

PURIFICAÇÃO DE ADENOVÍRUS 2 POR CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA E AFINIDADE – PERSPECTIVAS PARA PRODUÇÃO DE ANTÍGENO PURO COM MAIOR EFICIÊNCIA

Inareí José Paulini¹, Joselma Siqueira-Silva², Luciana Thomaz³, Charlotte Marianna Hársi², Nancy Bellei⁴ e Celso Francisco Hernandes Granato⁴

¹Professor Doutor, Faculdade Venda Nova do Imigrante, 29375-000, Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil, Email: inareip@yahoo.com.br; ² Professor Doutor (a), Laboratório de Adenovírus, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, 05508-000, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil; ³Pós Doutora, Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, 05508-000, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil; ⁴Laboratório de Virologia Clínica, Departamento de Doenças Infecciosas, Universidade Federal de São Paulo, 04039-032, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO- Os adenovírus humanos podem causar infecções gastrointestinais, urogenitais e respiratórias tanto em crianças como adultos. As técnicas diagnósticas utilizadas para detecção de adenovírus ainda necessitam de ajustes para melhor eficiência. Amostras de hexon de adenovírus purificado podem ser direcionadas para produção de anticorpos monoclonais. Esse trabalho teve como objetivo a produção e purificação de antígeno de adenovírus. Células em monocamada foram infectadas com adenovírus e após processo de purificação inicial foram submetidas a dois tipos cromatografia. A ultracentrifugação utilizando gradiente de cloreto de céσιο permitiu eliminar a maior parte de moléculas vindas de células inoculadas. A cromatografia de troca iônica mostrou ter bom desempenho. A cromatografia de afinidade foi satisfatória, mas apresentou pouco rendimento. Os dois processos de cromatografia podem ser utilizados no processo de obtenção de hexon de adenovírus com alto grau de pureza. O processo de cromatografia de troca iônica apresenta melhor eficiência e tem melhor custo benefício. **PALAVRAS - CHAVE:** adenovírus. hexon. purificação. Cromatografia.

ABSTRACT- Human adenovirus (HAdV) present 67 serotypes which are causative agents of infections in the gastrointestinal, uro-genital, and neurological systems, both in children and adults. HAdV are rarely diagnosed due to the lack of sensitive, practical and cost-benefits diagnostic tests. The aim of the present study is to produce HAdV-2 hexon protein which will be applied in diagnostics tests assembly. Monolayers cells was infected adenovirus 2. When the cytopathic effect was evident, the cells were clarified by centrifugation. The supernatants were collected and the precipitated by ultracentrifugation. Viral particles and soluble proteins in the supernatant were purified in cesium chloride gradients. Proteins fraction of the gradient were analyses by eletroforesis and electronic microscopy. This sample was purified by ion exchange and affinity chromatography. The ion exchange chromatography process presents better efficiency and has a better cost benefit.

KEYWORDS: adenovirus. hexon. purification. chromatography.

1 INTRODUÇÃO

Os adenovírus 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 B1 HAdV-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). Embora muitas destas infecções sejam graves exigindo hospitalização, os adenovírus são raramente diagnosticados de forma eficiente devido a deficiências dos testes quanto a sensibilidade, praticidade e custo benefício (LION et al., 2014; PUERARI et al., 2014; WATANABE et al., 2013; DOWDLE et al., 1971).

O uso de adenovírus purificado para testes de diagnóstico requer protocolos de purificação altamente eficientes que proporcionam alto grau de pureza das partículas infecciosas e removem eficazmente DNA contaminante e proteínas de células hospedeiras (NESTOLA et al., 2014; HONGLING et al., 2009; CEPKO et al., 1983; BOULANGER et al., 1973).

Os adenovírus são relativamente estáveis e têm sido tradicionalmente purificados em cloreto de céσιο (CsCl) (RUX et al., 2007; BOULANGER et al., 1973). Antes disso, são necessários ciclos de congelamento-descongelamento para quebrar células infectadas. As preparações purificadas contendo grandes quantidades de partículas virais são normalmente obtidas. Então o procedimento clássico para a purificação de adenovírus consiste em três etapas: clarificação, concentração e purificação. Primeiramente, o volume de material celular inoculado é clarificado utilizando centrifugação. Esse processo é capaz de eliminar a maior parte das proteínas celulares. Em seguida, o material é submetido ao processo de ultracentrifugação. Por último, o concentrado viral passa pelos processos de cromatografia. Esses processos podem ser: cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade (NESTOLA et al., 2014). A utilização da proteína hexon de adenovírus pura é a melhor escolha para ser usada nos protocolos de obtenção de anticorpos monoclonais e policlonais (SIQUEIRA-SILVA et al., 2009). O hexon purificado também é indicado para servir como reagente em ensaios imunoenzimáticos, imunocromatográficos e em outros estudos moleculares (HONGLING et al., 2009).

