

## INTERAÇÃO DO ADENOVÍRUS HUMANO 41 COM CÉLULAS DE ORIGEM HEMATOPOIÉTICA E LINFÓCITOS INTESTINAIS: ESTUDO DA PERMISSIVIDADE CELULAR

Misael Leonardo Silva<sup>1</sup>, Inarei José Paulini<sup>2</sup>, Joselma Siqueira-Silva<sup>3</sup> e Charlotte Marianna Hársi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestre, Laboratório de Adenovírus, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil: misaelleonardo@gmail.com <sup>2</sup>Professor Doutor, Faculdade Venda Nova do Imigrante (FAVENI), ES, Brasil: inareip@yahoo.com.br; <sup>3</sup>Professor (a) Doutor, Faculdade Nove de julho (UNINOVE), SP, Brasil. <sup>4</sup>Professora Associada, Laboratório de Adenovírus, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

**RESUMO-** Os adenovírus humanos podem causar infecções gastrointestinais, urogenitais e respiratórias tanto em crianças como adultos. Para verificar a permissividade de células de origem hematopoiética à infecção por HAdV-41, infectou-se PBMC e linfócitos intraepiteliais de pacientes voluntários. Os ensaios foram comparados com células HEK 293 infectadas. PBMC e linfócitos intestinais mostraram-se permissivos à infecção por HAdV-41. Essa evidência colabora para afirmar que HAdV-41 pode infectar tais células. Esses resultados ajudam a compreender os mecanismos de interação vírus - célula e trazem novas informações para desenvolver adenovírus como vetores, com base em sorotipos entéricos, visando aplicação na terapia genética.

**PALAVRAS - CHAVE:** Adenovírus. Linfócitos intraepiteliais. Permissividade. Células mononucleares.

**ABSTRACT-** Human adenoviruses are causative agents of infections in the gastrointestinal, urogenital, and neurological systems, both in children and adults. In order to verify the permissiveness of hematopoietic cells to HAdV-41 infection, PBMC and intestinal lymphocytes from volunteers were infected. The infection assays were compared to infected HEK 293 cells. PBMC and lymphocytes were permissive to HAdV-41 infection. This evidence confirmed that HAdV-41 can infect these cells types. These results help to understand the virus cell interactions mechanisms and they bring new information to develop adenovirus vector, based in enteric serotypes, to apply in target gene therapy.

**KEYWORDS:** Adenovirus. Intraepithelial lymphocytes. Permissiveness. Mononuclear cell.

### 1 INTRODUÇÃO

Os adenovirus humanos (HAdV) apresentam 67 sorotipos e podem ser agentes infecciosos em doenças gastrointestinais, urogenitais e respiratórias, tanto em crianças e adultos. Dentre elas estão : infecções respiratórias (grupo B1 HAdV-3, -7, -21, grupo B2 HAdV-14 e grupo E HAdV-4), gastroenterite (grupo F HAdV-40 E -41), infecções oculares (grupo D HAdV-8, -9 e -37), pneumonia (grupo B1 HAdV-3, -7, grupo C HAdV-1, 2 e grupo E HAdV-4), queratoconjuntivite (grupo B2 HAdV-11, e grupo D HAdV-8, -19 e HAdV-37), meningoencefalite (grupo A HAdV-12, grupo B1HAdV-7 e grupo D HAdV-32) e infecções urinárias (grupo B2 HAdV-11) (LION et al., 2014; SIQUEIRA-SILVA et al., 2009, HONGLING et al., 2009; FILHO et al., 2007).

A utilização de receptores alternativos por adenovírus pode ser uma estratégia de evasão do sistema imune. Vários grupos já reportaram o estabelecimento de infecções persistentes por adenovírus humano C em linhagens celulares de linfócitos (GARNETT et al, 2002). Nestes, o genoma viral é mantido e pequenas quantidades de partículas infecciosas são produzidas enquanto a célula mantém sua cinética de crescimento normal (CHU et al, 1992; FLOMENBER et al, 1996; SILVER, 1998). Essas observações sugerem que os adenovírus C podem ser

