era esperado que a quantidade de IEL, obtida de mucosa intestinal humana, fosse relativamente baixa, foi necessário realizar um ensaio prévio de detecção de HAdV-41 em amostras de pouca celularidade. Dessa forma, foram semeadas 5.000 células HEK-293 por cavidade em uma microplaca de 96 cavidades. Após 48 horas, estas foram inoculadas com multiplicidades de infecção (MOI) de 0,1; 0,5; 1 e 2 do inóculo viral purificado. A cultura foi incubada em câmara úmida a 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂ por 48 horas. Após este período, as células foram lavadas com PBS pH 7,4 e o último PBS de lavagem foi guardado para verificação de possíveis vírus no sobrenadante, que poderiam interferir na interpretação dos resultados.

As células foram ressuspensas em 100 µL de PBS pH 7,4 e o DNA total foi extraído como descrito no item 6,2 e submetido à detecção do genoma viral por PCR, *Nested*-PCR e PCR em tempo real.

Concomitantemente, 40.000 PBMC por cavidade, foram semeados em uma microplaca de 96 cavidades. As células foram inoculadas com MOIs de 0,5; 1 e 2 de

HAdV-41 em sistema de triplicata. As células infectadas foram incubadas em câmara úmida a 37 °C e atmosfera de 5 % de CO₂ durante 48 horas. Após esse período, o DNA viral foi analisado como descrito anteriormente.

4.14- ANÁLISE DA INFECÇÃO DO HADV-41 EM PBMC E IEL

Para esta análise, 40.000 PBMC e IEL por cavidade, foram semeados em uma microplaca de 96 cavidades. As células foram inoculadas, em sistema de triplicata, com 1 MOI de HAdV-41 purificado. As células infectadas foram incubadas em câmara úmida a 37 °C e atmosfera de 5 % de CO₂ durante 48 horas. Após esse período, o RNA total foi extraído com Brazol (LGC Biotecnologia), seguindo recomendações do fabricante.

4.14.1- Remoção do DNA genômico viral e celular

Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com o *kit* Turbo DNA free (Applied Biosystems®) para a eliminação do DNA. Uma alíquota do RNA total extraído, após o tratamento com DNase, foi submetido à PCR para a detecção de vestígios de DNA. Esta etapa é muito importante para confirmar que a reação de PCR em tempo real foi totalmente dependente do cDNA formado na etapa de transcrição reversa e não de possíveis vestígios de DNA presentes na amostra. Assim, o RNA total tratado foi então utilizado para a reação de transcrição reversa.

4.14.2- Obtenção de cDNA

Para a reação de desnaturação foram utilizados 10,5 µL de RNA total, 0,5µL de oligodT (250 µg/mL) (Applied Biosystems®) e 1 µL (10 mM) de dNTP (VJR comercial, São Paulo- Brasil). Em seguida, a solução foi incubada a 65°C por 5 minutos e a 4°C por mais um minuto para a estabilização da estrutura do RNA. Após esse processo, foram adicionados ao produto desnaturado: o tampão da enzima transcriptase (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 37,5 mM KCl e 1,5 mM MgCl₂), 4 U de inibidor de ribonuclease (Invitrogen®) e 0,02 M ditionitroto (DTT- Invitrogen), para a ativação do inibidor de ribonuclease. Por fim, foi adicionado 1µL (200 U) da enzima transcriptase reversa MoMLV (*Moloney murine leukemia virus*) (Invitrogen).

A solução foi incubada a 50°C por uma hora para a extensão e, em seguida, para a inativação da enzima, as amostras foram incubadas a 70°C por 15 minutos. Finalmente, o cDNA obtido foi submetido aos testes de detecção de expressão

gênica viral, utilizando oligonucleotídeos desenhados para os genes precoces do HAdV-41: E1A, E1B (55K); E3 (14K) e VARNA (MA e MATHEWS, 1996) e para os genes de expressão tardia: fibra curta (L6) e Hexon (L3). A expressão gênica específica foi detectada por PCR em tempo real e para a quantificação relativa da expressão foi utilizado como controle endógeno a expressão do gene celular constitutivo GAPDH.

4.14.3- Padronização da PCR em tempo real para determinação da expressão de cada gene viral em estudo

Após a obtenção do cDNA, este foi analisado em PCR em tempo real utilizando os pares de oligonucleotídeos desenhados. Para tanto, foi necessário padronizar a reação para cada gene para maximizar a eficiência da reação e diminuir a formação de *primer dimers* que dificultariam a interpretação dos resultados. Como mistura de reação utilizou-se o *kit Quantimix easy SYBR Green* (Biotools®), com 10 µL de SYBR Green, 6,75 µL de água ultra-pura (MilliQ®); 0,5 µL de cada par de oligonucleotídeo (10 pmol/µL); 0,25 µL do corante ROX e 2 µL de *template*. Apenas para a detecção da expressão de VARNA e fibra curta foram utilizados 0,25 µL (5 pmol/µL) dos oligonucleotídeos VARNA e Fibra curta na mistura de reação, a fim de diminuir a formação de *primers dimers*.

As condições de termociclagem foram as mesmas para todos os pares de oligonucleotídeos, variando apenas a temperatura de anelamento que é específica para cada um deles. O ciclo consistiu de 2 minutos a 50°C para incubação de UDG e dUTP que previnem a reamplificação de produtos de PCR carregados entre as reações. dUTP assegura que nenhum DNA que contenha dU sirva de *template* em futuras PCRs. A incubação com UDG, antes da PCR, destrói qualquer produto que contenha dU na reação. Para a inativação da UDG incubou-se 10 minutos a 94 °C. Em seguida, a ciclagem foi feita em 40 ciclos a 94°C por um minuto, 30 segundos para o anelamento dos oligonucleotídeos (tabela 2), extensão a 72 °C por 30 segundos. Após o término da ciclagem, obteve-se a extensão final do produto a 72 °C por 5 minutos.

Tabela 4: Temperatura de anelamentos dos pares de oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de cinética de infecção.

Par de oligonucleotídeo	Temperatura de anelamento (T_m)
--------------------------------	--

GADPDH	56°C
E1A	58°C
E1B	59°C
14K (E3)	60°C
VARNA	55°C
Hexon	67°C
Fibra Curta	45,8°C

4.14.4- Cinética de infecção do HAdV-41 em células HEK-293.

Para estudar a cinética de infecção do HAdV-41 em células permissivas, foram distribuídas 20.000 células HEK-293 por cavidade em uma microplaca de 96 cavidades, contendo meio MEM com 0,2 % de SFB. Após a adesão celular, as células foram inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 por cavidade. O RNA total foi coletado de hora em hora, a partir de 10 horas pós-infecção (p.i.) até completar 24 horas de infecção. Para a coleta do RNA total foi utilizado Brazol, seguindo as recomendações do fabricante. Para tanto, foi adicionado 171 µL de Brazol por cavidade. O lisado celular foi transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 513 µL de Brazol. A solução foi homogeneizada com o auxílio do agitador (AP56 Phoenix) durante 5 minutos e foi acrescentado 50 µL de clorofórmio gelado. Em seguida, a solução foi centrifugada a 12.000 RPM por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado de 300 µL de isopropanol gelado. A solução foi homogeneizada novamente por 2 minutos e centrifugada a 12. 000 RPM por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi suspenso em 39µL de água dietil pirocarbonato (DEPC).

4.14.5- Cinética de infecção do HAdV-41 em PBMC

Para estudar o comportamento de HAdV-41 em PBMC infectado, 40.000 PBMC por cavidade foram distribuídas em uma microplaca de 96 cavidades, contendo meio DMEM alta glicose suplementado e acrescido de 0,2 % de SFB. Em seguida, as células foram inoculadas com 1 MOI de HAdV-41. Para a extração do RNA total seguiram-se as mesmas etapas descritas nos itens 7; 7.1 e 7.2.

4.15. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA VIRAL

Para estudar o comportamento da expressão gênica do HAdV-41 em células HEK 293 e em PBMC, foi realizada uma análise quantitativa dessa expressão. Para isso, utilizamos o método de quantificação relativa da expressão gênica, baseada no nível de expressão gênica de um gene constitutivo em relação a um gene alvo. Como gene constitutivo foi utilizado o gene GAPDH. O método se baseia no número de ciclos amplificação necessários para detectar uma amostra (C_T). Os C_T gerados para o gene constitutivo e os genes alvos são comparados para normalizar cada amostra, gerando o ΔC_T .

$$\Delta C_T = C_T \text{ do gene alvo} - C_T \text{ do GAPDH}$$

Essa normalização foi feita para cada amostra da triplicata, a fim de corrigir determinadas variáveis, tais como: variação de volume pipetado, número de celular contido em cada cavidade, perda de material durante o processo de extração do RNA total e eficiência das reações de RT-PCR e PCR em tempo real. Após essa normalização, foi calculada a média dos ΔC_T de cada triplicata.

$$\text{Média de cada ponto} = \frac{\Delta C_T1 + \Delta C_T2 + \Delta C_T3}{3}$$

Após a obtenção da média de cada ponto, a expressão gênica de um determinado gene, em cada ponto da análise, foi comparada com a expressão desse mesmo gene em um ponto específico escolhido como homogenizador. O resultado dessa análise é chamado de $\Delta\Delta C_T$.

$$\Delta\Delta C_T = \text{média } \Delta C_T \text{ do ponto alvo} - \text{média } \Delta C_T \text{ do ponto homogenizador}$$

Após a homogenização de cada ponto da análise, aplicou-se a seguinte fórmula para determinação da quantidade relativa de expressão gênica.

$$\text{Quantidade relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Os dados da quantificação relativa de cada gene foram colocados em um gráfico gerado pelo programa Excell (Microsoft- Office) para uma melhor visualização dos resultados.

Os resultados de ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$ e da quantificação relativa estão apresentados nos anexos 2 e 3.

4.16- IFI DE PBMC INFECTADOS COM HADV-41

Para a realização de Imunofluorescência indireta de PBMC infectados com HAdV-41, foram coletados 20 mL de sangue de quatro três voluntários. Os linfócitos foram extraídos utilizando a separação celular em Ficoll. Após a contagem celular de cada doador, as células foram ressuspensas em DMEM alta glicose suplementado e distribuídas 40.000 células por cavidade em uma microplaca. Em seguida, as células foram inoculadas com 1, 5 e 10 MOI de HAdV-41, em sistema de triplicata. Após 60 horas de infecção, as células foram coletadas e transferidas para tubos de 1,5 mL e centrifugadas a 500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular suspenso em PBS pH 7,4 e centrifugado novamente a 500 x g por 10 minutos. Esse processo foi repetido três vezes para a eliminação completa de possíveis partículas virais presentes no sobrenadante. Após essa etapa, o sedimento celular foi suspenso em 10 μ L de PBS pH 7,4, distribuído em uma lâmina de microscopia, seco à temperatura ambiente e fixado com acetona a 4 °C por 10 minutos. Depois de fixadas, as células foram testadas contra três soros diferentes: soro policlonal anti-HAdV-41 total, soro policlonal anti fibra curta de HAdV-41 e monoclonal anti-Hexon de HAdV-41, em sistema de triplicata para cada soro (Figura 2).

Sobre as lâminas foram aplicados 7 μ L de cada anticorpo, diluídos em PBS pH 7,2 com azul de Evans 0,02 % e 5 % de leite, nas seguintes diluições: policlonal anti-HAdV-41 total (1/800), monoclonal anti-Hexon de HAdV-41 (1/800) e anticorpo policlonal anti-fibra curta de HAdV-41 (1/100).

A incubação dos anticorpos foi feita em câmara úmida a 37 °C durante 1 hora. Em seguida, as lâminas foram lavadas, mergulhando-as de 2 a 3 vezes em recipientes contendo PBS *Tween* 0,05 % e mais 10 minutos de molho na mesma solução. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, da mesma maneira e deixadas de molho durante 5 minutos. As lâminas foram secas em temperatura ambiente e 7 μ L do anticorpo secundário, anti-IgG de coelho marcado com FITC (diluição 1/120) (Invitrogen), foi aplicado em cada orifício. Para o anticorpo monoclonal Hexon, foi

utilizado 7 μ L do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com FITC (diluição 1/100) (Invitrogen). Os anticorpos secundários foram diluídos em PBS pH 7.2 e 1/30 de azul de Evans.

A incubação, das lâminas com os soros secundários, foi feita em câmara úmida a 37 °C por 30 minutos. Para a retirada do anticorpo secundário foi repetido o esquema de lavagem explicitado acima. Após a secagem, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada, contendo 1 % do corante diaminofenilindol (DAPI), e recobertas com lamínula. A visualização das lâminas foi feita no microscópio de Fluorescência Olympus.

RESULTADOS

5.1- PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E TITULAÇÃO DE HADV-41

Para a produção de partículas de HAdV-41, células HEK 293 foram inoculadas com o vírus de passagem. Em média, foram necessários 15 dias p.i. para a coleta das células HEK-293 inoculadas.

Para otimizar o protocolo de purificação de HAdV-41 foram testadas quantidades variáveis de lotes virais, submetidas ou não à ultracentrifugação do sobrenadante. Foram necessários produzir 42 frascos de 150 cm² para obter-se uma quantidade de partículas suficientes para a visualização no gradiente de CsCl (Figura 11).

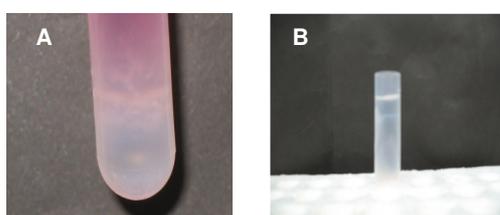


Figura 11: Purificação de HAdV-41 em gradiente de CsCl (KANEGAE, 1994). (A) Primeiro gradiente da purificação, onde pode-se visualizar a banda viral entre a fase rósea e a translúcida. (B) Segundo gradiente da purificação, onde a banda viral pode ser visualizada como um linha refringente logo abaixo da linha branca de *debris* celulares.

Do lote, no qual o sobrenadante não foi submetido à ultracentrifugação, o título viral foi de $5,6 \times 10^6$ UFF/mL e do lote submetido à ultracentrifugação do sobrenadante o título viral obtido foi de $2,3 \times 10^7$ UFF/mL. No entanto, no primeiro lote foi obtido um volume final de apenas 200 μ L, o que equivale $5,6 \times 10^4$ UFF/frasco. No segundo, o volume foi de 500 μ L ou $2,74 \times 10^5$ UFF/frasco. Essa diferença de rendimento final, de quase 5 vezes, pode ser atribuída à maior concentração viral, devido ao maior número de partículas iniciais submetidas ao processo e, principalmente, pela concentração das partículas virais presentes no sobrenadante. Esses ensaios confirmam a importância da concentração viral no sobrenadante mesmo em vírus com ciclo não-lítico, como o HAdV-41.

5.2- DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE DETECÇÃO DE HADV-41 EM CÉLULAS HEK-293 INFECTADAS POR PCR, *NESTED*-PCR E PCR EM TEMPO REAL

5.2.1 Padronização da PCR convencional

Na PCR convencional foi possível detectar o DNA viral até a diluição 10^{-3} , a qual correspondia a 8,15 pg de DNA inicial (Figura 12).



Figura 12: Eletroforese em gel de agarose(0,8% em TAE) dos amplificados por PCR da diluição seriada do DNA de HAdV-41purificado, utilizando oligonucleotídeo genérico (XU et al., 2000). M – Marcador de peso molecular de 50pb (Biolabs); 1 – Controle negativo, cavidade de 2 a 7 diluições de 10^{-1} a 10^{-6} de DNA de HAdV-41

5.2.2 – Padronização da *Nested* – PCR

Para a realização da reação de Nested-PCR foi desenhado o par de oligonucleotídeo *hexon* F, como mostra a Tabela 6.

O alinhamento do produto amplificado pela reação de Xu e colaboradores (2000) com o gene *hexon* de todas as espécies de Ads mostrou maior similaridade entre a espécie A e F (Figura 13, 14 e 15). Na reação de PCR o par de oligonucleotídeos Hexon F, inicialmente, não mostrou especificidade para a espécie F ao detectar, também, o gene *hexon* das espécies A e B (Figura 16). Para melhorar a especificidade do par de oligonucleotídeos foi realizada uma PCR em gradiente de temperatura, na qual, a partir de 68°C a reação passou a ser específica para a espécie F (Figura 17).

Definidas as condições ideais de reação, foi realizada a *Nested*–PCR sobre os amplificados da reação de PCR (XU et al., 2000). Foi possível detectar a presença do genoma viral até a diluição de 10^{-7} , que corresponde a 0,815 fg de DNA inicial. Esse resultado demonstra que a *Nested*–PCR é 10.000 vezes mais sensível que a PCR convencional (Figura 18).

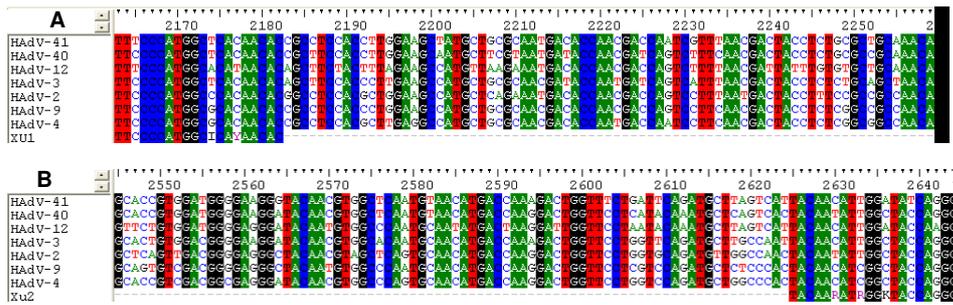


Figura 13: Alinhamento de nucleotídeos gerado pelo programa BioEdit, contranstando as sequências do gene Hexon de 6 espécies de adenovírus humanos com par de oligonucleotídeos projetados por Xu *et al*, 2000. (A) Alinhamento do oligonucleotídeo *forward* de XU com as espécies F (HAdV 40 e 41), espécie A (HAdV-12), espécie B (HAdV-3), espécie C (HAdV-2), espécie D (HAdV-9) e espécie E (HAdV-4). O oligonucleotídeo *forward* se alinha na posição 2163-2182 do gene *Hexon*. (B) Alinhamento do oligonucleotídeo *reverse* de XU com todas as espécies de adenovírus humanos. O oligonucleotídeo se alinha na posição 2625-2645 do gene *Hexon*, resultando num produto de tamanho médio de 485pb.

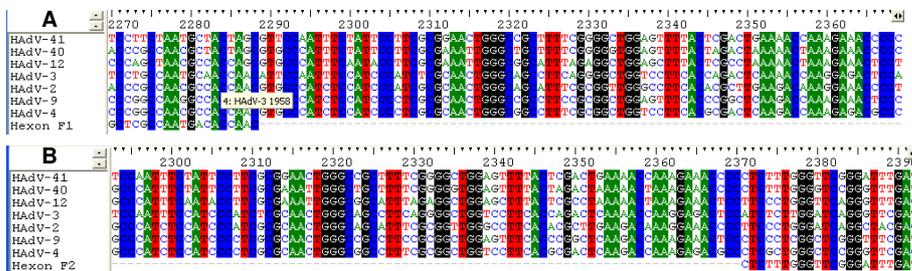


Figura 14: Alinhamento de nucleotídeos gerado pelo programa BioEdit, contranstando as sequências do gene Hexon de 6 espécies de adenovírus humanos com par de oligonucleotídeos projetados para reconhecer o amplificado da PCR de XU *et al*, 2000. (A) Alinhamento do oligonucleotídeo *forward* HEXON F com as espécies F (HAdV 40 e 41), espécie A (HAdV-12), espécie B (HAdV-3), espécie C (HAdV-2), espécie D (HAdV-9) e espécie E (HAdV-4). O oligonucleotídeo *forward* se alinha na posição 2270-2288 do gene *Hexon*. (B) Alinhamento do oligonucleotídeo *reverse* HEXON F com todas as espécies de adenovírus humanos. O oligonucleotídeo se alinha na posição 2371-2392 do gene *Hexon*, evidenciado sua localização interna ao produto da PCR Xu *et al*, 2000.

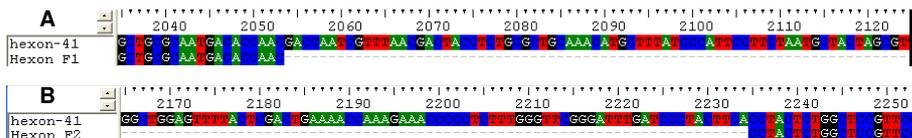


Figura 15: Alinhamento de nucleotídeos gerado pelo programa BioEdit, contranstando as sequências do gene Hexon do HAdV-41 com par de oligonucleotídeos HEXON F. (A) Alinhamento do oligonucleotídeo *forward* HEXON F com HAdV 41 que se alinha na posição 2030-2053 do gene *Hexon*. (B) Alinhamento do oligonucleotídeo *reverse* HEXON F com HAdV-41 que se alinha na posição 2235-2253 do gene *Hexon*, gerando um produto de 223pb.

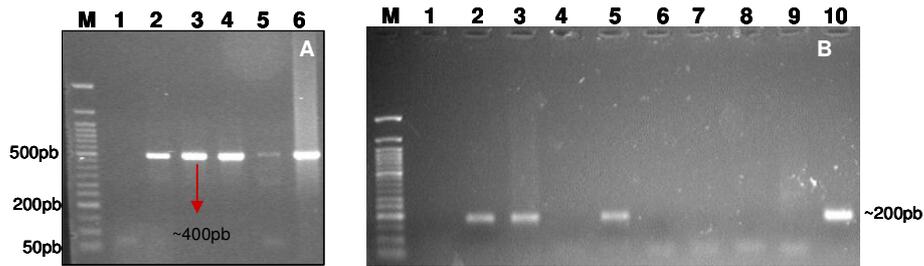


Figura 16: (A) PCR das espécies de Ad usando os oligonucleotídeos genéricos XU (Gel de agarose 0,8% em TBE). M- marcador de peso molecular de 50pb (Biolabs); 1- CN; 2- esp. A; 3- esp. B); 4- esp. C; 5-esp. D e 6-espécie F. (B) PCR das espécies de Ad utilizando os oligonucleotídeos HEXON F em gel de agarose 0,8% em TBE. M – marcador de 50pb; cavidade 1 – CN; cavidades 2 e 3: adenovírus espécie A; cavidades 4 e 6- espécie C; cavidade 5: espécie B; cavidades 7, 8 e 9- espécie D; cavidade 10- espécie F.

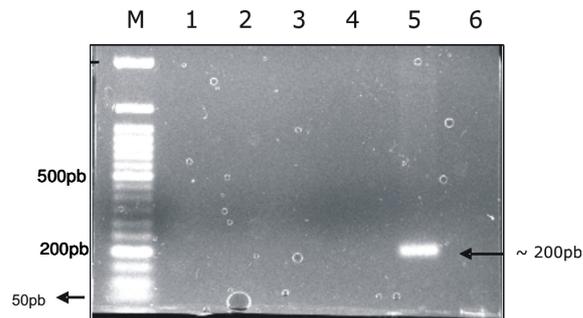


Figura 17: *Nested*-PCR das espécies de Ad usando primer específico para espécie F (Gel de agarose 0,8% em TBE). M- marcador de peso molecular de 50pb (Biolabs); 1- espécie A; 2- espécie B; 3- espécie C; 4-espécie D; 5-espécie F e 6 – CN.



Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de *Nested* - PCR da diluição seriada do DNA de HAdV-41purificado para determinação do espectro de detecção da reação, utilizando oligonucleotídeo HEXON XU. M – Marcador de peso molecular de 50pb (Biolabs); C- Controle negativo, cavidades de 1 a 7 diluições de 10^{-3} a 10^{-9} de DNA de HAdV-41.

5.2.3- Padronização da PCR em tempo real.