O objetivo do presente estudo foi produzir e purificar proteínas majoritárias do capsídeo do adenovírus. As cromatografias de troca iônica e afinidade foram eficientes na obtenção de alto grau de pureza da proteína hexon.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTURA DE CÉLULAS, PROTÓTIPOS DE VÍRUS, TITULAÇÃO DE VÍRUS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.

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

O protótipo de vírus utilizado foi o adenovírus sorotipo 2 por ser de fácil cultivo e ter maior capacidade de replicação em células HEK.

2.2 PRODUÇÃO DE VÍRUS E PURIFICAÇÃO EM GRADIENTE DE CLORETO DE CÉSIO.

Monocamadas de células HEK 293 foram preparadas em 48 garrafas de cultura (300cm²). Após dois ou três dias, quando a confluência da cultura celular atingiu 80%, as células foram lavadas com PBS e as culturas foram inoculadas com uma suspensão de estoque adenovírus 2 de passagem (0,1 m.o.i). Após uma adsorção por um período de 2 h a 37 ° C, cada cultura foi acondicionada em meio MEM suplementado com 0,2% de soro fetal bovino. As células HEK 293 inoculadas foram incubadas a 37 ° C em estufa de CO₂ a 5% e observado diariamente. Quando o efeito citopático foi evidente (entre 2-4 dias), as células foram colhidas

e centrifugadas a 280 g durante 10 min (4° C). Os sobrenadantes foram então removidos e os sedimentos celulares foram armazenados a -20 ° C. O adenovírus sorotipo 2 foi purificado em gradiente de cloreto de cério (CsCl) preparado em tampão HEPES 10 mM A pH 7,4. Os vírus foram liberados dos grumos de células infectadas após três ciclos de congelamento e descongelamento. O material celular foi suspenso num tampão HEPES 10 mM a PH 7,4. As suspensões foram clarificadas adicionando um volume igual de Vertrel XF (Clarus Technology), seguido por agitação vigorosa. Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 3000 g durante 25 min a 4 ° C. Partículas virais no sobrenadante foram purificadas em gradientes de de densidade de CsCl preparados num tampão HEPES 10 mM pH 7,4, seguindo um protocolo já descrito (KANEGAE et al.1994). As amostras foram concentradas por tubos Amicon Ultra 100KDa (Millipore) a 280 g durante 5 min (4° C).

2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Uma quantidade de 100 µL do adenovírus 2 purificado foi colocado em uma rede de mica (interface carbono / mica) e embebido com acetato de uranila. Micrografias foram obtidas através do microscópio eletrônico de transmissão Philips CM12 (TEM, Philips, Eindhoven, Holanda) operados a 80 kV e uma ampliação nominal de 15.000 vezes (SIQUEIRA -SILVA et al., 2009).

2.4 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A resina Sephadex A-50 foi equilibrada com PBS 0,01M. As frações foram eluídas com concentrações crescentes de cloreto de sódio numa faixa de concentração de 0,02M para 0,50M (em intervalos de 0,02M). As frações foram quantificadas no espectrofotômetro (280 nm). Seis frações, cada uma de 10mL (contendo hexon puro) foram reunidas e concentradas a 0,5 mL (Amicon ultra / Millipore 100kda).

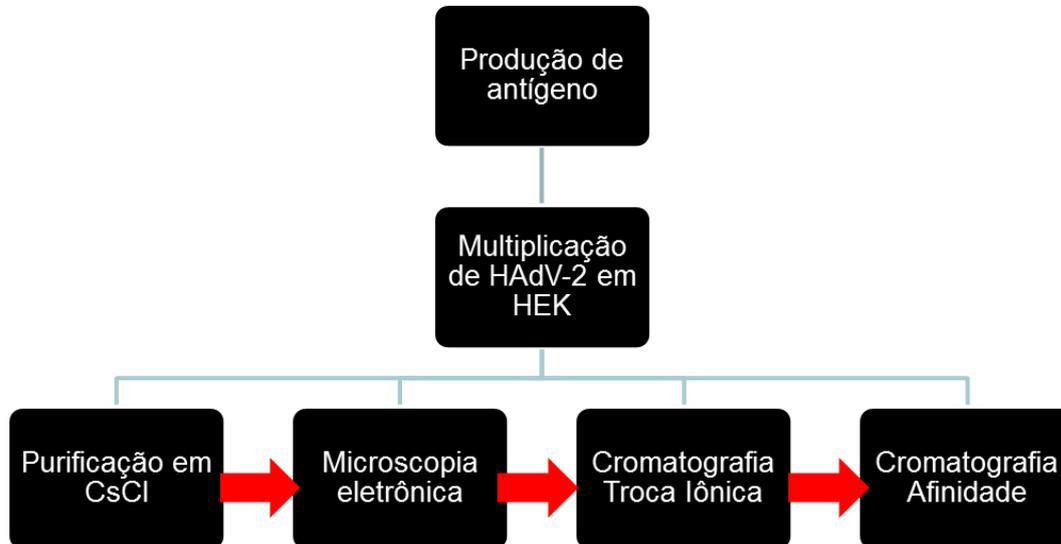
2.5 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Para cromatografia de afinidade, a resina CNBr sepharose 4B (1 g) foi embebida com 1 mM HCl pH 3,0 para a ativação. Anticorpo policlonal anti-adenovírus (concentração 2 mg) produzido em BALB/c (SIQUEIRA -SILVA et al., 2009) foi dialisado e concentrado com o tampão de acoplamento NaHCO₃ 0,1 M pH 8,0. Em seguida, foi adicionado a resina de CNBr sepharose 4B. Após a adição da amostra de adenovírus 2, as proteínas foram eluídas com NaCl 1 M, pH 8,3. As frações colhidas foram quantificadas a 280 nm e analisadas por *SDS-PAGE* e *Western blotting*.