capazes de realizar um ciclo infeccioso alternativo nas populações de linfócitos, com uma replicação não lítica e apresentando persistência. Para os adenovírus, o receptor primário CAR parece inacessível no epitélio colunar intacto. Isto leva a supor que outros receptores ou mecanismos de invasão do tecido devem ser utilizados para permitir a infecção das mucosas. Walters e colaboradores, em 2002, demonstraram que, no início do processo infeccioso, células da camada basal do epitélio respiratório estão repletas de adenovírus. Estes, quando liberados destas células, assim como o excesso de fibra produzido no início da multiplicação viral, são transportados no sentido baso-apical, interagindo com CAR e desmembrando o epitélio colunar. Desta forma, os vírus atingem as células epiteliais e passam de uma célula à outra. O que não é conhecido é como os adenovírus chegam até as células da camada basal. O entendimento de como os vírus infectam a célula exige novas informações sobre os mecanismos de adsorção e a entrada, além de informações precisas sobre quais tipos celulares e tecidos são infectados *in vivo*.

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

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CULTURA DE CÉLULAS, PURIFICAÇÃO VIRAL EM GRADIENTE DE CLORETO DE CÉSIO, TITULAÇÃO DE VÍRUS POR IMUNOFLORESCÊNCIA.

Os processos de cultura de células, purificação e titulação de vírus por imunofluorescência foram feitos de acordo com trabalhos anteriores (SIQUEIRA -SILVA et al., 2009).

### 2.2 CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

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

### 2.3 LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS (IEL)

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

## 2.4 OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS DE MUCOSA INTESTINAL HUMANA.

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

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

## 2.5 MÉTODO DE TRIPSINIZAÇÃO A QUENTE (Freshney, R.I, 2000)

O tecido (epitélio intestinal), após ser fragmentado e lavado para a retirada do muco, foi submetido ao método de tripsinização a quente. Os fragmentos foram transferidos para um frasco contendo 20 mL de tripsina a 0,25 % em PBS pH 7,4, pré-aquecida a 37 °C. A suspensão foi agitada a 100 RPM, a 37 °C, durante 30 minutos, em uma incubadora com plataforma de agitação (Minitron-INFORMS, Inglaterra). Os fragmentos foram decantados e o primeiro sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados mais 20 mL de tripsina e a suspensão foi novamente incubada com agitação de 100 RPM. Após 30 minutos, as células desagregadas foram colhidas em um tubo de 50 mL contendo SFB, para a neutralização da tripsina, e mantidas a 4 °C. Este processo foi repetido várias vezes durante a tripsinização (aproximadamente 4 horas ou até a desagregação total do tecido). As células desagregadas foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento celular foi ressuspensionado em meio DMEM com alta glicose, suplementado e contendo antibióticos.

As células foram contadas e transferidas para uma microplaca de 96 cavidades (40.000 células por cavidade) com meio DMEM com alta glicose, suplementado e contendo antibióticos. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

## 2.6 MÉTODO DE TRIPSINIZAÇÃO A FRIO (Freshney, 2000)

Os fragmentos de epitélio intestinal foram transferidos para um frasco contendo 20 mL de tripsina 0,25 % em PBS e em 5 mL de DMEM com alta glicose, para nutrição celular. Estas células foram incubadas a 4 °C por 24 horas para a penetração da tripsina no tecido. Após este período, os frascos foram aquecidos a 37 °C por 1 hora, os fragmentos celulares foram decantados e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, nova solução de tripsina 0,25 % a 37°C foi acrescentada aos fragmentos intestinais e a suspensão foi incubada em uma plataforma

de agitação a 100 RPM, a 37 °C, durante 30 minutos (Minitron- INFORMAN, Inglaterra). As células desagregadas foram colhidas e transferidas para um tubo contendo SFB a 4 °C, para a inativação da tripsina.

