JOSELMA SIQUEIRA SILVA

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DO ADENOVÍRUS
HUMANO, SOROTIPO 41 (HAdV-41), COM
CÉLULAS PERMISSIVAS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Charlotte
Marianna Hársi

São Paulo
2008

RESUMO

Siqueira-Silva J. Estudo da interação do adenovírus humano, sorotipo 41 (HAdV-41), com células permissivas [Tese de doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

O HAdV-41, de tropismo entérico, é fastidioso em cultura celular e possui dois tipos de fibras (longa e curta) distribuídas alternadamente. As fibras longa (FL) e curta (FC) são codificadas por dois genes distintos (L5-1 e L5-2): a FL reconhece o receptor CAR, mas a FC não o faz, sugerindo que apenas a FL seja utilizada na fase de adsorção viral. Essa característica estrutural, dentro de gênero *Mastadenovirus*, é exclusiva dos HAdV-40 e 41. Essas informações direcionam os objetivos do trabalho: estudar a cinética de infecção do HAdV-41 em células HEK-293; construir dodecaedros recombinantes contendo as fibras (FL e FC) do HAdV-41; e determinar a função da FC na adsorção e na penetração em células HEK-293 e CaCo2. O ensaio de cinética de infecção (comparada com a do HAdV-2) foi realizado por 7 dias; e as culturas, analisadas por microscopia confocal (MCVL) e por microscopia eletrônica (MET). Os resultados mostraram que o HAdV-41 difere do HAdV-2 em: ciclo replicativo mais lento e liberação da progênie viral por mecanismo não lítico. Posteriormente, construíram-se os baculovírus recombinantes, expressando-se as fibras (FL e FC) do HAdV-41, utilizando-se o kit “*Bac-to-Bac[®] Baculovirus expression system*” (InvitrogenTM). As cinéticas de expressão das proteínas FC e FL, assim como os ensaios de co-expressão das proteínas base-Ad3 + FC e base-Ad3 + FL, foram realizados em células Sf9 e verificados por *western blot*. Visando à produção dos dodecaedros recombinantes (base e fibra), os estoques virais (base-Ad3, BFC, BFL, baseRGEHS-Ad3 e base-Ad3+Fibra-Ad3) foram amplificados e titulados por plaqueamento. Os dodecaedros recombinantes (base-Ad3, base-Ad3+FC-Ad41, base-Ad3+FL-Ad41, baseRGEHS-Ad3+FCAd41 e base-Ad3+FAd3) foram produzidos em células High FiveTM. Após 72 horas de infecção, os dodecaedros foram purificados em gradientes de sacarose, analisados por MET e inoculados em células HEK-293 e CaCo2. Após a análise por MCVL, observou-se que a proteína FC talvez não desempenhe função na entrada do dodecaedro nas células estudadas. Na etapa seguinte, os dodecaedros recombinantes base-Ad3+FC-Ad41 e base-Ad3 foram digeridos com pepsina e analisados por *western blot*. Foi observado que a fibra curta sofreu proteólise parcial, enquanto o dodecaedro base-Ad3 foi completamente proteolísado. Esses resultados indicam que, nas condições *in vitro*, a proteína FC do HAdV-41 não reconhece as células HEK-293 e CaCo2, possivelmente porque o HAdV-41 sofra proteólise no trato gastro-intestinal, seu ambiente natural, sendo necessário para que ocorra o reconhecimento de receptores na célula intestinal. Os resultados obtidos neste trabalho fornecerão subsídios para o desenvolvimento de vetores de terapia gênica direcionada para o epitélio intestinal, assim como vetores vacinais administrados por via oral.

Palavras-chave: HAdV-41. Tropismo entérico. Cinética de infecção. Sistema Baculovírus. Dodecaedros recombinantes. Fibra Curta (FC).

ABSTRACT

Siqueira-Silva J. Interaction studies of human adenovirus serotype 41 (HAdV-41) with permissive cells [PhD thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

HAdV-41 has gastrointestinal tropism and is considered fastidious in cell cultures. The virus possesses two types of fibers (long and short) alternatively distributed. The long (LF) and short fiber (SF) are coded by two different genes (L5-1 and L5-2): the LF recognizes the CAR receptor but the SF does not, suggesting that only the LF participates in viral adsorption. This structural fact is exclusive of HAdV-40 and 41 in the *Mastadenovirus* genus. These data direct our objectives: to study the infection kinetics of HAdV-41 in HEK-293 cells; to construct recombinant dodecahedrons containing both fibers of HAdV-41; and to determine the role of the SF in viral adsorption and penetration in HEK-293 and CaCo2 cells. The infection kinetics assay (compared with HAdV-2) was performed for 7 days and cell cultures were analyzed by both confocal laser scanning microscopy (CLSM) and transmission electronic microscopy (TEM). Results showed that HAdV-41 differs from HAdV-2 in: a slower replication cycle and release of viral progeny by non-lytic mechanisms. In other experiments, we constructed recombinant baculoviruses expressing HAdV-41 LF and SF, using the “*Bac-to-Bac*® *Baculovirus expression system*” (Invitrogen™). Expression kinetics of the individual protein, as well as co-expression assays of base-Ad3+SF and base-Ad3+LF proteins were performed in *Sf9* cells, and analyzed by Western-blot. For the production of the recombinant dodecahedrons (base and fiber), viral stocks (base-Ad3, BSF, BLF, baseRGEHS-Ad3 and base-Ad3+Fiber-Ad3) were produced in High Five™ cells. 72 hours post-infection, dodecahedrons were purified in sucrose gradients, analyzed by TEM and inoculated in HEK-293 and CaCo2 cells. After analysis with CLSM, we observed that the SF may not have a role in dodecahedron entry in the cells studied. Next, recombinant dodecahedrons base-Ad3+SF-Ad41 and base-Ad3 were digested with pepsin and analyzed by Western blot. We observed partial proteolysis of the SF, while the base-Ad3 dodecahedron was completely digested. These results show that, *in vitro*, the HAdV-41 SF does not recognize HEK-293 or CaCo2 cells, possibly because the HAdV-41 suffers proteolysis in the gastro-intestinal tract, its natural environment, which allows the recognition of receptors in intestinal cells. The results obtained at the present thesis may be used as the base for the development of gene-therapy vectors directed to intestinal epithelium, as well as orally administered vaccine vectors.

Key words: HAdv-41. Enteric tropism. Infection kinetics. Baculovirus system. Recombinant dodecahedrons. Short Fiber (SF).

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os adenovírus

1.1.1 Histórico

Em 1953, durante a manutenção de culturas primárias de adenóides e tonsilas, removidas cirurgicamente de crianças, Rowe e colaboradores observaram a presença de um vírus desconhecido capaz de causar degeneração celular. Em 1954, Hilleman e Werne, em um estudo envolvendo recrutas americanos com quadros de infecção respiratória, isolaram um agente capaz de induzir mudanças citopáticas em culturas de células humanas. Mais tarde, esses vírus foram relacionados como agentes da degeneração da adenóide, de infecção respiratória e da febre faringo-conjuntiva ou de doença respiratória aguda. Em 1956, esses agentes foram denominados adenovírus, devido ao tecido em que foram descobertos (Enders et al., 1956).

1.1.2 Classificação

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV-*International on Taxonomy of Viruses*), os adenovírus pertencem à família *Adenoviridae*, a qual pode ser filogeneticamente distinta em quatro gêneros: *Mastadenovirus*, constituído por vírus que infectam mamíferos; *Aviadenovirus*, constituído por vírus que infectam somente aves; *Siadenovirus*, constituído por vírus que infectam aves, anfíbios e peixes; *Atadenovirus*, constituído por vírus que infectam ruminantes, aves, e marsupiais (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTdb).

Atualmente, os pesquisadores discutem sobre a criação do quinto gênero (*Fishadenovirus*), devido à identificação de um adenovírus isolado em esturjão, cujas características não se enquadram em nenhum dos gêneros existentes (Davison et al., 2003).

Figura 1: Distância filogenética entre os membros da família Adenoviridae. Os membros de cada gênero são representados por cores diferentes e os vírus que pertencem à mesma espécie são agrupados por círculos ovais. As abreviações dos nomes dos vírus são indicadas ao final de cada ramificação, com o nome das espécies em *itálico*. A primeira letra indica o nome do animal do qual foi isolado o vírus: B (bovino); C (canino); D (pato); E (equino); F (galinha), Fr (sapo); H (humano); M (murino); O (ovino); P (suíno); Po (gambá); Sn (cobra); T (peru) e TS (primata primitivo). A distância filogenética foi calculada com base na sequência nucleotídica do gene *hexon*, disponível no GenBank. Fonte: Davison et al., 2003.

Os adenovírus humanos (HAdV) pertencem ao gênero *Mastadenovirus* e são conhecidos 51 sorotipos, distribuídos em seis espécies (de A a F), de acordo com as características antigênicas, morfológicas e moleculares (Wadell, 1984; Tiemessen e Kidd, 1995).

Jones II et al. (2007) isolaram um novo sorotipo de HAdV (HAdV-52) de 4 pacientes com gastroenterite. As características desse novo sorotipo são distintas das características das espécies de HAdV-A a HAdV-F, sendo proposta a classificação em uma nova espécie, a espécie G (Jones II et al., 2007).

Para a definição de uma nova espécie é necessário que várias características sejam esclarecidas, tais como: homologia da sequência de DNA, percentual em bases guanina e

citossina (G+C), potencial de oncogenicidade em roedores recém-nascidos, hospedeiro, neutralização cruzada, possibilidade de recombinação, número de genes VA-RNA, potencial para hemaglutinação e organização genética da região E3 (Benko et al., 1999).

Para a definição dos sorotipos são necessários ensaios de neutralização da infecção viral em cultura de células permissivas. Em casos em que ocorre reação cruzada, são realizados os testes de hemaglutinação e restrição do DNA com endonucleases de restrição (Wigand e Adrian, 1986).

Os HAdVs têm a habilidade de infectar uma vasta gama de tecidos, sendo identificados como agentes etiológicos de diversas patologias, como por exemplo: síndromes respiratórias, ceratoconjuntivites, infecções entéricas e renais (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação dos sorotipos de HAdVs dentro das espécies e suas principais características.

	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
Percentual G+C	48	51	58	58	58	-
Perfil de restrição com a <i>Sma</i>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	CD46, CD80 e CD86	CAR VCAM 1 Sulfato de Heparana	CAR, ácido siálico	CAR	CAR ? ^c
Nº de genes VA-RNA	1	2(B1) 1(B2)	2	2	2	1
Nº de ORF em E3	6	9 (B1) 8 (B2)	7	8	9	5
Motivos reconhecidos pela <i>penton</i>-base^d	RGD e LDV	RGD e LDV	RGD e LVD	RGD e LDV	RGD e LDV	LDV RGDA(40) IGDD (41)
Comprimento da fibra (repetição dos motivos)	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 as espécies

b: Padrão de hemaglutinação: I- aglutinação completa de eritrócitos de macaco; II- aglutinação completa de eritrócitos de rato; III- aglutinação parcial de eritrócitos de rato, IV- aglutinação de eritrócitos de ratos após a adição de anti-soro heterotípico.

c: 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, integrais. **Fonte:** Modificado de Segerman, 2004.

1.1.3 Composição da partícula viral

Os adenovírus são vírus de 70 a 90 nm de diâmetro, não envelopados, de simetria icosaédrica, apresentando um coeficiente de sedimentação em gradiente de cloreto de cério (CsCl) em torno de 1,33 a 1,34 g/cm³. Esses vírus são constituídos por 11 proteínas, denominadas polipeptídeos (II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X e TP), conforme ilustrado na figura 2A. Das 11 proteínas, 7 estão presentes no capsídeo viral (II, III, IV, IIIa, VI, VIII e IX). O capsídeo contém 252 subunidades chamadas capsômeros, das quais 240 são constituídas pela proteína *hexon* (pII), compondo as faces do icosaedro. Os 12 capsômeros restantes são compostos pelas proteínas *penton*-base (pIII) e fibra (pIV), que formam os vértices (Figura 2B).

Figura 2: (A) – Separação das proteínas do HAdV em SDS-PAGE; (B) - Representação esquemática da partícula do adenovírus e localização das suas proteínas.

Fontes: Wadell et al., 1980; <http://www.flupatrol.com/wp-content/uploads/2007/05/big-adenovirusv3.gif>;

As proteínas pIIIa, pVI, pVIII e pXI constituem o capsídeo e estão associadas ao *hexon*, que é responsável pela estabilização e flexibilidade do *virion* (Greber et al., 1998; Vellinga et al., 2005).