2.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (*SDS-PAGE*)

Após a cromatografia de afinidade, os extratos de proteína hexon foram separados por *SDS-PAGE* (HONGLING et al, 2009) transferidos para uma membrana de nitrocelulose Hybond-P PVDF (Amersham Biosciences). Depois, foram bloqueadas com solução bloqueio (0,05% de Tween e 5% de leite em pó não gorduroso em PBS) por 1h a 4°C. Em seguida, incubou-se por 12h com anticorpo anti-adenovírus produzido em camundongo (Merck) diluído a 1: 5000. A membrana foi lavada 3 vezes com solução de lavagem (Tween 0,1% em PBS). Em seguida, a membrana foi então incubada com peroxidase anti-IgG diluída 1: 5000 por 1h. A nitrocelulose foi lavada 3 vezes com solução de lavagem (Tween 0,1% em PBS) e tratadas com ECL (Amersham) durante 5 minutos, expostas a Hyperfilm (Amersham Biosciences) durante 20 min e visualizados.

Figura 1: Resumo da Metodologia



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A monocamada de células HEK-293 infectada com 0,1 m.o.i de adenovírus 2 mostrou efeito citopático característico (entre 2-4 dias) com lise celular, células arredondadas, escuras e formação de cachos (PIENIAZEK et al., 1990; DE JONG et al., 1983). A suspensão de células lisadas foi clarificada com clarificador Vertrel XF. Os detritos das células foram removidos por centrifugação. Em seguida, as partículas virais foram isoladas em gradiente de cloreto de céσιο, a porção correspondente a partículas virais pôde ser visualizada. Em seguida, uma alíquota das porções superiores e inferiores das amostras foram analisadas por Microscopia Eletrônica. A presença de hexon de adenovírus e a partícula viral inteira pôde ser vista, como já descrito em trabalhos anteriores (RUX et al., 2007; NERMUT et al., 1979). Após a troca iônica, a maior parte das proteínas celulares (indesejadas) foram eluídas entre 0,02 e 0,06 M de cloreto de sódio. A fibra, penton e hexon foram eluídas a 0,14, 0,30 e 0,46 M de cloreto de sódio, respectivamente. As frações de eluição 0,38-0,5M mostraram a banda de hexon purificado, como já descrito (aproximadamente 100KDa) (HONGLING et al., 2009). A análise de *Western Blotting* de hexon purificado utilizando os anticorpos monoclonais mostra elevada especificidade de ligação entre essas duas moléculas (HONGLING et al., 2009) (FIGURA 7). A banda indica a proteína hexon isolada (aproximadamente 100 kDa).

Os adenovírus são importantes patógenos responsáveis por infecções graves em crianças menores de dois anos de idade e em pacientes imunocomprometidos (LION et al., 2014; PUERARI et al., 2014; WATANABE et al., 2013). Um grande número de amostras de pacientes com síndrome gripal característica de infecção por adenovírus foram classificadas como sendo negativas por cultura celular e imunofluorescência direta. Essa realidade mostra que as técnicas não são eficientemente robustas para confirmação de enfermidade causada por adenovírus. A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) mostra-se muito mais sensível para detecção, porém, é uma técnica que necessita de muitos recursos (equipamentos/pessoal especializado) e tempo para ser realizada (PUERARI et al., 2014; WATANABE et al., 2013, FERONE et al., 2014).