## 2.7 MÉTODO DE CULTURA DE EXPLANTE DE TECIDO INTESTINAL

Para a cultura de explante de tecido intestinal, o órgão foi primeiramente lavado em PBS pH 7,4 contendo 1 mM de DTT para a retirada do muco intestinal. O tecido foi posto sobre uma placa de Petri, contendo SFB, para a retirada da serosa e da camada muscular. A mucosa intestinal isolada foi cortada em pedaços de 1 a 5 mm e estes colocados sobre a superfície interna de um frasco de meio de cultura, previamente coberto com um filme de SFB, para facilitar a adesão tecidual. Após 2 a 3 horas de incubação, período necessário para a adesão do tecido à superfície do frasco, foi adicionado 1 mL de meio DMEM com alta glicose, suplementado e contendo antibióticos. Após 3 a 4 dias, os fragmentos foram retirados do frasco e as células, que migraram para fora dos fragmentos e aderiram à superfície do frasco, foram tripsinizadas e transferidas para novos frascos contendo meio DMEM com alta glicose, suplementado e contendo antibióticos.

## 2.8 MÉTODO DE ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS (Mosley e Klein, 1992).

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

As células (PBMC) foram colhidas, lavadas em PBS, contadas e transferidas para uma microplaca de 96 cavidades (40.000 células por cavidade) com meio DMEM com alta glicose, suplementado e contendo antibióticos. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

## 2.9 MÉTODO DE MOSLEY E KLEIN MODIFICADO

Neste método, foram introduzidas algumas modificações no protocolo original (MOSLEY e KLEIN, 1992). A primeira modificação foi a substituição da solução de EDTA e DTT utilizada na desagregação celular, pelo método de extração por tripsinização a frio, como descrito no item 2.6. O sedimento celular foi ressuspendido em 6 mL de Percoll 40 % e sobreposto a 2 mL de Percoll 70%. Este gradiente descontínuo foi centrifugado a 500 x g por 30 minutos a 18 °C. Após a centrifugação, houve a formação de um anel de linfócitos e hemácias sobre o Percoll 70 % e o posicionamento dos enterócitos acima do Percoll 40 %. O anel de linfócitos e hemácias foi colhido, transferido para um tubo de centrifuga contendo 10 mL de PBS pH 7,4 e centrifugado a 500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o sedimento celular foi novamente ressuspendido em PBS pH 7,4 e centrifugado para a retirada

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

As células foram contadas e transferidas para uma microplaca de 96 cavidades (40.000 células por cavidade) com meio DMEM com alta glicose, suplementado e contendo antibióticos. As células foram incubadas a 37 ° C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>

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

Como era esperado que a quantidade de linfócitos intraepiteliais, obtida de mucosa intestinal humana, fosse relativamente baixa, foi necessário realizar um ensaio prévio de detecção de HAdV-41 em amostras de pouca celularidade. Dessa forma, foram semeadas 5.000 células HEK-293 por cavidade em uma microplaca de 96 cavidades. Após 48 horas, estas foram inoculadas com multiplicidades de infecção (MOI) de 0,1; 0,5; 1 e 2 do inóculo viral purificado. A cultura foi incubada em câmara úmida a 37°C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Após este período, as células foram lavadas com PBS pH 7,4 e o último PBS de lavagem foi guardado para verificação de possíveis vírus no sobrenadante, que poderiam interferir na interpretação dos resultados. Concomitantemente, 40.000 PBMC por cavidade, foram semeados em uma microplaca de 96 cavidades. As células foram inoculadas com MOIs de 0,5; 1 e 2 de HAdV-41 em sistema de triplicata. As células infectadas foram incubadas em câmara úmida a 37 ° C e atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Após esse período, o DNA viral foi analisado (dados não mostrados).

## 2.11 ANÁLISE DA INFECÇÃO DO HADV-41 EM PBMC E IEL

Para esta análise, 40.000 PBMC e IEL foram semeados em uma microplaca de 96 cavidades. As células foram inoculadas, em sistema de triplicata, com 1 MOI de HAdV-41 purificado. As células infectadas foram incubadas em câmara úmida a 37 ° C e atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Após esse período, o RNA total foi extraído com Brazol (LGC Biotecnologia), seguindo recomendações do fabricante.

## 2.12 CINÉTICA DE INFECÇÃO DO HADV-41 EM CÉLULAS HEK-293.

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

## 2.13 CINÉTICA DE INFECÇÃO DO HAdV-41 EM PBMC

Para estudar o comportamento de HAdV-41 em PBMC infectado, 40.000 PBMC por cavidade foram distribuídas em uma microplaca de 96 cavidades, contendo meio DMEM alta glicose suplementado e acrescido de 0,2 % de SFB. Em seguida, as células foram inoculadas com 1 MOI de HAdV-41. Após esse período, o RNA total foi extraído com Brazol (LGC Biotecnologia), seguindo recomendações do fabricante.