A proteína pIIIa está situada no vértice do icosaédro, e junto com o *hexon* formam faces triangulares, determinando o formato do *virion*, necessário para que ocorra a formação da partícula viral (Stewart et al., 1993).

A proteína pIX se encontra associada com o *hexon*. Este complexo é responsável pela estabilização da partícula viral (Furcinitti et al., 1989).

As proteínas pVI e pVIII estão associadas à superfície interna do capsídeo viral, sendo a proteína pVI a responsável por manter o contato do *hexon* com o *core* (Stewart et al., 1993).

O *core* viral é constituído pela molécula de DNA, dupla fita, ao qual estão associadas as proteínas pV, pVII, pX e a TP. As proteínas pV, pVII e pX possuem caráter básico, ricas em resíduos de arginina e mantêm contato com o DNA viral (Hosakawa et al., 1976; Chatterjee et al., 1986; Anderson et al., 1989). A proteína pV é responsável pela formação de um complexo com o DNA viral, provendo uma ligação estrutural entre o capsídeo e o genoma viral através da interação com as proteínas *penton*-base (pIII) e pVI, ancorando o *core* ao vértice do capsídeo (Mathews e Russel, 1995; San Martin e Burnett, 2003). A proteína pVII desempenha a função de histona, sendo responsável pela compactação e organização do material genético no interior do capsídeo viral (Mirza e Weber, 1982; Chatterjee et al., 1986). A proteína pX é clivada na proteína μ , a qual está presente em partículas virais maduras. No entanto, a função da proteína μ permanece desconhecida (Hosakawa et al., 1976; Shenk, 1996). A proteína TP (*terminal protein*) está covalentemente ligada à terminação 5' do genoma (Shenk, 1996).

A seguir, na figura 3 pode-se visualizar o esquema do adenovírus, assim como a localização das proteínas do capsídeo e do *core* viral.

Figura 3: Representação esquemática da composição e estrutura do adenovírus. A localização dos seus componentes do capsídeo é bem definida. Em contraste, a disposição dos componentes do *core* e do DNA viral é altamente conjectural. **Fonte:** Russel, 2000.

Na tabela 2 estão relacionadas as proteínas do adenovírus, as localizações no *virion*, assim como as suas respectivas funções.

Tabela 2: Proteínas estruturais do HAdV, localização e função na partícula viral.

Proteína (polipeptídeo)	Localização no virion	Funções
II	Monômero do <i>hexon</i>	Majoritaria no capsídeo (estrutural)
III	Base do <i>penton</i>	Penetração na célula
IIIa	Associada à base do <i>penton</i>	Formação da partícula viral; estabilização
IV	Fibra	Reconhecimento do receptor primário
V	<i>Core</i> : associado ao DNA e à base do <i>penton</i> ; peptídeo associado ao <i>penton</i>	Empacotamento
VI	Peptídeo associado ao <i>hexon</i>	Contato do <i>hexon</i> com o <i>core</i> , estabilização.
VII	<i>Core</i>	Histona
VIII	Peptídeo associado ao <i>hexon</i>	Estabilização
IX	Peptídeo associado ao <i>hexon</i>	Estabilização
X (μ)	<i>Core</i>	Desconhecida
TP	Genoma	Replicação do DNA

Além das proteínas estruturais descritas até o momento, o HAdV possui mais 2 proteínas associadas a partículas virais maduras, a pVIa2 e a protease 23K, importantes no processamento de algumas proteínas estruturais, que são importantes para o vírus no processo de entrada da partícula viral na célula hospedeira (Weber, 1976; Greber et al., 1996).

É interessante ressaltar que somente três proteínas estruturais estão expostas na partícula viral: o *hexon*, a *penton*-base e a fibra. Essas três proteínas desempenham funções essenciais, tais como: interface da partícula viral com o meio, interação com a célula hospedeira nas etapas de adsorção e penetração.

1.1.4 Organização do genoma viral

Os HAdVs apresentam um genoma, constituído por uma molécula de DNA dupla-fita, linear (30.000 a 45.000 pares de base), que codifica em torno de 40 proteínas (Shenk, 1996).

Atualmente, diversos sorotipos de adenovírus representantes de cada espécie já estão seqüenciados: HAdV-2 (Roberts, 1985); HAdV-5 (Chroboczek et al., 1992); HAdV-40

(Davison et al., 1993); HAdV-12 (Sprengel et al., 1994); HAdV-17 (Chillon et al., 1999); HAdV-35 (Gao et al., 2003; Vogels et al., 2003).

Com base nos estudos desses genomas foi observado que os adenovírus apresentam uma organização gênica semelhante, na qual são identificadas duas origens de replicação, cada uma presente em cada terminação do genoma e oito unidades de transcrição, dependentes de RNA polimerase II, sendo cinco unidades de transcrição inicial (E1A, E1B, E2, E3, E4), duas unidades de transcrição intermediária (pIX, pIVa2) e a unidade de transcrição tardia principal (MLTU), que gera 5 famílias de mRNAs (L1 ao L5) (Shenk, 1996) (Figura 4). O cromossomo viral possui também, dependendo da espécie, uma ou duas regiões de transcrição de pequenos RNAs de fita dupla (VA-RNA) transcritos pela RNA polimerase III (Kidd et al., 1995; Shenk, 1996) (Figura 4).

Figura 4: Mapa de transcrição do genoma do HAdV. Os transcritos iniciais são marcados em cinza (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 e E4); e os tardios, em azul (L1-L5). As setas indicam a direção da transcrição. Os VA-RNA estão marcados em marrom. MLP: *Major late promoter*. **Fonte:** Russel, 2000.

As duas fitas de DNA são transcritas: na fita na qual a transcrição ocorre no sentido da direita para a esquerda resultam os transcritos E1A, E1B, IX, MLTU, VA-RNA e E3; e naquela onde a transcrição ocorre no sentido da esquerda para a direita resultam os transcritos E4, E2 e IVa2 (Shenk, 1996).

A expressão das diferentes unidades é sincronizada, e pode ser dividida em fases de expressão inicial, intermediária e tardia. A fase inicial ou precoce é caracterizada pela expressão dos genes que modulam as funções celulares, facilitando a replicação do DNA e a

transcrição dos genes tardios. O tempo estimado para que ocorra esse processo é de 6 a 8 horas em células permissivas, enquanto a fase tardia é de 4 a 6 horas (Russel, 2000).

1.1.5 Regiões de expressão precoce do HAdV

São descritas na literatura cinco unidades de transcrição inicial ou precoce, as quais estão localizadas nas duas fitas de DNA do genoma viral, sendo: E1A, E1B, E2, E3 e E4. A organização e a expressão temporal desses genes evita a formação de mRNAs complementares, que poderiam resultar na formação de RNAs de fita dupla (dsRNA). As dsRNAs são reconhecidas pela proteína quinase (PKR) dependente de dsRNA e de RNase L, que ativam o sistema de defesa induzida por IFN (Kitajewski et al., 1986; Katze et al., 1987).

A expressão dos genes precoces dos adenovírus inicia-se com a transcrição do gene E1A, cujo produto estimula a transcrição dos demais genes de expressão precoce, tais como, o gene E1B e o VA-RNA (Berk et al., 1979; Jones e Shenk, 1979).

Nos adenovírus, são codificadas pelas regiões precoces mais de 20 proteínas, as quais desempenham funções diversas, tais como, a regulação do ciclo celular e a regulação da transcrição viral, favorecendo um ambiente ideal para a expressão dos genes virais e a formação da progênie viral.

A seguir, serão descritas as funções dos genes precoces, intermediários e tardios dos adenovírus.

1.1.5.1 O gene E1A

O gene E1A é o primeiro transcrito assim que o vírus atinge o poro nuclear. A sua expressão é induzida por fatores de transcrição celulares, resultando em 2 proteínas, a 289R e a 243R. Os produtos do gene E1A são capazes de ativar a transcrição viral (denominados trans-ativadores), através dos motivos TATA, que são encontrados, geralmente, 30 pares de base acima do sinal de iniciação de transcrição (Green, 1983). Esses produtos são capazes de ativar os promotores de alguns genes celulares, como por exemplo, os genes que expressam as proteínas do choque térmico 70 (hsp 70) e β globulina (Kovesdi et al., 1987 Kirch et al., 1993). No início da expressão do gene E1A, ocorre a indução das células hospedeiras a entrar na fase S do ciclo celular, sendo por isto, considerado por muitos autores, como um oncogene (Cao et al., 2007; Nevels e Dobner, 2007; Takahashi et al., 2007). Para tanto, a E1A se liga ao pRB (proteína do retinoblastoma), liberando o fator de transcrição E2F. Este, por sua vez,

ativa genes celulares, ocorrendo a progressão do ciclo celular (fase G1 – fase S), favorecendo um ambiente ideal para a replicação do DNA viral (Shenk, 1996).

1.1.5.2 O gene E1B

O gene E1B codifica duas proteínas: a 19K e a 55K. Essas são responsáveis por bloquear a apoptose de formas distintas. A 55K bloqueia a apoptose mediada pela p53 (Zhao e Liao, 2003). A p53 é uma proteína supressora de tumor, que tem a função de regular a transcrição de diversos genes envolvidos no ciclo celular e na apoptose. Quando a p53 forma um complexo com a proteína E4ORF6 (proteína codificada pelo gene E4), a proteína 55K promove a degradação desse complexo por proteassomos (Harada et al., 2002).

A proteína 19K é análoga ao inibidor da apoptose Bcl-2 (Chiou et al., 1994). O Bcl-2 é um inibidor da apoptose induzida por vários estímulos, tais como: Fas (Hashimoto et al., 1991); TNF- α (Gooding et al., 1991); apoptose dependente de p53 (Chiou et al., 1994).

1.1.5.3 O gene E2

O gene E2 codifica três proteínas necessárias para a replicação do DNA: a DNA polimerase, a proteína pré-terminal (pTP), e a proteína de ligação ao DNA (*DNA-binding protein*) (Liu et al., 2003).

A DNA polimerase é uma das proteínas mais conservadas entre os adenovírus e pertence à família Pol (DNA polimerase que possui atividade exonuclease 3' - 5') (Ikeda et al., 1981; Field et al., 1984).

A *DNA-binding protein* é uma proteína que possui afinidade por DNA de fita simples (ssDNA). Essa proteína desempenha a função de estabilizar a hélice do DNA durante a sua elongação e replicação (Liu et al., 2003).

A pTP é processada pela protease 23K originando a TP, a qual se liga covalentemente às extremidades 5' do DNA viral, atuando como uma origem de replicação. O complexo DNA+pTP forma um heterodímero com a DNA polimerase, sendo necessária essa formação para que ocorra o início da replicação viral (Roovers et al., 1993; Webster et al., 1994). Além de desempenhar um papel na replicação viral, a TP também desempenha a função de proteger o DNA viral das exonucleases e mediar a ligação do DNA viral à matrix nuclear (Schaack et al., 1990).

1.1.5.4 O gene E3

O gene E3 codifica de 5 a 9 proteínas, dependendo da espécie do adenovírus. Pelo fato dessas proteínas possuírem função imunoregulatória, não são necessárias para a replicação do adenovírus em culturas celulares, e por este motivo, muitos vetores adenovirais desprovidos deste gene. (Lichtenstein et al., 2004; Windhein et al., 2004; Gonçalves e de Vries, 2006). Entretanto, *in vivo* os produtos do gene E3 têm a função de modular a resposta imune do hospedeiro (Fessler et al., 2004).

Três das proteínas codificadas pelo gene E3 (10.4K, 14.5K e 14.7K) são funcionalmente conservadas entre os adenovírus. Outras duas proteínas (12.5K e 19K) são encontradas nas espécies B e C, mas não nos adenovírus da espécie F.

A proteína 14.7K desempenha a função de proteger as células infectadas da morte celular mediada por TNF α e FasL (Persson et al., 1978; Tollefson e Wold, 1988; Wang et al., 1988). As proteínas 10.4K e 14.4K formam o complexo denominado RID (*receptor internalization and degradation*). Esse complexo induz a internalização e a degradação dos receptores de morte celular, tais como Fas, TRAIL-R1 e R2, impedindo a ligação desses receptores com os seus ligantes (Tollefson et al., 1990).

A proteína de 19K tem a propriedade de se ligar ao MHC-I, retendo-o no retículo endoplasmático, impedindo assim a exposição de peptídeos virais na superfície celular e a lise das células infectadas pelos linfócitos T citotóxicos (Persson et al., 1980).