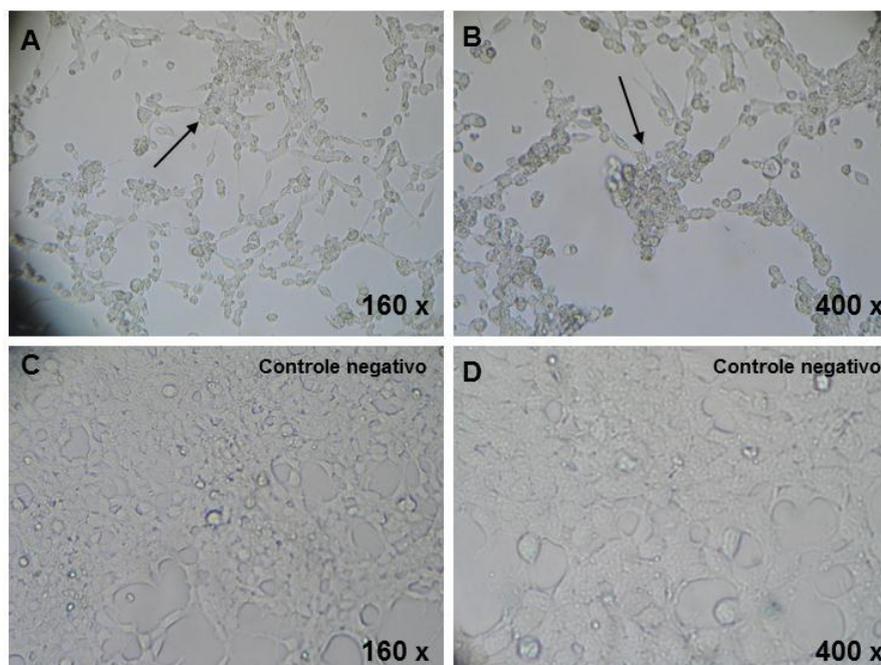
Anticorpos monoclonais contra hexon têm sido produzidos e avaliados em vários países com sensibilidade e especificidade variáveis. Udeh e colaboradores (2008) avaliaram que aproximadamente 400 milhões de dólares/ano de recursos destinados a saúde podem ser economizados com um bom diagnóstico para adenovírus de conjuntivite nos Estados Unidos. Além disso, 1,1 milhões de casos de uso inapropriado de antibiótico podem ser evitados.

Esse estudo teve como objetivo a produção e purificação de antígeno (hexon) de adenovírus visando ser utilizado para produzir anticorpos específicos. Esses imunobiológicos tem maior potencial de detecção para todos os 67 sorotipos (SING et al., 1988; PICHLAGOLLON et al., 2007; HONGLING et al., 2009; MADISCH et al., 2005) do adenovírus no teste imunoenzimático (ELISA) ou no teste imunocromatográfico.

A metodologia de escolha para produção de antígeno foi o método clássico de purificação de adenovírus, pois, acreditou-se que se conseguiria grandes quantidades de proteína hexon, em menos tempo e com menos recursos (FIGURA 1) (SIQUEIRA-SILVA, 2008, LEITE, 1986). Conseguiu-se obter cerca de 3mg de proteína hexon em 6 meses. O gasto foi de aproximadamente cinco mil reais. Além disso, alguns estudos demonstraram que o uso da expressão heteróloga para produção de hexon pode resultar em formação de hexon em sua forma monomérica (conformação protéica não imunogênica).

Neste estudo, a produção de HAdV-2 *in vitro* mostrou-se rápida, se comparada com a de outros adenovírus (PIENIAZEK et al., 1990; DE JONG et al., 1983, SIQUEIRA-SILVA, 2009, LEITE, 1986). Em média, levou-se 4 dias para a observação do efeito citopático (ECP) total nas células inoculadas. O adenovírus sorotipo 41 (espécie F) leva de 7 a 9 dias para causar dano às células. O efeito citopático (ECP) dos adenovírus da espécie C inicia-se com retração da monocamada celular e avança com a formação de cachos celulares entre 2 a 4 dias após a infecção, que vão se ampliando, até o descolamento total do tapete celular (FIGURA 2) (SIQUEIRA-SILVA, 2009, LEITE, 1986).

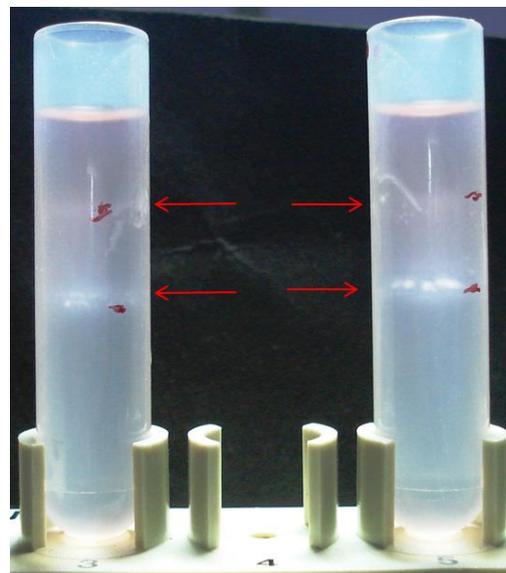
Figura 2: Efeito citopático de células HEK-293 infectadas com HAdV-2 após 96 horas de infecção. A: lise celular e formação de cachos (setas), magnificação de 160 vezes e B: magnificação de 400 vezes. C: células HEK-293 não infectadas após 96 horas (controle negativo), magnificação de 160 vezes e D: magnificação de 400 vezes.