A quantidade inicial de DNA aplicado na reação de PCR em tempo real foi de 2,5µL por reação. Como o equipamento de detecção da fluorescência é muito sensível, as amostras mais concentradas não foram aplicadas, pois apresentariam distorção. Desta forma, foram utilizadas as diluições do DNA purificado de HAdV-41, a partir da 10^{-3} , analisadas em triplicatas. A Tabela 5 apresenta as diluições utilizadas e a média do limiar de detecção de cada uma delas. A Figura 19 apresenta, para cada diluição analisada, a curva de intensidade de fluorescência em relação ao número de ciclos. A linha basal de fluorescência encontra-se a 50 unidade relativa de fluorescência (RFU).

Na PCR em tempo real foi obtido o seguinte resultado:

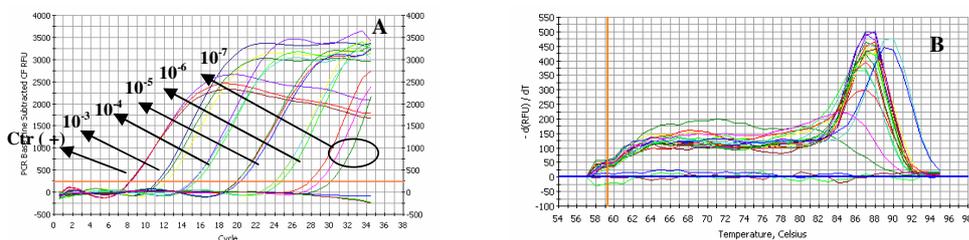


Figura 19: (A) Curvas de amplificação obtidas na reação de PCR em tempo real de diluições seriadas de DNA de HAdV-41. (B) Curva de desnaturação do amplificado da reação de PCR (Xu et al., 2000).

Na Figura 19A, a linha horizontal de cor laranja representa o limiar mínimo de detecção pela PCR em tempo real. A fluorescência detectada abaixo desta é considerada ruído de fundo. Quando o nível de intensidade de fluorescência ultrapassa este limiar, a amostra é considerada positiva para a PCR.

A Figura 19B evidencia a especificidade da reação, apresentando uma única temperatura de desnaturação do produto amplificado.

Tabela 5: Resultados obtidos na reação de PCR em tempo real expressos em número mínimo de ciclos necessários (TC) para a detecção de DNA viral em cada amostra testada.

Amostras	Diluições	ΔTC
1,2 e 3	10^{-3}	16,22
4,5 e 6	10^{-4}	20,09
7,8 e 9	10^{-5}	24,43
10,11 e 12	10^{-6}	28,41
13,14 e 15	10^{-7}	32,04
16, 17 e 18	10^{-8}	ND
19	Branco	ND

A PCR em tempo real detectou amostras na diluição de 10^{-7} , o que representa 0,4 fg de DNA inicial. Para a quantificação absoluta de DNA inicial foi obtida a seguinte curva padrão (Figura 20).



Figura 20: Curva padrão de detecção de DNA viral, obtido na análise das diluições do DNA de HAdV-41 purificado, submetidas a reação de PCR em tempo real, elaborada pelo programa iQCyler .

Os parâmetros obtidos pela curva padrão foram os seguintes: eficiência da PCR 90,6%, o *slope* -3.6 e coeficiente de correlação de 0.997.

5.3- ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÓPIAS DE HADV-41

Pela técnica de PCR convencional foi possível a detecção de 8,15pg DNA viral intracelular, na *Nested-PCR* 0,815 fg e, na PCR em tempo real, 0,4 fg. Sabe-se que a média dos pesos moleculares das bases nitrogenadas (guanina, citocina, timina, adenina) que compõem o ácido desoxirribonucléico é de 330,95 e que o genoma do HAdV-41 possui 34.214 pares de bases. Assim, com esses valores podemos estimar o número de cópias do genoma viral encontrado com base na massa de DNA detectada pela PCR.

- 1) peso molecular do genoma do HAdV-41 → 22646246g
- 2) PCR convencional → 217.500 partículas iniciais de HAdV-41
- 3) *Nested*-PCR → 21,74 partículas
- 4) PCR em tempo real → 10,4 partículas

5.4- ELABORAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA HADV-41

Após a análise das seqüências gênicas do HAdV-41, foram obtidos os seguintes pares de oligonucleotídeos (Tabela 6).

Tabela 6: Seqüência nucleotídica dos pares de oligonucleotídeos desenhados para os genes E1A, E1B (55K), E3 (14K), L1 (hexon) e LV-2 (fibra curta) do HADV-41 e do gene GAPDH celular.

Oligonucleotídeos	Posição de anelamento	Seqüência (5'-3')
E1A <i>forward</i>	470-493 (gene E1A de HAdV-41)	5'-TCATCGGGGCTCTAGTGGAAATC-3'
E1A <i>reverse</i>	653-675 (gene E1A de HAdV-41)	5'-TGGGCGTCGTCTACAGGAAACTC-3'
E1B (55K) <i>forward</i>	1133-1155 (gene E1B de HAdV-41)	5'-AGGGCTGGTGGGGCAAACAAGA-3'
E1B (55K) <i>reverse</i>	1511-1530 (gene E1B de HAdV-41)	5'-CCACACCCGCGAAAAAGCATCAGT-3'
E3 (14K) <i>forward</i>	2785-2808 (gene E3 HAdV-41)	5'-GCTGAACCTTGCTATGATGTAACC-3'
E3 (14K) <i>reverse</i>	2891-2911 (gene E3 HAdV-41)	5'-CTGGGCCGATTGCTGAGTAA-3'
Hexon F <i>forward</i>	2035-2053 (gene hexon HAdV-41)	5'-GCTCGCCAATGACACCAAC-3'
Hexon F <i>reverse</i>	2235-2253 (gene <i>hexon</i> HAdV-41)	5'-ATCAAATCCCGAACCCAAAGAG-3'
Fibra curta <i>forward</i>	505-524 (gene FC HAdV-41)	5'-CTGACAGTAAGCAACAACCA-3'
Fibra curta <i>reverse</i>	788-804 (gene FC HAdV-41)	5'-AATGCGTCCGTTACTGT-3'
GAPDH <i>forward</i>	702-724 (gene GAPDH humano)	5'-CGGGGCTCTCCAGAACATCATCC-3'
GAPDH <i>reverse</i>	981-1001 (gene GAPDH humano)	5'-CCAGCCCAGCGTCAAAGGTG-3'

5.5- OBTENÇÃO DE IEL DE MUCOSA INTESTINAL HUMANA

Para a obtenção de linfócitos intraepiteliais de mucosa intestinal foram testados os métodos de extração celular por tripsina à quente, à frio, cultura de explante, protocolo de Mosley e Klein, (1992) e o protocolo de Mosley e Klein (1992) modificado, obtendo os seguintes resultados (Tabela 7):

Tabela 7: Parâmetros utilizados na análise dos métodos de extração de linfócitos intraepiteliais testados.

Método	Rendimento	Viabilidade Celular	Grau de Pureza	Tempo de Extração	Controle de Contaminação
Tripsinização à quente	Alto	Médio	Baixo	Médio	Médio
Tripsinização à frio	Alto	Alto	Baixo	Alto	Médio
Explante	Baixo	Alto	Baixo	Alto	Difícil
Protocolo de Mosley e Klein	Alto	Baixo	Médio	Baixo	Médio
Protocolo de Mosley e Klein modificado	Alto	Alto	Alto	Alto	Médio

O método de cultura de explante mostrou-se inviável, pelo baixo rendimento, pelo tempo necessário para a migração celular e principalmente pelo difícil controle dos contaminantes.

O método de tripsinização teve alto rendimento, mas a extração a frio apresentou maior viabilidade celular quando comparada com a tripsinização a quente. O protocolo de Mosley e Klein (1992), que utiliza gradiente de Percoll para separação celular, mostrou grande rendimento, maior até que o método de tripsinização, mas as células não permaneciam viáveis por muito tempo, acarretando perdas superiores a 80% nas primeiras 24h pós-extração, provavelmente devido ao uso de EDTA (Figura 21). Além disso, não possibilita a separação de linfócitos e hemácias.

O protocolo modificado por nós, tripsinização a frio seguida de separação por gradiente de Percoll e Ficoll, apresentou bom rendimento, com maior viabilidade celular e pureza na separação dos tipos celulares.

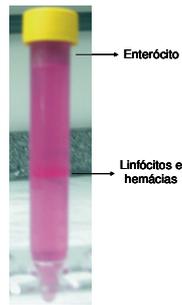


Figura 21: Gradiente de Percoll para separação de enterócitos e linfócitos. Os enterócitos se encontram na parte superior do tubo e linfócitos se posicionam como um anel acima do Percoll 70%.

5.6- ENSAIO PRÉVIO PARA A DETERMINAÇÃO DA PERMISSIVIDADE DE LINFÓCITOS À INFECÇÃO POR HAdV-41.

5.6.1 - Ensaio de infecção de células HEK-293 com HAdV-41

Após a inoculação de 5.000 células HEK-293 com 0,1; 0,5, 1 e 2 MOI de HAdV-41 purificado foi obtido o seguinte resultado (Figura 22):

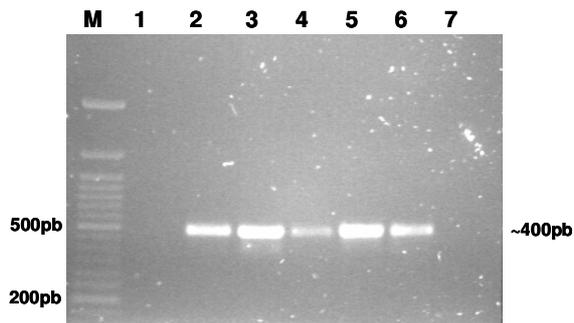


Figura 22: PCR das espécies de Ad usando primer genérico XU (Gel de agarose 0,8% em TBE). M- marcador de peso molecular de 50pb (Biolabs); C- HEK-293 não inoculada; cavidade 1- PBS de lavagem das células HEK-293 inoculadas com 1MOI de HAdV-41; cavidade 2- HEK-293 inoculada com 0,1MOI de HAdV-41; cavidade 3 – PBS de lavagem de células inoculadas com 0,1MOI de HAdV-41; cavidade 4 –células inoculadas com 1MOI de HAdV-41; cavidade 5 – células inoculadas com 2MOI de HAdV-41; cavidade 6 – controle negativo (mistura de reação).

Foi possível a detecção de DNA viral nas três MOI testadas. No entanto, na análise do último PBS de lavagem, também foi possível a detecção de DNA viral em todas as células inoculadas (Figura 22).

Como havia partículas virais no sobrenadante que não foram eliminadas pelas repetidas lavagens, foi necessário realizar outro ensaio de infecção. No novo ensaio de infecção o processo de lavagem foi substituído por uma diluição do sobrenadante, onde foram adicionados 100µL de PBS ao meio já presente e outros 100µL foram retirados. Esse processo foi repetido 20 vezes. Esse mecanismo minimizou a perda e a lise celular, diminuindo a influência do sobrenadante na interpretação dos resultados (Figura 23).

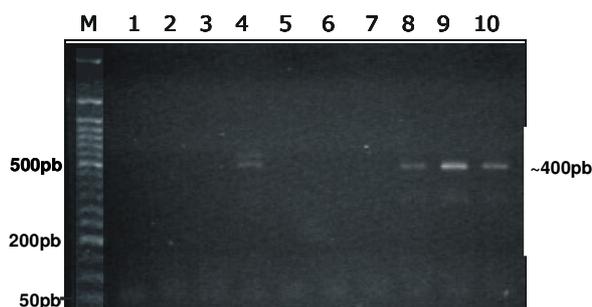


Figura 23: PCR das espécies de Ad usando primer genérico XU (Gel de agarose 0,8% em TBE). M- marcador de peso molecular de 50pb (Biolabs); 1- CN; 2- CE; 3 - Controle de lavagem; 4 - PBS de lavagem 0,1MOI; 5- Controle HEK não inoculada; 6 - PBS de lavagem 0,5MOI; 7 - PBS de lavagem 1MOI; 8 - HEK inoculada com 0,1MOI de HAdV-41; 9 - HEK inoculada com 0,5MOI; 10 - HEK inoculada com 1MOI.

Mesmo minimizando a lise celular durante o processo de lavagem, foi observada a presença de genoma viral no PBS de lavagem das células inoculadas com 1MOI. Porém, foi possível observar duas bandas distintas e um padrão de fluorescência bem menos evidente do que os apresentados pelas células inoculadas (Figura 23).

Essas amostras foram analisadas por PCR em tempo real, obtendo-se os resultados mostrados na figura 14.

A MOI de 0,1 apresentou C_T de 28,5; MOI de 0,5 apresentou C_T de 24 e a MOI de 1 apresentou C_T de 19,8. No controle positivo foi observado um C_T de 16,4. Por volta do ciclo 33 pode-se observar o PBS de lavagem das células inoculadas com 1 MOI. Na Figura 24 é possível observar a formação de apenas um pico de temperatura de desnaturação do produto amplificado, o que evidencia a

especificidade da reação. Como o número de células inoculadas não variou de um experimento para outro, é possível verificar, indiretamente, a infectividade do HAdV-41 em células HEK-293. Cada C_T , em uma eficiência de reação de 100%, significa o dobro de material detectado. Desse modo, nas células inoculadas com uma MOI de 1 era esperado encontrar 10 vezes mais genoma viral do que nas células inoculadas com uma MOI de 0,1, se os HAV-41 utilizados no inóculo fossem todos infectivos. Nossos resultados permitiram verificar 8 vezes mais material viral nas células inoculadas com MOI de 1 do que nas células inoculadas com MOI de 0,1. Essa variação está dentro dos padrões aceitáveis, pois mesmo quando se utiliza vírus purificados em gradiente de CsCl como inóculo em ensaios de infecção, pode ocorrer quebra das fibras de algumas partículas durante o processo de purificação, dificultando o vírus de adsorver-se à célula.

Assim, pode-se afirmar que esta metodologia pode ser aplicada para o estudo da infectividade do HAdV-41 em linfócitos.

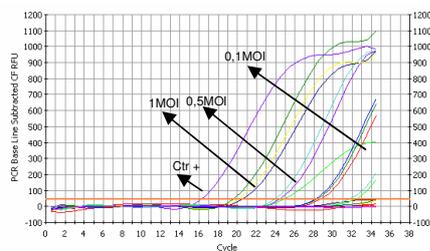


Figura 24A: Gráfico representando as curvas de detecção inicial em intensidade de fluorescência x C_T para cada amostra de células HEK-293 inoculadas com HAdV-41 em diferentes MOIs. Cada amostra é representada por uma linha de cor diferente.

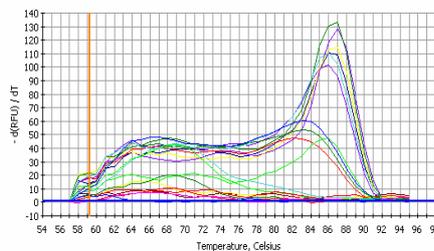


Figura 24B: Gráfico representando as curvas de denaturação dos produtos da PCR, para a detecção de HAdV-41 em células HEK-293, utilizando o par de oligonucleotídeo Hexon F.

Formatado: Fonte: (Padrão) Arial, 8 pt, Fonte de script complexo: Arial, 8 pt

5.6.2 - Ensaio de infecção de PBMC com HAdV-41

Após a extração do material genético foi feita uma *Nested*- PCR para a detecção de HAdV-41 em PBMC inoculados (Figura 25).

Os resultados da PCR mostram que o HAdV-41 foi capaz de infectar PBMC. No entanto, o PBS de lavagem do PBMC inoculado com 1 MOI apresentou resquícios de DNA viral no sobrenadante. Por isso, a infecção de HAdV-41 em PBMC foi analisada através da detecção do RNA viral em células inoculadas. Após 48 horas, o RNA total foi extraído e submetido à reação de transcrição reversa. O cDNA formado foi submetido à PCR em tempo real, utilizando oligonucleotídeos para

os genes E1A, E1B, VARNA e Hexon de HAdV-41, obtendo resultados mostrados na figura 26.

A especificidade dos oligonucleotídeos foi analisada através dos gráficos de temperatura de denaturação dos produtos amplificados de cada gene específico. Essa temperatura permaneceu a mesma para todas as amostras testadas com o mesmo par de oligonucleotídeos, demonstrando somente um tipo de produto amplificado. Ademais, os produtos de amplificação foram checados em eletroforese em gel de agarose para confirmação do tamanho do produto amplificado formado.

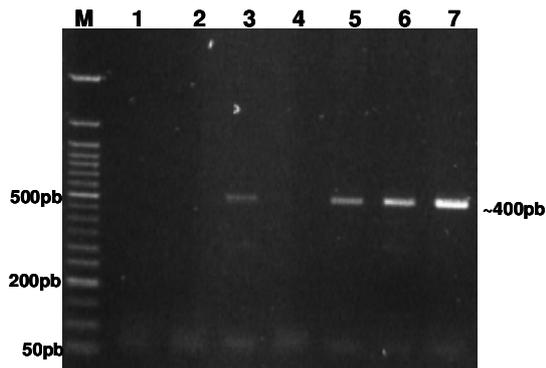


Figura 25: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de PCR utilizando oligonucleotídeos genéricos XU para a detecção de adenovírus em amostras de linfócitos de sangue de voluntários. M – Marcador de 50pb; 1 – CN; 2- controle de extração; cavidades de 3 a 7 – amostras de linfócitos

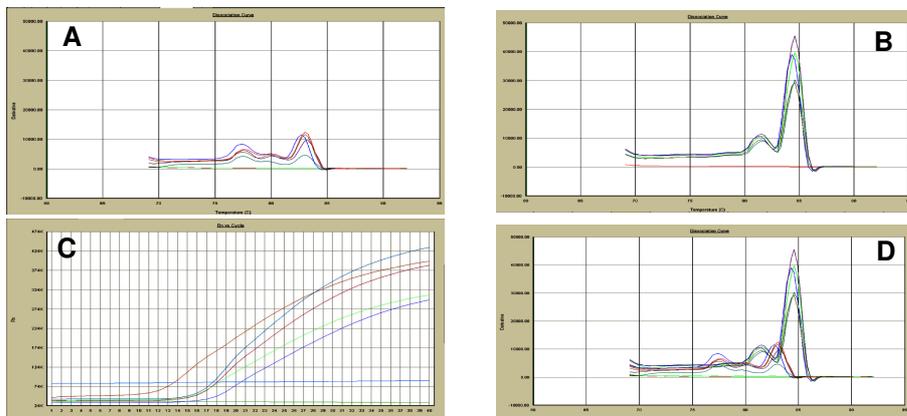


Figura 26: PCR em tempo real do cDNA obtidos de linfócitos infectados com HAdV-41, utilizando oligonucleotídeos pra a região E1A. (A) curva de denatuação do produto amplificado a partir do RNA total extraído de linfócitos infectados com HAdV-41 previamente tratados com DNase para eliminação do DNA cromossômico, utilizando oligonucleotídeos para o gene E1A. (B) Curva de denaturação do produto amplificado do cDNA de linfócitos infectados utilizando o mesmo par de oligonucleotídeo. (C) Curva de amplificação do cDNA de linfócitos infectados com HAdV-41, utilizando o mesmo par de oligonucleotídeos. (D) Sobreposição da curva de denaturação da figura A e B.

Como pode ser observado na Figura 26A, não houve eliminação total do DNA presente na amostra, mas o perfil de amplificação demonstrado pelo gráfico de desnaturação nos permite concluir que a amplificação ocorrida foi não-específica. Como o SYBR *green* se intercala em qualquer dupla fita de DNA, os fragmentos de diversos tamanhos obtidos pela digestão pela DNase, apresentaram temperatura de desnaturação diferentes. Na Figura 26B observa-se um único pico de temperatura de desnaturação, evidenciando a especificidade da reação. Na figura 26D pode-se observar que a temperatura de desnaturação do produto amplificado a partir do cDNA é distinta das temperaturas de desnaturação obtidas da extração de RNA total tratado com DNase. Desta forma, podemos ter a garantia de que a reação de transcrição reversa foi dependente apenas do RNA presente na amostra. Na Figura 26C pode-se observar que o controle positivo apresentou um C_T de 13. Todas as amostras infectadas positivaram ao redor do 17º ciclo de amplificação, com exceção de uma única amostra que apresentou um C_T de 19. Este resultado permite-nos dizer que 48 horas após a infecção houve expressão do gene E1A do HAdV-41 em células mononucleares do sangue periférico.

5.6.3- Cinética de infecção do HAdV-41 em células HEK-293

Para analisar os resultados obtidos com a cinética de expressão gênica de HAdV-41 em PBMC, foi necessário primeiramente determinar seu comportamento em uma linhagem celular permissiva conhecida, as células HEK-293.

A expressão dos genes precoces E1A, E1B (55K) e E3 (14K) foram detectados 11h pós-infecção (Figuras 27, 28 e 29 respectivamente) indicando que o vírus leva mais de 10h para completar as etapas de adsorção, penetração, lise do endossomo, transporte até o núcleo, desnudamento, exposição do DNA e início da expressão gênica. As expressões gênicas dos genes tardios *hexon* e fibra curta foram detectadas 13h e 14h p.i. respectivamente (Figura 31 e 32). A expressão de VA RNA foi detectada 14h p.i. (Figura 30).

Os dados brutos de cT obtidos pela PCR em tempo real e os cálculos de quantificação relativa encontram-se em anexo (Anexo 2).

A expressão do gene E1A que se inicia às 11h p.i. atinge seu maior nível de expressão 24h p.i. (Figura 27). O gene E1B (55K) atinge seu maior nível de expressão 18h p.i. (Figura 28). O gene VARNA possui maior nível de expressão as 23h p.i (Figura 30), 14K (E3) as 24h p.i. (Figura 29), assim como o gene *hexon* e a

fibra curta possuem maior nível de expressão às 17h p.i. (Figura 31 e 32 respectivamente). Convém ressaltar que a cinética foi feita até 24h p.i.

Nossos resultados mostram que o ciclo infectivo do HAdV-41 em células HEK-293 inicia-se após 10h de infecção, evidenciada pela expressão do gene precoce E1A.

A expressão de E1A e E3 (14K) que se iniciaram concomitantemente, (11h p.i.) atingiram níveis equiparáveis de expressão, com E1A mostrando uma tendência de ascensão no nível de expressão. E3 (14K) mostrou uma tendência de equilíbrio, como observado no platô (Figura 33). Por sua vez, o gene E1B (55K) que também iniciou sua expressão às 11h p.i. teve seu nível de expressão aumentado drasticamente, no início da expressão, e após atingir um pico, teve sua expressão diminuída e voltou a se comportar como o gene E1A (Figura 33). O gene VARNA teve sua expressão inicial baixa e logo após a queda da expressão de E1B, ocorreu um pico de expressão que pareceu se manter, pelo menos até o tempo observado (24h) (Figura 33). Os genes *hexon* e fibra curta apresentaram um aumento geométrico no nível de suas expressões praticamente ao mesmo tempo, mas o gene *hexon* apresentou o maior pico de expressão, atingindo níveis superiores a 100.000 vezes em relação aos outros genes.