A proteína 11.6K ou ADP (*adenovirus death protein*) é a única proteína do gene E3 que é expressa tardiamente, sob ação do MLP (*Major late promoter*) (Tollefson et al., 1996; Tollefson et al., 1996). Essa proteína transmembrânica nuclear é expressa em grande quantidade pelos adenovírus da espécie C, sendo relacionada à lise celular (Tollefson et al., 1996; Tollefson et al., 1996). É interessante ressaltar que o gene E3 dos adenovírus F não expressa essa proteína.

1.1.5.5 O gene E4

O gene E4 expressa em torno de 6 polipeptídeos, denominados de acordo com a sua ORF (*open reading frame*). As suas proteínas estão envolvidas em diversas atividades, tais como: ativação transcricional de promotores heterólogos, tradução de mRNAs virais e supressão da síntese das proteínas da célula hospedeira (Leppard, 1997).

1.1.5.6 RNAs associados aos vírus (VA-RNA)

Os VA-RNAs são pequenos RNAs de dupla fita transcritos pela RNA polimerase III (Kidd et al., 1995). As espécies A, F e B2 possuem apenas um gene VA-RNA (VA-RNAI), enquanto as espécies B1, C e E possuem dois genes (VA-RNAI e II) (Kidd et al., 1995).

A função do VA-RNAI encontra-se bem estabelecida: após a sua síntese na fase inicial da infecção viral, se liga à enzima PKR, antagonizando assim o seu efeito. (proteína quinase dependente de RNA). Este processo resulta no efeito abortivo do mecanismo de defesa anti-viral induzido por IFN (Kitajewski et al., 1986; Katze et al., 1987).

No entanto, permanece desconhecida a função do VA-RNAII.

1.1.5.7 Região de transcrição intermediária

A região de transcrição intermediária codifica duas proteínas multifuncionais (pIX e pIVa2), transcritas por promotores independentes (Binger e Flint, 1984). A proteína pIX tem papel estrutural no capsídeo viral e auxilia no empacotamento do DNA viral (Ghosh-Choudhury et al., 1987). A proteína pIVa2 tem a função de transativar o MLP (Tribouley et al., 1994).

1.1.5.8 Região de transcrição tardia

A unidade de transcrição tardia ocupa aproximadamente 40% do genoma adenoviral, codificando todas as proteínas estruturais, com exceção da pIX. Essa unidade de transcrição é controlada pelo MLP, ocorrendo a formação de um único transcrito primário, o MLTU (*Major late transcript unit*), o qual recebe em torno de 5 a 6 sítios de poliadenilação, e após o processo de *splicing* alternativo, resulta 5 a 6 famílias de mRNA (L1-IIIa; L2-III, VII, V, L3-penton-base, VI; *hexon*, protease 23K; L4-pVIII e L5-fibra) (Mei et al., 2003; Young, 2003).

Durante a fase tardia do ciclo celular, os mRNAs são traduzidos e os polipeptídeos virais são imediatamente liberados dos poliribossomos e transportados ao núcleo para a formação da partícula viral. No interior do núcleo, ocorrem as seguintes etapas: formação do capsômero, formação do capsídeo e incorporação do DNA viral no seu interior.

1.1.6 A proteína fibra e o seu papel na infectividade

A proteína fibra do adenovírus é um homotrímero da proteína IV, a qual é dividida em três regiões: a região globular (*knob*), a haste e a cauda, conforme pode ser visualizado na

figura 5. A proteína fibra na sua forma trimérica é resistente à denaturação por SDS a 25-30°C, indicando que são proteínas extremamente estáveis (Hong and Engler, 1996).

Figura 5: Modelo computacional da estrutura trimérica da fibra do HAdV-2. (1) Região da cauda; (2) região da haste; (3) Região globular C-terminal. Os monômeros (L5) estão representados pelas cores vermelha, verde e azul. **Fonte:** van Raaij et al., 1999.

A região globular carboxi-terminal (C-terminal) da fibra é a responsável pelo reconhecimento do receptor primário, adsorvendo a partícula viral à célula (Philipson et al., 1968). Esse processo pode ser facilmente inibido através da saturação dos receptores com a proteína fibra purificada, indicando que a fibra e a partícula viral competem pelo mesmo receptor (Mei et al., 2002, Segerman e al., 2003). Diversos estudos mostram que quando a região globular da fibra dos adenovírus é expressa em diversos sistemas de expressão (células de inseto e bactéria) esta se organiza naturalmente em trímeros, e somente estes são capazes de reconhecer os receptores, reforçando que este reconhecimento é dependente da estrutura tridimensional da fibra (Henry et al., 1994; Louis et al., 1994).

A região da haste possui repetições de aproximadamente 15 aminoácidos, enoveladas em uma estrutura tipo fibrosa sendo extremamente resistentes a proteases (Stouten et al. 1992; Chroboczek et al., 1995; van Raaij et al., 1999). O número de repetições dos aminoácidos varia de acordo com a espécie de adenovírus, originando fibras com tamanhos diferentes (tabela 1).

A região N-terminal da cauda (MMKRARLEDDFNPVYPY) é conservada em todas as espécies de adenovírus humanos e é responsável pela interação com a *penton*-base.

Alterações na fibra, ou mesmo partículas sem fibras, apresentam um declínio da infectividade em células permissivas, indicando que a proteína fibra é essencial para que ocorra uma infecção eficiente (Legrand et al., 1999; von Seggern et al., 1999; Shayakhmetov et al., 2000; Rea et al., 2001; Havenga et al., 2002).

Devido à importância da proteína fibra no tropismo viral, essa proteína acaba sofrendo uma pressão seletiva, e a troca das fibras é um dos eventos naturais mais comuns de recombinação entre os adenovírus, indicando ser um benefício na emergência de novas cepas (Matumoto et al., 1958; Hatch e Siem, 1966; de Jong et al., 1983; Flomemberg et al., 1987; Kajon et al., 1996).

Miyazawa et al. (1999) demonstraram que quimeras constituídas de capsídeo do adenovírus C e fibra do adenovírus B apresentam o tráfego intracelular similar ao adenovírus B. Esse dado sugere que a fibra é capaz de influenciar no tráfego intracelular dos adenovírus.

A fibra produzida em excesso durante a replicação viral é liberada da célula junto com a *penton*-base. No meio extracelular, as fibras interagem com proteínas que constituem as junções celulares, desmembrando o epitélio, facilitando a liberação dos vírus e conseqüentemente a sua dispersão no trato respiratório ou entérico (Walters et al., 2002; Trotman et al., 2003).

1.1.7 Receptores celulares dos HAdVs

1.1.7.1 O CAR (Coxsackie B and adenovirus receptor)

O CAR é uma proteína de 46 kDa, membro da superfamília das imunoglobulinas, utilizada como receptor tanto pelos coxsackievírus B quanto pelos adenovírus (Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997; Coyne et al., 2005). O CAR é, ainda, um componente das proteínas de adesão celular (*tight junctions*), localizado, sobretudo nas membranas basolaterais de células epiteliais, mantendo a integridade juncional do epitélio (Cohen et al., 2001). O CAR foi descrito como sendo uma proteína composta por 365 aminoácidos, tendo uma seqüência extracelular de 222 resíduos, com dois domínios (D1 e o D2) seguida de um domínio helicoidal transmembrânico e um domínio citoplasmático de 107 resíduos. (Figura 5A e 5B). Os adenovírus reconhecem o D1, enquanto os coxsackievirus reconhecem o D2 (Coyne et al., 2005; Russel, 2000).

Figura 6: Estrutura do CAR: (A) Esquema da estrutura do CAR, indicando os domínios extracelulares D1 e D2 (círculo vermelho), transmembrânico e citoplasmático (círculo verde). A estrutura tridimensional dos domínios D1 e D2 é baseada em análise cristalográfica. (B) Mediação célula a célula pelo CAR. **Fonte:** Coyne et al., 2005.

O CAR é principalmente expresso em linhagens epiteliais, sendo detectado no fígado, rim, pulmão, cérebro, coração, cólon, testículo, próstata e pâncreas, mas não em músculo esquelético, baço, ovário, timo e placenta. Sua expressão também é detectada em células hematopoiéticas, porém em baixos níveis (Philipson e Petterson, 2004).

Foi demonstrado que diversos sorotipos de adenovírus podem utilizar o CAR como receptor primário, apresentando, no entanto, certa variação de afinidade (Roelvink et al., 1998). São exceções os adenovírus humanos da espécie B que não reconhecem o CAR. Os sorotipos 11 e 35 da subespécie B2 interagem com o receptor CD46, uma molécula expressa em todas as células nucleadas humanas (Gaggar et al., 2003); o sorotipo 3, da subespécie B1, por sua vez, utiliza CD80 e CD86 presentes em células dendríticas e linfócitos B (Short et al., 2004).

Além de ser utilizado como receptor primário por algumas espécies de adenovírus, foi observado que o CAR é alvo dos adenovírus durante a fase tardia da infecção viral. Durante essa fase, ocorre a liberação dos virions, e possivelmente das fibras, sendo direcionados para a região basolateral, onde essas estruturas interagem com o CAR, acarretando a ruptura das *tight junctions*, alterando a integridade do epitélio respiratório (Trotman et al., 2003; Walters et al., 2002, Coyne et al., 2005). Essa estratégia facilitaria o escape apical dos vírus na

barreira do epitélio (Figura 6). Dessa forma, a interação fibra-CAR pode ser mais importante não somente para a entrada nas células hospedeiras, mas também para promover a dispersão viral no hospedeiro,. (Walters et al., 2002).

Figura 7: Modelo do escape dos HAdVs no epitélio respiratório. **Fonte:** Walters et al., 2002.

1.1.7.2 CD46

O CD46 é uma glicoproteína de membrana presente em todas as células nucleadas. Essa proteína pertence à família das proteínas reguladoras da ativação do complemento, e seus ligantes são C3b e C4b (Barilla-Labarca et al., 2002). A sua principal função é proteger a célula hospedeira do ataque de complementos homólogos (Liszewski e Aykinson, 1992).

Recentemente, o CD46 foi identificado como receptor de alguns adenovírus da espécie B: HAdV-3 (Sirena et al., 2004); HAdV-11 (Segerman et al., 2003) e HAdV-35 (Gaggar et al., 2003). Além destes o HAdV-35 da espécie D, também, reconhece essa proteína como receptor (Wu et al., 2004).

1.1.7.3 CD80 e CD86

As proteínas CD80 e CD86 são moléculas co-estimulatórias que estão presentes em células dendríticas maduras, linfócitos e macrófagos ativados. Alguns adenovírus da espécie B, como por exemplo, o HAdV-3, subespécie B1, infectam linfócitos e células dendríticas via CD80 e CD86 (Short et al., 2004).

1.1.7.4 Sulfato de heparana

Em um estudo realizado por Dehecchi e colaboradores, 2000, foi demonstrado que a fibra dos HAdV-2 e HAdV-5, através do motivo KKTK presente na haste, é capaz de

reconhecer o sulfato de heparana, que é um glicosaminoglicano (HS-GAGs). Após esse reconhecimento, os vírus foram capazes de infectar células CHO (*chinese hamster ovary*) negativas para o CAR, no entanto, com baixa eficiência.

A função do sulfato de heparana no início da infecção dos adenovírus *in vivo* permanece desconhecida (Dehecchi et al., 2000).

1.1.8 A *penton*-base e sua função

A *penton*-base é um homopentâmero da proteína pIII, a qual é agrupada em estruturas tipo anéis (van Oostrum e Burnett, 1985). A fibra se liga não covalentemente ao centro da *penton*-base, e esse complexo se situa nos vértices do icosaedro, circundados por 5 *hexons*. (Figura 8).

Figura 8: Representação esquemática da *penton*-base (pentamérica) e da fibra (trimérica) dos adenovírus.
Fonte: Segerman et al., 2004.

A *penton*-base dos adenovírus está relacionada ao reconhecimento de receptores secundários, promovendo a internalização da partícula viral, e, dentro da célula, ao escape da partícula viral do endossomo (Wickham et al., 1993; Seth, 1994; Meier et al., 2002).

A etapa de internalização da partícula viral na célula hospedeira é mediada por dois motivos distintos, dependendo da espécie de adenovírus: o motivo RGD (Arg-Gly-Asp) e o motivo LDV (Leu, Asp, Val) (Ruoslahti e Pierschbacher, 1987; Komoriya et al., 1991). Esses motivos interagem com os receptores secundários (integrinas) através das ligações de cátions divalentes (Xiong et al., 2003).