Fonte: autores.

O processo de purificação viral do HAdV-2 foi realizado utilizando-se dois métodos de concentração viral. Então, as monocamadas celulares foram coletadas e processadas em busca das proteínas virais (hexon) e dos vírus presentes no citoplasma e ancorados na membrana celular. Além disso, foram coletados os sobrenadantes de cultura de células quando o ECP era evidenciado. Como a purificação por gradiente de CsCl é feita por densidade diferencial, teve-se o cuidado de se produzir grandes quantidades de estoques virais para purificação (RUX et al., 2007; KANEGAE et al., 1994). A coleta da banda viral é baseada na refração da luz na massa protéica, podendo assim ser diferenciado da solução de CsCl (RUX et al., 2007; KANEGAE et al., 1994) (FIGURA 3).

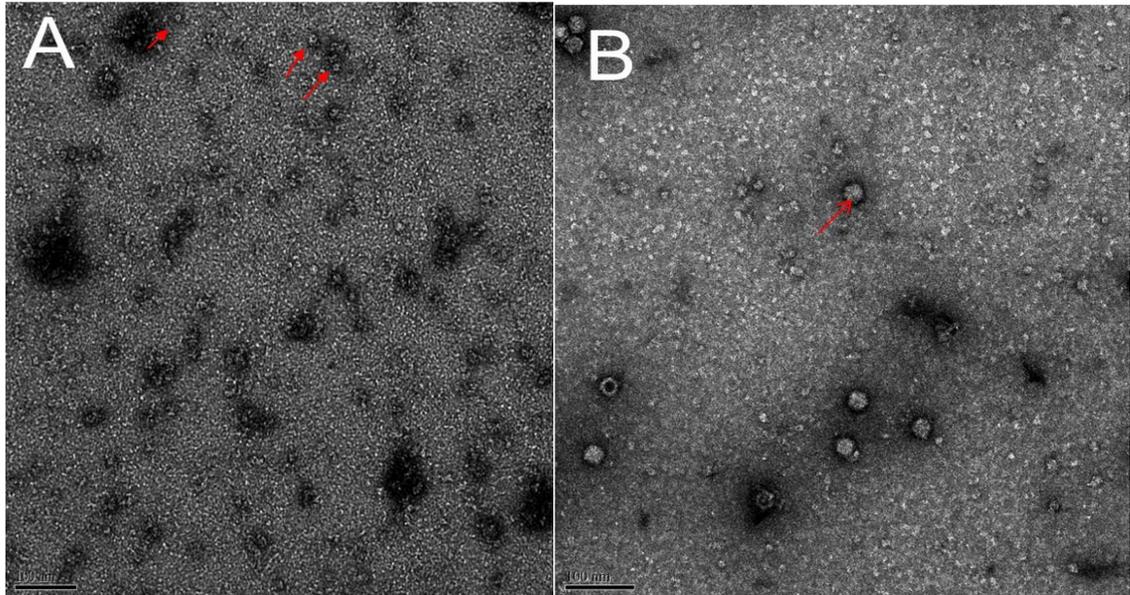
Figura 3: Purificação de adenovírus 2 por meio de processo de ultracentrifugação em cloreto de cério. Porção correspondente a proteína hexon e outras proteínas em solução (seta superior). Porção correspondente ao vírus total HAdV-2 densidade = $1,33\text{g/cm}^3$ (seta inferior).



Fonte: Autores

A cromatografia de troca iônica resultou em boa purificação do material, obteve-se cerca de 2mg (miligramas) de proteína hexon pura (FIGURA 4).