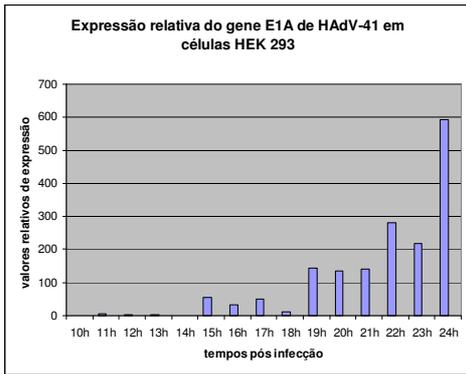


Figura 27: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene E1A em células HEK 293 inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

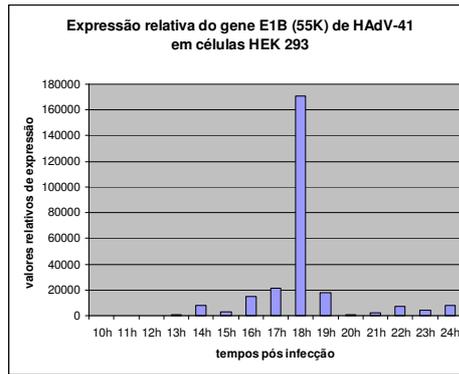


Figura 28: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene E1B (55K) em células HEK 293 inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

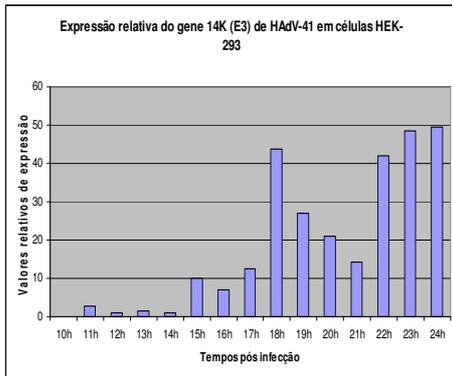


Figura 29: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene E3 (14K) em células HEK 293 inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

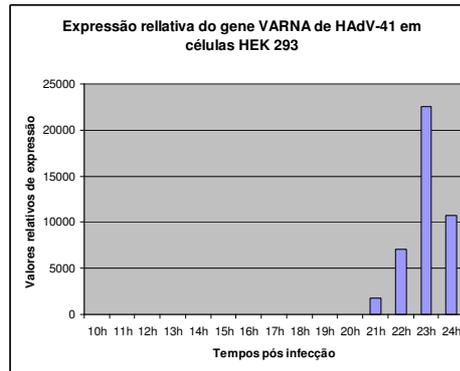


Figura 30: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene VARNA em células HEK 293 inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

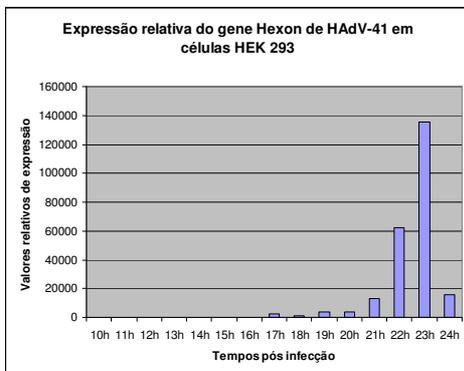


Figura 31: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene *hexon* em células HEK 293 inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

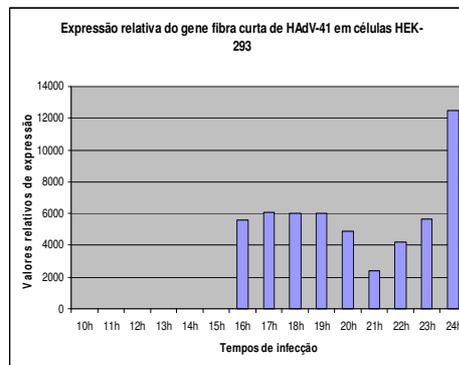


Figura 32: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene fibra curta em células HEK 293 inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

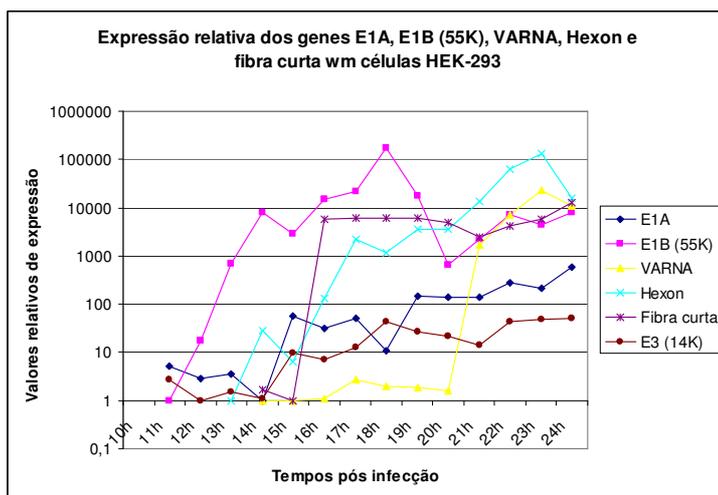


Figura 33: Curva logarítmica para visualização da dinâmica de expressão gênica de HAdV-41. Quantificação relativa da expressão dos genes E1A, E1B (55K), E3 (14K), VARNA, *hexon* e fibra curta de HAdV-41 em células HEK 293, inoculadas com 1MOI de HAdV-41 purificado.

5.6.4- Cinética de infecção do HAdV-41 em PBMC

A expressão gênica viral em PBMC foi detectada a partir de 17 horas pós-infecção.

Nas figuras 34, 35 e 36 respectivamente, encontram-se os dados da expressão relativa de E1A, E1B e VARNA. A expressão de *hexon* foi detectada a partir de 18h p.i. e a fibra curta 20h p.i. (Figuras 37 e 38). Essa diferença temporal entre, a expressão genes precoces e tardios, também foi observada na cinética feita em células HEK-293, no entanto a expressão de VARNA, em células HEK 293, só foi detectada 3h após a detecção da expressão de E1A.

Os dados brutos de cT obtidos pela PCR em tempo real e os cálculos de quantificação relativa encontram-se em anexo (Anexo 3).

O gene E1A apresentou maior nível de expressão 20h p.i. (Figura 34); E1B às 21h p.i. (Figura 35) e o gene VARNA às 20h p.i. (Figura 36). Por sua vez, o gene *Hexon* e fibra curta foram mais expressos às 24h p.i. (Figuras 37 e 38).

Vale ressaltar que não podemos inferir nada sobre a dinâmica de expressão do HAdV-41 após 24h p.i., porque não houve análise das células após este ponto.

Os valores relativos de expressão dos genes analisados em PBMC mantiveram, mais ou menos, o mesmo nível de expressão. O gene *hexon* mostrou uma tendência ascendente que não foi verificada na expressão dos genes VARNA, E1A e E1B, que apresentaram um platô. A expressão do gene fibra curta não mostrou nenhuma tendência definida. O nível de expressão do gene mais expresso (*hexon*) mostrou um valor relativo menor que 1000 (Figura 39).

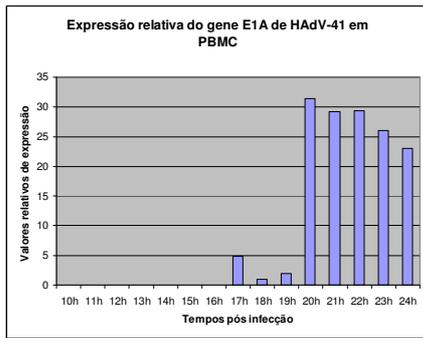


Figura 34: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene E1A em PBMC inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

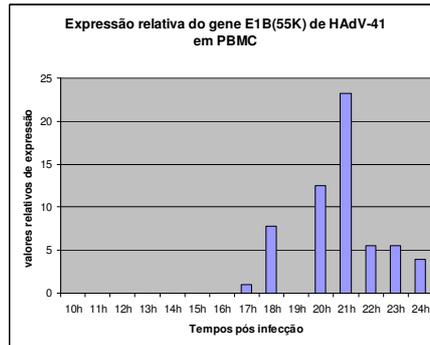


Figura 35: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene E1B (55K) em PBMC inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

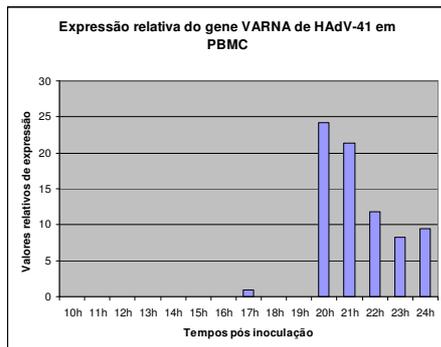


Figura 36: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene VARNA em PBMC inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

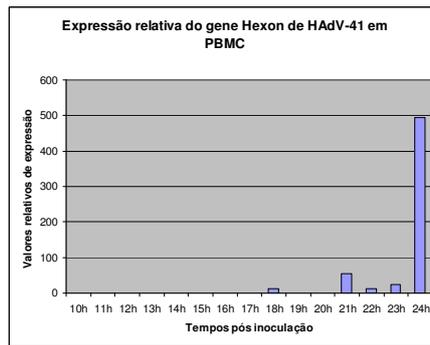


Figura 37: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene *hexon* em PBMC inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

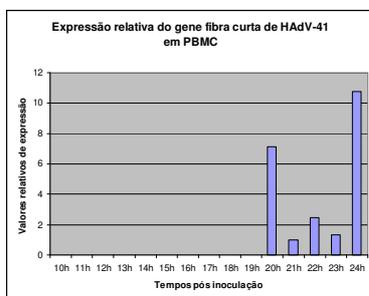


Figura 38: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene fibra curta em células PBMC inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

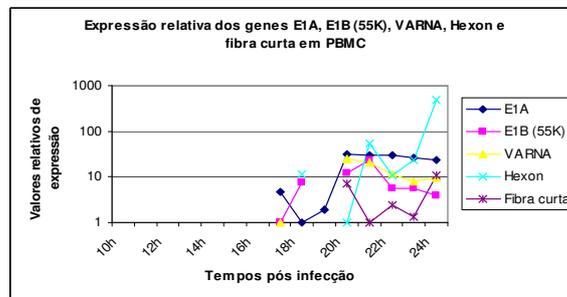


Figura 39: Curva logarítmica para visualização da dinâmica de expressão gênica de HAdV-41. Quantificação relativa da expressão dos genes E1A, E1B (55K), E3 (14K), VARNA, *hexon* e fibra curta de HAdV-41 em PBMC inoculadas com 1MOI de HAdV-41 purificado.

5.6.5 – Ensaio de infecção de HAdV-41 em IEL

Após a inoculação de IELs, oriundos de dois voluntários distintos, com HAdV-41 foi encontrado os seguintes resultados:

Figura 40: Gráfico da expressão gênica de HAdV-41 em IEL, obtidos do voluntário 1

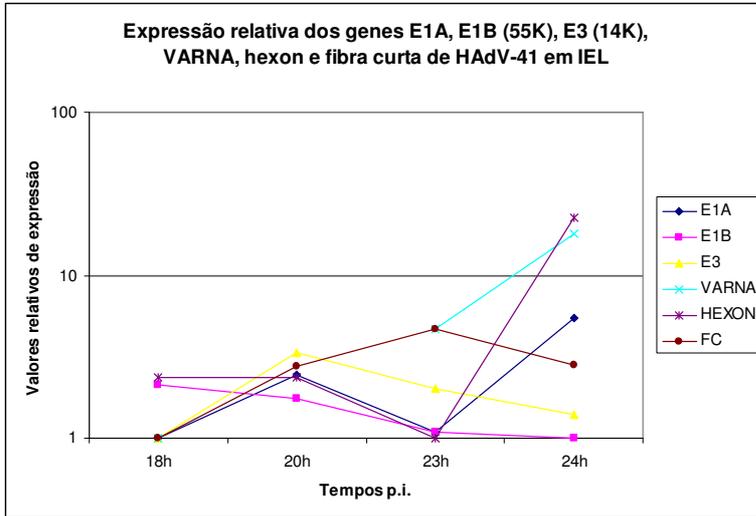
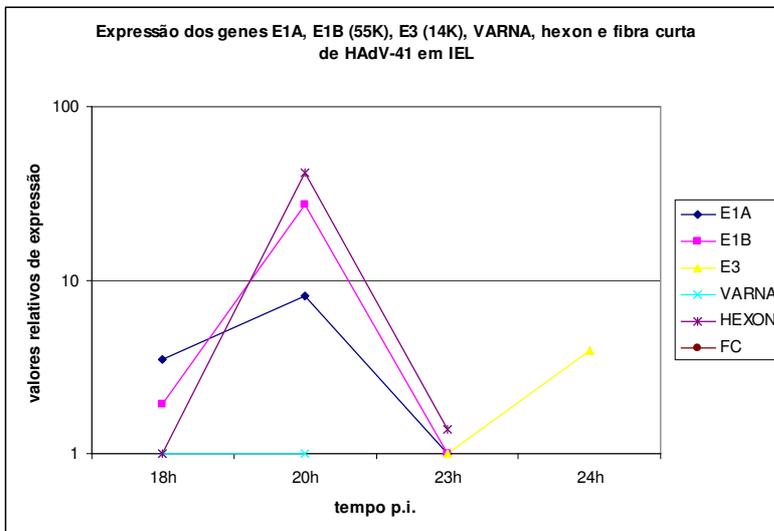


Figura 41: Gráfico da expressão gênica de HAdV-41 em IEL, obtidos do voluntário 2



As figuras 40 e 41 mostram que o HAdV-41 foi capaz de infectar IEL de voluntários diferentes, embora o comportamento da expressão dos genes virais tenha sido diferente. Na figura 40 é possível observar que todos os genes analisados expressaram, com destaque para a tendência de expressão do gene *hexon* e VARNA. A expressão dos genes precoces tiveram comportamento semelhante. Os genes mais expressos foram hexon e VARNA as 24h p.i. No voluntário 2, não houve a detecção da expressão do gene fibra curta e a expressão do gene hexon foi detectada as 18h, 20h e 23h p.i. e não mais as 24h p.i (Figura 41). O gene VARNA apenas foi detectado as 18h e 20h p.i., mas não apresentou uma tendência de ascensão, como demonstrado na figura 40. Ao contrário dos outros genes precoces, a expressão de E3 só foi detectada as 23h p.i. e mostrou uma tendência ascendente.

5.7- IFI DE PBMC INFECTADOS

Após a análise das lâminas em microscopia de fluorescência foram obtidos os seguintes resultados:

Tabela 8: Reação de imunofluorescência de PBMC infectados com diferentes MOI de HAdV-41(1, 5 e 10MOI) , detectados com os soro total anti-HAdV-41.

Soros	Voluntário 1	Voluntário 2	Voluntário 3
Soro total 1MOI	++	+++	++
Soro total 5MOI	NA	NA	+++
Soro total 10MOI	NA	NA	+++
Soro total ctrl	-	-	-

Legenda: NA – amostra não analisada; (-) amostra negativa

Este experimento prévio de detecção de proteínas virais em PBMC inoculados permite concluir que não só está ocorrendo a expressão gênica, como também há produção de proteínas. O número de células positivas foi maior nas células inoculadas com 10MOI do que em 1MOI. Não houve variação considerável entre as células inoculadas com 10 ou 5MOI. As células não inoculadas tinham pouca fluorescência de fundo.

Com o intuito de utilizar um soro anti-HAdV-41 em citometria de fluxo para determinar o tipo celular permissivo à infecção por HAdV-41, foram testados vários soros. Esses primeiros experimentos mostraram que os soros policlonais total e anti fibra curta assim como o monoclonal anti-Hexon foram capazes de detectar proteínas virais, com diferentes graus de intensidade. (Resultados não apresentados em tabela.) No entanto, o ruído de fundo observado na microscopia de fluorescência indicou que o soro policlonal total e o soro policlonal anti-fibra curta não eram ideais

para o uso em citometria de fluxo. Para tentar diminuir o ruído de fundo, os soros policlonais foram incubados com PBMC de voluntários para a retirada de anticorpos não específicos dos soros. Após esse procedimento, o experimento foi repetido com outros voluntários para determinar o nível de ruído de fundo do soro. Houve redução do ruído de fundo, mas não o suficiente para a realização da citometria de fluxo.

O soro monoclonal anti-Hexon mostrou a menor eficiência entre os soros testados e número de focos fluorescentes observado foi muito inferior em relação aos outros soros. No entanto, foi o que apresentou o menor nível de ruído de fundo. Nossos resultados indicam que o soro anti-fibra curta e o soro total, por revelarem com boa intensidade as células infectadas podem ser utilizados na citometria de fluxo, contanto que seja minimizado o ruído de fundo produzido. O anti-Hexon como apresentou resultados muito fracos na diluição utilizada (1/800) precisa ser titulado caso seja necessária a sua utilização em citometria de fluxo.

DISCUSSÃO

Muito pouco é conhecido sobre a interação dos adenovírus humanos com células do sistema imune. A maioria dos trabalhos existentes está focada no estudo do vetor adenoviral aplicado em terapia gênica (SHUANG, ENDO e NEMEROW, 1995; CHIRMULE et al, 1999; DOBBELSTEIN, 2004; IMPERIALE e KOCHANNEK; 2004, KOCH et al, 2001). No entanto, esses vetores são, em sua grande maioria baseados nos sorotipos 2 e 5, que pertencem a espécie C, que se difere em muitos aspectos do *Human adenovirus F* (TIEMESSEN e KIDD, 1995; TIEMESSEN e KIDD, 1994). Esta espécie apresenta grande potencial de uso em terapia gênica direcionada, no entanto, pouco se sabe sobre seu mecanismo de infecção *in vivo*, tipos celulares que interagem e mecanismos de evasão do sistema imune.

Os adenovírus interagem com CAR para reconhecer e entrar na célula alvo (BERGELSON et al, 1997; TOMKO, XU e PHILIPSON, 1997), mas o reconhecimento do receptor primário não é suficiente para explicar o tropismo apresentado pelas diversas espécies de adenovírus humanos (GRUBB et al, 1994; PICKLES et al, 1998; WALTERS et al, 1999; ZABNER et al, 1997). No epitélio intestinal, onde os *Human adenovirus F* preferencialmente se replicam, o receptor CAR está localizado na membrana basolateral das células, teoricamente inacessível para as partículas transientes no lúmen. Porém, já foi observado, nas células basais do epitélio respiratório, partículas virais e sub-produtos da replicação sendo liberadas no espaço paracelular, onde interagiriam com CAR, rompendo as *tight junction* e ocasionando o desmembramento do epitélio (WALTER et al, 1999). No entanto, o mecanismo de transporte das partículas virais até as porções basais do epitélio permanece um mistério. Provavelmente, algum mecanismo de transcitose pode estar envolvido, como ocorre na infecção por HIV das células M das placas de Peyer (JANEWAY et al, 2007).

Na mucosa intestinal, existem linfócitos especiais inseridos na camada epitelial, que diferem funcional e fenotipicamente dos outros linfócitos T (HASS et al., 1993). Essas células são pouco conhecidas e suas funções na resposta imune precisa ser elucidada. Sabe-se que são células muito importantes para manter o *status quo* do epitélio intestinal, sendo requeridas quando este é lesionado por fatores químicos, físicos ou biológicos (GOODMAN e LEFRANCOIS, 1988). Devido

a sua localização peculiar e alguns resultados prévios obtidos em nosso laboratório, surgiu a dúvida se essas células poderiam ser infectadas por adenovírus entéricos.

Para estudar a interação do HAdV-41 com essas células foi necessário estabelecer um ensaio prévio com células de origem hematopoiéticas, pois desconhecia-se os tipos celulares permissivos a esse vírus. Para isso, várias técnicas tiveram que ser padronizadas. Foi necessário obter partículas virais purificadas, estabelecer um protocolo de extração de linfócitos intraepiteliais de mucosa intestinal humana, estabelecer o espectro de detecção do genoma viral pelos métodos de PCR, *Nested-PCR* e PCR em tempo real, elaborar oligonucleotídeos específicos para HAdV-41 e padronizar a RT-PCR em tempo real, para poder ter subsídios para analisar a permissividade celular à infecção por HAdV-41.

6.1 - Produção, purificação e titulação de HAdV-41

A produção de HAdV-41 *in vitro* mostrou-se lenta se comparada com outros adenovírus (DE JONG et al, 1983). Em média, levamos 15 dias para a observação do efeito citopático (ECP) total nas células HEK-293 inoculadas. O ECP dos adenovírus da espécie F inicia-se com uma retração da monocamada celular e avança com formação de cachos celulares entre 5 a 7 dias após a infecção, que vão se tornando mais evidentes, até o descolamento total do tapete celular.

No processo de multiplicação do HAdV-41 a progressão é lenta, não lítica e ocorre a acumulação das partículas virais dentro da célula, diferentemente do que acontece no ciclo de multiplicação do HAdV-2. Em cultura de células de intestino delgado fetal infectadas, o HAdV-2 é liberado em grandes quantidades para o meio extracelular, enquanto os HAdV-41 produzidos permanecem no núcleo das células infectadas (TIEMESSEN et al, 1995). Esse resultado indica que os HAdV-41 não causam lise celular e estariam mais adaptados à multiplicação em um epitélio que descama, como o epitélio intestinal

Essa observação condiz com a falta de um gene da região E3, que produz uma proteína de 11,6 KDa denominada, *adenovirus death protein*. Essa proteína, apesar de estar localizada na região precoce, é expressa tardiamente e causa a lise celular (TOLLEFSON et al., 1996a; TOLLEFSON et al., 1996b). Nos *Human adenovirus C*, esta proteína está relacionada com a lise das células infectadas. Quando o gene que expressa a ADP é retirado do genoma ou sua expressão é

bloqueada, o vírus passa a apresentar um ciclo não lítico (TOLLEFSON et al, 2003). Por serem defectivos nessa proteína e não possuírem outros mecanismos similares que possam causar lise celular, os *Human adenovirus F* são incapazes de lisar as células durante seu ciclo replicativo. Por essa razão, esses vírus são liberados junto com as células, no processo de descamação epitelial, ou quando ocorre a morte celular por senescência ou outros fatores. Ainda não se sabe se os *Human adenovirus F* possuem algum mecanismo próprio para a liberação das partículas virais das células. De qualquer forma, esta estratégia apresenta algumas vantagens para os vírus, pois ao serem liberados no lúmen junto com as células, eles escapam da neutralização pelas IgA secretoras.

Nosso processo de purificação do HAdV-41 foi testado por dois métodos de concentração viral. No primeiro método, somente eram coletadas as monocamadas inoculadas, enquanto no segundo, foram também coletados os sobrenadantes.

A purificação viral é um procedimento necessário para que apenas partículas virais completas sejam utilizadas nos ensaios de infecção. Este procedimento elimina a possibilidade de que outras moléculas, como frações solúveis de proteínas virais, possam estar presentes no inóculo, interferindo no processo de reconhecimento do receptor celular pelo vírus. No entanto, este é um processo extremamente meticuloso e exige a produção de uma grande quantidade de vírus.

Como a purificação por gradiente de CsCl é feita por densidade diferencial, teve-se o cuidado de produzir duas quantidades de estoques virais para a purificação. A coleta da banda viral é baseada na refração da luz na massa protéica, podendo assim ser diferenciado da solução de CsCl. No primeiro estoque de purificação foram produzidos 20 frascos de 150cm² de células HEK-293 inoculadas e no segundo foram produzidos 42 frascos. Como mencionado anteriormente, o HAdV-41 é fastidioso e de difícil cultivo, tornando sua purificação uma etapa limitante, visto que é necessário uma grande quantidade de células infectadas para que as partículas virais atinjam um número crítico que possam ser visualizadas no gradiente de CsCl. Além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos de infecção utilizados pelos adenovírus da espécie F para se propagar entre as células. Por não apresentar um ciclo lítico, os *Human adenovirus F* podem apresentar duas vias de liberação das partículas virais: liberação apical ou liberação paracelular. Na liberação apical, as partículas virais são liberadas no sobrenadante e na via paracelular não há necessidade de liberação dessas partículas. Se a primeira via for utilizada pelos

adenovírus F, é de se esperar que haja uma quantidade considerável de partículas virais no meio de cultivo, razão pela qual optamos por também ultracentrifugar o sobrenadante das células inoculadas.

A purificação do primeiro lote foi mais difícil, pois a banda viral não foi facilmente visualizada dificultando a sua coleta. A visualização da banda viral no segundo lote foi bem mais fácil, evidenciando a importância de se obter grandes quantidades de partículas virais para facilitar o processo de purificação.

Após obter as partículas virais purificadas, foi feita a titulação do vírus por IFI. O título viral obtido para o primeiro lote foi $5,6 \times 10^6$ UFF/mL e para o segundo $2,3 \times 10^7$ UFF/mL, o que equivale $5,6 \times 10^4$ UFF/frasco e $2,74 \times 10^5$ UFF/frasco, respectivamente. Essa diferença de rendimento final de quase 5 vezes pode ser atribuída a maior concentração viral, devido ao maior número de partículas iniciais submetidas ao processo e, principalmente, pela concentração das partículas virais presentes no sobrenadante. Esses ensaios confirmam a importância da concentração viral do sobrenadante mesmo em vírus com ciclo não-lítico como o HAdV-41.