As integrinas são heterodímeros formados pelas subunidades α e β . São moléculas de adesão celular que mediam o contato da célula com a matrix extracelular como, por exemplo, fibronectina, vitronectinas e contatos célula a célula (Alberts et al., 1994).

Os adenovírus das espécies B e C reconhecem as integrinas $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$ e $\alpha v \beta 5$ (Wickham et al., 1993; Davison et al., 2001 e Li et al., 2001). No entanto, não se sabe quais as

integrinas reconhecidas pela *penton*-base do adenovírus da espécie F (Tiemessen e Kidd, 1995).

O reconhecimento das integrinas celulares pelo motivo RGD dos adenovírus resulta o agrupamento das integrinas na membrana celular, potencialização da sinalização celular, promovendo a internalização da partícula viral (Li et al., 1998a ; Li et al., 1998b ; Chiu et al., 1999).

1.1.9 Tropismo celular

Os adenovírus têm a habilidade de infectar uma vasta gama de tecidos, sendo identificados como agentes etiológicos de diversas patologias, como, por exemplo, síndromes respiratórias, ceratoconjuntivites, infecções entéricas e renais.

Os estudos filogenéticos dos diversos sorotipos distribuem os adenovírus em dois grupos: aqueles relacionados às infecções gastrointestinais (A e F) e os respiratórios (B, C e E).

As bases moleculares do tropismo e da patogenicidade desses vírus são pouco conhecidas. A permissividade celular e o tropismo viral dependem, dentre outros fatores, da expressão dos receptores na membrana celular e da sua interação com as proteínas virais (Tiemessen e Kidd, 1994; Mathias et al., 1994; DiGuilmi et al., 1995; Bergelson et al., 1997; Roelvink et al., 1998).

Os padrões patogênicos dos adenovírus podem ser agrupados em 5 tipos: infecções assintomáticas (espécies A e D), infecções respiratórias agudas (espécies C, B1 e E), infecções gastrointestinais (espécies A e F), infecções do trato urinário (espécie B2) e infecções oculares (espécie D) (Wadell, 1984; Allard et al., 1992).

Os adenovírus das diferentes espécies podem apresentar: tropismo distinto (o HAdV-41 possui tropismo entérico, o HAdV-37 possui tropismo ocular); alta ou baixa afinidade pelo receptor CAR (HAdV-2 e HAdV-37); uso de receptores distintos (espécie C - CAR, espécie B – CD46, CD80 e CD86); diferentes mecanismos de penetração; transporte intracelular e diferentes tempos de chegada ao poro nuclear.

1.1.10 O processo de entrada dos adenovírus

Os estudos realizados com o protótipo HAdV-2 (espécie C) mostraram que as proteínas envolvidas no reconhecimento da célula hospedeira são a fibra e a *penton* base, cujo processo ocorre em duas etapas distintas, porém cooperativas. Na primeira, a fibra, através da

sua região globular C-terminal, se adsorve ao receptor primário, denominado CAR, aproximando a partícula viral da membrana celular (Louis et al., 1994; Chroboczek et al., 1995; Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997). A seguir, numa segunda etapa, a *penton*-base, dada a presença da sequência RGD, interage com integrinas $\alpha\beta 3$ e $\alpha\beta 5$ presentes na membrana celular (Mathias et al., 1994). Dessa interação resulta a internalização da partícula viral, por mecanismo de endocitose mediada por receptor com a formação de vesículas revestidas por clatrina (Miyazawa et al., 2001; Medina-Kawe, 2003). Os dois eventos podem ser experimentalmente dissociados, pois em baixas temperaturas (0-4°C) ocorre apenas a adsorção da partícula viral, ao passo que a endocitose requer temperatura de 37 °C.

A entrada do vírus na célula requer eventos de sinalização celular, tais como, a sinalização mediada por fosfatidilinositol 3-OH quinase (PI3K) e pequenas GTPases pertencentes à família Rho (Cdc42 e Rac), resultando a polimerização dos microfilamentos de actina e endocitose mediada por clatrina (Li et al., 1998; Medina-Kawe, 2003).

Durante a internalização, os adenovírus são desmontados, e as fibras são liberadas, ocorrendo a exposição da *penton*-base (Greber et al., 1996). Com a acidificação do endossomo, pH 6.0, a *penton*-base sofre mudanças conformacionais, expondo domínios hidrofóbicos, os quais interagem com a membrana do endossomo, ocorrendo assim a sua ruptura e o escape dos vírus (Seth et al., 1994).

Com o objetivo de chegar ao poro nuclear, os adenovírus são transportados pelos microtúbulos por intermédio de proteínas motoras, como as dineínas (Leopold et al., 2000; Suomalainen et al., 1999).

A entrada no núcleo é mediada pela interação da proteína *hexon* com proteínas do complexo do poro nuclear (CAN/Nup214) que ancoram a partícula no poro nuclear, iniciando o desnudamento (Trotman et al., 2001). A interação do capsídeo viral com as histonas nucleares H1 resulta na importação de fatores, tais como a proteína Hsp 70, que inicia a liberação do DNA viral do capsídeo para o núcleo (Saphire et al., 2000; Trotman et al., 2001).

A passagem do core viral (DNA, TP, VII, V e μ) através do NPC acontece por intermédio da proteína p32, uma proteína localizada na mitocôndria, mas também detectada no núcleo (Matthews e Russel, 1998). O DNA viral e as proteínas V e VII podem ser detectados no núcleo entre 1 e 2 horas após infecção (Greber et al., 1997; Matthews e Russell, 1998).

Figura 9: Esquema da via de infecção do adenovírus. (1) Reconhecimento do CAR pela região globular da fibra; (2) Reconhecimento das integrinas pela *penton*-base; (3) Formação da fossa revestida por clatrina e liberação das fibras; (4) Endocitose do adenovírus com formação da vesícula revestida por clatrina; (5) Liberação das fibras do adenovírus e acidificação do endossomo; (6) Lise do endossomo devido à interação da *penton*-base com a membrana; (7) Transporte do capsídeo pela dineína migrando sobre o microtúbulo; (8) Interação do capsídeo com proteínas do poro nuclear; (9) Liberação do *core* no poro nuclear. **Fonte:** Modificado de Medina-Kauwe, 2003.

1.1.11 Replicação dos adenovírus

Assim que o *core* viral é entregue no NPC, o genoma viral é direcionado para a matrix nuclear, onde ocorre a interação da TP com a proteína celular CAD (enzima de síntese de pirimidina) e, possivelmente, com outras proteínas presentes na matrix nuclear (Angeletti e Engler, 1998; Fredman e Engler, 1993).

O DNA dos adenovírus contém regiões terminais repetitivas (ITRs), que estão associadas à TP covalentemente à terminação 5' do DNA viral (Rekosh et al., 1977). A replicação do DNA viral começa em ambas as terminações 5' do genoma, onde seqüências internas à ITR (5'-ATAATATACC-3') são reconhecidas pelo heterodímero pTP e DNA polimerase (Hay et al., 1995).

Para o início da replicação do DNA viral são necessários fatores celulares, NF I e III. Os fatores celulares NF I se ligam à DNA polimerase e à pTP, recrutando o complexo pTP-DNA polimerase para a origem de replicação; o NFIII estabiliza a fita de DNA (Verrijzer et al., 1991). A seguir, a DNA polimerase celular adiciona um monofosfato de citosina (3'OH) diretamente à pTP, funcionando como um *primer* para a DNA polimerase (Shenk, 1996).

Após a adição de mais nucleotídeos na nova fita de DNA, a DNA polimerase se separa da pTP (King et al., 1997).

A cadeia de elongação requer duas proteínas virais codificadas pela E2 (a polimerase viral e a DNA *binding protein*) e o fator celular NF II (Shenk, 1996). A DNA *binding protein* desempenha a função de estabilizar a hélice do DNA durante a sua elongação e replicação, facilitando assim a função da polimerase.

1.1.12 Montagem das partículas virais

A transcrição de genes tardios tem início após a replicação do DNA. A maior parte dos mRNAs tardios individuais é produzida a partir de um grande transcrito (MTLU), o qual é codificado pelo filamento direito do genoma viral, sendo processado posteriormente em mRNAs individuais.

As proteínas do capsídeo são produzidas no citoplasma e, em seguida, transportadas para o núcleo, ocorrendo assim a montagem das novas partículas virais nos corpos de inclusão nucleares. Os *hexons* se agrupam formando as faces do icosaédro. O DNA viral penetra no capsídeo vazio através de uma abertura em um dos vértices. Por fim, os *pentons* (base e fibra) fecham a partícula viral. (Ostapchuk e Hearing, 2003).

A montagem da progênie viral é acompanhada da alteração da permeabilidade da membrana nuclear, sendo necessária para que ocorra a liberação dos vírus recém formados para o citoplasma (Tollefson et al., 1996). A seguir, ocorre a desintegração da membrana plasmática e liberação dos vírus da célula (Russel, 2000).

O processo de lise celular induzida pelos adenovírus encontra-se bem descrito para os adenovírus da espécie C. É interessante ressaltar que esse processo não se aplica a todos os adenovírus, como por exemplo, aos adenovírus da espécie F.

1.2 Adenovírus humanos da espécie F (HAdV-F)

Flewett et al.(1974) utilizando técnica de microscopia eletrônica no diagnóstico de gastroenterites, descrevem um novo grupo de adenovírus presente em grande quantidade nas fezes diarréicas. Takiff et al.(1981) isolam um adenovírus entérico em células HEK-293 ou *Grahan cell*. A seguir, de Jong et al.(1983) caracterizam os adenovírus entéricos (sorotipos 40 e 41) como membros da espécie F.

Atualmente, os adenovírus dos sorotipos 40 e 41 são representados por duas cepas “Dugan” e “Tak”, respectivamente, ambas isoladas na Holanda, a partir de fezes de crianças com diarreia (de Jong et al., 1983).

Os HAdV-F, sorotipos 40 e 41 (HAdV-40 e HAdV-41), de tropismo entérico específico, são considerados de grande importância na etiologia da gastroenterite infantil aguda (Tiemessen e Kidd, 1994; Tiemessen e Kidd, 1995). Os adenovírus entéricos se replicam muito bem no intestino de crianças com diarreia, com liberação de 10^{11} partículas virais por grama de fezes (Uhnou et al., 1984). Contudo, esses vírus são fastidiosos em cultura celular, sugerindo uma forte adaptação da replicação viral no epitélio intestinal (Tiemessen et al., 1993).

1.2.1 Características dos HAdVs-F

Os HAdV-F (HAdV-40 e 41) apresentam características moleculares, biológicas e estruturais diferentes dos demais adenovírus (Tiemessen et al., 1993; Tiemessen e Kidd, 1995).

Os HAdVs-F apresentam modificações nos genes que codificam proteínas precoces (E1A; E1B E2, E3 e E4) e possuem dois tipos de fibras, uma longa e outra curta, que estão distribuídas de forma alternada, uma em cada base (*Pieniazek et al.*, 1990; *Favier et al.*, 2002). Essa característica estrutural, dentro de gênero *Mastadenovirus*, é exclusiva dos HAdV-40 e 41.

Outra diferença estrutural dos HAdV-40 e HAdV-41 é a ausência do motivo RGD na *penton*-base, importante na etapa de penetração do vírus na célula. O HAdV-40 carrega o motivo RGAD (Arg-Gly-Ala-Asp); e o HAdV-41, o motivo IGDD (Ile-Gly-Asp-Asp) (*Albinsson e Kidd*, 1999). Não são conhecidas as proteínas celulares que interagem com a *penton*-base dos adenovírus da espécie F.

1.2.2 As fibras do HAdV-41

Ao contrário dos outros adenovírus humano, o gene da fibra (L5) dos HAdV-F possui 2 ORFs (*Kidd et al.*, 1993; *Yeh et al.*, 1994). A primeira ORF (L5-1) codifica uma proteína denominada fibra curta; e a segunda (L5-2) codifica uma proteína denominada fibra longa. É interessante ressaltar que essas proteínas se encontram distribuídas igualmente na partícula viral, uma em cada *penton*-base do vírus (*Pieniazek et al.*, 1990; *Favier et al.*, 2002).

1.2.2.1 Fibra longa

A proteína fibra longa é um polipeptídeo de 562 aminoácidos e possui o peso molecular de 60.5kDa (Pieniazek et al., 1989; Kidd et al., 1990). O comprimento da fibra longa (obtido da região globular C-terminal até a região N-terminal da haste) é de 34nm (Chrobackzek et al., 1995; Favier et al., 2002). A análise de predição do ponto isoelétrico (*pI*) da fibra longa completa indica um *pI* de 7.51; enquanto que o *pI* da região globular é de 8.64 (Favier et al., 2002; Favier et al., 2004).