## 2.14 IMUNOFLUORESCÊNCIA (IFI) DE PBMC INFECTADOS COM HADV-41

Para a realização de Imunofluorescência indireta de PBMC infectados com HAdV-41, foram coletados 20 mL de sangue de três doadores. Os linfócitos foram extraídos utilizando a separação celular em Ficoll. Após a contagem celular de cada doador, as células foram ressuspensas em DMEM alta glicose suplementado e distribuídas 40.000 células por cavidade. Em seguida, as células foram inoculadas com 1, 5 e 10 MOI de HAdV-41, em sistema de triplicata. Após 60 horas de infecção, as células foram coletadas e transferidas para tubos de 1,5 mL e centrifugadas a 500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular suspenso em PBS pH 7,4 e centrifugado novamente a 500 x g por 10 minutos. Esse processo foi repetido três vezes para a eliminação completa de possíveis partículas virais presentes no sobrenadante. Após essa etapa, o sedimento celular foi suspenso em 10 $\mu$ L de PBS pH 7,4, distribuído em uma lâmina de microscopia, seco à temperatura ambiente e fixado com acetona a 4 °C por 10 minutos. Depois de fixadas, as células foram testadas contra três soros diferentes: soro policlonal anti-HAdV-41 total, soro policlonal anti fibra curta de HAdV-41 e monoclonal anti-Hexon de HAdV-41, em sistema de triplicata para cada soro. Sobre as lâminas foram aplicados 7  $\mu$ L de cada anticorpo, diluídos em PBS pH 7,2 com azul de Evans 0,02 % e 5 % de leite, nas seguintes diluições: policlonal anti-HAdV-41 total (1/800), monoclonal anti-Hexon de HAdV-41 (1/800) e anticorpo policlonal anti-fibra curta de HAdV-41 (1/100). A incubação dos anticorpos foi feita em câmara úmida a 37 °C durante 1 hora. Em seguida, as lâminas foram lavadas, mergulhando-as de 2 a -3 vezes em recipientes contendo PBS Tween 0,05 % e mais 10 minutos de molho na mesma solução. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, da mesma maneira e deixadas de molho durante 5 minutos. As lâminas foram secas em temperatura ambiente e 7  $\mu$ L do anticorpo secundário, anti-IgG de coelho marcado com FITC (diluição 1/120) (Zymed-Invitrogen), foi aplicado em cada orifício. Para o anticorpo monoclonal Hexon, foi utilizado 7  $\mu$ L do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com FITC (diluição 1/100) (Zymed-Invitrogen). Os anticorpos secundários foram diluídos em PBS pH 7.2 e 1/30 de azul de Evans. A incubação, das lâminas com os soros secundários, foi feita em câmara úmida a 37 °C por 30 minutos. Para a retirada do anticorpo secundário foi repetido o esquema de lavagem explicitado acima. Após a secagem, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada, contendo 1 % do corante diaminofenilindol (DAPI), e recobertas com lamínula. A visualização das lâminas foi feita no microscópio de Fluorescência Olympus.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS (IELS) DE MUCOSA INTESTINAL HUMANA

Para a obtenção de linfócitos intraepiteliais de mucosa intestinal foram testados os métodos de extração celular por tripsina à quente, à frio, cultura de explante, protocolo de

Mosley e Klein, (1992) e o protocolo de Mosley e Klein (1992) modificado, obtendo os seguintes resultados (Tabela 1):

**Tabela 1:** Parâmetros utilizados na análise dos métodos de extração de linfócitos intraepiteliais testados.

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

Fonte: autores

O método de cultura de explante mostrou-se inviável, pelo baixo rendimento, pelo tempo necessário para a migração celular e principalmente pelo difícil controle dos contaminantes. O método de tripsinização teve alto rendimento, mas a extração a frio apresentou maior viabilidade celular quando comparada com a tripsinização a quente. O protocolo de Mosley e Klein (1992), que utiliza gradiente de Percoll para separação celular, mostrou grande rendimento, maior até que o método de tripsinização, mas as células não permaneciam viáveis por muito tempo, acarretando perdas superiores a 80% nas primeiras 24h pós-extração, provavelmente devido ao uso de EDTA. Além disso, não possibilita a separação de linfócitos e hemácias (TABELA 1).