6.2 - Padronização dos métodos de detecção de DNA viral

Determinado o título viral, foi estabelecido o limiar de detecção do genoma viral pelos métodos citados anteriormente. Sabe-se que os linfócitos não são os sítios preferenciais de replicação dos adenovírus (MENTEL et al, 1997; FLOMEMBERG et al, 1997). Isto sugere que, se os adenovírus fossem capazes de infectar tais células, apenas uma pequena quantidade de genoma viral estaria presente, o que dificultaria sua detecção (HORVATH, PALKNONYAY e WEBER, 1986). Por outro lado, não era sabida qual a sensibilidade das técnicas de detecção de DNA viral que seriam aplicadas neste trabalho. Teoricamente, seria necessária apenas uma única fita de DNA para que a reação da PCR fosse positiva. No entanto, sabe-se que na PCR convencional, a distinção entre amostras positivas e negativas depende da percepção visual da banda formada no gel de agarose. Além disso, este processo não permite uma avaliação quantitativa do material amplificado. Na PCR em tempo real, o que determina a positividade da amostra é o acúmulo de fluorescência durante os ciclos de amplificação. Entretanto, ela também tem suas limitações, pois, caso a quantidade inicial de DNA seja muito baixa, a fluorescência acumulada poderá não ser suficiente para distingui-la do ruído de fundo.

Para nos assegurarmos de que as células expostas ao vírus estavam sendo infectadas ou não, foi necessário averiguar o limiar de detecção dos métodos utilizados. Nossos resultados mostraram que a PCR em tempo real foi a técnica mais sensível, sendo capaz de detectar amostras que continham pelo menos 10 partículas virais. Esses resultados estão bem próximos aos observados por JOTHIKUMAR e colaboradores (2005) que, trabalhando com o sistema *TaqMan* em PCR em tempo real, puderam detectar 8 cópias de HAdV-41 iniciais na reação. Neste trabalho, os autores utilizaram outra metodologia para a quantificação viral. Regiões específicas do genoma do HAdV-41 foram amplificadas e clonadas e os plasmídeos gerados foram considerados equivalentes genômicos. Estes foram quantificados em espectrofotometria, diluídos seriadamente na base 10 e utilizados para a construção da curva-padrão da PCR em tempo real. Este método é mais sensível, visto que apenas o material genético alvo na reação de PCR em tempo real é quantificado. No nosso método, todo DNA extraído pela técnica de HIRT (1967) é quantificado. No entanto, esta técnica permite uma extração seletiva de DNA baseada no seu peso molecular. Genomas muito grandes, como os celulares, são excluídos na primeira fase de extração, restando na fase líquida apenas os DNA de pequenos tamanhos, que foram precipitados com um meio alcoólico e baixa temperatura. Quando bem trabalhada a quebra cromossômica é minimizada e o DNA viral é extraído com mínima contaminação de DNA cromossômico. Nossos resultados permitiram concluir que nossa extração foi bem trabalhada, visto que obtivemos resultados semelhantes aos apresentados pelos autores citados acima.

Determinado o limiar de detecção do genoma viral, foi estabelecido um experimento prévio de infecção de células HEK-293 com HAdV-41 com amostras de baixa celularidade, visto que os linfócitos $T\gamma\delta$ são células de difícil obtenção e representam de 1 a 5% dos linfócitos T do baço e dos linfonodos de humanos e de camundongos (CHIEN et al, 2006). Neste ensaio foi possível determinar a presença do vírus em amostras com concentração de 5000 células HEK-293. Portanto, nossos métodos estavam adequados para detectar poucas cópias de DNA viral em poucas células infectadas.

Iniciamos então, os experimentos de infecção de linfócitos. Em um primeiro ensaio, inoculamos PBMC com HAdV-41 e detectamos a presença do DNA viral 48h p.i. Optamos pela análise do DNA viral, por que não sabíamos se os HAdV-41 teriam um ciclo abortivo em células hematopoiéticas, pois o vírus poderia conseguir entrar

na célula e ser degradado, entrar em latência ou ser replicado, dependendo do grau de permissividade apresentado pelas PBMC. A análise do DNA viral nos PBMC apresentou resultados animadores, no entanto, essa opção mostrou-se muito trabalhosa, principalmente pela dificuldade de eliminar a presença de DNA viral do sobrenadante. Mesmo após inúmeras lavagens, o DNA viral era detectado no sobrenadante. Sabíamos que esse fato, provavelmente, era decorrente de lise celular durante o processo de lavagem, mas isto impossibilitou que pudéssemos inferir algo sobre a permissividade do PBMC à infecção por HAdV-41. Consideramos que, se os PBMC estavam sendo infectados e o genoma viral estava presente mesmo após 48h de infecção, o vírus estaria em latência e, portanto, estaria expressando, ao menos, os genes precoces. Partimos, dessa maneira, para a análise da expressão gênica viral. Iniciamos pela análise da expressão de E1A e depois dos resultados positivos, analisamos os outros genes virais.

Nesses experimentos, pudemos constatar que os HAdV-41 não apenas conseguiram infectar essas células, como também replicar, como demonstrado pela expressão dos genes tardios. A expressão dos genes tardios é um marcador de replicação de DNA, visto que os genes tardios apenas iniciam sua expressão após o início da replicação do DNA viral (TIEMESSEN, NEL e KIDD, 1996).

Os resultados positivos observados nos PBMC infectados foram animadores, visto que esta é a primeira evidência de que este vírus possa infectar tais tipos celulares. Este é um dado inédito, já que a grande maioria dos trabalhos, envolvendo a interação de adenovírus e linfócitos, se restringe ao estudo da espécie C (COLIN et al., 2003; GARNETT et al., 2002; MENDEL et al., 1997; HUANG et al., 1996; LAVERY et al., 1987).

6.3 - Tropismo celular

Os *Human adenovirus F* têm a habilidade de replicar em diferentes linhagens celulares, como HEK-293 (BROWN, PETRIC e MIDDLETON, 1984; CHIBA et al, 1983; PIENIAZEK et al, 1990, TAKIFF, STRAUS e GARON, 1981; UHNO et al, 1983) e células KB (MAUTNER et al, 1989, WITT e BOUSQUET, 1988). Alguns autores sugerem que a permissividade de HEK-293 à infecção por HAdV-41 é resultado da expressão basal de produtos de E1A de HAdV-5, o qual pode complementar a função defectiva do E1A dos adenovírus da espécie F (TAKIFF, STRAUS e GARON, 1981). Outros autores dizem que fatores celulares E1A *like*,

como Hsp70, presentes apenas em células de linhagem contínua, poderiam complementar a função de E1A desses adenovírus (PIENIAZEK et al, 1990a). Foi observado também, que a expressão das proteínas E1A de HAdV-41, que são consideradas defectivas por outros autores, é efetiva em células infectadas, fato comprovado pelos produtos expressos por E1A de HAdV-41 que são capazes de trans-ativar mutantes HAdV-5 com E1A deletado (CROYLE et al, 1998).

Em um estudo de permissividade celular, foi comparado o crescimento de HAdV-2, HAdV40 e HAdV-41 sob as mesmas condições de cultivo: célula permissiva: células de rim de embrião humano (HEK-293); semi-permissiva: células da conjuntiva (células Chang) e não permissiva: fibroblastos de embrião humano (HEF). Em células Chang infectadas foram encontrados $2,4 \times 10^4$ UFF/mL de HAdV-2 e nenhum foco fluorescente para os HAdV40 e HAdV-41. Em células HEK 293 foi detectado as proteínas virais de HAdV-2 e HAdV-41, mas não do HAdV40. Nenhuma síntese protéica viral foi detectada em HEF. Com relação à síntese de DNA viral, foi detectado a replicação do HAdV-2, HAdV-40 e HAdV-41 em células Chang e HEK-293, mas não em células HEF. Esse resultado mostra que o HAdV-40 é mais fastidioso que o HAdV-41 (TIEMESSEN e KIDD, 1993).

Por essa e outras razões, a linhagem celular HEK-293 é considerada permissiva à infecção por HAdV-41 O cultivo eficiente destes vírus nestas células é obtido quando as células são mantidas em meio com baixa concentração de SFB (0,2%) e quando é aguardado o tempo necessário para a coleta das células infectadas (7 a 10 dias) (PIENIAZEK et al, 1990b).

Esses trabalhos corroboram nossos resultados, pois nosso sistema de infecção em células HEK-293, mostrou-se completamente permissivo, como demonstrado pelos altos títulos obtidos pós-cultivo e pela detecção de DNA, mRNA e síntese de proteína viral. Esses resultados também foram observados em PBMC inoculados, o que indica que essas células também se comportam como um sistema permissivo à infecção viral, embora tenha ocorrido baixa expressão gênica viral e baixo rendimento.

6.4 - Adenovírus e células linfóides

Embora os adenovírus tenham sido descobertos em cultura de adenóides (ROWE et al, 1953), esses vírus têm sido convencionalmente propagados em linhagens celulares de origem não linfóide. Ao contrário dos extensos estudos da

interação molecular entre os adenovírus e células de origem epidérmica (BERGELSON et al, 1997; DiGIULMI et al, 1995; MATHIAS et al, 1994 ROELVINK et al, 1998), pouco é conhecido sobre a biologia molecular dos adenovírus em células linfóides. Alguns trabalhos apontam a possibilidade de uma interessante interação entre produtos gênicos adenovirais e genes especificamente expressos em linfócitos B (BORRELLI et al., 1984 e 1986). Mas algumas questões ainda permanecem em aberto, por exemplo: como os linfócitos estão envolvidos na rota de infecção dos adenovírus?

A literatura é muito contraditória sobre a permissividade desses tipos celulares à infecção por adenovírus (FLOMENBERG et al., 1997; ALLARD, ALBINSSON e WADELL, 1992; GARNETT et al, 2002). As células da linhagem hematopoiética apresentam níveis variados da proteína CAR, geralmente baixos se comparados com células epidérmicas (COLIN et al., 2003). Dentre essas células, os linfócitos T são os que apresentam o maior nível de expressão desta proteína. Contudo eles não se mostram permissivos à replicação dos adenovírus da espécie C, sugerindo a existência de padrões alternativos para infecção adenoviral de células da linhagem hematopoiética (COLIN et al., 2003). Contraditoriamente, outros grupos têm relatado o estabelecimento de persistência em linhagens linfóides infectadas com adenovírus da espécie C, nas quais, o DNA viral é mantido e pequenas quantidades de partículas infecciosas são produzidas enquanto a célula mantém sua cinética de crescimento normal (CHU et al., 1992; FLOMENBERG et al., 1997; SILVER et al., 1988). Esses dados sugerem que os adenovírus da espécie C ter um ciclo replicativo alternativo em células linfóides, de forma persistente e não-lítica (GARNETT et al., 2002).

Os adenovírus contêm mais de 20 genes dedicados ao controle de vários aspectos da resposta imune inata ou adquirida das células hospedeiras. Algumas dessas funções não são necessárias para o sucesso da replicação do vírus *in vitro*, mas parecem ter processos alvos que são essenciais para a sobrevivência do vírus durante a fase aguda ou infecção latente, *in vivo* (HORWITZ, 2001).

A característica central das respostas das células hospedeiras à infecção viral é a ativação de genes celulares por interferonas ou outros mediadores solúveis. Interferon- γ (IFN) é um importante mediador na resposta celular à infecção viral e é baseada em sua capacidade de ativar genes anti-virais e induzir a célula hospedeira ao estado “anti-viral” (JOSEPH e LOOK, 2001). INF- γ é produzido por linfócitos T e

por células *natural killer*, que mediam efeitos nas células afetadas através de um receptor de alta afinidade ligado à uma quinase específica da família Janus- uma tradutora de sinal e ativadora de uma cascata de transcrição (JAK-STAT) (JOSEPH e LOOK, 2001).

Genes que são ativados durante a imunidade dependente de IFN- γ incluem: a molécula de adesão celular (ICAM-1), o complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC-I) necessário para o recrutamento e ativação de leucócitos; necessário para o processamento dos antígenos virais; a sintase induzida por óxido nítrico; as IFN- α/β que desempenham importante papel na citotoxicidade “anti-viral” e outros genes requeridos para o estabelecimento do estado “anti-viral” em células hospedeiras (JOSEPH e LOOK, 2001).

O sucesso dos adenovírus em estabelecer uma infecção produtiva depende da evolução de mecanismos virais capazes de evadir da resposta imune inata e adquirida. A evolução dos adenovírus tem gerado estratégias inibidoras que bloqueiam mais de um passo da cascata de sinalização da resposta imune dependente de IFN- γ (JOSEPH e LOOK, 2001). Muitos desses genes imunoregulatórios estão agrupados na região precoce 3 (E3), que podem inibir a apresentação de antígenos pelo MHC-I; a morte celular induzida por TNF- α , Fas- ou mecanismos TRAIL induzidos de citólise (WOLD et al., 1999). Além desses genes, os adenovírus possuem na região E1B duas proteínas inibidoras da apoptose, 55K e 19K, (ZHAO E LIAO, 2003; CHIOU et al,1994) e o gene VARNA que impede o reconhecimento de dsRNA viral produzidos durante o ciclo replicativo viral (KATZE et al., 1987; KITAJEWSKI et al., 1986)

Outra estratégia viral de evasão do sistema imune é a persistência viral. A habilidade de adenovírus da espécie C em estabelecer infecções persistentes, em tecidos linfáticos (tonsilas e adenóides), há muito é conhecida e metade de todas as infecções respiratórias causadas pela espécie C é seguida por persistência viral (FOX et al, 1969, FOX, HALL e COONEY, 1977). Essa persistência também foi observada em outras espécies de adenovírus, cuja liberação foi detectada durante meses nas fezes (espécie A, D e C) (ALLARD, ALBINSSON e WADELL, 1992) ou na urina (espécie B2) (ADRIANE et al, 1988; de JONG et al, 1983, FOX et al, 1969; FOX, HALL e COONEY, 1977; WADELL, 2000). Como o número de pacientes imunocompromidos tem aumentado, devido ao aumento de transplante de órgão e a

epidemia causada pelo HIV, a importância clínica de adenovírus persistente tem ganhado grande relevância (KOJAOGHLANIAN, FLOMENBERG e HORWITZ, 2003; SUPARNO et al., 2004; WALLS, SHANKAR e SHINGADIA, 2003). Entre os pacientes com transplante de medula óssea, estudos prospectivos recentes relataram que a incidência de infecções adenovirais varia de 20-30% (SUPARNO et al, 2004), o que sugere que os adenovírus eliminados nas fezes durante a persistência viral possam ser oriundos de placas de Petri infectadas (WADELL, 1984).

Células provenientes dos nódulos linfáticos, bem como células fagocitárias estacionárias podem também, ser encontradas em associação com o trato urinário. No entanto, a localização ou o tipo celular com Ads persistente que são eliminados nas fezes ou urina não foi determinado. *In vivo*, DNA de adenovírus C foi encontrado em linfócitos T tonsilar e um tipo celular não linfóide na tonsila (GARNETT et al, 2002), como demonstrado por citometria de fluxo de células derivadas de tonsilas e adenóides. No entanto, os Ads são raramente detectados em PBMC de indivíduos saudáveis (FLOMENBERG et al, 1997).

Entre os Ads C, o estabelecimento das linhagens hematopoiéticas infectadas já foi observado em vários trabalhos (ANDIMAN e MILLER, 1982; CHU et al.,1992; SILVER e ANDERSON, 1988). *In vivo*, esses adenovírus também são capazes de causar infecção primária de linfoma de células B, as quais, quando propagadas em cultura celular, mostraram características que foram similares àquelas descritas para infecções persistentes (FLOMENBERG et al, 1996).

A replicação persistente é caracterizada por infecção não lítica, por uma produção baixa, mas prolongada de vírions na célula e por cinética celular normal, o que indica que a síntese proteica celular não é inibida. Essas diferenças na interação vírus-célula indicam uma alteração na regulação da expressão gênica viral (MAHRS, BOSS e GOODING, 2003; McNEES et al, 2004) quando comparado com infecções líticas. Essas divergências são provavelmente causadas pelo ambiente celular, onde poderia estar ocorrendo uma restrição da replicação viral (MAHR, BOSS e GOODING, 2003; McNEES et al, 2004).

A latência e a persistência de adenovírus em hospedeiro humano há muito tem sido relatada, embora pouco se saiba sobre os mecanismos moleculares envolvidos nesta interação. A persistência ou reisolamento de adenovírus em hospedeiro humano normal já foi relatada 24 meses após o início da infecção (FOX

et al, 1969; HILLS et al, 1973) e acredita-se que os linfócitos, principalmente as células B, sejam os responsáveis pela manutenção da latência (ABKEN et al, 1987).

Outros autores relatam que os adenovírus latentes possam ser importantes na patogênese da doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), que ocorre em fumantes (MATSUSE et al, 1992). Neste trabalho, as seqüências de DNA da região E1A de adenovírus foram detectadas por PCR, mais freqüentemente em nódulos pulmonar de pacientes com COPD do que em pacientes sem obstrução do trato respiratório. Entretanto, a detecção de seqüências de DNA da região E3 não foi diferente nos dois grupos estudados. Além disso, DNA da região E1A foi encontrado em células epiteliais, sugerindo que o vírus deve estar envolvido no COPD. Em outro estudo em crianças, a infecção persistente por adenovírus foi associada à asma e a obstrução aérea crônica (MACEK et al, 1994), mas o significado desses resultados necessita de mais estudos. (LUKASHOK et al, 1997)

Adenovírus latente ou persistente poderia explicar o estado clínico em hospedeiros imunossuprimidos, os quais podem ser reinfectedados com um vírus endógeno durante o tratamento de imunossupressão. Entretanto, em pacientes com transplante renal, a infecção parece ser adquirida por um vírus exógeno, oriundo do órgão do doador. (HARNETT et al, 1982). Outra possível explicação deste tipo de infecção poderia ser a integração estável de seqüência de E1A e E1B de DNA de adenovírus, covalentemente ligado ao cromossomo do hospedeiro (MITANI, KUBO, 2002).

A região E1A mostrou-se ser suficiente para transformar células de roedores por vários sorotipos de adenovírus. Em modelos animais, foi demonstrado que alguns sorotipos, principalmente Ad12, Ad18 e Ad31, são altamente oncogênicos. Entretanto, maioria dos estudos fracassou ao associar a infecção por adenovírus com a etiologia de tumores humanos (GREEN et al; 1980; GREEN et al, 1979).

Mesmo com todos esses trabalhos algumas questões sobre a biologia dos adenovírus ainda precisam ser respondidas. O DNA latente pode reativar-se e produzir vírions infectivos? Quais espécies de adenovírus podem causar infecções persistentes ou latentes *in vivo*? Qual o significado desses achados para a história natural dos adenovírus? Quais são as perspectivas para a utilização desses adenovírus em terapia gênica? Porque os adenovírus são capazes de causar persistência em células de origem linfocitária e não em outras? Quais mecanismos moleculares estão envolvidos no estabelecimento da persistência?

6.5 - A cinética de expressão gênica de HAdV-41

A expressão temporal de cada gene do HAdV-41 foi condizente com sua posição no genoma viral. Assim, era de se esperar que os primeiros genes a serem expressos fossem E1A e E1B seguidos pelos genes L1 a L6 respectivamente, e a região E3 mais tardiamente (Figura 19).

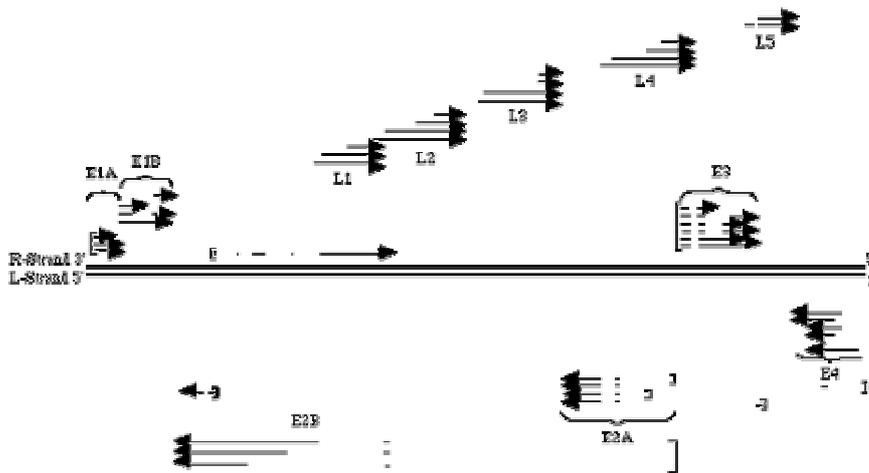


Figura 19: Mapa da posição gênica dos principais genes de adenovírus

A única exceção observada foi a expressão precoce de 14K, que deveria iniciar-se concomitante aos genes tardios. Essa particularidade será melhor analisada quando pudermos analisar outros genes da região E3.

A quantificação relativa dos diversos genes analisados mostrou-se coerente, com exceção ao pico de expressão apresentado pelo gene E1B (55K) as 18h p.i. Embora o experimento tenha sido feito em triplicata, esse é um ponto que merece uma atenção maior para maiores conclusões. Um fato interessante foi o pico de expressão de VARNA sucedido pela baixa da expressão de E1B. Uma das funções de E1B (55K) é bloquear o transporte de MHC de classe I para a superfície celular e assim tornar a célula infectada “invisível” os linfócitos T citotóxicos, responsáveis pela eliminação de células senescentes e infectadas. Dessa forma, E1B previne que

os adenovírus sejam destruídos até que VARNA esteja disponível em quantidades suficientes para subverter a defesa celular, baseada em $IFN\alpha$. Assim, esse dois genes trabalham em sinergia para garantir uma proteção mínima à replicação dos adenovírus até que todos os mecanismos de defesa do adenovírus, situados na região E3, estejam em funcionamento.

Outros autores já estudaram a cinética de infecção de adenovírus (BINGER e FLINT, 1984). No entanto, neste estudo os autores trabalharam com HAdV-5 que pertence a espécie C, em células HeLa e intervalo de análise de 2 horas. Como nesta época não estava disponível a tecnologia do PCR em tempo real, os autores analisaram a expressão gênica viral por *Northern Blotting*. Os autores observaram que os mRNA virais E1A, E3 e E4 foram detectados de 4-6 h p.i.; E2A e E2B 8h p.i e L1 só foi detectado 10-12h p.i. Os membros das famílias de L3 (Hexon) e L5 (Fibra) aparecem 14h p.i.

Nossos resultados mostraram que o HAdV-41 apresenta um ciclo lento, tendo os primeiros genes expressos após 10h p.i., 6 horas após a detecção dos primeiros genes em HAdV-5. Esse atraso pode ser atribuído a adsorção, penetração e/ou transporte até o núcleo. A espécie C e F reconhecem CAR como receptor primário, embora com diferenças de afinidades, no entanto a espécie C penetra na célula por reconhecimento das integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ presentes na membrana celular. Como resultado desta interação, ocorre a internalização da partícula viral, por mecanismo de endocitose mediada por clatrina (MATHIAS et al, 1994). A espécie F não reconhece essas integrinas e não há conhecimento sobre quais proteínas são usadas na internalização viral ou quais vias de entrada utilizadas por essa espécie. Outra possível causa desse ciclo lento em adenovírus F pode estar na via de transporte até o núcleo. A espécie C lisa o endossomo inicial, através da liberação de suas fibras que são citotóxicas. Após a lise o vírus está livre para utilizar os mecanismos de transporte de vesículas para se direcionar ao núcleo. Na espécie F desconhece-se a via utilizada para o transporte até o núcleo.

Por fim, nossos dados mostram que os adenovírus da espécie F apresentam um ciclo lento quando comparado com a espécie C. No entanto, a dinâmica de expressão foi quase idêntica, mostrando a clássica expressão dos genes precoces sucedidos pelos genes tardios.