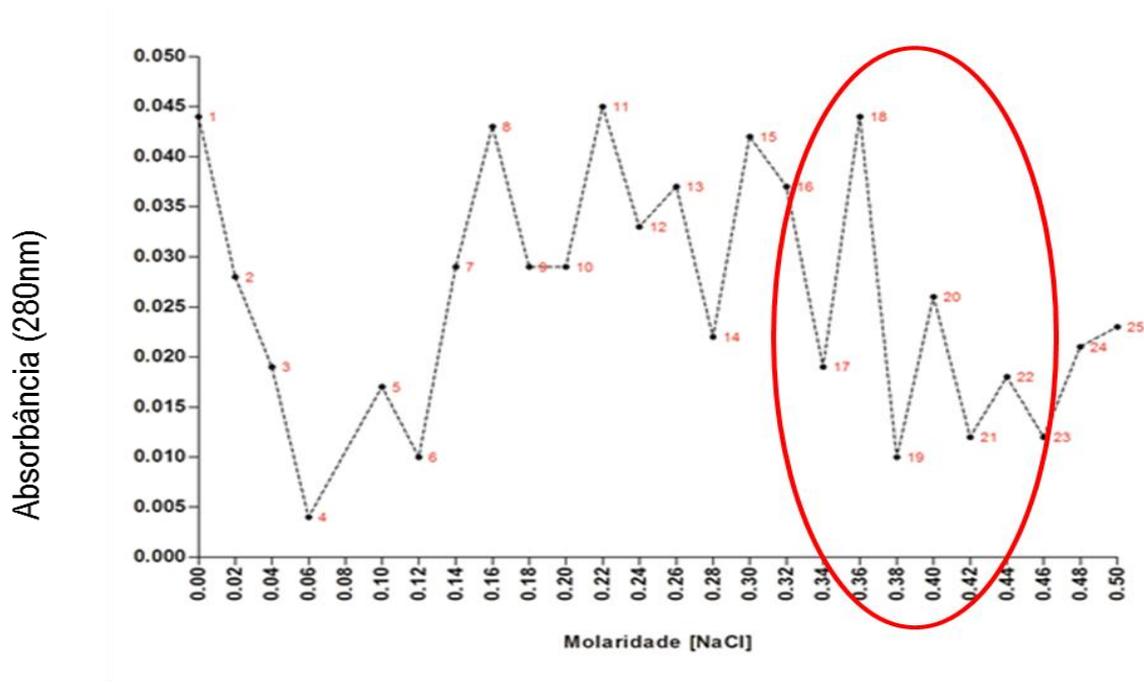
Figura 4: (A) Microscopia eletrônica da “porção” superior do gradiente de cloreto césio contendo proteínas de HADV-2 (setas: presença de hexon). (B) Microscopia eletrônica da fração onde se situa HAdV-2 (seta) em gradiente de cloreto de césio ($d=1,33$).



Fonte: Autores

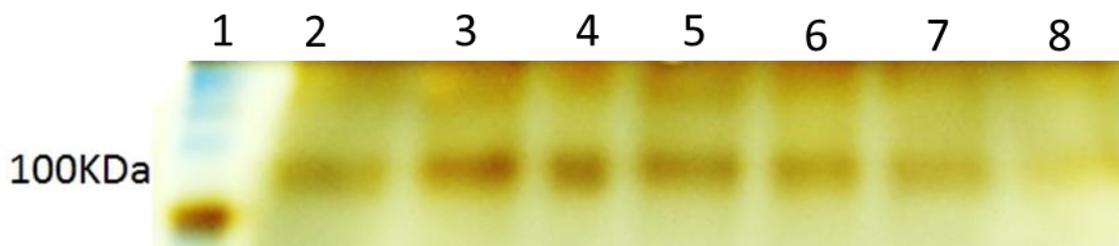
As frações de eluição da proteína hexon foram encontradas nas mesmas concentrações em que foram descritas anteriormente (PEIXOTO et al., 2006; LEITE, et al., 1986, PEREIRA et al., 1968). Além disso, Pereira e colaboradores (1968) mostraram que as proteínas vindas da passagem do vírus pelas células são eluídas entre 0,02M e 0,06M, quando esse material viral é submetido à cromatografia de troca iônica (FIGURAS 5 e 6).

Figura 5: Purificação de material viral por troca iônica em resina DEAE Sephadex cada A-50. Relação entre a eluição da amostra em diferentes concentrações de NaCl e densidade óptica (D.O 280 nm) no espectrôfotometro NanoDrop 2000c Thermo Cientific. A parte destacada mostra as concentrações de NaCl na qual a proteína Hexon foi eluída da resina.