Sabe-se que a fibra longa dos HAdV-F reconhece o CAR, no entanto, com menor afinidade quando comparado com os outros adenovírus humanos (Roelvink et al., 1998). Esse dado sugere que a fibra longa seja utilizada pelo HAdV-41 na etapa de adsorção viral à célula hospedeira. As características da fibra longa do HAdV-41 podem ser visualizadas na tabela 3.

1.2.2.2 Fibra curta

A proteína fibra curta é um polipeptídeo de 387 aminoácidos e possui o peso molecular de 40.1kDa (Pieniazek et al., 1989; Kidd et al., 1990). O comprimento da fibra curta (isto é, obtido da região globular C-terminal até a região N-terminal da haste) é de 20nm (Chrobackzek et al., 1995; Favier et al., 2002). A fibra curta completa tem um *pI* de 9.13, enquanto que o *pI* da região globular é de apenas 7.24 (Favier et al., 2002; Favier et al., 2004).

Sabe-se que a fibra curta do HAdV-41 não reconhece o CAR (Roelvink et al., 1998). No momento, não foi elucidado o receptor utilizado pela fibra curta (tabela 3).

Em um estudo realizado por Favier et al. (2004), foi demonstrado que as fibras longa e curta do HAdV-41 purificadas são resistentes tanto à exposição ao meio ácido (pH 2.0) quanto à exposição a quimotripsina. Também foi observado que, após tratamento com ácido ou digestão, a fibra longa não sofrera alteração no seu tropismo pelo CAR (domínio extracelular). No entanto, o mesmo resultado não foi obtido com a fibra curta do HAdV-41, ou seja, mesmo após o tratamento com ácido e com quimotripsina, não houve o reconhecimento do CAR pela fibra. É interessante ressaltar que não deve ser ignorada a hipótese de que a fibra curta após exposição às enzimas gástricas reconheça outros receptores presentes na célula.

Seiradake e Cusack, 2005 demonstraram que a região globular C-terminal da fibra curta do HAdV-41 sofre proteólise após exposição à pepsina. Esse resultado pode ser um indício de que o HAdV-41 expõe epítomos após a sua exposição às enzimas presentes no trato gastro-intestinal, favorecendo assim a sua interação com o mesmo.

Com base nos trabalhos publicados, acreditamos que existam diferenças no HAdV-41 que devem ser elucidadas a fim de se desenvolverem vetores de terapia gênica direcionada para o epitélio intestinal, assim como vetores vacinais administrados por via oral.

Tabela 3: Valores de predição do *pI* das proteínas do capsídeo dos adenovírus de diferentes espécies.

Tropismo	Sorotipo	Hexon	Penton-base	Fibra (knob)	Espécie	Receptor primário
Entérico	HAdV-41	5.49	5.75	7.51 (8.64) (longa)	F	CAR
Entérico	HAdV-41			9.13 (7.24) (curta)	F	-
Respiratório	HAdV-2	4.86	5.05	5.85 (6.35)	C	CAR
Respiratório	HAdV-5	5.03	5.18	5.89 (5.91)	C	CAR
Respiratório	HAdV-3	5.32	5.26	5.61	B	CD46 CD80 CD86

Fonte: Modificado de Favier et al., 2004.

1.3 Adenovírus e terapia gênica

Os Adenovírus têm sido utilizados em terapia gênica como vetores, desenvolvidos a partir dos tipos HAdV-2 e HAdV-5. Esses vírus possuem características importantes para o seu uso em terapia gênica, tais como: crescimento em cultura de células com obtenção de títulos altos e espaço no genoma viral para a inserção de genes heterólogos (Lemiale et al., 2007).

O epitélio intestinal possui diversas características para a realização da terapia gênica, como, por exemplo, o seu fácil acesso via lúmen, que permitiria transferência gênica direta, *in vivo*, por administração via oral ou por métodos de endoscopia (Sandberg et al., 1994; Croyle et al., 1998). O epitélio intestinal apresenta uma grande área tissular, boa absorção e capacidade de secretar proteínas na circulação sanguínea (Ledley et al., 1992).

O epitélio intestinal é alvo tanto de imunização oral quanto de tratamento de distúrbios genéticos ou metabólicos (como a fibrose cística, pólipos adenomatosos, fenilcetonúria e o câncer de cólon) (Mestecky, 1987; Croyle et al., 1998)

Os vetores adenovirais, derivados dos protótipos HAdV-2 e HAdV-5, quando testados quanto à sua expressão no epitélio intestinal, têm a sua eficácia reduzida (Croyle et al., 1998).

Um estudo realizado por Croyle et al.(1998) demonstrou que a capacidade de adsorção e penetração do HAdV-5 (espécie C) e do HAdV-41(espécie F) em enterócitos é distinta. Nas

células não diferenciadas, os dois sorotipos se comportam de forma similar. No entanto, nas células diferenciadas, o HAdV-5 tem a sua penetração e transdução afetada, ao passo que o HAdV-41 não apenas mantém a sua capacidade de penetração, como também auxilia na transdução do HAdV-5.

O decréscimo da expressão de integrinas $\alpha\beta$ na membrana dos enterócitos diferenciados é a razão provável da não internalização do HAdV-5. Por sua vez, dada as suas características estruturais, o HAdV-41 deve utilizar outras proteínas celulares como receptores, sendo algumas, talvez, de importante expressão em enterócitos diferenciados (Croyle et al., 1998).

Recentemente, têm sido desenvolvidos vetores de terapia gênica não viral, constituídos de proteínas ou lipídios. Alguns desses vetores são produzidos a partir de proteínas virais recombinantes ou peptídeos sintéticos derivados de proteínas virais (Fender et al., 1997; Zhang et al., 1999).

1.3.1 Dodecaedros recombinantes

Gelderblon et al.(1961) observaram a formação de complexos protéicos com forma dodecaédrica durante o ciclo viral do HAdV-3. No entanto, não foi observada a formação desse complexo durante o ciclo viral dos HAdV-2 e 5 (Boulanger e Puvion, 1976; Karayan et al., 1994; Fender et al., 1997).

Diversos autores descrevem o dodecaedro como um *virus-like particle* (VLP) formado a partir da base do HAdV-3 (12 bases). Essa quimera apresenta 28nm de diâmetro, possui uma cavidade de 80 Å e orifícios entre cada pentâmero de 20 Å. O dodecaedro pode acomodar moléculas entre 225 e 317 kDa, podendo ser utilizado para transporte de drogas. No entanto, o mesmo não é recomendado para DNAs maiores do que 100pb (Fender et al., 1997; Fuschiotti et al., 2005; Fuschiotti et al., 2006).

Fuschiotti et al.(2005) observaram que a pentamerização da base do HAdV-3 ocorre por causa da interação entre os domínios N-terminais, resultando a formação da *penton*-base. A seguir, ocorre proteólise desses domínios, com perda de 48 aminoácidos, resultando a dodecamerização e, conseqüentemente, a formação do dodecaedro.

Dodecaedros recombinantes podem ser formados *in vitro*, tanto pela expressão dos genes da base e da fibra em sistema eucarioto, quanto pela incubação das proteínas base e fibra purificadas (Fender et al., 1997; Fender et al., 2003). Essa interação ocorre pelo fato de a região N-terminal da cauda da fibra dos adenovírus ser conservada entre as diferentes

espécies, resultando a obtenção de quimeras bases do HAdV-3 acrescidas da fibra do sorotipo desejado (Fender et al., 1997).

A seguir, pode-se visualizar a representação esquemática dos dodecaedros recombinantes, constituídos de base do HAdV-3 (Bs-Dd) e base do HAdV-3 e fibra (Pt-Dd).

Figura 10: Representação esquemática de um *penton* (base e fibra) e estrutura dos dodecaedros de HAdV3 com base em microscopia eletrônica. A: Representação esquemática da *penton*-base do HAdV-3 (Pt) que consiste na fibra trimérica e na base pentamérica. B e C: A montagem tanto da base quanto da base e fibra resultam nas estruturas denominadas Pt-Dd e Bs-Dd, conforme podem ser visualizadas tanto nos esquemas quanto nas micrografias (D e E). **Fonte:** Vivès et al., 2004.

Fender et al. (1997) construíram um vetor, expressando a fibra e a *penton*-base do HAdV-3 em sistema baculovírus. Os autores observaram não somente a formação de dodecaedros recombinantes, mas também que essas quimeras foram capazes de infectar células HeLa e atingir o núcleo, de maneira similar à partícula viral. Essas quimeras, além de possuir o motivo RGD, responsável pelo reconhecimento das integrinas celulares, possuem também o motivo KQKR, responsável pelo reconhecimento de sulfato de heparana (Vivès et al., 2004).

Garcel et al. (2006) demonstraram que essas quimeras são capazes de transportar proteínas para o interior da célula, indicando um possível uso desses dodecaedros em terapia gênica direcionada.

A utilização de quimeras é empregada em maior proporção nos estudos de terapia gênica, ensaios de imunização e desenvolvimento de vacinas e estudos estruturais de proteínas virais. Entretanto, essa importante ferramenta pode ser empregada no melhor conhecimento da biologia dos vírus ao direcioná-la para células-alvo diferentes.

1.3.2 Sistema de expressão baculoviral e obtenção de dodecaedros recombinantes

1.3.2.1 Os Baculovírus

Os baculovírus são vírus de dupla fita de DNA, circular, com aproximadamente 130 Kb (Arif, 1986). São vírus envelopados, e o seu material genético encontra-se condensado em uma nucleoproteína denominada *core* (Rizzi, 2006).

Durante a infecção pelo baculovírus, são formados dois tipos de progênie viral: os *budded vírus* e os vírus oclusos (Granados e Williams, 1986). Eles se diferem em forma de brotamento e liberação dos nucleocapsídeos. Após a montagem do nucleocapsídeo no núcleo, e liberação para o citoplasma, os *budded vírus* migram através da membrana plasmática, adquirindo assim o envelope viral. Esses vírus são responsáveis pela infecção célula a célula. Os vírus oclusos, no núcleo são envoltos em uma matriz denominada poliedrina, a qual contribui para uma maior estabilidade do vírus na natureza. Esses vírus são responsáveis pela infecção primária, ou seja, a infecção da lagarta no meio ambiente. No entanto, a poliedrina não é necessária para a biogênese do vírus em cultura celular (Castro et al., 1999).

1.3.2.2 Os baculovírus recombinantes

O sistema de expressão baculoviral é constituído de um vetor viral que permite a clonagem e a expressão de genes heterólogos em células de inseto da ordem lepidoptera ou mesmo no próprio inseto (Roy et al., 1997).

Nos vetores baculovirais, o gene da poliedrina foi excluído para que, no seu lugar, pudesse ser inserido o gene de interesse. O promotor do gene poliedrina é um promotor forte e não constitutivo. Os genes que estão sob a ação desse promotor começam a ser expressos 24 horas pós-infecção, com picos de expressão que se estendem até 96 horas (O' Reilly et al., 1992).

O sistema de expressão em células de lepidóptera, utilizando vetores baculovirais é bastante vantajoso, pois expressa proteínas heterólogas em altos níveis; possui promotores fortes e ativos durante a fase tardia da infecção viral, possui a capacidade de clonagem de grandes insertos (15.000 pares de base), é eficiente na expressão de genes eucariotos e é de fácil manuseio em laboratório (Castro et al., 1999).

O sistema de expressão de baculovírus em células de insetos é apropriado para a síntese de proteínas eucarióticas, pois permite o enovelamento da estrutura da proteína, a formação de pontes dissulfídicas, oligomerização, modificações pós-traducionais (incluindo

clivagem de peptídeo sinal, clivagem proteolítica, N-glicosilação, O-glicosilação, acilação, amidação, fosforilação e carboximetilação), similares às produzidas em células de mamíferos (Castro et al., 1999).

O sistema de expressão baculoviral permite a expressão de uma única proteína, assim como, de múltiplas proteínas ou mesmo quimeras, através da co-infecção de culturas com vários baculovírus recombinantes.

Atualmente, os vetores baculovirais têm sido muito utilizados para a obtenção de VLPs em células de inseto, como, por exemplo, os dodecaedros recombinantes.

Os VLPs obtidos em sistema baculoviral podem ser utilizados em diversos processos, tais como verificar a montagem das proteínas virais na ausência do vírus infeccioso, produção de antígenos para ensaios de imunização, produção de proteínas para o desenvolvimento de kits de diagnóstico e produção de quimeras para estudos de interação com células (Maranga et al., 2002; Noad e Roy, 2003; Petry et al., 2003; Garcea e Gissman, 2004).