A cinética de expressão de HAdV-41 em PBMC apresentou um atraso em relação a cinética feita em células HEK-293. Esse atraso no ciclo infectivo em PBMC

em comparação com HEK-293, pode ser atribuído a etapa de adsorção e/ou fatores celulares de transcrição. A adsorção é dependente do reconhecimento do receptor CAR, o qual é raramente encontrado em células mononucleares do sangue periférico (COLIN et al, 2004). Se a infecção é decorrente do reconhecimento de outro receptor celular ainda não descrito, sua dinâmica de adsorção pode ser diferente daquela descrita para a proteína CAR. Na ausência do receptor primário (CAR), a entrada dos adenovírus pode ser feita por reconhecimento direto dos co-receptores (integrinas), mas neste caso ocorre um retardo na entrada do vírus na célula e sua eficácia é de aproximadamente 10 %.

Fatores de transcrição celular também podem influenciar na dinâmica viral, tornando a célula mais ou menos permissiva a replicação do vírus, dependendo se permite uma maior ou menor expressão dos genes virais.

A expressão temporal foi quase idêntica à observada em células HEK-293, com exceção do gene VARNA. Esse intervalo de tempo entre a expressão dos genes precoces e tardios, era esperado devido à localização dos genes no genoma do vírus. A expressão precoce de VARNA em PBMC pode indicar que, pode haver uma interação diferente dos mecanismos de regulação gênica viral e celular daquela encontrada em células HEK-293. Isto poderia acarretar em uma expressão precoce ou tardia de determinado gene viral.

Nossos dados mostraram que houve a replicação completa do HdV-41, como mostrado pela expressão dos genes tardios. A expressão dos genes tardios é um marcador para indicar que houve replicação do genoma dos adenovírus. Nossos dados mostraram também, que os níveis de expressão gênica do HAdV-41 em PBMC é da ordem de 200 vezes menor que observado em células HEK-293, visto que foram utilizados o dobro de células na cinética em PBMC em relação à HEK-293. Isso pode indicar que poucas partículas virais entraram nessas células e, provavelmente, poucas estão sendo formadas. Essa estratégia de multiplicação inicial do inoculo pode ser um mecanismo de evasão, para que, depois de atingir níveis consideráveis, os adenovírus possam replicar em suas células alvos preferenciais.

6.6 - Ensaios de infecção de linfócitos intraepiteliais de mucosa intestinal humana.

Após de verificar que células de origem linfóide são permissíveis à infecção por HAdV-41, analisamos a permissividade dos linfócitos intraepiteliais de mucosa intestinal. Para obtê-los várias técnicas de extração celular foram testadas.

Muitas técnicas tem sido desenvolvidas para a cultura primária de um determinado tecido isolado. Essas técnicas podem ser divididas em puramente mecânicas, as quais envolvem dissecação, com ou sem alguma forma de maceração, e técnicas que utilizam desagregação enzimática. A dissecação de explantes primários é recomendada quando uma pequena quantidade de tecido está disponível. A desagregação enzimática é recomendada quando há uma maior disponibilidade de tecido e uma alta taxa de recuperação é requerida. A desagregação mecânica é recomendada quando grande quantidade de tecidos moles está disponível, mas a taxa de rendimento não é um parâmetro a ser considerado (FRESHNEY, 2000).

O método de extração de linfócitos intraepiteliais pelo método de cultura de explante se mostrou inviável. A taxa de recuperação celular foi inferior a todos os outros métodos testados, além de ser muito difícil de controlar a contaminação microbiana das amostras. Aumentamos a dose de antibióticos utilizada em todos os reagentes da extração, mas não conseguimos controlar de maneira satisfatória a contaminação na cultura de explante. Isso pode ter ocorrido porque as bactérias da flora intestinal por apresentarem adesinas específicas são extramente aderentes, tornando difícil sua remoção mecânica pelos processos de lavagens aplicados. Outra razão a ser considerada é que utilizamos como controle bacteriano apenas os antibióticos penicilina G e a estreptomicina. Para um melhor controle microbiano seria ideal adicionar um outro antibiótico de largo espectro e de baixa toxicidade às células.

O método de isolamento de linfócitos intraepiteliais descrito por Mosley e Klein (1992), não se mostrou adequado em nosso trabalho. Obtivemos grande rendimento da extração, mas as células não permaneciam viáveis por muito tempo, ocorrendo grande perda celular em menos de 24h. Isto pode ter ocorrido por diversas razões: a agitação magnética pode ter gerado um grau de cisalhamento celular que se tornou irreversível, levando as células à morte por dano físico. O EDTA utilizado na solução de extração, o qual é um quelante de Ca^{++} e Mg^{++} , pode ter sido outra variável responsável pela morte celular, pois os linfócitos parecem ser muito mais sensíveis a

variações de Ca^{++} e Mg^{++} que as linhagens celulares estabelecidas. O período de exposição ao EDTA pode ter causado uma diminuição do Ca^{++} e Mg^{++} intracelular o que ocasionou na ruptura do equilíbrio iônico intracelular que não pode ser reparado, levando as células à morte.

No caso da extração enzimática utilizando tripsina, nosso trabalho mostrou que o método de tripsinização a frio obteve maior rendimento em relação a tripsinização a quente e em nenhum dos casos houve perda celular na magnitude observada no método de Mosley e Klein (1992). No entanto, o uso da tripsina em métodos de extração celular apresenta algumas desvantagens. Uma delas é o dano que pode resultar da exposição prolongada do tecido a tripsina a 37°C . Este fato nos obriga a colher as células expostas a cada 30 minutos de incubação no método de tripsinização a quente, ao invés de deixá-las expostas pelo período integral (4 horas) que é necessário para que haja a desagregação total do tecido. Isto torna o método extremamente cansativo, visto que são necessárias a coleta, limpeza e fragmentação do tecido antes de extrair as células. O tempo necessário para todas essas etapas inviabiliza seu uso rotineiro. Um método simples, para minimizar o dano às células durante a desagregação, é incubar o tecido na tripsina a 4°C , para permitir a penetração da enzima no tecido e manter sua atividade proteolítica baixa. Seguindo esse procedimento, o tecido necessitou menos tempo de incubação a 37°C para a desagregação (COLE e PAUL, 1966), tornando menos cansativo a extração das células, facilitando a realização dos procedimentos laboratoriais.

Dessa forma, o protocolo de extração de IEL adotado foi a tripsinização à frio, como método de extração celular. No entanto, para a separação dos linfócitos e hemácias, optamos por outro método de separação, pois no protocolo original utiliza-se um tampão de lise diferencial que não foi detalhado no trabalho. Como qualquer alteração em tampões de lise pode causar efeitos irreversíveis no experimento utilizamos um gradiente de Percoll seguido de um gradiente de Ficoll, para separação celular. Desta forma, foram separados os linfócitos e hemácias dos enterócitos e, no segundo gradiente os linfócitos das hemácias. Desta forma, conseguimos obter os linfócitos intraepiteliais de mucosa intestinal em quantidades razoáveis para a realização de nossos experimentos.

Após a obtenção e inoculação dos IELs, com HAdV-41 foi detectada a expressão dos genes virais em experimento de infecção com células de dois

voluntários distintos.. Esse dado, também inédito, evidencia a capacidade do HAdV-41 de interagir com células de origem hematopoiética.

Embora os adenovírus tenham infectado IEL desses dois voluntários, o perfil de expressão viral foi distinto. No voluntário 2, por alguma razão, a expressão do gene tardio fibra curta não foi detectada. As expressões do gene hexon e dos genes precoces E1A e E1B também não foram detectadas após 24h de inoculação. Surpreendentemente, a expressão do gene E3 aparenta uma tendência de ascensão a partir de 23h. Isto pode sugerir, que neste caso, o vírus possa estar desenvolvendo uma latência, sem a expressão dos genes estruturais e pouca expressão dos genes regulatórios da região de transcrição precoce. No entanto, para verificar esta possibilidade, outros experimentos de infecção, com voluntários diferentes, terão que ser realizados. No voluntário 1, houve a detecção expressão de todos os genes virais testados e apresentou perfil de expressão semelhante ao apresentado pelo ensaio de infecção de PBMC, embora o nível de expressão tenha sido, aparentemente 10 vezes menor.

6.7 - Imunofluorescência indireta para detecção de adenovírus em PBMC .

A reação de IFI de proteínas virais foi feita com o objetivo de padronizar um soro anti-HAdV-41 para a identificação do tipo celular permissivo à infecção viral, por citometria de fluxo dos PBMC inoculados

Os resultados obtidos comprovaram que o soro policlonal anti-HAdV-41 total e anti-fibra curta detectavam a presença de proteínas virais em PBMC infectados, porém com diferentes graus de sensibilidade. Não sabemos quais proteínas foram detectadas, mas, nossos resultados da cinética de expressão indicam que, nos linfócitos infectados há produção não apenas das proteínas precoces, como também, de hexon e fibra. Isto indica replicação viral e formação de capsídeos virais. Este resultado é mais um indicativo de que está ocorrendo uma infecção produtiva nessas células

O ruído de fundo produzido pelos anticorpos policlonais foi considerável, pois para o uso em citometria de fluxo o anticorpo deve emitir o mínimo de *background* para permitir a compensação do equipamento. Mesmo após o bloqueio dos anticorpos inespecíficos, feito com PBMC não inoculados, o ruído de fundo permaneceu significativo. Uma saída para tentar melhorar a especificidade desses

soros é a purificação e precipitação de IgG por ácido caprílico e proteína A. Outra alternativa seria a titulação do monoclonal anti-hexon, que apresentou o menor ruído de fundo, mas apresentou baixa eficiência, para verificar sua sensibilidade em citometria de fluxo. A caracterização fenotípica da célula hematopoiética permissiva é importante porque nos fornece indícios de qual mecanismo de entrada e evasão o HAdV-41 está utilizando para infectar tais células.

Ao infectar a mucosa intestinal, a primeira célula de origem linfóide que os HAdV-41 entram em contato é o IEL. É interessante notar, que essas células, composta em sua maioria de linfócitos T $\gamma\delta$ não reconhecem MHC I e por conseqüência não respondem à apresentação de antígenos. Coincidentemente, os *Human adenovirus F* e *Human adenovirus A*, que são os adenovírus humanos preferencialmente entéricos, são defectivos na proteína adenoviral gp19K, responsável pela retenção de moléculas de MHC I no RE. Coincidência ou não, a falta desta proteína não foi um fator de pressão seletiva negativa, visto que esses vírus são bem adaptados à replicação no intestino. Cabe ressaltar, que este pode ser um exemplo de co-evolução parasita-hospedeiro, onde um “molda” características essenciais no outro, em perfeito equilíbrio. Resta-nos saber se os *Human adenovirus F* são capazes de utilizar essa brecha no sistema imune e infectar especificamente essas células, como meio de dispersão pelo organismo ou persistência e evasão do sistema imune.

CONCLUSÕES

7.1 – O HAdV-41 é capaz de infectar PBMC

7.2 – O HAdV-41 é capaz de infectar IEL

7.3 – A expressão gênica de HAdV-41 em PBMC inoculadas mostrou ser 200 vezes menor do que em células HEK 293 inoculadas

7.4 – E expressão gênica de HAdV-41 em IEL inoculados mostrou ser 10 vezes menor do que em PBMC inoculadas.

7.5 – Foi possível a detecção de síntese de proteína viral observada por IFI

7.6 - Ultracentrifugar o sobrenadante de cultura aumenta o título do HAdV-41 purificado

7.7 – A PCR convencional é capaz de detectar 217.500 partículas iniciais de HAdV-41

7.8 – A reação de *Nested* PCR é capaz de detectar 21,75 partículas iniciais de HAdV-41

7.9 – A PCR em tempo real é capaz de detectar 10,4 partículas iniciais de HAdV-41

7.10 – O oligonucleotídeo Hexon F é capaz de diferenciar a espécie F dos demais adenovírus na reação de *Nested* PCR a partir do amplificado de uma PCR genérica para a região do gene hexon.

7.11 – O método de tripsinização a frio seguido de separação de IEL por gradiente de Percoll e Ficoll, mostrou-se o melhor método para a separação e purificação de IEL de mucosa intestinal humana.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS

NBR 6023: Informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro – RJ: ABNT, 2000, 22p.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals index Medicus, 2007.

Available from:

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi

www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. Massachusetts: W.B. Saunders Company, 2005

ABKEN H, BUTZLER C, WILLECKE K. Adenovirus type 5 persisting in human lymphocytes is unlikely to be involved in immortalization of lymphoid cells by fusion with cytoplasts or by transfection with DNA of mouse L cells. **Anticancer Res.** p.7:553–558, 1987.

ADRIAN,T.; WADELL, G.; HIERHOLZER, J. C.; WIGAND, R. DNA restriction analysis of adenovirus prototype 1 to 41. **Arch. Virol.**, v.91, p.277-290, 1986.

ALBERTS, B.; BAY, D.; LEWIS, J. et al. **Molecular Biology of the cell**. 3° edition, New York: Garland Publishing Inc, 1994

ALBINSSON, B.O.; KIDD, A. Adenovirus type 41 lacks an RGD $\alpha\beta$ -integrin binding motif on the penton base and undergoes delayed uptake in A549 cells. **Virus Research.**, v.64, p. 125-136, 1999).

ALLARD, A., ALBINSSON, B., AND WADELL, G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **J Med Virol.**, v. 37, n. 2, p.149-57, 1992.

ALLISON, J. P. CD28-B7 interactions in T-cell activation. **Curr Opin Immunol.**, v. 6, n. 3, p. 414-9, 1994.

AMBRIOVIC-RISTOV, A., MERCIER, S., ELOIT, M. Shortening adenovirus type 5 fiber shaft decreases the efficiency of postbinding steps in CAR-expressing and nonexpressing cells. **Virology.**, v. 312, n. 2, p. 425-33, 2003.

ANDERSSON,M.; PÄÄBO,S.; NILSSON,T.; PETERSON P.A Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as possible means for adenovirus to evade immune surveillance. **Cell.**, v. 43, p. 215-222, 1985.

ANGELETTI, P.C. & ENGLER, J.A. Adenovirus preterminal protein binds to the CAD enzyme at active sites of viral DNA replication on the nuclear matrix. **J. Virol.**, v. 72, p. 2896-2904, 1998.

ARNBERG, N., KIDD, A. H., EDLUND, K., NILSSON, J., PRING-AKERBLOM, P., WADELL, G. Adenovirus type 37 binds to cell surface sialic acid through a charge-dependent interaction. **Virology.**, v. 302, n. 1, p. 33-43, 2002.

ARNBERG, N., PRING-AKERBLOM, P., and WADELL, G. Adenovirus type 37 uses sialic Acid as a cellular receptor on Chang C cells. **J Virol.**, v. 76, n. 17, p. 8834-41, 2002.

ARNBERG, N.; MEI, Y.; WADELL, G. Fiber genes of adenoviruses with tropism for the eye and the genital tract. **Virology.** v.227, p. 239-244, 1997.

ARNBERG,N.; EDLUND, K.; KIDD,A.H. & WADELL,G. Adenovirus type 37 uses sialic acid as cellular receptor. **J. Virol.**, v. 74, p. 42-48, 2000.

- ASAOKA, K., TADA, M., SAWAMURA, Y., IKEDA, J., ABE, H. Dependence of efficient adenoviral gene delivery in malignant glioma cells on the expression levels of the Coxsackievirus and adenovirus receptor. **J Neurosurg.**, v. 92, n. 6, p. 1002-8, 2000.
- BAI, M.; HARFE B.; FREIMUTH,P. Mutations that alter and Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells. **J Virol.**, v. 67, n. 9 p. 5198-5205, 1993.
- BALUCHAMY , S.; SANKAR, N.; NAVARAJ, A.; MORAN, E.; THIMMAPAYA. Relationship between E1A binding to cellular proteins, c-myc activation an S-phase induction. *Oncogen.* V.26, p.781-787, 2007
- BARCLAY, A. N., BROWN, M. H., LAW, S. K. A., McKNIGHT, A. J., TOMLINSON, M. G., van der MERWE, P. A. **The Leukocyte Antigen facts book.** New York: Academic Press, Harcourt Brace and Company, Publishers, 1997.
- BARILLA-LABARCA, M. L., LISZEWSKI, M. K., LAMBRIS, J. D., HOURCADE, D., ATKINSON, J. P. Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. **J Immunol.**, v. 168, n. 12, p. 6298-304, 2002.
- BENKÖ,M.; HARRACH,B. & RUSSEL, W.C. Adenoviridae. *In*: VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.V., BISHOP, D.H.L. (Ed.). **Virus Taxonomy. Seventh Report of Internacional Committee on Taxonomy of Viruses.** San Diego: Academic Press, 1999. p. 227-238.
- BERGELSON, J.M.; CUNNINGHAM, J.A.; DROGUETT, G.; KURT-JONES, E.A.; KRITHIVAS, A.; HONG, J.S.; HORWITZ, M.S.; CROWELL, R.L. & FINBERG, R.W. Isolation of common receptor for Coxsackie B viruses and Adenoviruses 2 and 5. **Science.**, v. 275, p. 1320-1323, 1997.
- BERK, A. J., LEE, F., HARRISON, T., WILLIAMS, J., and SHARP, P. A. Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. **Cell.**, v. 17, n. 4, p. 935-44, 1979.
- BEWLEY, M. C., SPRINGER, K., ZHANG, Y. B., FREIMUTH, P., FLANAGAN, J. M. Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. **Science.**, v. 286, n. 5444, p. 1579-83, 1999.
- BINGER, M. H., FLINT, S. J. Accumulation of early and intermediate mRNA species during subgroup C adenovirus productive infections. **Virology.**, v. 136, n. 2, p. 387-403, 1984.
- BISCHOFF, J. R., KIRN, D. H., WILLIAMS, A., HEISE, C., HORN, S., MUNA, M., Ng, L., Nye, J. A., SAMOSON-JOHANNES, A., FATTAEY, A., and McCORMICK, F. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. **Science.**, v. 274, n. 5286, p. 373-6, 1996.
- BRIDGE, E., KETNER, G. Redundant control of adenovirus late gene expression by early region 4. **J. Virol.**, v. 63, n. 2, p. 631-8, 1989.
- BROCKMANN, D., ESCHE, H. The multifunctional role of E1A in the transcriptional regulation of CREB/CBP-dependent target genes. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 272, p. 97-129, 2003.
- BROWN, M.; PETRIC, M.; MIDDLETON, P. J.; Diagnosis of fastidious enteric adenovirus 40 and 41 in stool specimens. **J. Clin. Microbiol.** V.20, p. 334-338, 1984
- BURGETT, H.G.; MARYANSKI, J.L.; KVIST, S. E3/19K protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytolytic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 1356-1360, 1987.
- BURGETT,H.G.; BLUSCH,J.H. Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. **Virus Genes.**, v. 21, n.1/2, p. 13-25, 1999.

- CAO, J. ARULANANDAN, R.; VULTUR, A; ANAGNOSTOPOULOUS,A.; RAPTIS, L. Adenovirus E1A requires c-Ras for full neoplastic transformation or supresion of differentiation of murine preadipocytes. **Molecular Carcinogenesis**. V.46, p.284-302, 2007
- CARTER, T. H., AND GINSBERG, H. S.. Viral transcription in KB cells infected by temperature-sensitive "early" mutants of adenovirus type 5. **J.Virol**. v.18, n.1, p.156-166, 1976.
- CATTANEO, R.. Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. **J. Virol**. v.78, n.9, p.4385-4388, 2004.
- CHEN, H.; VINNAKOTA, R.; FLINT, S.J. Intragenic activating and repressing elements control transcription from the adenovirus lva2 initiator. **Mol Cell Biol**. v.14, n.1, p. 676-685, 1994
- CHIBA, S.; NAKATA,S.; NAKAMURA, I.; TANIGUCHI, K.; URASAWA,S.; FUJINAGA, K.; NAKAO, J. Outbreak of infantile gastroenteritis due to type 40 adenovirus. **Lancet**. p.954-957, 1983
- CHIEN, Y.; BONEVILLE,M. Gamma delta receptors. **Cell. and Mol. Life Sciences.**, v. 63, p. 2089-2094, 2006.
- CHIEN, Y.H.; JORES, R.; CROWLEY, M.P. Recognition by gamma/delta T cells. **Annu. Rev. Immunol**. v.14, p.511-532, 1996
- CHILLON, M., BOSCH, A., ZABNER, J., LAW, L., ARMENTANO, D., WELSH, M. J., AND DAVIDSON, B. L. Group D adenoviruses infect primary central nervous system cells more efficiently than those from group C. **J. Virol.**, v. 73, n. 3, p. 2537-40, 1999.
- CHIOU, S. K., RAO, L., AND WHITE, E. Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. **Mol Cell Biol.**, v. 14, n. 4, p. 2556-63, 1994.
- CHIOU, S. K., TSENG, C. C., RAO, L., AND WHITE, E. Functional complementation of the adenovirus E1B 19- kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. **J. Virol.**, v. 68, n. 10, p. 6553-66, 1994.
- CHIRMULE, N.; PROPERT, K. J.; NAGOSIN, S.A.; QIAN, Y.; QIAN, R.; WILSON, J.M. Immune responses to adenovirus and adeno associated virus humans. **Gene Therapy**. v.6, p.1574- 1583, 1999
- CHIU,CY.; MATHIAS, P.; NEMEROW,G.R.; STEWART,P.L. Structure of adenovirus complexed with its internalization receptor $\alpha\beta 5$ integrin. **J. Virol.**, p. 6759-6768, 1999.
- CHROBOCZEK, J., BIEBER, F., AND JACROT, B. The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. **Virology.**, v. 186, n. 1, p. 280-5, 1992.
- CHROBOCZEK, J.; RUIGROK, R.; CUSAK, S. Adenovirus fiber. In: DOEFLER W., BOEHM, P. **The molecular repertoire of Adenoviruses**. Berlin/ New York: Springer- Verlag, 1995. p. 163-200.
- CHU, Y., HEISTAD, D., CYBULSKY, M. I., DAVIDSON, B. L. Vascular cell adhesion molecule-1 augments adenovirus-mediated gene transfer. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 2, p. 238-42, 2001.
- CHU, Y.; SPERBER,K.; MAYER, L.; HSU, M.T. Persistent infection of human adenovirus type 5 in human monocytes cell lines. **Virology.**, v.188, p. 793-800, 1992.
- CHU, Y; HEISTAD, D.D.; CYBULSKY,M.I.; DAVINSON, B.L. Vascular cell adhesion molecule -1 augments adenovirus- mediated gene transfer. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v.21, p.238-242, 2001
- COHEN, C. J., SHIEH, J. T., PICKES, R. J., OKEGAWA, T., HSIEH, J. T., BERGELSON, J. M. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 98, n. 26, p. 15191-6, 2001.