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

### 3.2 IFI DE PBMC INFECTADOS

Este experimento prévio de detecção de proteínas virais em PBMC inoculados permite concluir que não só está ocorrendo a expressão gênica, como também há produção de proteínas. O número de células positivas foi maior nas células inoculadas com 10MOI do que em 1MOI. Não houve variação considerável entre as células inoculadas com 10 ou 5MOI. As células não inoculadas tinham pouca fluorescência de fundo (TABELA 2).

Tabela 2- Reação de imunofluorescência de PBMC infectados com diferentes MOI de HAdV-41(1, 5 e 10MOI) , detectados com os soro total anti-HAdV-41.

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

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

Com o intuito de utilizar um soro anti-HAdV-41 em citometria de fluxo para determinar o tipo celular permissivo à infecção por HAdV-41, foram testados vários soros. Esses primeiros experimentos mostraram que os soros policlonais total e anti fibra curta assim como o monoclonal anti-Hexon foram capazes de detectar proteínas virais, com diferentes graus de intensidade (resultados não apresentados em tabela). No entanto, o ruído de fundo observado na microscopia de fluorescência indicou que o soro policlonal total e o soro policlonal anti-fibra curta não eram ideais para o uso em citometria de fluxo. Para tentar diminuir o ruído de fundo, os soros policlonais foram incubados com PBMC de voluntários para a retirada de anticorpos não específicos dos soros. Após esse procedimento, o experimento foi repetido com outros voluntários para determinar o nível de ruído de fundo do soro. Houve redução do ruído de fundo, mas não o suficiente para a realização da citometria de fluxo.

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

Na mucosa intestinal, existem linfócitos especiais inseridos na camada epitelial, que diferem funcional e fenotipicamente dos outros linfócitos T (HASS et al., 1993). Essas células são pouco conhecidas e suas funções na resposta imune precisam ser elucidadas. Sabe-se que são células muito importantes para manter o *status quo* do epitélio intestinal, sendo requeridas quando este é lesionado por fatores químicos, físicos ou biológicos (GOODMAN e LEFRANCOIS, 1988). Devido a sua localização peculiar e alguns resultados prévios obtidos em nosso laboratório, surgiu a dúvida se essas células poderiam ser infectadas por adenovírus entéricos.

Para estudar a interação do HAdV-41 com essas células foi necessário estabelecer um ensaio prévio com células de origem hematopoiéticas, pois desconhecia-se os tipos celulares permissivos a esse vírus. Para isso, várias técnicas tiveram que ser padronizadas. Foi necessário obter partículas virais purificadas e estabelecer um protocolo de extração de linfócitos intraepiteliais de mucosa intestinal humana. A produção de HAdV-41 *in vitro* mostrou-se lenta se comparada com outros adenovírus. Em média, levamos 15 dias para a observação do efeito citopático (ECP) total nas células HEK-293 inoculadas. O ECP dos adenovírus da espécie F inicia-se com uma retração da monocamada celular e avança com formação de cachos celulares entre 5 a 7 dias após a infecção, que vão se tornando mais evidentes, até o descolamento total do tapete celular. No processo de multiplicação do HAdV-41 a progressão é lenta, não lítica e ocorre a acumulação das partículas virais dentro da célula, diferentemente do que acontece no ciclo de multiplicação do HAdV-2. Em cultura de células de intestino delgado fetal infectadas, o HAdV-2 é liberado em grandes quantidades para o meio extracelular, enquanto os HAdV-41 produzidos permanecem no núcleo das células infectadas (TIEMESSEN et al, 1995). Esse resultado indica que os HAdV-41 não causam lise celular e estariam mais adaptados à multiplicação em um epitélio que descama, como o epitélio intestinal.