Fender et al.(1997) utilizaram o sistema de expressão baculoviral para a obtenção de dodecaedros de HAdV-3 recombinantes. Após as análises por microscopia eletrônica, foi verificado que os dodecaedros foram expressos, montados corretamente e em grande quantidade, ressaltando a eficiência do sistema de expressão.

Neste trabalho, foi utilizado o sistema de expressão baculoviral para a obtenção de dodecaedros recombinantes base-Ad3 contendo as fibras curta e longa do HAdV-41.

Acreditamos que a utilização destas quimeras em ensaios de interação com células permissivas ao HAdV-41 elucidará importantes questões, tais como: melhor compreensão da interação desse vírus com as células, tropismo e até mesmo o reconhecimento de um receptor pela fibra curta. O estabelecimento da função da fibra curta poderá levar ao desenvolvimento de vetores de terapia gênica direcionada ou mesmo ao desenvolvimento de vetores vacinais administrados por via-oral.

6 CONCLUSÕES

- Após a padronização das técnicas de cultivo e purificação do HAdV-41, foi obtido um estoque viral composto de partículas virais completas (capsídeo íntegro e presença das duas fibras, distribuídas alternadamente) com um título viral bastante satisfatório. A cinética de infecção do HAdV-41 em células HEK-293 (comparada com a cinética de infecção do HAdV-2) apresentou um ciclo infectivo mais lento, com acúmulo de partículas virais na célula a partir de 72 horas até 156 horas pós infecção e liberação da progênie viral por mecanismo não lítico;
- Os dodecaedros base-Ad3+FC-Ad41, baseRGEHS-Ad3+FC-Ad41 e base-Ad3+FL-Ad41 foram obtidos por co-expressão em células High Five™;
- Após análise dos dodecaedros por microscopia eletrônica de transmissão, foi observada a montagem completa do dodecaedro base-Ad3+FC-Ad41 (composto pela base do HAdV-3 e pela fibra curta do HAdV-41, uma por base), e a montagem incompleta do dodecaedro base-Ad3+FL-Ad41 (composto pela base do HAdV-3 e pouca fibra longa do HAdV-41, apenas em algumas bases);
- Nos ensaios de interação do dodecaedro baseRGEHS-Ad3+FC-Ad41, concluiu-se que a proteína FC talvez não desempenha função nas etapas de adsorção e penetração em células HEK-293 e CaCo2 não diferenciadas. Após a exposição da fibra curta à enzima pepsina, foi verificado que essa proteína foi clivada, com a liberação de um peptídeo de 6 kDa. Esse resultado pode ser um indício de que a proteína fibra curta do HAdV-41 expõe epítomos após a sua proteólise por pepsina, que podem favorecer a interação desse vírus com outros receptores no trato gastro-intestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts Watson J. Molecular biology of the Cell. 3th ed. New York: Garland publishing; 1994. Chapter 19.

Albinsson B, Kidd AH. Adenovirus type 41 lacks an RGD alpha(v)-integrin binding motif on the penton base and undergoes delayed uptake in A549 cells. *Virus Res.* 1999; 64:125-36.

Allard A, Albinsson B, Wadell G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1992 ;37:149-57.

American Type Culture Collection™ - ATCC. CaCo2.
[http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atc_cNum= HTB-37™](http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atc_cNum=HTB-37™)
[2008 jan 4].

Anderson CW, Young ME, Flint SJ. Characterization of the adenovirus 2 virion protein, mu. *Virology.* 1989;172:506-12.

Angeletti PC, Engler JA. Adenovirus preterminal protein binds to the CAD enzyme at active sites of viral DNA replication on the nuclear matrix. *J Virol.* 1998;72:2896-904.

Arif, BM. The Structure of the viral genome. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1986;131: 21-29.

Bai M, Harfe B, Freimuth P. Mutations that alter an 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.* 1993;67:5198-205.

Barilla-LaBarca ML, Liszewski MK, Lambris JD, Hourcade D, Atkinson JP. Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. *J Immunol.* 2002;168:6298-304.

Basic Local Alignment Search Tool (Blast): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html> [2005 Out 20].

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Benkő M, Harrach B, Russel WC. Adenoviridae. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CV, Bishop DHL. Virus Taxonomy. Seventh Report of International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press; 1999. p. 227-38.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 1997;275:1320-3.

Berk AJ, Lee F, Harrison T, Williams J, Sharp PA. Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell*. 1979;17:935-44.

Binger MH, Flint SJ. Accumulation of early and intermediate mRNA species during subgroup C adenovirus productive infections. *Virology*. 1984;136:387-403.

Boulanger PA, Puvion F. Occurrence of a peculiar type of adenovirus 2 penton oligomer. *Intervirology*. 1976;7:126-34.

Brown M, Petric M, Middleton PJ. Diagnosis of fastidious enteric adenoviruses 40 and 41 in stool specimens. *J Clin Microbiol*. 1984;20:334-8.

Brown M. Selection of nonfastidious adenovirus species in 293 cells inoculated with stool specimens containing adenovirus 40. *J Clin Microbiol*. 1985;22:205-9.

Brown M, Petric M. Evaluation of cell line 293 for virus isolation in routine viral diagnosis. *J Clin Microbiol*. 1986;23:704-8.

Brown M, Wilson-Friesen HL, Doane F. A block in release of progeny virus and a high particle-to-infectious unit ratio contribute to poor growth of enteric adenovirus types 40 and 41 in cell culture. *J Virol*. 1992;66:3198-205.

Cao J, Arulanandam R, Vultur A, Anagnostopoulou A, Raptis L. Adenovirus E1A requires c-Ras for full neoplastic transformation or suppression of differentiation of murine preadipocytes. *Mol Carcinog*. 2007;46:284-302.

Castro MEB, Souza ML, Sihler W, Rodrigues JCM, Ribeiro BM. *Biologia Molecular de Baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil*. *Pesq agropec*. 1999; 34:1733-1761.

Chatterjee PK, Vayda ME, Flint SJ. Adenoviral protein VII packages intracellular viral DNA throughout the early phase of infection. *EMBO J.* 1986;5:1633-44.

Chiba S, Nakata S, Nakamura I, Taniguchi K, Urasawa S, Fujinaga K, Nakao T. Outbreak of infantile gastroenteritis due to type 40 adenovirus. *Lancet.* 1983;2:954-7.

Chillon M, Bosch A, Zabner J, Law L, Armentano D, Welsh MJ, Davidson BL. Group D adenoviruses infect primary central nervous system cells more efficiently than those from group C. *J Virol.* 1999;73:2537-40.

Chiou SK, Tseng CC, Rao L, White E. Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J Virol.* 1994;68:6553-66.

Chiu CY, Mathias P, Nemerow GR, Stewart PL. Structure of adenovirus complexed with its internalization receptor, alphavbeta5 integrin. *J Virol.* 1999;73:6759-68.

Chroboczek J, Bieber F, Jacrot B. The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology.* 1992;186:280-5.

Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:15191-6.

Coyne CB, Bergelson JM. CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:869-82.

Croyle MA, Walter E, Janich S, Roessler BJ, Amidon GL. Role of integrin expression in adenovirus-mediated gene delivery to the intestinal epithelium. *Hum Gene Ther.* 1998;9:561-73.

Croyle MA, Stone M, Amidon GL, Roessler BJ. In vitro and in vivo assessment of adenovirus 41 as a vector for gene delivery to the intestine. *Gene Ther.* 1998;5:645-54.

Davison AJ, Telford EA, Watson MS, McBride K, Mautner V. The DNA sequence of adenovirus type 40. *J Mol Biol.* 1993;234:1308-16.

Davison E, Kirby I, Whitehouse J, Hart I, Marshall JF, Santis G. Adenovirus type 5 uptake by lung adenocarcinoma cells in culture correlates with Ad5 fibre binding is mediated by $\alpha(v)\beta 1$ integrin and can be modulated by changes in $\beta 1$ integrin function. *J Gene Med.* 2001;3:550-9.

Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol.* 2003;84:2895-908.

de Jong JC, Wigand R, Kidd AH, Wadell G, Kapsenberg JG, Muzerie CJ, Wermenbol AG, Firtzlaff RG. Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. *J Med Virol.* 1983;11:215-31.

Dehecchi MC, Tamanini A, Bonizzato A, Cabrini G. Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology.* 2000;268:382-90.

Dehecchi MC, Melotti P, Bonizzato A, Santacatterina M, Chilosi M, Cabrini G. Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *J Virol.* 2001;75:8772-80.

Di Guilmi AM, Barge A, Kitts P, Gout E, Chroboczek J. Human adenovirus serotype 3 (Ad3) and the Ad3 fiber protein bind to a 130-kDa membrane protein on HeLa cells. *Virus Res.* 1995;38:71-81.

Enders JF, Bell JA, Dingle JH, Francis T Jr, Hilleman MR, Huebner RJ, Payne AM. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science.* 1956;124:119-20.

Espejo RT, López S, Arias C. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J Virol.* 1981;37:156-60.

Estes MK, Graham DY, Mason BB. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol.* 1981;39:879-88.

Expert Protein Analysis System - ExPASy Proteomics Server. <http://www.expasy.org> [2003 Dez 05].

Favier AL, Schoehn G, Jaquinod M, Harsi C, Chroboczek J. Structural studies of human enteric adenovirus type 41. *Virology.* 2002;293:75-85.

Favier AL, Burmeister WP, Chroboczek J. Unique physicochemical properties of human enteric Ad41 responsible for its survival and replication in the gastrointestinal tract. *Virology*. 2004;322:93-104.

Fender P, Ruigrok RW, Gout E, Buffet S, Chroboczek J. Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat Biotechnol*. 1997;15:52-6.

Fender P, Schoehn G, Foucaud-Gamen J, Gout E, Garcel A, Drouet E, Chroboczek J. Adenovirus dodecahedron allows large multimeric protein transduction in human cells. *J Virol*. 2003;77:4960-4.

Fender P, Boussaid A, Mezin P, Chroboczek J. Synthesis, cellular localization, and quantification of penton-dodecahedron in serotype 3 adenovirus-infected cells. *Virology*. 2005;340:167-73.

Fender P, Schoehn G, Perron-Sierra F, Tucker GC, Lortat-Jacob H. Adenovirus dodecahedron cell attachment and entry are mediated by heparan sulfate and integrins and vary along the cell cycle. *Virology*. 2008;371:155-64.

Fessler SP, Chin YR, Horwitz MS. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF) signal transduction by the adenovirus group C RID complex involves downregulation of surface levels of TNF receptor 1. *J Virol*. 2004;78:13113-21.

Field J, Gronostajski RM, Hurwitz J. Properties of the adenovirus DNA polymerase. *J Biol Chem*. 1984;259:9487-95.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Diagnostic electron microscopy of faeces. I. The viral flora of the faeces as seen by electron microscopy. *J Clin Pathol*. 1974;27:603-8.

Flomenberg PR, Chen M, Horwitz MS. Characterization of a major histocompatibility complex class I antigen-binding glycoprotein from adenovirus type 35, a type associated with immunocompromised hosts. *J Virol*. 1987;61:3665-71.

Fredman JN, Engler JA. Adenovirus precursor to terminal protein interacts with the nuclear matrix in vivo and in vitro. *J Virol*. 1993;67:3384-95.

Furcinitti PS, van Oostrum J, Burnett RM Adenovirus polypeptide IX revealed as capsid cement by difference images from electron microscopy and crystallography. *EMBO J*. 1989;8:3563-70.

Fuschiotti P, Fender P, Schoehn G, Conway JF. Development of the dodecahedral penton particle from adenovirus 3 for therapeutic application. *J Gen Virol*. 2006;87:2901-5.

Fuschiotti P, Schoehn G, Fender P, Fabry CM, Hewat EA, Chroboczek J, Ruigrok RW, Conway JF. Structure of the dodecahedral penton particle from human adenovirus type 3. *J Mol Biol*. 2005;356:510-20.

Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med*. 2003;9:1408-12.

Gao W, Robbins PD, Gambotto A. Human adenovirus type 35: nucleotide sequence and vector development. *Gene Ther*. 2003;10:1941-9.

Garcea RL, Gissmann L. Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Curr Opin Biotechnol*. 2004;15:513-7.

Garcel A, Gout E, Timmins J, Chroboczek J, Fender P. Protein transduction into human cells by adenovirus dodecahedron using WW domains as universal adaptors. *J Gene Med*. 2006;8:524-31.