- CROWLEY, M.P.; FAHRER,A.M.; BAUMGARTH, N.; HAMPL, J.; GRUTGEMANN, I.; TEYTON, L.; CHIEN, Y. A population of murine $\gamma\delta$ cells that recognise an inducible MHC class Ib molecule. **Science**. v.287, p.314-316, 2000.
- CROYLE, M. A.; STONE, M.; AMIDON, G. L.; ROESSLER, B. J. In vitro and in vivo assessment of adenovirus 41 as a vector for gene delivery to the intestine. **Gene Therapy**. v.5, p. 645-654, 1998
- DALES, S., CHARDONNET, Y. Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. **Virology**., v. 56, n. 2, p. 465-83, 1973.
- DAVISON, A. J., TELFORD, E. A., WATSON, M. S., MCBRIDE, K., AND MAUTNER, V. The DNA sequence of adenovirus type 40. **J. Mol. Biol.**, v. 234, n. 4, p. 1308-16, 1993.
- DAVISON, A.J.; BENKÖ, M.; HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. **J. Gen. Virol.**, v. 84, p. 2895- 908, 2003.
- DAVISON, E., KIRBY, I., WHITEHOUSE, J., HART, I., MARSHALL, J. F., SANTIS, G. Adenovirus type 5 uptake by lung adenocarcinoma cells in culture correlates with Ad5 fibre binding is mediated by alpha(v)beta1 integrin and can be modulated by changes in beta1 integrin function. **J. Gene. Med.**, v. 3, n. 6, p. 550-9, 2001.
- DAVISON,E.; DIAZ,R.M.; HART,I.R.; SANTOS,G.; MARSHALL,J.F. Integrin alpha5beta1- mediated adenovirus infection is enhanced by integrin- activating antibody TS2/16. **J. Virol.**, v. 71, n. 8, p. 6204-7, 1997.
- DE JONG, P. J., VALDERRAMA, G., SPIGLAND, I., AND HORWITZ, M. S. Adenovirus isolates from urine of patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Lancet**., v. 1, n. 8337, p.1293-6, 1983.
- DE JONG, R. N., VAN DER VLIET, P. C., AND BRENKMAN, A. B. Adenovirus DNA replication: protein priming, jumping back and the role of the DNA binding protein DBP. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 272, p. 187-211, 2003.
- DE VRIES, E., VAN DRIEL, W., BERGSMA, W. G., ARNBERG, A. C., AND VAN DER VLIET, P. C. HeLa nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA-multimeric protein complex. **J. Mol. Biol.** v. 208, n. 1, p. 65-78, 1989.
- DECHECCHI, M. C., TAMANINI, A., BONIZZATO, A., CABRINI, G. Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. **Virology**., v. 268, n. 2, p. 382-90, 2000.
- DECHECCHI,M.C.; MELOTTI,P.; BONIZZATO,A.; SANTACATTERINA,M.; CHILOSI,M.; CABRINI,G. Heparan sulfato glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus type 2 and 5. **J. Virol.**, v. 75, n. 18, p. 8772-80, 2001.
- DEXTER, T. M.; SPOONCER, E. Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annu Rev Cell Biol* v. 3, p.423-41, 1987.
- Di MAIO, D.; COEN, D.M. Replication Strategies of DNA Viruses. *In*: FIELDS, B.N; PETER M.; HOWLEY, MD; DIANE E; GRIFFIN, ROBERT A.; LAMB; MALCOLM A.;MARTIN, M.D; ROIZMAN, B.; STEPHEN E., STRAUS D. (Eds.). **Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001. p.107-117.
- DOBBELSTEIN, M. Replicating adenoviruses in cancer therapy. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v. 273, p.291-334, 2004.
- DORIG, R. E.; MARCIL, A.; CHOPRA, A., RICHARDSON, C. D. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). **Cell** v. 75, n. 2, p. 295-305, 1993.

- DORONIN, K.; TOTH, K.; KUPPUSWAMY, M., WARD, P., TOLLEFSON, A. E., WOLD, W. S. Tumor-specific, replication-competent adenovirus vectors overexpressing the adenovirus death protein. **J. Virol.**, v. 74, n. 13, p. 6147-55, 2000.
- DORSHKIND, K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 111-37, 1990.
- DOUCAS, V., ISHOV, A. M., ROMO, A., JUGUILON, H., WEITZMAN, M. D., EVANS, R. M., AND MAUL, G. G. Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. **Genes Dev.**, v. 10, n. 2, p. 196-207, 1996.
- DUQUE, P. M., ALONSO, C., SANCHEZ-PRIETO, R., LEONART, M., MARTINEZ, C., de BUITRAGO, G. G., CANO, A., QUINTANILLA, M., RAMON y CAJAL, S. Adenovirus lacking the 19-kDa and 55-kDa E1B genes exerts a marked cytotoxic effect in human malignant cells. **Cancer. Gene. Ther.** v. 6, n. 6, p. 554-63, 1999.
- DURMORT, C., STEHLIN, C., SCHOEHN, G., MITRAKI, A., DROUET, E., CUSACK, S., BURMEISTER, W. P. Structure of the fiber head of Ad3, a non-CAR-binding serotype of adenovirus. **Virology**, v. 285, n. 2, p. 302-12, 2001.
- EHRICH, E. W., DEVAUX, B., ROCK, E. P., JORGENSEN, J. L., DAVIS, M. M., and CHIEN, Y. H. T cell receptor interaction with peptide/major histocompatibility complex (MHC) and superantigen/MHC ligands is dominated by antigen. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 2, p. 713-22, 1993.
- EVANS, J. D., AND HEARING, P. Distinct roles of the Adenovirus E4 ORF3 protein in viral DNA replication and inhibition of genome concatenation. **J. Virol.** v. 77, n. 9, p. 5295-304, 2003.
- FARLEY, D. C., BROWN, J. L., AND LEPPARD, K. N. Activation of the early-late switch in adenovirus type 5 major late transcription unit expression by L4 gene products. **J. Virol.** v.78, n.4, p.1782-1791, 2004.
- FAVIER, A.L.; SCHOEHN, G.; JAUINOD, M.; HARSİ, C.M.; CHROBOCZEK. Structural Studies of Human Enteric Adenovirus Type 41. **Virology**, v. 293, p. 75-85, 2002.
- FECHNER, H., WANG, X., WANG, H., JANSEN, A., PAULISCHER, M., SCHERUBL, H., BERGELSON, J. M., SCHULTHEISS, H. P., POLLER, W.. Trans-complementation of vector replication versus Coxsackie-adenovirusreceptor overexpression to improve transgene expression in poorly permissive cancer cells. **Gene Ther.**, v. 7, n. 22, p. 1954-68, 2000.
- FEUCHTINGER, T.; LÜCKE, J.; HAMPRECHT, K.; RICHARD, C.; HANDGRETINGER, R.; SCHUMM, M.; GREIL, J.; BOCK, T.; NIETHAMMER, D.; LANG, P. Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. **British J. Haematology.** v. 128, p. 503-509, 2005.
- FIELD, J., GRONOSTAJSKI, R. M., AND HURWITZ, J. Properties of the adenovirus DNA polymerase. **Biol. Chem.**, v. 259, n. 15, p. 9487-95, 1984.
- FLEWETT, T.H., BRYDEN, A.S. & DAVIES, H.. Diagnostic electron microscopy of faeces. I. The viral flora of the faeces as seen by electron microscopy. **J. Clin. Path.** v.27, p.603-608, 1974
- FLINT, S. J., GONZALEZ, R. A. Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55-kDa and E4 Orf6 proteins. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 272, p. 287-330, 2003.
- FLOMENBERG, P. R., CHEN, M., MUNK, G., AND HORWITZ, M. S. Molecular epidemiology of adenovirus type 35 infections in immunocompromised hosts. **J. Infect. Dis.**, v. 155, n. 6, p. 1127-34, 1987.
- FLOMENBERG, P.; PIASKOWSKI, V.; HARB, J.; SEGURA, A.; CASPER, J.T. Spontaneous persistent infection of B cell lymphoma with adenovirus. **J. Med. Virol.**, v. 48, n. 3, p. 267-72, 1996.

FREDMAN, J.N., ENGLER, J.A. Adenovirus precursor to terminal protein interacts with nuclear matrix in vivo and in vitro. **J. Virol.** v. 67, p. 3394-3395, 1993.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells-** A manual of basic technique. Ed Wiley Liss-USA, 157-163, 2000.

FUEYO, J., GOMEZ-MANZANO, C., ALEMANY, R., LEE, P. S., MCDONNELL, T. J., MITLIANGA, P., SHI, Y. X., LEVIN, V. A., YUNG, W. K., AND KYRITSIS, A. P. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. **Oncogene.**, v. 19, n. 1, p. 2-12, 2000.

FURCINITTI, P. S., VAN OOSTRUM, J., BURNETT, R. M. Adenovirus polypeptide IX revealed as capsid cement by difference images from electron microscopy and crystallography. **Embo. J.**, v. 8, n.12, p. 3563-70, 1989.

GAGGAR, A., SHAYAKHMETOV, D. M., LIEBER, A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. **Nat. Med.**, v. 9, n. 11, p. 1408-12, 2003.

GAO, W., ROBBINS, P. D., AND GAMBOTTO, A. Human adenovirus type 35: nucleotide sequence and vector development. **Gene Ther.**, v. 10, n. 23, p. 1941-9, 2003;

GARNETT, C.T.; ERDMAN, D.; XU, W.; GOODING, L.D. (2002) Prevalence and quantification of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. **J. Virol.**, v.76, n. 21, p. 10608-10616, 2002.

GHOSH-CHOUDHURY, G., HAJ-AHMAD, Y., GRAHAM, F. L. Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full length genomes. **Embo. J.**, v. 6, n. 6, p. 1733-9, 1987.

GONÇALVES, A.F.V.; DE VRIES, A.A.F. Adenovirus: from foe to friend. **Rev. Med. Virol.**, v. 16, p. 167-186, 2006.

GOODING, L. R., AQUINO, L., DUERKSEN-HUGHES, P. J., DAY, D., HORTON, T. M., YEI, S. P., AND WOLD, W. S. The E1B 19,000-molecular-weight protein of group C adenoviruses prevents tumor necrosis factor. **J. Virol.** v.65, n.6, p.3083-3094, 1991

GOODMAN, T.; LEFRANCOIS, L. Expression of the gamma delta T cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. **Nature.**, v. 333, p. 855-858, 1988.

GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C., AND NAIRN, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J. Gen. Virol.**, v. 36, n. 1, p. 59-74, 1977.

GREBER, U. F. Virus assembly and disassembly: the adenovirus cysteine protease as a trigger factor. **Rev. Med. Virol.**, v. 8, n. 4, p. 213-222, 1998.

GREBER, U. F., SUOMALAINEN, M., STIDWILL, R. P., BOUCKE, K., EBERSOLD, M. W., HELENIUS, A. The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. **Embo. J.**, v. 16, n. 19, p. 5998-6007, 1997.

GREBER, U. F., WEBSTER, P., WEBER, J., AND HELENIUS, A. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. **Embo. J.**, v. 15, n. 8, p.1766-77, 1996.

GREBER, U. F., WILLETTS, M., WEBSTER, P., AND HELENIUS, A. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. **Cell.**, v. 75, n. 3, p. 477-86, 1993.

GRUBB, B. R., PICKLES, R. J., YE, H., YANKASKAS, J. R., VICK, R. N., ENGELHARDT, J. F., WILSON, J. M., JOHNSON, L. G., AND BOUCHER, R. C. Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans. **Nature.**, v. 371, n. 6500, p. 802-6, 1994.

HALLDEN, G., HILL, R., WANG, Y., ANAND, A., LIU, T. C., LEMOINE, N. R., FRANCIS, J., HAWKINS, L., AND KIRN, D. (2003). Novel immunocompetent murine tumor models for the

- assessment of replication-competent oncolytic adenovirus efficacy. **Mol. Ther.** v.8, n.3, p.412-424, 2003
- HARADA, J. N., SHEVCHENKO, A., PALLAS, D. C., AND BERK, A. J. Analysis of the adenovirus E1B-55Kanchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. **J. Virol.**, v. 76, n. 18, p. 9194-206, 2002.
- HARNETT GB, BUCKENS MR, CLAY SJ, SABER BM. Acute hemorrhagic cystitis caused by adenovirus type 11 in a recipient of a transplanted kidney. **Med J Aust.** v.1, p.565-567, 1982.
- HASHIMOTO, S., ISHII, A., AND YONEHARA, S. The E1b oncogene of adenovirus confers cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor and monoclonal anti-Fas antibody. **Int. Immunol.**, v. 3, n. 4, p. 343-51, 1991
- HASS,W.; PEREIRA,P.; TONEGAWA,S. Gamma/Delta cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 637-686, 1993.
- HATCH, M. H., AND SIEM, R. A. Viruses isolated from children with infectious hepatitis. **Am. J. Epidemiol.**, v. 84, n. 3, p. 495-509, 1996.
- HAVENGA, M. J., LEMCKERT, A. A., OPHORST, O. J., VAN MEIJER, M., GERMERAAD, W. T., GRIMBERGEN, J., VAN DEN DOEL, M. A., VOGELS, R., VAN DEUTEKOM, J., JANSON, A. A., DE BRUIJN, J. D., UYTDEHAAG, F., QUAX, P. H., LOGTENBERG, T., MEHTALI, M., BOUT, A. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. **J. Virol.**, v. 76, n. 9, p.4612-20, 2002.
- HAY, R.T, et al. Molecular interactions during adenovirus DNA replication. In: W. DOERFLER & P. BOHM. **The Molecular Repertorie of Adenoviruses.** Berlim: Springer; 1995, p. 31-48.
- HEARING, P., SAMULSKI, R. J., WISHART, W. L., SHENK, T. Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. **J. Virol.**, v. 61, n. 8, p. 2555-8, 1987.
- HEISE, C., HERMISTON, T., JOHNSON, L., BROOKS, G., SAMPSON-JOHANNES, A., WILLIAMS, A., HAWKINS, L., KIRN, D. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. **Nat. Med.**, v. 6, n. 10, p. 1134-9, 2000.
- HEMMI, S., GEERTSEN, R., MEZZACASA, A., PETER, I., DUMMER, R. The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. **Hum. Gene. Ther.**, v. 9, n. 16, p. 2363-73, 1998.
- HIEBERT, S. W., BLAKE, M., AZIZKHAN, J., AND NEVINS, J. R. Role of E2F transcription factor in E1Amediated trans activation of cellular genes. **J. Virol.**, v. 65, n. 7, p. 3547-52, 1991.
- HIERHOLZER, J. C. Adenoviruses in the immunocompromised host. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 5, n. 3, p. 262-74, 1992.
- HILLEMANN, M. R., WERNER, J. H. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 85, n. 1, p. 183-8, 1954.
- HIRT, B. Selective Extraction of Polyoma DNA from Infected Mouse Cell Cultures, **J. Mol. Biol.**, v.26, n.2, p.365-369, 1967.
- HODGKIN, P. D., BASTEN, A. B cell activation, tolerance and antigen-presenting function. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 7, n. 1, p. 121-9, 1995.
- HORVATH, J., AND WEBER, J. M. Nonpermissivity of human peripheral blood lymphocytes to adenovirus type 2 infection. **J. Virol.**, v. 62, n. 1, p. 341-5. 1988.

HORVATH, J.; PALKONYAY, L.; WEBER, J. Group C Adenoviruses DNA sequences in Human lymphoid cells. **J Virol.** p. 189-192, 1986

HORWITZ, M.S. Adenoviruses, In: FIELDS, B.N.; PETER M.; HOWLEY, MD; DIANE E; GRIFFIN, ROBERT A.; LAMB; MALCOLM A.;MARTIN, M.D; ROIZMAN, B.; STEPHEN E., STRAUS D. – **Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers. 2001, p. 1864-1885.

HOWARD, J. C. Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 7, n. 1, p. 69-76, 1995.

HOWE, J. A., DEMERS, G. W., JOHNSON, D. E., NEUGEBAUER, S. E., PERRY, S. T., VAILLANCOURT, M. T., AND FAHA, B. Evaluation of E1-mutant adenoviruses as conditionally replicating agents for cancer therapy. **Mol. Ther.**, v. 2, n. 5, p. 485-95, 2000.

HOWITT, J., ANDERSON, C. W., FREIMUTH, P. Adenovirus interaction with its cellular receptor CAR. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 272, p. 331-64, 2003.

HUANG, M. M., HEARING, P. Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. **J. Virol.**, v. 63, n. 6, p. 2605-15, 1989.

HUANG, M. R., OLSSON, M., KALLIN, A., PETTERSSON, U., TOTTERMAN, T. H. (1997). Efficient adenovirus-mediated gene transduction of normal and leukemic hematopoietic cells. **Gene. Ther.**, v. 4, n. 10, p. 1093-9, 1997.

HUANG, S., ENDO, R. I., AND NEMEROW, G. R. Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. **J. Virol.**, v. 69, n. 4, p. 2257- 63, 1995.

HUANG, W., KIEFER, J., WHALEN, D., AND FLINT, S. J. DNA synthesis-dependent relief of repression of transcription from the adenovirus type 2 IVa(2) promoter by a cellular protein. **Virology** v.314, n.1, p.394-402, 2003.

HUANG,S.; KAMATA,T.; TAKADA,Y.; RUGGERI,Z.M.; NEMEROW,G.R. Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells. **J. Virol.**, v. 70, p. 4502-4508, 1996.

HUTCHIN, M. E., PICKLES, R. J., AND YARBROUGH, W. G. Efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to oropharyngeal epithelial cells correlates with cellular differentiation and human coxsackie and adenovirus receptor expression. **Hum. Gene. Ther.**, v. 11, n. 17, p. 2365-75, 2000.

IKEDA, J. E., ENOMOTO, T., AND HURWITZ, J. Replication of adenovirus DNA-protein complex with purified proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 78, n. 2, p. 884-8, 1981.

IMPERIALE, M. J., AND KOCHANNEK, S. Adenovirus vectors: biology, design, and production. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 273, p. 335-57, 2004.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunologia: o sistema imune na saúde e na doença.** 7° Ed. Porto Alegre: Artmed., 2007.

JENNINGS-GEE, J. E.; TSUJI, Y.; PLETSCH, E. C.; MORAN, E.; MYMRYK, J. S.; TORTI, F. M. Coordinate inhibition of cytokine mediated induction of ferritin H, manganese superoxide dismutase and interleukin 6 by the Adenovirus E1A oncogene. **J. Biol. Chem.** V.281, p. 16428-16435, 2006

JONES II, M.S.; HARRACH, B.; GANAC, R.D.; GOZUM, M.M.A.; DELA CRUZ, W.P.; RIEDEL, B.; PAN, C.; DELWART, E.L. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. **J. Virol.**, June, p. 5978-5984, 2007.

JONES, N., AND SHENK, T. An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, n. 8, p. 3665-9, 1979.

JOSEPH, T.D.; LOOK, D.C. Specific inhibition of interferon signal transduction pathways by adenoviral infection. **J. Biol. Chem.** v.276,n.50, p.47136-142., 2001.

JOTHIKUMAR, N.; CROMEANS, T.L. HILL, V.R.; XIAOYAN, L. SOBSEY, M.D. ERDMAN, D.D. Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41. **Applied and Environmental Microbiology**, p.3131-3136, 2005

KAJON, A. E., MISTCHENKO, A. S., VIDELA, C., HORTAL, M., WADELL, G., AVENDANO, L. F. Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the south cone of South America (1991-1994). **J. Med. Virol.**, v. 48, n. 2, p. 151-6, 1996.

KALLSTROM, H., LISZEWSKI, M. K., ATKINSON, J. P., JONSSON, A. B. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic Neisseria. **Mol. Microbiol.**, v. 25, n. 4, p. 639-47, 1997.

KANEGAE, Y.; MAKIMURA, M.; SAITO, I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. **Jpn. J. Med.Sci.Biol.** v.47 p.157-166, 1994.

KATZE, M. G., DECORATO, D., SAFER, B., GALABRU, J., HOVANESSIAN, A. G. Adenovirus VAI RNA complexes with the 68 000 Mr protein kinase to regulate its autophosphorylation and activity. **Embo. J.**, v. 6, n. 3, p. 689-97, 1987.

KIDD, A. H., GARWICZ, D., OBERG, M. Human and simian adenoviruses: phylogenetic inferences from analysis of VA RNA genes. **Virology.**, v. 207, n. 1, p. 32-45, 1995.

KIRBY, I., DAVISON, E., BEAVIL, A. J., SOH, C. P., WICKHAM, T. J., ROELVINK, P. W., KOVESDI, I., SUTTON, B. J., SANTIS, G. Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein. **J. Virol.**, v. 74, n. 6, p. 2804-13, 2000.

KIRCH, H. C., PUTZER, B., SCHWABE, G., GNAUCK, H. K., SCHULTE HOLTHAUSEN, H. Regulation of adenovirus 12 E1A transcription: E2F and ATF motifs in the E1A promoter bind nuclear protein complexes including E2F1, DP-1, cyclin A and/or RB and mediate transcriptional (auto)activation. **Cell. Mol. Biol. Res.**, v. 39, n. 8, p. 705-16, 1993.

KIRN, D. Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: what have we learned? **Gene. Ther.**, v. 8, n. 2, p. 89-98, 2001.

KIRN, D. Replication-selective oncolytic adenoviruses: virotherapy aimed at genetic targets in cancer. **Oncogene.**, v. 19, n. 56, p. 6660-9, 2000.

KITAJEWSKI, J., SCHNEIDER, R. J., SAFER, B., MUNEMITSU, S. M., SAMUEL, C. E., THIMMAPAYA, B., AND SHENK. Adenovirus VA- RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 alpha kinase. **Cell.**, v. 45, n. 2, p. 195-200, 1986.

KLEINBERGER, T. Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein. **Apoptosis.**, v. 5, n. 3, p. 211-5, 2000.

KLEINBERGER, T., AND SHENK, T. Adenovirus E4orf4 protein binds to protein phosphatase 2A, and the complex down regulates E1A-enhanced junB transcription. **J. Virol.**, v. 67, n. 12, p. 7556-60, 1993.

KOCH, P., GATFIELD, J., LOBER, C., HOBOM, U., LENZ-STOPPLER, C., ROTH, J., DOBBELSTEIN, M. Efficient replication of adenovirus despite the overexpression of active and nondegradable p53. **Cancer. Res.**, v. 61, n. 15, p. 5941-7, 2001.

KOCHANEK, S., CLEMENS, P. R., MITANI, K., CHEN, H. H., CHAN, S., CASKEY, C. T. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both fulllength dystrophin and beta-galactosidase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, n. 12, p. 5731-6, 1996.

- KOJAOGHLANIAN, T., FLOMENBERG, P., HORWITZ, M. S. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. **Rev. Med. Virol.**, v. 13, n. 3, p. 155-71, 2003.
- KOMORIYA, A., GREEN, L. J., MERVIC, M., YAMADA, S. S., YAMADA, K. M., HUMPHRIES, M. J. The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 23, p. 15075-9, 1991.
- KOVESDI, I., REICHEL, R., NEVINS, J. R. Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A mediated coordinate gene control. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 84, n. 8, p. 2180-4, 1987.
- LAMONT, J. P., NEMUNAITIS, J., KUHN, J. A., LANDERS, S. A., MCCARTY, T. M. A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (the Baylor experience). **Ann. Surg. Oncol.**, v. 7, n. 8, p. 588-92, 2000.
- LEGRAND, V., SPEHNER, D., SCHLESINGER, Y., SETTELEN, N., PAVIRANI, A., AND MEHTALI, M. Fiberless recombinant adenoviruses: virus maturation and infectivity in the absence of fiber. **J. Virol.**, v. 73, n. 2, p. 907-19, 1999.
- LEHRMAN, S. Virus treatment questioned after gene therapy death. **Nature.**, v. 401, n. 6753, p. 517-8, 1999.
- LEOPOLD, P.L.; KREITZER, G.; MIYAZAWA, N.; REMPEL, S.; PFISTER, K.K.; RODRIGUEZ-BOULAN, E., CRYSTAL, R.G. Dynein- and microtubule- mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. **Human. Gene. Therapy.** v.11, p. 151-165, 2000.
- LEPPARD, K. N., EVERETT, R. D. The adenovirus type 5 E1b 55K and E4 Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components. **J. Gen. Virol.**, v. 80, n. 4, p. 997-1008, 1999.
- LI, E., BROWN, S. L., STUPACK, D. G., PUENTE, X. S., CHERESH, D. A., NEMEROW, G. R. Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor. **J. Virol.**, v. 75, n. 11, p. 5405-9, 2001.
- LI, E., STUPACK, D., BOKOCH, G. M., NEMEROW, G. R. Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. **J. Virol.**, v. 72, n. 11, p. 8806-12, 1998a.
- LI, E., STUPACK, D., KLEMKE, R., CHERESH, D. A., NEMEROW, G. R. Adenovirus endocytosis via alpha(v) integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase. **J. Virol.**, v. 72, n. 3, p. 2055-61, 1998b.
- LICHTENSTEIN, D. L., TOTH, K., DORONIN, K., TOLLEFSON, A. E., WOLD, W. S. Functions and Mechanisms of Action of the Adenovirus E3 Proteins. **Int. Rev. Immunol.**, v. 23, n. 1-2, p. 75-111, 2004.
- LIN, H. J., AND FLINT, S. J. Identification of a cellular repressor of transcription of the adenoviral late IVa(2) gene that is unaltered in activity in infected cells. **Virology** v.277, n.2, p. 397-410, 2000.
- LISZEWSKI, M. K., ATKINSON, J. P. Membrane cofactor protein. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v. 178, p. 45- 60, 1992.
- LIU, H., NAISMITH, J. H., HAY, R. T. Adenovirus DNA replication. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 272, p. 131-64, 2003.
- LONBERG-HOLM, K., CROWELL, R. L., PHILIPSON, L. Unrelated animal viruses share receptors. **Nature** v. 259, n. 5545, p. 679-81, 1976.
- LOUIS, N.; FENDER, P.; BARGE, A.; KITTS, P., CHROBOCZEK, J. Cell-binding domain of Adenovirus serotype 2 fiber. **J. Virol.**, v. 68, p. 4104-4106, 1994.
- LUKASHOK S, HORWITZ MS. Adenovirus persistence. In: Ahmed R, Chen I, eds. **Persistent viral infections**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, p.147-164, 1997.