Fonte: Autores

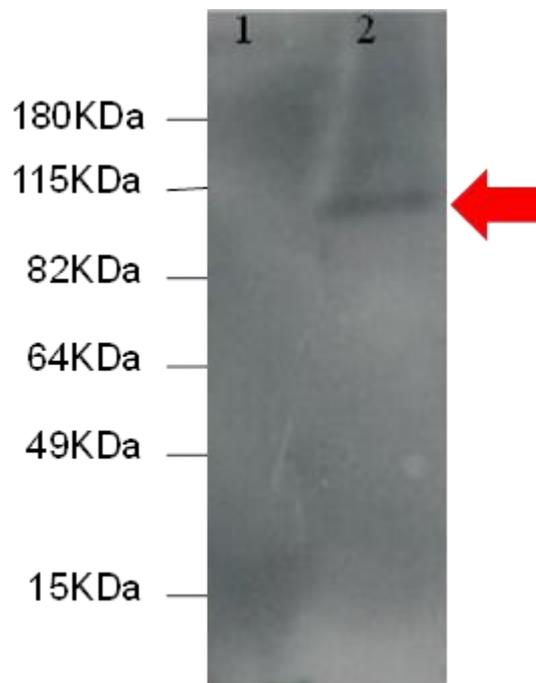
Figura 6: SDS-PAGE após purificação do "hexon" por cromatografia de troca iônica (DEAE sephadex A-50). Canaletas de 1 a 8 correspondem a as frações de eluição com concentração de NaCl vindas da cromatografia de troca iônica (0,32M -0,42M)



Fonte: Autores

A cromatografia de afinidade permitiu uma purificação satisfatória da proteína hexon, porém, o rendimento foi baixo (cerca de 1 miligrama). Após o *imunoblotting*, confirmou-se que anticorpo monoclonal comercial foi capaz de reconhecer especificamente o hexon de adenovírus puro pois não houve reação cruzada com proteínas do extrato de célula HEK utilizado como controle negativo (HONGLING et al, 2009) (FIGURA 7).

Figura 7: *Western blotting*. Lane 1: Controle negativo, não houve reação do anticorpo monoclonal comercial anti-hexon com extrato de proteínas de células HEK. Lane 2: A seta indica banda correspondente a reação do anticorpo monoclonal comercial com hexon purificado pela cromatografia de afinidade



Fonte: Autores

4 CONCLUSÃO

A obtenção de hexon de adenovírus pela via clássica (multiplicação em células, seguida de ultracentrifugação e cromatografia) fornece alto grau de pureza. Na sequência, esse antígeno puro pode permitir a produção de anticorpos específicos com maior facilidade e rapidez. Além disso, é possível utilizá-lo para estudos de epítomos, construção de vacinas e pesquisas de modificações conformacionais do capsídeo viral.

AGRADECIMENTOS

À Dr. Joselma Siqueira Silva, Dr. Luciana Thomaz e Dr. Charlotte Harsi pela disponibilidade de material e equipamentos na purificação do adenovírus 2.

Ao apoio financeiro da FAPESP, Projeto número 2011/50100-6.

REFERÊNCIAS

- BOULANGER P.A, PUVIO F. Large-Scale Preparation of Soluble Adenovirus Hexon, Penton and Fiber Antigens in Highly Purified Form. **Europea Journal Biochemistry**, v.39, p.37-42,1973. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1973.tb03100.x/epdf>>. Acesso em: 02 dez. 2016.
- CEPKO, C.L, WHETSTONE, A., SHARP, P.A. Antibody that is group specific and potentially useful as a diagnostic reagent. **Journal Clinical Microbiology**, v.17, n.2, p.360, 1983. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/17/2/360.full.pdf+html>>. Acesso em: 20 nov. 2016.
- 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. **J Clinical Microbiology**, v.37, n. 12, p. 3940 -5,1999. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/37/12/3940.full.pdf+html>>. Acesso em: 03 dez. 2016.
- DOWDLE, W.R , LAMBRIEX M. , HIERHOLZER J.C Production and Evaluation of a Purified Adenovirus Group-Specific (Hexon) Antigen for Use in the Diagnostic Complement Fixation Test. **Applied Microbiology**, Apr. 1971, p. 718-722. Disponível em : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC377262/pdf/applmicro00114-0154.pdf>>. Acesso em: 22 nov.2016.
- FERONE, E.A., BEREZIN, E.N., DURIGON, G.S.,FINELLI, C., FELICIO, M.C.C., STORNI, J.G., DURIGON, E.L., OLIVEIRA, D.B.L. Clinical and epidemiological aspects related to the detection of adenovirus or respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory tract infection. **Jornal de Pediatria**, Rio Janeiro, v. 90, n.1, p.42–49. 2014. <http://www.scielo.br/pdf/jped/v90n1/0021-7557-jped-90-01-00042.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2016.
- 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. Disponível em: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/56/3/313.pdf?expires=1494280484&id=id&acname=guest&checksum=0A8C1B57DB1466651A17B5F59D78229A>>. Acesso em: 03 dez. 2016.
- 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. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7823411>>. Acesso em: 03 dez. 2016.
- LEITE, J.P.G (1986) PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE ADENOVIRUS ASSOCIADOS A GASTROENTERITE. Tese de Mestrado Fiocruz, Ano de Obtenção: 1986.