Gelderblom H, Bauer H, Frank H, Wigand R. The structure of Group II adenoviruses. *J Gen Virol*. 1967;1: 553-560.

Ghosh-Choudhury G, Haj-Ahmad Y, Graham FL. Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full length genomes. *EMBO J*. 1987;6:1733-9.

Gilbert L, Toivola J, Lehtomäki E, Donaldson L, Käpylä P, Vuento M, Oker-Blom C. Assembly of fluorescent chimeric virus-like particles of canine parvovirus in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313:878-87.

Gonçalves MA, de Vries AA. Adenovirus: from foe to friend. *Rev Med Virol*. 2006;16:167-86.

Gomes SA, Niel C, D'Halluin JC. Growth of fastidious adenovirus serotype 40 in HRT 18 cells: interactions with E1A and E1B deletion mutants of subgenus C adenoviruses. *Arch Virol*. 1992;124:45-56.

Gooding LR, Aquino L, Duerksen-Hughes PJ, Day D, Horton TM, Yei SP, Wold WS. The E1B 19,000-molecular-weight protein of group C adenoviruses prevents tumor necrosis factor cytolysis of human cells but not of mouse cells. *J Virol*. 1991;65:3083-94.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977;36:59-74.

Granados RR, Williams KA. In vivo infection and replication of baculoviruses. In Granados RR, Federici BA. *The biology of baculoviruses*. Boca Raton: CRC; 1986. p. 89-108.

Greber UF, Suomalainen M, Stidwill RP, Boucke K, Ebersold MW, Helenius A. The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J*. 1997;16:5998-6007.

Greber UF, Webster P, Weber J, Helenius A. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J*. 1996;15:1766-77.

Greber UF. Virus assembly and disassembly: the adenovirus cysteine protease as a trigger factor. *Rev Med Virol*. 1998;8:213-222.

Green M. Transcriptional activation of cloned human β -globin genes by viral immediate-early gene products. *Cell*. 1983; 35:137-148.

Harada JN, Shevchenko A, Shevchenko A, Pallas DC, Berk AJ. Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J Virol*. 2002;76:9194-206.

Hársi CM, Rolim DP, Gomes SA, Gilio AE, Stewien KE, Baldacci ER, Candeias JA. Adenovirus genome types isolated from stools of children with gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil. *J Med Virol*. 1995;26:1783-6.

Hashimoto S, Ishii A, Yonehara S. The E1b oncogene of adenovirus confers cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor and monoclonal anti-Fas antibody. *Int Immunol*. 1991;3:343-51.

Hatch MH, Siem RA. Viruses isolated from children with infectious hepatitis. *Am J Epidemiol*. 1966;84:495-509.

Havenga MJ, Lemckert AA, Ophorst OJ, van Meijer M, Germeraad WT, Grimbergen J, van Den Doel MA, Vogels R, van Deutekom J, Janson AA, de Bruijn JD, Uytdehaag F, Quax PH, Logtenberg T, Mehtali M, Bout A. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol*. 2002;76:4612-20.

Hay RT, Freeman A, Leith I, Monaghan A, Webster A. Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;199:31-48.

Henry LJ, Xia D, Wilke ME, Deisenhofer J, Gerard RD. Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in *Escherichia coli*. *J Virol*. 1994;68:5239-46.

Hesse A, Kosmides D, Kontermann RE, Nettelbeck DM. Tropism modification of adenovirus vectors by peptide ligand insertion into various positions of the adenovirus serotype 41 short-fiber knob domain. *J Virol*. 2007;81:2688-99.

Hilleman MR, Werner JH. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1954;85:183-8.

Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol*. 1967;26:365-369.

Hong JS, Engler JA. Domains required for assembly of adenovirus type 2 fiber trimers. *J Virol*. 1996;70:7071-8.

Hosakawa K, Sung MT. Isolation and characterization of an extremely basic protein from adenovirus type 5. *J Virol* 1976; 924-934.

Ibay G. Adenoviruses. <http://www.flupatrol.com/wpcontent/uploads/2007/05/bigadenoviruses-v3.gif> [2007 dez 12].

International Committee on Taxonomy of Viruses. Adenoviruses. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WIntkey/Images/em_adeno.gif [2007 dez 12].

Ikeda JE, Enomoto T, Hurwitz J. Replication of adenovirus DNA-protein complex with purified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:884-8.

Jones MS 2nd, Harrach B, Ganac RD, Gozum MM, Dela Cruz WP, Riedel B, Pan C, Delwart EL, Schnurr DP. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol*. 2007;81:5978-84.

Jones N, Shenk T. An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76:3665-9.

Kajon AE, Mistchenko AS, Videla C, Hortal M, Wadell G, Avendaño LF. Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the south cone of South America (1991-1994). *J Med Virol*. 1996;48:151-6.

Kaletsky RL, Simmons G, Bates P. Proteolysis of the Ebola virus glycoproteins enhances virus binding and infectivity. *J Virol*. 2007;81:13378-84.

Kanegae Y, Makimura M, Saito I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn J Med Sci Biol*. 1994;47:157-66.

Karayan L, Gay B, Gerfaux J, Boulanger PA. Oligomerization of recombinant penton base of adenovirus type 2 and its assembly with fiber in baculovirus-infected cells. *Virology*. 1994 Aug 1;202(2):782-95.

Katze MG, Decorato D, Safer B, Galabru J, Hovanessian AG. Adenovirus VA-RNA complexes with the 68000 Mr protein kinase to regulate its autophosphorylation and activity. *Embo J*. 1987;6:689-97.

Kidd AH, Madeley CR. In vitro growth of some fastidious adenoviruses from stool specimens. *J Clin Pathol*. 1981 Feb;34(2):213-6.

Kidd AH, Erasmus MJ, Tiemessen CT. Fiber sequence heterogeneity in subgroup F adenoviruses. *Virology*. 1990;179:139-50.

Kidd AH, Chroboczek J, Cusack S, Ruigrok RW. Adenovirus type 40 virions contain two distinct fibers. *Virology*. 1993;192:73-84.

Kidd AH, Garwicz D, Oberg M. Human and simian adenoviruses: phylogenetic inferences from analysis of VA RNA genes. *Virology*. 1995;207:32-45.

King AJ, Teertstra WR, van der Vliet PC. Dissociation of the protein primer and DNA polymerase after initiation of adenovirus DNA replication. *J Biol Chem*. 1997;272:24617-23.

King LA, Possee RD. The baculovirus expression system: a laboratory guide. New York: Chapman & Hall; 1992.

Kirch HC, Pützer B, Schwabe G, Gnauck HK, 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*. 1993;39:705-16.

Kitajewski J, Schneider R, Safer B, Munemitsu S M, Samuel CE, Thimmappaya B, Shenk T. Adenovirus VA-RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 alpha kinase. *Cell*. 1986; 45:95-200.

Komoriya A, Green LJ, Mervic M, Yamada SS, Yamada KM, Humphries MJ. 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*. 1991;266:15075-9.

Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR. Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Apr;84(8):2180-4.

Lazarowitz SG, Choppin PW. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology*. 1975;68:440-54.

Ledley FD, Brody B, Kozinetz CA, Mize SG. The challenge of follow-up for clinical trials of somatic gene therapy. *Hum Gene Ther*. 1992;3:657-63.

Legrand V, Spohner D, Schlesinger Y, Settelen N, Pavirani A, Mehtali M. Fiberless recombinant adenoviruses: virus maturation and infectivity in the absence of fiber. *J Virol*. 1999;73:907-19.

Lemiale F, Haddada H, Nabel GJ, Brough DE, King CR, Gall JG. Novel adenovirus vaccine vectors based on the enteric-tropic serotype 41. *Vaccine*. 2007;25:2074-84.

Leopold PL, Kreitzer G, Miyazawa N, Rempel S, Pfister KK, Rodriguez-Boulan E, Crystal RG. Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum Gene Ther*. 2000;11:151-65.

Leppard KN. E4 gene function in adenovirus, adenovirus vector and adeno-associated virus infections. *J Gen. Virol*. 1997;78:2131-8.

Li E, Stupack D, Bokoch GM, Nemerow GR. Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *J Virol*. 1998;72:8806-12.

Li E, Stupack D, Klemke R, Cheresch DA, Nemerow GR. Adenovirus endocytosis via alpha(v) integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase. *J Virol*. 1998;72:2055-61.

Li E, Brown SL, Stupack DG, Puente XS, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor. *J Virol*. 2001;75:5405-9.

Lichtenstein DL, Toth K, Doronin K, Tollefson AE, Wold WS. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int Rev Immunol*. 2004;23:75-111.

Liszewski MK, Atkinson JP. Membrane cofactor protein. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1992;178:45-60.

Liu H, Naismith JH, Hay RT. Adenovirus DNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2003;272:131-64.

Louis N, Fender P, Barge A, Kitts P, Chroboczek J. Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber. *J Virol*. 1994;68:4104-6.

Maranga L, Cruz PE, Aunins JA, Carrondo MJT. Production of core and virus-like-particles with baculovirus infected insect cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2002;74:183-206.

Mathews DA, Russel WC. Adenovirus core protein V interacts with p32 – a protein which is associated with both the mitochondria and the nucleus. *J Gen Virol*. 1998;79:1677-1685.

Mathias P, Wickham T, Moore M, Nemerow G. Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol*. 1994;68:6811-4.

Matthews DA, Russell WC. Adenovirus protein-protein interactions: molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease. *J Gen Virol*. 1995;76:1959-69.

Matumoto M, Uchida S, Hoshika T. Isolation of an intermediate type of adenovirus from a fatal case of infantile pneumonia. *Jpn J Exp Med*. 1958;28:305-15.

Maubant S, Saint-Dizier D, Boutillon M, Perron-Sierra F, Casara PJ, Hickman JA, Tucker GC, Van Obberghen-Schilling E. Blockade of $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrins by RGD mimetics induces anoikis and not integrin-mediated death in human endothelial cells. *Blood*. 2006;108:3035-44.

McPhillips TH, Dinan D, Subramanian K, Samal SK. Enhancement of aquareovirus infectivity by treatment with proteases: mechanism of action. *J Virol*. 1998;72:3387-9.

Medina-Kauwe LK. Endocytosis of adenovirus and adenovirus capsid proteins. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55:1485-96.

Mei YF, 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*. 2002;295:30-43.

Mei YF, 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*. 2003;84:2061-71.

Meier O, Boucke K, Hammer SV, Keller S, Stidwill RP, Hemmi S, Greber UF. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol*. 2002;158:1119-31.

Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* 1987;7:265-276.

Mirza MA, Weber J. Structure of adenovirus chromatin. *Biochem Biophys Acta*. 1982;696:76-86

Miyazawa N, Leopold PL, Hackett NR, Ferris B, Worgall S, Falck-Pedersen E, Crystal RG. Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular trafficking of adenovirus gene transfer vectors. *J Virol*. 1999;73:6056-65.

Miyazawa N, Crystal RG, Leopold PL. Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein. *J Virol*. 2001;75:1387-400.

Mulvania T, Hayes B, Hedin D. A flow cytometric assay for rapid, accurate determination of baculovirus titers. *BioProcessing J*. 2004;3:47-53.

Nevels M, Dobner T. Determination of the transforming activities of adenovirus oncogenes. *Methods Mol Med.* 2007;131:187-95.

Noad R, Roy P. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 2003;11:438-44.

Norrby E. The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. II. Identification and characterization of an incomplete hemagglutinin. *Virology.* 1966; 30:608-17.

O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. In: W.H. Freeman. Salt Lake City: Oxford University Press; 1992. 347 p.

Oligonucleotide Properties Calculator. <http://www.basic.nwu.edu/> [2003 Dez 15].

Ostapchuk P, Hearing P. Regulation of adenovirus packaging. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2003;272:165-85.

Pereira Filho E, Faria NRC, Fialho AM, Assis RS, Almeida MMS, Rocha M, Galvao M, Santos FB, Barreto ML, Leite JP. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *J Med Microbiol.* 2007;56:313-19.

Peret TC, Durigon EL, Candeias JM, Stewien KE, Candeias JA. A combined staphylococcal coagglutination assay for rapid identification of rotavirus and adenovirus (COARA). *J Virol Meth.* 1995;52:265-272.

Persson H, Jörnvall 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.* 1980;77:6349-53.

Persson H, Oberg B, Philipson L. Purification and characterization of an early protein (E14K) from adenovirus type 2-infected cells. *J Virol.* 1978;28:119-39.

Petry H, Goldmann C, Ast O, Lüke W. The use of virus-like particles for gene transfer. *Curr Opin Mol Ther.* 2003;5:524-8.