- MAGEK V, SORLI J, KOPRIVA S, MARIN J. Persistent adenoviral infection and chronic airway obstruction in children. **Am J Respir Care Med.** v.150, p.7–10, 1994.
- MAHR, J. A., BOSS, J. M., AND GOODING, L. R. The adenovirus e3 promoter is sensitive to activation signals in human T cells. **J Virol** v.77, n.2,p.1112-1119, 2003.
- MANNERVIK, M., FAN, S., STROM, A. C., HELIN, K., AKUSJARVI, G. Adenovirus E4 open reading frame 4- induced dephosphorylation inhibits E1A activation of the E2 promoter and E2F-1-mediated transactivation independently of the retinoblastoma tumor suppressor protein. **Virology.**, v. 256, n. 2, p. 313-21, 1999.
- MATHEWS, D.A.; RUSSEL, W.C. Adenovirus core protein V interacts with p32- a protein which is associated with both the mitochondria and the nucleus. **J. Gen. Virol.** v.79, p. 1677-1685, 1998.
- MATHEWS, D.A.; RUSSEL, W.C. Adenovirus protein-protein interaction: molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease. **J. Gen. Virol.** v.76, p.1959-1969, 1995.
- MATHIAS, P.; WICKHAM, T.; MOORE, M. & NEMEROW, G. Multiple adenovirus serotypes use $\alpha\beta$ integrins for infection. **J. Virol.** V. 68: p.6811-6814, 1994.
- MATSUSE T, HAYASHI S, KUWANO KI Latent adenoviral infection in the pathogenesis of chronic airways obstruction. **Am Rev Respir Dis** v.146, p.177–184, 1992.
- MATUMOTO, M., UCHIDA, S., HOSHIKA, T. Isolation of an intermediate type of adenovirus from a fatal case of infantile pneumonia. **Jpn J Exp Med** v.28, n.4, p.305-15, 1958.
- MAURER, K., KREY, T., MOENNIG, V., THIEL, H. J., RUMENAPF, T. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. **J Virol** v.78, n.4, p.1792-9, 2004.
- MAUTNER, V.; MACKAY, N.; STEIN, N.; THORDOTTIR, V. Complementation of enteric adenovirus type 40 for lytic growth in tissue culture by e1B 55k function of adenovirus types 5 and 12. **Virology** v. 171, p. 619-622, 1989
- MCNEES, A. L., MAHR, J. A., ORNELLES, D., AND GOODING, L. R.. Postinternalization inhibition of adenovirus gene expression and infectious virus production in human T-cell lines. **J Virol** v.78, n.13, p.6955-66, 2004.
- MEI, Y. F., LINDMAN, K., WADELL, G. Human adenoviruses of subgenera B, C, and E with various tropisms differ in both binding to and replication in the epithelial A549 and 293 cells. **Virology** v.295, n.1, p.30-43, 2002.
- MEI, Y. F., SKOG, J., LINDMAN, K., WADELL, G. Comparative analysis of the genome organization of human adenovirus 11, a member of the human adenovirus species B, and the commonly used human adenovirus 5 vector, a member of species C. **J Gen Virol** v.84, p.2061-71, 2003.
- MEIER, O., BOUCKE, K., HAMMER, S. V., KELLER, S., STIDWILL, R. P., HEMMI, S., GREBER, U. F. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. **J Cell Biol** v. 158, n.6, p.1119-31, 2002.
- MENTEL,R.; DOPPING,G.; WEGNER,V.; SEIDEL,W.; LIEBERMANN,H.; DOHNER,L. Adenovirus-receptor interaction with human lymphocytes. **J Med Virol** v.51, n.3, p.252-257, 1997..
- MENTEL,R.; DOPPING,G.; WEGNER,V.; SEIDEL,W.; LIEBERMANN,H.; DOHNER,L. Adenovirus-receptor interaction with human lymphocytes. **J Med Virol** v.51, n.3, p.252-7, 1997.
- MITANI, K.; KUBO, S. Adenovirus as an integrating vector. **Current Gene Therapy.** v.2, p.135-144, 2002

MIYAZAWA, N., CRYSTAL, R. G., LEOPOLD, P. L. Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein. **J Virol** v.75, n.3, p.1387-400, 2001.

MOSLEY, R.L.; KLEIN, J.R. A rapid method for isolation murine intestine intraepithelial lymphocytes with high yield and purity. **J. Immunol. Methods**. v. 156, p. 19-26, 1992.

NAKANO, M. Y., BOUCKE, K., SUOMALAINEN, M., STIDWILL, R. P., GREBER, U. F. The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. **J Virol** v.74, n.15, p.7085-95, 2000.

NEVELS, M.; DOBNER, T. Determination of the transforming activities of adenovirus oncogenes. **Methods Mol. Med**. v. 131, p. 187-195, 2007

NILSSON, M., KARLSSON, S., FAN, X. Functionally distinct subpopulations of cord blood CD34+ cells are transduced by adenoviral vectors with serotype 5 or 35 tropism. **Mol Ther** v.9, n.3, p.377-88, 2004.

OKADA, N., LISZEWSKI, M. K., ATKINSON, J. P., CAPARON, M. Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.92, n.7, p.2489-93, 1995..

OSTAPCHUK, P., HEARING, P. Minimal cis-acting elements required for adenovirus genome packaging. **J Virol** v.77, n.9, p.5127-35, 2003a.

PERSSON, H., JORNVALL, H., ZABIELSKI, J. Multiple mRNA species for the precursor to an adenovirus encoded glycoprotein: identification and structure of the signal sequence. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.77, n.11, p.6349-53, 1980.

PERSSON, H., OBERG, B., PHILIPSON, L. Purification and characterization of an early protein (E14K) from adenovirus type 2-infected cells. **J Virol** v.28, n.1, p.119-39, 1978.

PHILIPSON, L., AND PETERSSON, R. F. The coxsackie-adenovirus receptor--a new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v.273, p.87-111, 2004.

PHILIPSON, L., LONBERG-HOLM, K., PETERSSON, U.. Virus-receptor interaction in an adenovirus system. **J Virol** v.2, n.10, p.1064-75, 1968.

PICKLES, R. J., FAHRNER, J. A., PETRELLA, J. M., BOUCHER, R. C., BERGELSON, J. M. Retargeting the coxsackievirus and adenovirus receptor to the apical surface of polarized epithelial cells reveals the glycocalyx as a barrier to adenovirus-mediated gene transfer. **J Virol** v.74, n.13, p. 6050-7, 2000.

PICKLES, R. J., MCCARTY, D., MATSUI, H., HART, P. J., RANDELL, S. H., BOUCHER, R. C. Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer. **J Virol** v.72, n.7, p.6014-23, 1998.

PIENIAZEK,D.; PIENIAZEK, N.J.; MACEJAK, D.; LUFTIG,R.B. Enteric adenovirus 41 (Tak) requires low serum for growth in human primary cells cells. **Virology**. V.178, p.72-80, 1990a.

PIENIAZEK,D.; PIENIAZEK,N.J.; MACEJAK,D. Differential growth of human enteric adenovirus 41 (Tak) in continuous cell lines. **Virology**. V174, p. 239-249, 1990b.

PRCHLA, E., PLANK, C., WAGNER, E., BLAAS, D., FUCHS, R.. Virus-mediated release of endosomal content in vitro: different behavior of adenovirus and rhinovirus serotype 2. **J Cell Biol** v.131, n. 1, p.111-23, 1995.

RAO,L.; PEREZ, D. WHITE, E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. **J. Cell Biol**. v.135, p.1441-1455.; 1996.

- RAWLE, F.C.; KNOWLES, B.B.; RICCIARDI, R.P.; BRAHMACHERI, V.; DUERKSEN-HUGHES, P.; WOLD, W.S.; GOODING, L.R. Specificities of the mouse cytotoxic T lymphocytes response to adenovirus 5. E1A is immunodominant in H-2b, but not in H-2d or H-2k mice **J Immunol** v.146, p.3977-3984., 1991.
- REA, D., HAVENGA, M. J., VAN DEN ASSEM, M., SUTMULLER, R. P., LEMCKERT, A., HOEBEN, R. C., BOUT, A., MELIEF, C. J., OFFRINGA, R.. Highly efficient transduction of human monocyte-derived dendritic cells with subgroup B fiber-modified adenovirus vectors enhances transgene-encoded antigen presentation to cytotoxic T cells. **J Immunol** v.166, n.8, p. 5236-44, 2001.
- REBEL, V. I., HARTNETT, S., DENHAM, J., CHAN, M., FINBERG, R., SIEFF, C. A. Maturation and lineage-specific expression of the coxsackie and adenovirus receptor in hematopoietic cells. **Stem Cells** v.18, n.3, p.176-82, 2000.
- REKOCH, D.M.; RUSSEL, W.C.; BELLET, A.J. ROBINSON, A.J. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. **Cell**. v.11, p.283-295, 1977.
- ROELVINK, P. W., MI LEE, G., EINFELD, D. A., KOVESDI, I., WICKHAM, T. J. Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. **Science** v.286, n.5444, p.1568-71, 1999.
- ROELVINK, P.W.; LIZONOVA, A.; LEE, J.G.M.; BERGELSON, J.M.; FINBERG, R.W.; BROUGH, D.E.; KOVESDI, I. WICKHAM, T.J. The Coxsackie-Adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for Adenovirus serotypes from Subgroups A,C,D,E and F. **J. Virol.** v.72, n.10, p.7909-7915., 1998
- ROOVERS, D. J., VAN DER LEE, F. M., VAN DER WEES, J., SUSSENBACH, J. S. Analysis of the adenovirus type 5 terminal protein precursor and DNA polymerase by linker insertion mutagenesis. **J Virol** v.67, n.1, p.265-76, 1993.
- ROSA-CALATRAVA, M., PUVION-DUTILLEUL, F., LUTZ, P., DREYER, D., DE THE, H., CHATTON, B., KEDINGER, C.. Adenovirus protein IX sequesters host-cell promyelocytic leukaemia protein and contributes to efficient viral proliferation. **EMBO Rep** v.4, n.10, p.969-75, 2003.
- ROTH, J., DOBBELSTEIN, M. Interaction of p53 with the adenovirus E1B-55 kDa protein. **Methods Mol Biol** v.234, p.135-49, 2003.
- ROTH, J., KONIG, C., WIENZEK, S., WEIGEL, S., RISTEA, S., DOBBELSTEIN, M. Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton and E4 34-kilodalton oncoproteins. **J Virol** v.72, n.11, p.8510-6, 1998.
- ROWE, W. P., HUEBNER, R. J., GILMORE, L. K., PARROTT, R. H., WARD, T. G. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. **Proc Soc Exp Biol Med** v.84, n.3, p570-3, 1953.
- RUOSLAHTI, E., PIERSCHBACHER, M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science** v.238, n.4826, p.491-7, 1987
- RUSSEL, W.C. Update on adenovirus and its vectors. **J. Gen. Virol.** V.81, p.2573-2604., 2000.
- SAITO, H.; KRANZ, D.M.; TAKAGAKI, Y.; HAYDAY, A.C.; EISEN, H.N.; TONEGAWA, S. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. **Nature** v.309, p.757-762., 1984.
- SAN MARTIN, C., BURNETT, R. M. Structural studies on adenoviruses. **Curr Top Microbiol Immunol** v.272, p.57-94., 2003.
- SANTORO, F., KENNEDY, P. E., LOCATELLI, G., MALNATI, M. S., BERGER, E. A., LUSSO, P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. **Cell** v.99, n.7, p.817-27, 1999.

- SAPHIRE, A. C., GUAN, T., SCHIRMER, E. C., NEMEROW, G. R., GERACE, L. Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70. **J Biol Chem** v.275, n.6, p.4298-304, 2000.
- SCHAACK, J., HO, W. Y., FREIMUTH, P., SHENK, T. Adenovirus terminal protein mediates both nuclear matrix association and efficient transcription of adenovirus DNA. **Genes Dev** v.4, n.7, p.1197-208, 1990.
- SCHILD, H.; MAVADDAT, N.; LITZENBERGER, C.H.; ELRICH, E.; DAVIS, M.M.; BLUESTONE, J.A.; MATIS, L.; DRAPER, R.K.; CHIEN, Y. The nature of major histocompatibility complex recognition by $\gamma\delta$ T cells. **Cell**. v.76, p.29-37, 1994
- SEGERMAN, A. **Adenovirus B: receptors, tropism and hematopoietic cells**. 2004. 78p. [dissertation-Ph.D.] Department of Clinical Microbiology/Virology. Umeå University, Sweden, 2004.
- SEGERMAN, A., MEI, Y. F., AND WADELL, G. Adenovirus types 11p and 35p show high binding efficiencies for committed hematopoietic cell lines and are infective to these cell lines. **J Virol** v.74, n.3, p.1457-6, 2000.
- SEGERMAN, A.; AMBERG, N.; ERIKSON, A.; LENDMAN, K.; WADELL, G. There are two different species B adenovirus receptor: sBAR, common to species B1 and B2 adenoviruses, and sB2AR exclusively used by species B2 adenoviruses. **J. Virol.**, v.77, p.1155-1162, 2003.
- SEKI, T., DMITRIEV, I., KASHENTSEVA, E., TAKAYAMA, K., ROTS, M., SUZUKI, K., CUIEL, D. T. Artificial extension of the adenovirus fiber shaft inhibits infectivity in coxsackievirus and adenovirus receptor-positive cell lines. **J Virol** v.76, n.3, p.1100-8, 2002
- SETH, P. Adenovirus-dependent release of choline from plasma membrane vesicles at an acidic pH is mediated by the penton base protein. **J Virol** v.68, n.2, p.1204-6, 1994.
- SHAYAKHMETOV, D. M., LIEBER, A. Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. **J Virol** v.74, n.22, p.10274-86, 2000.
- SHAYAKHMETOV, D. M., PAPAYANNOPOULOU, T., STAMATOYANNOPOULOS, G., LIEBER, A. Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. **J Virol** v.74, n.6, p.2567-83, 2000.
- SHORT, J.J.; PEREBOEV, A.V.; KAWAKAMI, Y.; VASU, C.; HOLTERMAN, M.J.; CUIEL, D.T. Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. **Virology**. v.322, p 349-359, 2004
- SIDLE, A., PALATY, C., DIRKS, P., WIGGAN, O., KIESS, M., GILL, R. M., WONG, A. K., HAMEL, P. A. Activity of the retinoblastoma family proteins, pRB, p107, and p130, during cellular proliferation and differentiation. **Crit Rev Biochem Mol Biol** 31(3), 237-71., 1996.
- SILVER, L.; ANDERSON, C.W. Interaction of human adenovirus serotype 2 with human lymphoid cells. **Virology** V.165 p377-387, 1988.
- SIMOS, G.; GEORDATOS, S.D. The lamin B receptor associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. **FEBS letter**.v. 346, p.225-228, 1994
- SIRENA, D., LILIENFELD, B., EISENHUT, M., KALIN, S., BOUCKE, K., BEERLI, R. R., VOGT, L., RUEDL, C., BACHMANN, M. F., GREBER, U. F., HEMMI, S. The Human Membrane Cofactor CD46 Is a Receptor for Species B Adenovirus Serotype 3. **J Virol** v.78, n.9, p.4454-62, 2004.
- SPRENGEL, J., SCHMITZ, B., HEUSS-NEITZEL, D., ZOCK, C., DOERFLER, W. Nucleotide sequence of human adenovirus type 12 DNA: comparative functional analysis. **J Virol** v.68, n.1, p.379-89, 1994.

- STEWART, P. L., FULLER, S. D., BURNETT, R. M. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. **Embo J** v.12, n.7, p.2589-99, 1993.
- STONE, D., FURTHMANN, A., SANDIG, V., LIEBER, A. The complete nucleotide sequence, genome organization, and origin of human adenovirus type 11. **Virology** v.309, n.1, p.152-65, 2003.
- SUOMALAINEN, M., NAKANO, M. Y., KELLER, S., BOUCKE, K., STIDWILL, R. P., GREBER, U. F. Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. **J Cell Biol** v.144, n.4, p.657-72, 1999
- SUPARNO, C., MILLIGAN, D. W., MOSS, P. A., AND MAUTNER, V. Adenovirus infections in stem cell transplant recipients: recent developments in understanding of pathogenesis, diagnosis and management. **Leuk Lymphoma** v.45, n.5, p. 873-885, 2004.
- SVENSSON, U. Role of vesicles during adenovirus 2 internalization into HeLa cells. **J Virol** v.55, n.2, p.442-9, 1985.
- TAKAHASHI, A.; HIGASHINO, F.; AOYAGI, M.; NAKAYAMA, M.; YANAGAWA, A.; HASEGAWA, H.; HATTA, M.; ISHIDA, S.; NAKAJIMA, K.; TOTSUKA, Y.; SHINDOH, M. Adenovirus E1A negatively regulates E1AF and its family protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** P. 433-443, 2007
- TAKIFF, H.E.; STRAUSS, S.E.; GARON, C.F. Propagation and *in vitro* studies of previously non cultivable enteral adenoviruses in 293 cells. **Lancet**, v.2, p. 832-834, 1981
- TALLONE, T., MALIN, S., SAMUELSSON, A., WILBERTZ, J., MIYAHARA, M., OKAMOTO, K., POELLINGER, L., PHILIPSON, L., PETTERSSON, S. A mouse model for adenovirus gene delivery. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.98, n. 14, p. 7910-5, 2001.
- THIMMAPAYA, B., WEINBERGER, C., SCHNEIDER, R. J., SHENK, T. Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. **Cell** v.31, n.3, p.543-51, 1982.
- TIEMESSEN, C. T.; NEL, M. J.; KIDD, A.H. Adenovirus 41 replication cell-related differences in viral gene transcription. **Mol. Cell. Probes.** v.10, n. 4, p.279, 287, 1996.
- TIEMESSEN, C. T.; KIDD, A. H. Adenovirus type 40 and 41 growth in vitro: host range diversity reflected by differences in patterns of DNA replication. **J. Virol.** p.1239-1244, 1993
- TIEMESSEN, C.T.; KIDD, A.H. Adenovirus type 40 and 41 growth in vitro: host range diversity reflected by differences in patterns of DNA replication. **J. Virol.** v. 68, n.2, p.1239-1244, 1994.
- TIEMESSEN, C.T.; KIDD, A.H. The subgroup F Adenoviruses. **J. Gen. Virol.** v.76 p. 481-497, 1995.
- TOLLEFSON, A. E., KRAJCSI, P., PURSLEY, M. H., GOODING, L. R., WOLD, W. S. . A 14,500 MW protein is coded by region E3 of group C human adenoviruses. **Virology**, v. 175, n.1, p.19-29, 1990.
- TOLLEFSON, A. E., RYERSE, J. S., SCARIA, A., HERMISTON, T. W., WOLD, W. S. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. **Virology** v.220, n.1, p.152-62., 1996a.
- TOLLEFSON, A. E., SCARIA, A., HERMISTON, T. W., RYERSE, J. S., WOLD, L. J., WOLD, W. S. . The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. **J Virol** v.70, n.4, p.2296-306, 1996b..
- TOLLEFSON, A. E., SCARIA, A., SAHA, S. K., WOLD, W. S. The 11,600-MW protein encoded by region E3 of adenovirus is expressed early but is greatly amplified at late stages of infection. **J Virol** v.66, n.6, p.3633-42, 1992.

- TOLLEFSON, A. E., WOLD, W. S. Identification and gene mapping of a 14,700-molecular-weight protein encoded by region E3 of group C adenoviruses. **J Virol.** v.62, n.1, p.33-9, 1988.
- TOLLEFSON, A. N.; SCARIA, A.; YING, B.; WOLD, W. S. M. Mutations within the ADP (E3-11.6k) protein alter processing and localization of ADP and the kinetics of cell lysis of adenovirus infected cells. **J Virol.** p. 7764-7778, 2003.
- TOMKO, R. P., XU, R., PHILIPSON, L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.94, n.7, p. 3352-6, 1997
- TRIBOULEY, C., LUTZ, P., STAUB, A., KEDINGER, C. The product of the adenovirus intermediate gene IVa2 is a transcriptional activator of the major late promoter. **J Virol** v.68, n.7, p.4450-7, 1994.
- TROTMAN, L. C., ACHERMANN, D. P., KELLER, S., STRAUB, M., AND GREBER, U. F. Non-classical export of an adenovirus structural protein. **Traffic** v.4, n.6, p.390-402, 2003.
- TROTMAN, L. C., MOSBERGER, N., FORNEROD, M., STIDWILL, R. P., AND GREBER, U. F. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. **Nat Cell Biol** v. 3, n.12, p.1092-100, 2001.
- UHNO, I.; WADELL, G.; SVENSSON, N. L.; JOHANSSON, M. E. Two new serotypes of enteric adenovirus causing infantile diarrhea. **Dev. Biol. Stand** v.53, p. 311-318, 1983
- VAN OOSTRUM, J., AND BURNETT, R. M. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. **J. Virol.** v. 56, n.2, p.439-448, 1985.
- VOGELS, R. ZUIJDEEST, D., VAN RIJNSOEVER, R., HARTKOORN, E., DAMEN, I., DE BETHUNE, M. P., KOSTENSE, S., PENDERS, G., HELMUS, N., KOUDESTAAL, W., CECCHINI, M., WETTERWALD, A., SPRANGERS, M., LEMCKERT, A., OPHORST, O., KOEL, B., VAN MEERENDONK, M., QUAX, P., PANITTI, L., GRIMBERGEN, J., BOUT, A., GOUDSMIT, J., AND HAVENGA, M. (2003). Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. **J. Virol.**, v. 77, n.15, p.8263-71, 2003.
- VON SEGGERN, D.J.; CHIU, C.Y.; FLECK, S.K.; STEWART, P.L.; NEMEROW, G.R. A helper-independent adenovirus vector with E1, E3 and fiber deleted: structure and infectivity of fiberless particles **Virology**. v. 73, p.1601-1608, 1999.
- WADELL, G. **Adenoviruses**. fourth ed., Wiley, Principles and Practice of Clinical Virology p. 307-327, 2000.
- WADELL, G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v.110, p.191-220, 1984.
- WALLS, T., SHANKAR, A. G., AND SHINGADIA, D.. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. **Lancet Infect Dis** v.3, n.2, p.79-86, 2003.
- Walters, R. W., van't Hof, W., Yi, S. M., Schroth, M. K., Zabner, J., Crystal, R. G., and Welsh, M. J. Apical localization of the coxsackie-adenovirus receptor by glycosyl-phosphatidylinositol modification is sufficient for adenovirus-mediated gene transfer through the apical surface of human airway epithelia. **J. Virol.** v.75, n.16, p.7703-7711, 2001.
- WALTERS, R. W.; GRUNST, T.; BERGELSON, J. M.; FINBERG, R. W.; WELSH, M. J.; ZABNER, J. Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. **J. Biol. Chem.** v. 274, n. 15, 10219-26, 1999.
- WALTERS, R.W.; FREIMUTH, P.; MONINGER, T.O.; GANSKE, I.; ZABNER, J.; WELSH, M.J. Adenovirus fiber disrupts CAR- mediated intercellular adhesion allowing virus escape. **Cell**, v.110, p. 789-799, 2002.