LION, T. (2014) Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. **Clinical Microbiology**, Rev. 2014, 27(3):441 . Disponível em: <http://cmr.asm.org/content/27/3/441.full.pdf+html>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

HONGLING , Q. ZHICHAU, Z (2009) Eppitope mapping and cross reactivity analysis of monoclonal antibodies against hexon protein of human adenovirus type 3 **Virus Research** **146 (2009) 58–65**. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170209003165>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

MADISCH I, HARSTE, POMMER G. , HEIM A. Phylogenetic of the main neutralization and hemagglutination determinants of all human adenovirus prototypes as a basis for molecular classification and taxonomy . **Journal of Virology**. v.79, n.24, 15265-76, 2005. Disponível em : <http://jvi.asm.org/content/79/24/15265.full.pdf+html>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

NERMUT M.V, PERKINS W.J (1979) Consideration of three dimensional structure of the adenovirus hexon from electron microscopy and computer modeling. **Micron**, 1979. Vol. 10, pp 247-266. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0047720679900839>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

NESTOLA, P. SILVA, R.J.S, PEIXOTO, C. ALVES, P.M, CARRONDO, M.J.T, MOTA, J.P.B. (2014) Adenovirus purification by two-column, size-exclusion, simulated countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1347 p.111–121, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967314006694>>. Acesso em: 03 dez. 2016.

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**, 174, p.239-49, 1990. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2294640>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

PEIXOTO C., FERREIRA T.B, CARRONDO, M.J., CRUZ P.E, ALVES P.M. (2006) Purification of adenoviral vectors using expanded bed chromatography. **Journal of Virological Methods**, 132, p.121–126, 2006. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093405003137>>. Acesso em: 03 dez. 2016.

PEREIRA, H. G., VALENTINE, R. C., and RUSSELL, W. C. (1968) Crystallization of an adenovirus protein (the hexon). **Nature**,v. 219,p.946–947,1968. Disponível em : <https://www.nature.com/nature/journal/v219/n5157/pdf/219946a0.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

PICHLA-GOLLON, S. , DRINKER, M. RUX, J.J, BURNETT, R.M, BERGELSON, J.M . Structure-based identification of a major neutralizing site in an adenovirus hexon. **Journal of Virology**, p.1680-1689, 2007. Disponível em: <http://jvi.asm.org/content/81/4/1680.full.pdf+html>>. Acesso em: 03 dez. 2016.

PUERARI, D., CAMARGO, C. GUATURA, S., WATANABE, A.S.A, GRANATO, C., BELLEI, N. Aplicação de teste molecular para detecção de adenovírus em pacientes pediátricos distintos. **Revista Paulista de Pediatria**, v 33, n.2, p.136–141, 2015. Disponível em : http://www.scielo.br/pdf/rpp/v33n2/pt_0103-0582-rpp-33-02-00136.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2016.

RUX J.J, BURNETT R. M. Large-Scale Purification and Crystallization of Adenovirus Hexon. **Methods in Molecular Medicine**, Vol. 131: Adenovirus Methods and Protocols, Second Edition, vol. 2: Ad Proteins, RNA, Lifecycle, Host Interactions, and Phylogenetics, 2007. Disponível em : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656787>>. Acesso em: 03 dez. 2016.

SINGH-NAZI, N. , RODRIGUEZ, W.J, KIDD, A.H, BRANDT, C.D. Monoclonal Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Specific Identification and Typing of Subgroup F Adenoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 297-300, 1988. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC266271/pdf/jcm00074-0149.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

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, n.5, p. 736-744, August 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820835>>. Acesso em: 03 dez. 2016.

UDEH, B.L, SCHENEIDER J.E, OHSFELDT RL. Cost effectiveness of a point-of-care test for adenoviral conjunctivitis. **American Journal of the Medical Sciences**, v.336, n.3, p.254-64, 2008. Disponível em: [http://www.amjmedsci.org/article/S0002-9629\(15\)32190-X/fulltext](http://www.amjmedsci.org/article/S0002-9629(15)32190-X/fulltext)>. Acesso em: 03 dez. 2016.

WATANABE, A., CARRARO, E., CAMARGO, C., GUATURA, S., BELLEI, N., GRANATO, C. F. H. (2013). Human adenovirus detection among immunocompetent and immunocompromised patients presenting acute respiratory infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n.2, p.161-165, Mar-Apr, 2013. Disponível em:< http://www.scielo.br/readcube/epdf.php?doi=10.1590/0037-8682-1699-2013&pid=S0037-86822013000200161&pdf_path=rsbmt/v46n2/0037-8682-rsbmt-0037-8682-1699-2013.pdf&lang=en >. Acesso em: 03 dez. 2016.

Recebido para publicação: 07 de janeiro de 2017

Aprovado: 08 de março de 2017.