Após de verificar que células de origem linfóide são permissíveis à infecção por HAdV-41, analisamos a permissividade dos linfócitos intraepiteliais de mucosa intestinal. Para obtê-los várias técnicas de extração celular foram testadas. Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para a cultura primária de um determinado tecido isolado. Essas técnicas podem ser divididas em puramente mecânicas, as quais envolvem dissecação, com ou sem alguma forma de maceração, e técnicas que utilizam desagregação enzimática. A dissecação de explantes primários é recomendada quando uma pequena quantidade de tecido está disponível. A



desagregação enzimática é recomendada quando há uma maior disponibilidade de tecido e uma alta taxa de recuperação é requerida. A desagregação mecânica é recomendada quando grande quantidade de tecidos moles está disponível, mas a taxa de rendimento não é um parâmetro a ser considerado (FRESHNEY, 2000).

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

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

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

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

Após a obtenção e inoculação dos linfócitos intraepiteliais, com HAdV-41 foi detectada a expressão dos genes virais em experimento de infecção com células de dois voluntários distintos (dados não mostrados). Esse dado, também inédito, evidencia a capacidade do HAdV-41 de interagir com células de origem hematopoiética.

#### 4 CONCLUSÃO

O HAdV-41 é capaz de infectar células mononucleares do sangue periférico. O HAdV-41 é capaz de infectar linfócitos intraepiteliais. O método de tripsinização a frio seguido de separação por gradiente de Percoll e Ficoll, mostrou-se o melhor método para purificação de linfócitos de mucosa intestinal humana.

#### AGRADECIMENTOS

Dr. Charlotte Harsi pela disponibilidade de material e equipamentos .

#### REFERÊNCIAS

CHU, Y., SPERBER, K., MAYER, L., HSU, M.T. (1992) Persistent infection o human adenovirus type 5 in human monocytes cell lines. **Virology**, v.188, p793-800, 1992.

DE JONG., J.C ., WERMEBOL, A.G , VERJEIL – UIJTERWAL M.W, SLATEURS K.W, WERTHEIN – VAN DILLEN P.VAN DOMMUN, G.J , KHOO S.H, HIERHOLZER J.C. Adenovirus from human immunodeficiency vírus infected individuals, including two strains that represented new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 e D , respectively. **Journal Clinical Microbiology**, v.37, p.3940 -5,1999.

FILHO, E.P , FARIA, N.R.C, FIALHO , A.M , ASSIS, R.S , ALMEIDA , M.M.S ROCHA, M. GALVAO, M. , SANTOS, F.B , BARRETO, M.L , LEITE, J.P.G. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**,v.56, p.313–319,2007.

FLOMENBERG, P., PIASKOWSKY, V. , HARB, J., SEGURA, A., CASPER, J.T. Spontaneous persistent infection of B cell of lymphoma with adenovirus. **Journal of Medical Virology**, v.48., n.3 ., p267-72,1996.

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

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

GOODMAN, T., LEFRANCOIS, L.(1988) Expression of the gamma delta T cell receptor on intestinal CD8 intraepithelial lymphocytes. **Nature** . Vol 333. p855-858.1988.  
HASS, W., PEREIRA, P., TONEGAWA, S. Gamma delta cells . **Annual Immunology** v.11, p.637-686, 1993.

KANEGAE Y, MAKIMURA M, SAITO I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. **Japanese Journal Medical Science Biology**, v .47, p.157-66, 1994.

LION, T. Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. **Clinical Microbiology Review**, v.27, 441, 2014.

MOSLEY,R.L; KLEIN , J.R. A rapid method for isolation murine intestine intraepithelial lymphocytes with high yield and purity. **Journal of Immunology Methods**, v.156, p19-25,1992.

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**, v.174, p.239-49,1990.

SIQUEIRA-SILVA, J. HARSI, C.M. Infection kinetics of human adenovirus serotype 41 in HEK 293 cells. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p.736-744, August 2009.

SILVER, L., ANDERSON, C.W. Interaction of human adenovirus serotype 2 with human lymphoid cells. **Virology**, v.165. p377-387,1988.

TIEMESSEN, C.T., KIDD, A.H. The subgroup F Adenoviruses. **Journal of General Virology**, v.76. p481-497,1995.

**Recebido para publicação:** 25 de janeiro de 2017

**Aprovado:** 23 de março de 2017