Philipson L, Lonberg-Holm K, Pettersson U. Virus-receptor interaction in an adenovirus system. *J Virol.* 1968;2:1064-75.

Philipson L, Pettersson RF. The coxsackie-adenovirus receptor--a new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2004;273:87-111.

Pieniazek NJ, Slemenda SB, Pieniazek D, Velarde J Jr, Luftig RB. Sequence of human enteric adenovirus type 41 Tak fiber protein gene. *Nucleic Acids Res*. 1989;17:9474.

Pieniazek D, Pieniazek NJ, Macejak D, Coward J, Rayfield M, Luftig RB. Differential growth of human enteric adenovirus 41 (TAK) in continuous cell lines. *Virology*. 1990;174:239-49.

Pieniazek D, Pieniazek NJ, Macejak D, Luftig RB. Enteric adenovirus 41 (Tak) requires low serum for growth in human primary cells. *Virology*. 1990;178:72-80.

Pieniazek NJ, Slemenda SB, Pieniazek D, Velarde J Jr, Luftig RB. Human enteric adenovirus type 41 (Tak) contains a second fiber protein gene. *Nucleic Acids Res*. 1990;18:1901.

Rea D, Havenga MJ, van Den Assem M, Suttmuller RP, Lemckert A, Hoeben RC, Bout A, Melief CJ, 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*. 2001;166:5236-44.

Rekosh DM, Russell WC, Bellet AJ, Robinson AJ. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell*. 1977;11:283-95.

Rizzi, TS. Cinética da expressão gênica do *Nucleopolyhedrovirus* Agmnpv-2D (família *Baculoviridae*) em células de inseto. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2003.

Roberts BE, Miller JS, Kimelman D, Cepko CL, Lemischka IR, Mulligan RC. Individual adenovirus type 5 early region 1A gene products elicit distinct alterations of cellular morphology and gene expression. *J Virol*. 1985;56:404-13.

Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW, Brough DE, Kovesdi I, Wickham TJ. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol*. 1998;72:7909-15.

Roovers DJ, van der Lee FM, van der Wees J, Sussenbach JS. Analysis of the adenovirus type 5 terminal protein precursor and DNA polymerase by linker insertion mutagenesis. *J Virol*. 1993;67:265-76.

Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrot RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953;84:570-3.

Roy P, Mikhailov M, Bishop DH. Baculovirus multigene expression vectors and their use for understanding the assembly process of architecturally complex virus particles. *Gene*. 1997;190:119-29.

Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 1987;238:491-7.

Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*. 2000;81:2573-604.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. 3 vol.

San Martín C, Burnett RM. Structural studies on adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2003;272:57-94.

Sandberg JW, Lau C, Jacomino M, Finegold M, Henning SJ. Improving access to intestinal stem cells as a step toward intestinal gene transfer. *Hum Gene Ther*. 1994;5:323-9.

Sanger, F, Donelson JE, Coulson AR, Kossel H, Fischer, D. Determination of a nucleotide sequence in bacteriophage f1 DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1974; 90:315-33.

Saphire AC, Guan T, Schirmer EC, Nemerow GR, Gerace L. Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70. *J Biol Chem*. 2000;275:4298-304.

Schaack J, Ho WY, Freimuth P, Shenk T. Adenovirus terminal protein mediates both nuclear matrix association and efficient transcription of adenovirus DNA. *Genes Dev*. 1990 Jul;4:1197-208.

Schoehn G, Fender P, Chroboczek J, Hewat EA. Adenovirus 3 penton dodecahedron exhibits structural changes of the base on fibre binding. *EMBO J*. 1996;15:6841-6.

Schoggins JW, Gall JG, Falck-Pedersen E. Subgroup B and F fiber chimeras eliminate normal adenovirus type 5 vector transduction in vitro and in vivo. *J Virol*. 2003 Jan;77(2):1039-48.

Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, Dennerquist V, Wadell G, Arnberg N. Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol.* 2003;77:9183-91.

Segerman A. Adenovirus B: Receptors, Tropism and Hematopoietic cells. 2004. [Ph.D Thesis]. Umea: Umea University; 2004.

Seiradake E, Cusack S. Crystal structure of enteric adenovirus serotype 41 short fiber head. *J Virol.* 2005; 79:14088-94.

Seth P. Adenovirus-dependent release of choline from plasma membrane vesicles at an acidic pH is mediated by the penton base protein. *Virology.* 1994;68:1204-6.

Shayakhmetov DM, Lieber A. Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. *J Virol.* 2000;74(22):10274-86.

Shenk TE. *Adenoviridae: the viruses and their replication.* In: Fields BN, KnipDM, Howley, PM, editors. *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. Chapter 67.

Short JJ, Pereboev AV, Kawakami Y, Vasu C, Holterman MJ, Curiel DT. Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology.* 2004;322:349-59.

Sirena D, Lilienfeld B, Eisenhut M, Kälin S, Boucke K, Beerli RR, Vogt L, Ruedl C, Bachmann MF, Greber UF, Hemmi S. The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J Virol.* 2004;78:4454-62.

Sprengel J, Schmitz B, Heuss-Neitzel D, Zock C, Doerfler W. Nucleotide sequence of human adenovirus type 12 DNA: comparative functional analysis. *J Virol.* 1994;68:379-89.

Stewart ME, Bonne N, Shearer P, Khalesi B, Sharp M, Raidal S. Baculovirus expression of beak and feather disease virus (BFDV) capsid protein capable of self-assembly and haemagglutination. *J Virol Methods.* 2007;141:181-7.

Stewart PL, Fuller SD, Burnett RM. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J.* 1993;12:2589-99

Stouten PF, Sander C, Ruigrok RW, Cusack S. New triple-helical model for the shaft of the adenovirus fibre. *J Mol Biol.* 1992;226:1073-84.

Suomalainen M, Nakano MY, Keller S, Boucke K, Stidwill RP, Greber UF. Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol.* 1999;144(4):657-72.

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, an ets family of the protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355:438-43.

Takiff HE, Straus SE, Garon CF. Propagation and in vitro studies of previously non-cultivable enteral adenoviruses in 293 cells. *Lancet.* 1981;2:832-4.

Tiemessen CT, Kidd AH. Adenovirus 41 growth in semi-permissive cells shows multiple-hit kinetics. *Arch Virol.* 1990;110:239-45.

Tiemessen CT, Ujfalusi M, Kidd AH. Subgroup F adenovirus growth in foetal intestinal organ cultures. *Arch Virol.* 1993;132:193-200.

Tiemessen CT, Kidd AH. Adenovirus type 40 and 41 growth in vitro: host range diversity reflected by differences in patterns of DNA replication. *J Virol.* 1994;68:1239-44.

Tiemessen CT, Kidd AH. The subgroup F adenoviruses. *J Gen Virol.* 1995;76:481-97.

Tollefson AE, Wold WS. Identification and gene mapping of a 14,700-molecular-weight protein encoded by region E3 of group C adenoviruses. *J Virol.* 1988;62:33-9.

Tollefson AE, Krajcsi P, Pursley MH, Gooding LR, Wold WS. A 14,500 MW protein is coded by region E3 of group C human adenoviruses. *Virology.* 1990;175:19-29.

Tollefson AE, Ryerse JS, Scaria A, Hermiston TW, Wold WS. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology.* 1996;220:152-62.

Tollefson AE, Scaria A, Ying B, Wold WS. 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.* 2003;77:7764-78.

Tomko RP, 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.* 1997;94:3352-6.

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.* 1994;68:4450-7.

Trotman LC, Mosberger N, Fornerod M, Stidwill RP, Greber UF. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat Cell Biol.* 2001;3:1092-100.

Trotman LC, Achermann DP, Keller S, Straub M, Greber UF. Non-classical export of an adenovirus structural protein. *Traffic.* 2003;4:390-402.

Uhnöo I, Wadell G, Svensson L, Johansson M. Two new serotypes of enteric adenovirus causing infantile diarrhoea. *Dev Biol Stand.* 1983;53:311-8.

Uhnöo I, Wadell G, Svensson L, Johansson ME. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol.* 1984;20:365-72.

van Loon AE, Rozijn TH, de Jong JC, Sussenbach JS. Physicochemical properties of the DNAs of the fastidious adenovirus species 40 and 41. *Virology.* 1985;140:197-200.

van Oostrum J, Burnett RM. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *J Virol.* 1985;56:439-48.

van Raaij MJ, Mittraki A, Lavigne G, Cusack S. A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature.* 1999;401:935-8.

Vellinga J, Van der Heijdt S, Hoeben RC. The adenovirus capsid: major progress in minor proteins *J Gen Virol.* 2005;86:1581-8.

Verrijzer CP, van Oosterhout JA, van Weperen WW, van der Vliet PC. POU proteins bend DNA via the POU-specific domain. *EMBO J.* 1991;10:3007-14.

Vivès RR, Lortat-Jacob H, Chroboczek J, Fender P. Heparan sulfate proteoglycan mediates the selective attachment and internalization of serotype 3 human adenovirus dodecahedron. *Virology.* 2004;321:332-40.

Vogels R, Zuijdgeest D, van Rijnsoever R, Hartkoorn E, Damen I, de Béthune MP, Kostense S, Penders G, Helmus N, Koudstaal 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, Havenga M. Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *J Virol*. 2003;77:8263-71.

Von Seggern DJ, Chiu CY, Fleck SK, Stewart PL, Nemerow GR. A helper-independent adenovirus vector with E1, E3, and fiber deleted: structure and infectivity of fiberless particles. *J Virol*. 1999;73:1601-8.

Wadell G, de Jong PJ. Restriction endonucleases in identification of a genome type of adenovirus 19 associated with keratoconjunctivitis. *Infect Immun*. 1980;27:292-6.

Wadell G, Varsányi TM, Lord A, Sutton RN. Epidemic outbreaks of adenovirus 7 with special reference to the pathogenicity of adenovirus genome type 7b. *Am J Epidemiol*. 1980;112:619-28.

Wadell G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1984;110:191-220.

Walters RW, Grunst T, Bergelson JM, Finberg RW, Welsh MJ, Zabner J. Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J Biol Chem*. 1999 Apr 9;274(15):10219-26.

Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, Ganske I, Zabner J, Welsh MJ. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell*. 2002;110:789-99.

Wang EW, Scott MO, Ricciardi RP. 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*. 1988;62:1456-9.

Weber J. Genetic analysis of adenovirus type 2 III. Temperature sensitivity of processing viral proteins. *J Virol*. 1976;17:462-71.

Webster A, Leith IR, Hay RT. Activation of adenovirus-coded protease and processing of preterminal protein. *J Virol*. 1994;68:7292-300.

Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*. 1993;73:309-19.

Wigand R, Adrian T. Classification and epidemiology of adenoviruses. In: Doerfler W. *Adenovirus DNA*. Martinus Nijhoff: Boston; 1986.

Windheim M, Hilgendorf A, Burgert HG. Immune evasion by adenovirus E3 proteins: exploitation of intracellular trafficking pathways. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2004;273:29-85.

Witt DJ, Bousquet EB. Comparison of enteric adenovirus infection in various human cell lines. *J Virol Methods*. 1988 Aug;20:295-308.

Wu E, Trauger SA, Pache L, Mullen TM, von Seggern DJ, Siuzdak G, Nemerow GR. Membrane cofactor protein is a receptor for adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *J Virol*. 2004;78:3897-905.

Xiong JP, Stehle t, Goodman SL, Arnaout MA. Integrins, cations and ligands: making the connection. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1642-54.

Xu W, McDonough MC, Erdman DD. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2000;38:4114-20.

Ye L, Lin J, Sun Y, Bennouna S, Lo M, Wu Q, Bu Z, Pulendran B, Compans RW, Yang C. Ebola virus-like particles produced in insect cells exhibit dendritic cell stimulating activity and induce neutralizing antibodies. *Virology*. 2006;351:260-70.

Yeh HY, Pieniazek N, Pieniazek D, Gelderblom H, Luftig RB. Human adenovirus type 41 contains two fibers. *Virus Res*. 1994;33:179-98.

Young CS. The structure and function of the adenovirus major late promoter. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2003;272:213-49.

Zhang F, Andreassen P, Fender P, Geissler E, Hernandez JF, Chroboczek J. A transfecting peptide derived from adenovirus fiber protein. *Gene Ther*. 1999;6:171-81.

Zhao LY, Liao D. Sequestration of p53 in the cytoplasm by adenovirus type 12 E1B 55-kilodalton oncoprotein is required for inhibition of p53-mediated apoptosis. *J Virol*. 2003;77:13171-81.