- WANG, E. W.; SCOTT, M. O.; RICCIARDI, R. P. An adenovirus mRNA which encodes a 14,700-Mr protein that maps to the last open reading frame of region E3 is expressed during infection. **J. Virol.**, v. 62, n. 4, p. 1456-9, 1988.
- WEBER, J. Genetic analysis of adenovirus type 2. III. Temperature sensitivity of processing viral proteins. **J. Virol.**, v.17, p. 462-471, 1976.
- WEBSTER, A.; LEITH, I. R.; HAY, R. T. Activation of adenovirus-coded protease and processing of preterminal protein. **J. Virol.**, v. 68, n.11, p. 7292-300, 1994.
- WEBSTER, A.; RUSSEL, S.; TALBOT, P.; RUSSEL, W.C.; KEMP, G.D. Characterization of adenovirus proteinase: substrate specificity. **J. Gen. Virol.**, v.70, p.3225-3234, 1989.
- WEIDEN, M. D.; GINSBERG, H. S. Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 91, n. 1, p. 153-7, 1994.
- WHITE, E., CHIOU, S. K., RAO, L., SABBATINI, P., AND LIN, H. J. Control of p53-dependent apoptosis by E1B, Bcl-2, and Ha-ras proteins. **Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.**, v. 59, p.395-402, 1994.
- WICKHAM, T. J.; MATHIAS, P.; CHERESH, D. A.; NEMEROW, G. R. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. **Cell**, v. 73, n. 2, p. 309-19, 1993.
- WINDHEIM, M., HILGENDORF, A., BURGET, H. G. Immune evasion by adenovirus E3 proteins: exploitation of intracellular trafficking pathways. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 273, p. 29-85, 2004.
- WINGAND, R.; ADRIAN, T. Classification and epidemiology of adenoviruses. *In*: Doerfler, W. (ed) **Adenovirus DNA**. Boston: Martinus Nijhoff, 1986.
- WINTER, N.; D'HALLUIN, J. C. Regulation of the biosynthesis of subgroup C adenovirus protein IVa2. **J. Virol.**, v. 65, n. 10, p. 5250-9, 1991.
- WITT, D. J.; BOUSQUET, E. B.; Comparison of enteric adenovirus infection in various human cell lines. **J. Virol. Methods**. V.20, p. 295-308, 1988
- WOLD, W.S.M.; HERMISTON, T.W.; TOLLEFSON, A.E. E3 transcription unit of adenovirus. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 199, n.1, p. 237-274, 1995.
- WU, E.; TRAUGER, S. A.; PACHE, L.; MULLEN, T. M.; VON SEGGERN, D. J.; SIUZDAK, G.; NEMEROW, G. R. Membrane cofactor protein is a receptor for adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. **J. Virol.** v. 78, n. 8, p. 897-905, 2004.
- WU, J.; GROH, V.; SPIES, T. T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. **J. Immunol.** v.169, n.3, p.1236-1240, 2002
- XIONG, J. P.; STHLE, T.; GOODMAN, S. L.; ARNAOUT, M. A. Integrins, cations and ligands: making the connection. **J. Thromb. Haemost.**, v. 1, n. 7, p. 1642-54, 2003a.
- XU, W.; McDONOUGH, M.C.; ERDMAN, D.D. Species-Specific Identification of Human Adenoviruses by a Multiplex PCR Assay. **J Clin Microbiol.** v.38, p.4114-4120, 2000.
- YEH, H.Y.; PIENIAZEK, N.; PIENIAZEK, D.; LUFTIG, R. Genetic organization, size, and complete sequence of early region 3 genes of human adenovirus type 41. **Journal of Virology**, p. 2658-2663, 1996.
- YOSHIDA, K., NARITA, M., AND FUJINAGA, K. Binding sites of HeLa cell nuclear proteins on the upstream region of adenovirus type 5 E1A gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 17, n. 23, p. 10015-34, 1989.

Young, C. S. The structure and function of the adenovirus major late promoter. **Curr Top Microbiol**, v.272, p.213-249, 2003.

ZABNER, J.; FREIMUTH, P.; PUGA, A.; FABREGA, A.; WELSH, M.J. Lack of high affinity fiber receptor activity explains the resistance of ciliated airway epithelia to adenovirus infection. **J. Clin. Invest.** v. 100 n. 5, p. 1144-9,1997.

ZHANG, W.; IMPERIALE, M. J. Requirement of the adenovirus IVa2 protein for virus assembly. **J. Virol.**, v.77, n. 6, p. 3586-94, 2003.

ZHAO, H.; GRANBERG, F.; ELFINEH, L.; PETTERSSON, U.; AND SVENSSON, C. Strategic attack on host cell gene expression during adenovirus infection. **J. Virol.**, v.77, n. 20, p. 11006-15, 2003.

ANEXO 1:Gráfico das temperaturas de denaturação dos produtos obtidos em PCR em tempo real com diversos oligonucleotídeos estudados, evidenciando a especificidade da reação.

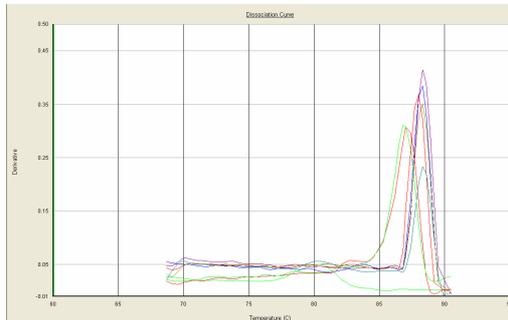


Figura 20: Curva de denaturação do produto amplificado a partir de cDNA obtido de RNA total extraído de PBMC infectados com HAdV-41, utilizando oligonucleotídeos para o gene GAPDH

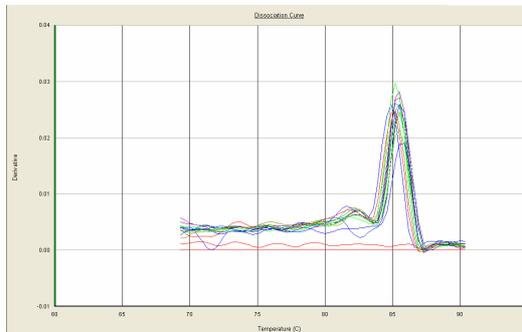


Figura 21: Curva de denaturação do produto amplificado a partir de cDNA obtido de RNA total extraído de PBMC infectados com HAdV-41, utilizando oligonucleotídeos para o gene E1A

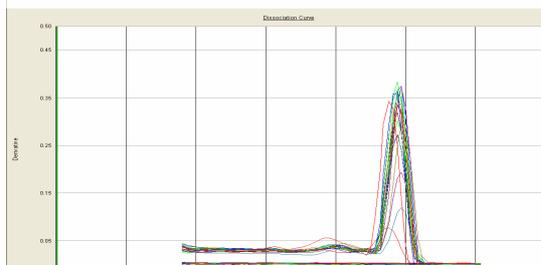


Figura 22: Curva de denaturação do produto amplificado a partir de cDNA obtido de RNA total extraído de PBMC infectados com HAdV-41, utilizando oligonucleotídeos para o gene E1B (55K).

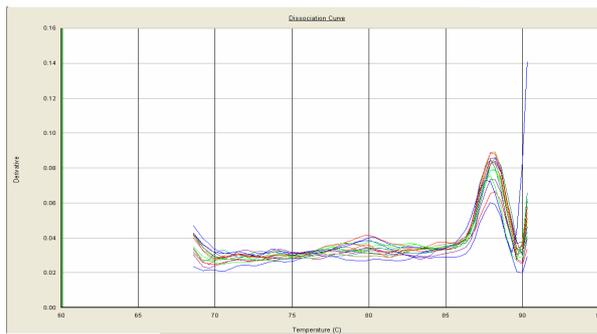


Figura 23: Curva de denaturação do produto amplificado a partir de cDNA obtido de RNA total extraído de PBMC infectados com HAdV-41, utilizando oligonucleotídeos para o gene VARNA.

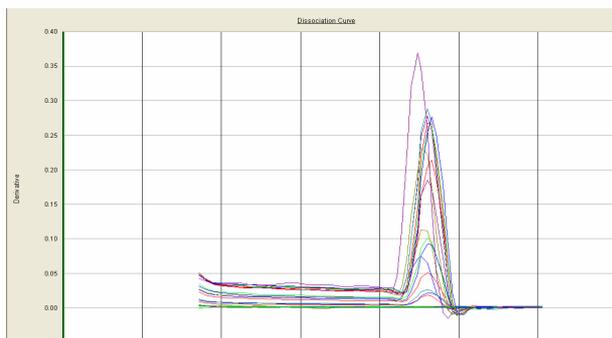


Figura 24: Curva de denaturação do produto amplificado a partir de cDNA obtido de RNA total extraído de PBMC infectados com HAdV-41, utilizando oligonucleotídeos para o gene HEXON.

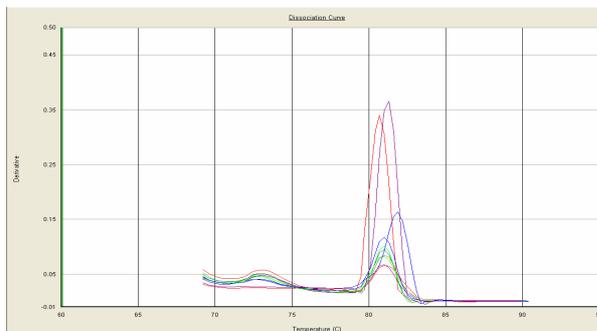


Figura 25: Curva de denaturação do produto amplificado a partir de cDNA obtido de RNA total extraído de PBMC infectados com HAdV-41, utilizando oligonucleotídeos para o gene FIBRA CURTA.

ANEXO 2: Dados brutos da expressão gênica de HAdV-41 em células HEK-293

Tabela 9: Média dos cT ⁽¹⁾ da expressão de cada gene analisado, em células HEK-293, obtidos em PCR em tempo real para cada um dos tempos analisados (hora).

Tempo p.i.	GAPDH	E1A	E1B (55K)	VARNA	HEXON	FC	14K (E3)
controle	21,1	0	0	0	0	0	0
10h	22,74	0	0	0	0	0	0
11h	19,83	29,44	39,48	0	0	0	26,64
12h	21,49	27,32	36,98	0	0	0	25,2
13h	19,81	28,7	30,04	0	39,48	0	26,3
14h	19,16	28,83	25,86	38,27	33,98	35,3	26,11
15h	19,24	22,4	27,37	38,4	36,23	36,11	21,22
16h	18,59	23,56	24,27	37,53	31,19	23,01	21,77
17h	20,26	21,99	26,07	37,91	28,82	24,56	20,33
18h	19,62	25,87	24,9	37,77	29,09	23,94	20,18
19h	19,12	21,48	21,39	37,35	27	23,44	20,24
20h	19,01	21,06	24,57	37,48	29,3	23,62	19,58
21h	19,01	20,9	24,99	27,36	24,99	24,35	19,98
22h	19,2	20,08	22,94	25,51	22,94	24,03	19,18
23h	19,49	20,75	22,11	24,14	22,11	23,09	19,26
24h	21,84	21,65	27,56	27,56	27,56	25,1	21,58

⁽¹⁾ Números de ciclos de amplificação necessários para detectar o início do limiar de detecção de determinado produto em PCR em tempo real

Tabela 10: Equalização relativa da expressão de cada gene de HAdV-41 em células HEK-293, utilizando como referência o nível de expressão do gene GAPDH, para obtenção do ΔcT ⁽²⁾.

Tempo p.i.	E1A	E1B-55K	VARNA	HEXON	FC	14K (E3)
10h	0	0	0	0	0	0
11h	6,7	19,65	0	0	0	3,9
12h	4,79	15,49	0	0	0	5,37
13h	7,21	1023	0	19,67	0	4,81
14h	9,02	6,7	19,11	14,82	16,14	6,3
15h	3,24	8,13	19,16	16,99	16,87	2,06
16h	4,02	5,81	18,94	12,6	4,42	2,53
17h	3,4	5,28	17,65	8,56	4,3	1,74
18h	5,61	2,27	18,15	9,47	4,32	-0,08
19h	1,86	5,56	18,23	7,88	4,32	0,62
20h	1,94	10,29	18,47	7,88	4,61	0,97
21h	1,89	8,56	8,35	5,98	5,63	1,53
22h	0,88	6,88	6,31	3,74	4,83	-0,02
23h	1,26	7,57	4,65	2,62	4,4	-0,23
24h	-0,19	6,73	5,72	5,72	3,26	-0,26

⁽²⁾ $\Delta cT = cT$ do gene alvo – cT do GAPDH

Tabela 11: Calibração relativa da expressão gênica do HAdV-41 em células HEK-293, para obtenção do $\Delta\Delta cT$ (3).

Tempo p.i.	E1A	E1B-55K	VARNA	HEXON	FC	E3(14K)
10h	-	-	-	-	-	-
11h	-2,32	0	-	-	-	-1,47
12h	-1,53	-4,16	-	-	-	0
13h	-1,81	-9,42	-	0	-	-0,56
14h	0	-12,95	0	-4,85	-0,73	0,93
15h	-5,78	-11,52	0,05	-2,68	0	-3,31
16h	-5	-13,84	-0,17	-7,07	-12,45	-2,84
17h	-5,62	-14,37	-1,46	-11,11	-12,57	-3,63
18h	-3,41	-17,38	-0,96	-10,2	-12,55	-5,45
19h	-7,16	-14,09	-0,88	-11,79	-12,55	-4,75
20h	-7,08	-9,36	-0,64	-11,79	-12,26	-4,4
21h	-7,13	-11,09	-10,76	-13,69	-11,24	-3,84
22h	-8,14	-12,77	-12,8	-15,93	-12,04	-5,39
23h	-7,76	-12,08	-14,46	-17,05	-12,47	-5,6
24h	-9,21	-12,92	-13,39	-13,95	-13,61	-5,63

⁽³⁾ $\Delta\Delta cT$ = média ΔcT do ponto alvo – média ΔcT do ponto homogenizador
Calibradores utilizados: E1A (14h); E1B (11h); VARNA (14h); Hexon (13h), FC (15h), 14K (12h)

Tabela 12: Quantidade relativa da expressão gênica do HAdV-41 em células HEK-293, com valores expressos em número de vezes (unidade absoluta e adimensional) em relação ao ponto escolhido como calibrador.

Tempo p.i.	E1A	E1B (55K)	VARNA	HEXON	FC	E3 (14K)
10h	0	0	0	0	0	0
11h	4,99	1	0	0	0	2,77
12h	2,88	17,88	0	0	0	1
13h	3,5	685	0	1	0	1,47
14h	1	7912,9	1	28,84	1,66	1,067
15h	54,95	2936,74	0,96	6,4	1	9,92
16h	32	14664	1,12	134,36	5595,3	7,1
17h	49,18	21173,9	2,75	2210,26	6080,6	12,38
18h	10,63	170569,5	1,94	1176,27	5996,9	43,71
19h	143	17438,64	1,84	3541,14	5966,9	26,9
20h	135,5	657,11	1,55	3541,14	4904,87	21,11
21h	140	2179,8	1734	13216	2418,67	14,32
22h	282	6984,78	7131,5	62432	4211,15	41,93
23h	216,77	4329,54	22536,9	135694,2	5673,4	48,5
24h	592,22	7750	10734,7	15825,9	12503,1	49,52

$$\text{Quantidade relativa de expressão} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

ANEXO 3: Dados brutos da expressão gênica de HAdV-41 em PBMC

Tabela 13: Média dos cT da expressão de cada gene analisado, em PBMC, obtidos em PCR em tempo real para cada um dos tempos analisados (hora).

Tempo p.i.	GAPDH	E1A	E1B-55K	VARNA	HEXON	FC
controle	18,15	0	0	0	0	0
10h	31,23	0	0	0	0	0
11h	31,14	0	0	0	0	0
12h	33,31	0	0	0	0	0
13h	33,3	0	0	0	0	0
14h	33,76	0	0	0	0	0
15h	36,2	0	0	0	0	0
16h	34,06	0	0	0	0	0
17h	30,1	29,22	30,53	28,36	0	0
18h	33,34	34,72	30,81	-	36,34	0
19h	34,39	34,78	-	-	-	-
20h	26,39	22,79	23,17	23,52	32,89	27,02
21h	25,45	21,95	21,34	22,77	26,2	28,91
22h	27	23,5	24,96	25,17	30,06	29,17
23h	27,8	24,47	25,77	26,49	29,72	30,84
24h	27,7	24,5	26,15	26,19	25,25	27,73

Tabela 14: Equalização relativa da expressão de cada gene de HAdV-41 em PBMC, utilizando como referência o nível de expressão do gene GAPDH, para obtenção do ΔcT .

Tempo p.i.	E1A	E1B-55K	VARNA	HEXON	FC
10h	-	-	-	-	-
11h	-	-	-	-	-
12h	-	-	-	-	-
13h	-	-	-	-	-
14h	-	-	-	-	-
15h	-	-	-	-	-
16h	-	-	-	-	-
17h	-0,88	0,43	-1,735	-	-
18h	1,376	-2,525	-	3,005	-
19h	0,39	-	-	-	-
20h	-3,6	-3,215	-2,865	6,5	0,63
21h	-3,496	-4,11	-2,683	0,75	3,463
22h	-3,5	-2,04	-1,83	3,06	2,17
23h	-3,33	-2,03	-1,31	1,92	3,04
24h	-3,145	-1,55	-1,51	-2,45	0,033

Tabela 15: Calibração relativa da expressão gênica do HAdV-41 em PBMC, para obtenção do $\Delta\Delta C_T$.

Tempo p.i.	E1A	E1B -55K	VARNA	HEXON	FC
10h	-	-	-	-	-
11h	-	-	-	-	-
12h	-	-	-	-	-
13h	-	-	-	-	-
14h	-	-	-	-	-
15h	-	-	-	-	-
16h	-	-	-	-	-
17h	-2,256	0	0	-	-
18h	0	-2,955	-	-3,495	-
19h	-0,986	-	-	-	-
20h	-4,976	-3,645	-4,6	0	-2,833
21h	-4,872	-4,54	-4,418	-5,75	0
22h	-4,876	-2,47	-3,565	-3,44	-1,293
23h	-4,705	-2,46	-3,045	-4,58	-0,423
24h	-4,521	-1,98	-3,245	-8,95	-3,43

Calibradores utilizados E1A (18h); E1B(17h); VARNA (17h); Hexon (20h) e fibra curta (21h).

Tabela 16: Quantidade relativa da expressão gênica do HAdV-41 em PBMC, com valores expressos em número de vezes (unidade absoluta e adimensional) em relação ao ponto escolhido como calibrador

Tempo p.i.	E1A	E1B -55K	VARNA	HEXON	FC
10h	0	0	0	0	0
11h	0	0	0	0	0
12h	0	0	0	0	0
13h	0	0	0	0	0
14h	0	0	0	0	0
15h	0	0	0	0	0
16h	0	0	0	0	0
17h	4,78	1	1	0	0
18h	1	7,75	-	11,27	0
19h	1,98	-	-	-	0
20h	31,47	12,5	24,25	1	7,12
21h	29,28	23,26	21,38	53,81	1
22h	29,36	5,54	11,83	10,85	2,45
23h	26,08	5,5	8,25	23,91	1,34
24h	22,96	3,94	9,48	494,56	10,78

ANEXO 4: Dados Brutos da expressão gênica de HAdV-41 em IEL

Tabela 17: Média dos $cT^{(1)}$ da expressão de cada gene analisado, em IEL do voluntário A, obtidos em PCR em tempo real para cada um dos tempos analisados (hora).

Tempo p.i.	GAPDH	E1A	E1B (55K)	E3 (14K)	VARNA	HEXON	FC
Controle	15,01	-	-	-	-	-	-
18h	23,06	22,82	23,15	24,2	23,6	23,75	23,56
20h	24,32	22,8	24,7	23,7	-	25	23,38
23h	24,12	23,73	25,17	24,24	22,5	26,05	22,4
24h	24,17	21,49	25,35	24,83	22,7	21,6	23,17

Tabela 18: Equalização relativa da expressão de cada gene de HAdV-41 em IEL do voluntário A, utilizando como referência o nível de expressão do gene GAPDH, para obtenção do $\Delta cT^{(2)}$.

Tempo p.i.	E1A	E1B (55K)	E3 (14K)	VARNA	HEXON	FC
18h	-0,24	0,09	1,14	0,54	0,69	0,5
20h	-1,52	0,38	-0,62	-	0,68	-0,94
23h	-0,39	1,05	0,12	-1,62	1,93	-1,72
24h	-2,68	1,18	0,66	-1,47	-2,57	-1

Tabela 19: Calibração relativa da expressão gênica do HAdV-41 em IEL voluntário A, para obtenção do $\Delta\Delta cT^{(3)}$.

Tempo p.i.	E1A	E1B (55K)	E3 (14k)	VARNA	HEXON	FC
18h	0	-1,09	0	0	-1,24	0
20h	-1,3	-0,8	-1,76	-	-1,24	-1,44
23h	-0,15	-0,13	-1,02	-2,16	0	-2,22
24h	-2,44	0	-0,48	-4,17	-4,5	-1,5

Tabela 20: Quantidade relativa da expressão gênica do HAdV-41 em IEL voluntário A, com valores expressos em número de vezes (unidade absoluta e adimensional) em relação ao ponto escolhido como calibrador.

Tempo p.i.	E1A	E1B (55K)	E3 (14K)	VARNA	HEXON	FC
18h	1	2,13	1	1	2,36	1
20h	2,46	1,74	3,32	-	2,36	2,77
23h	1,1	1,09	2,03	4,7	1	4,66
24h	5,43	1	1,4	18	22,36	2,83

Tabela 21: Média dos $cT^{(1)}$ da expressão de cada gene analisado, em IEL do voluntário B, obtidos em PCR em tempo real para cada um dos tempos analisados (hora).

Tempo p.i.	GAPDH	E1A	E1B (55K)	E3 (14K)	VARNA	HEXON	FC
Controle	22,51	-	-	-	-	-	-
18h	23,98	23,54	27,8	-	-	28,3	-
20h	23,42	21,85	24,08	-	23,71	22,35	-
23h	23,06	24,5	27,84	23,78	-	26,92	-
24h	24,12	-	-	29,38	-	-	-

Tabela 22: Equalização relativa da expressão de cada gene de HAdV-41 em IEL do voluntário B, utilizando como referência o nível de expressão do gene GAPDH, para obtenção do $\Delta cT^{(2)}$.

Tempo p.i.	E1A	E1B (55K)	E3 (14K)	VARNA	HEXON	FC
18h	-0,44	3,82	-	-	4,32	-

20h	-1,57	0,66	-	0,29	-1,07	-
23h	1,44	4,78	0,72	-	3,86	-
24h	-	-	2,63	-	-	-

Tabela 23: Calibração relativa da expressão gênica do HAdV-41 em IEL voluntário B, para obtenção do $\Delta\Delta Ct$ (3).

Tempo p.i.	E1A	E1B (55K)	E3 (14K)	VARNA	HEXON	FC
18h	-1,88	-0,96	-	-	0	-
20h	-3,01	-4,78	-	0,29	-5,39	-
23h	0	0	-1,91	-	-0,49	-
24h	-	-	0	-	-	-

Tabela 24: Quantidade relativa da expressão gênica do HAdV-41 em IEL voluntário B, com valores expressos em número de vezes (unidade absoluta e adimensional) em relação ao ponto escolhido como calibrador.

Tempo p.i.	E1A	E1B (55K)	E3 (14K)	VARNA	HEXON	FC
18h	3,48	1,94	-	-	1	0
20h	8,05	27,47	-	1,22	41,93	0
23h	1	1	3,92	-	1,37	0
24h	0	-	1	-	-	0