

## ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO ADENOVÍRUS HUMANO 41 COM CÉLULAS DE ORIGEM HEMATOPOIÉTICA E LINFÓCITOS INTESTINAIS

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

**RESUMO-** Poucos estudos sobre a interação entre adenovírus e células hematopoiéticas/intestinais linfocitárias foram capazes de comprovar limiar de afinidade entre si. O grau de interação desses vírus nas células de mucosa intestinal ainda não foi descrita em detalhes. No presente estudo, avaliou-se a expressão gênica do adenovírus 41 nessas células. Para isso, infectou-se PBMC e linfócitos intraepiteliais de pacientes voluntários e quantificou-se por técnicas de amplificação do material genético. Os ensaios foram comparados com células HEK 293 infectadas. A expressão gênica tanto em células hematopoiéticas quanto nas linfocitárias foi aproximadamente 200 vezes menor que nas células HEK. A PCR em tempo real mostrou-se com maior capacidade de detecção do material genético viral.

**PALAVRAS-CHAVE:** Adenovírus. Interação. Expressão gênica. Células hematopoiéticas. Células intestinais linfocitárias.

**ABSTRACT-** Few studies into the interaction between the adenovirus and Hematopoietic cells/intestinal lymphocytes have been able to demonstrate an affinity threshold between the two. The degree of interaction of this virus in the intestinal mucous has still not been described in detail. To this end, PBMC and intraepithelial lymphocytes of voluntary patients were infected, and the genetic material was quantified using amplification techniques. The assays were compared with infected HEK 293 cells. The gene expression both in hematopoietic cells and in the lymphocytes was approximately 200 times less than in the HEK cells. Real time PCR was seen to have a greater capacity to detect viral genetic material.

**KEYWORDS:** Adenovirus. Interaction. Lymphocytes. Polymorphic blood mononuclear cells.

### 1 INTRODUÇÃO

Os adenovírus humanos (HAdV) são importantes patógenos que causam doenças infecciosas localizadas e/ou sistêmicas nos seres humanos (PAULINI et al., 2017). Alguns trabalhos relataram a produção de DNA viral em linfócitos infectados com a produção de pequena quantidade de partículas infecciosas enquanto a célula mantém seu metabolismo normal. A porção de ligação do principal receptor dos adenovírus (CAR- coxsackie adenovírus receptor) se encontra na porção baso lateral do epitélio intestinal. Poucos estudos conseguem elucidar a questão da entrada dos adenovírus por esse receptor localizado nessa região do epitélio (SILVA et al., 2017). Alguns trabalhos 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. Detalhes sobre a expressão gênica desses vírus podem contribuir enormemente para elucidar a atividade de genes responsáveis pela produção de adenovírus que podem adentrar a camada basal.

Aqui, avaliou-se a expressão gênica do adenovírus 41 com células hematopoiéticas e células intestinais linfocitárias em comparação com células HEK também infectadas (SILVA et al., 2017).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DO HADV-41

Para a detecção do DNA genômico de HAdV-41 em células HEK 203 infectadas, foram utilizados dois métodos de extração de DNA distintos: o método de extração seletiva de DNA viral descrito por HIRT (1967) e um método de extração de DNA total, dependendo do tipo de ensaio estudado. Para a padronização das técnicas de detecção de genoma viral por reação em cadeia da polimerase (PCR), Nested-PCR, PCR em tempo real e para a obtenção da curva-padrão nos ensaios de quantificação absoluta, foram utilizados como *templates* DNA viral purificado pela técnica de HIRT (1967). O DNA viral extraído foi ressuscitado em Tris EDTA (TE) e quantificado por espectrofotometria. Em seguida, foi preparada uma série de diluições deste DNA, na base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) para aplicação como amostra estas aplicadas na padronização desses métodos (Tabela 1).

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

### 2.1 TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SELETIVA DE DNA (HIRT, 1967)

As células HEK inoculadas com HAdV-41 foram colhidas e centrifugadas a 500 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com PBS pH 7,4 e novamente centrifugado. O sedimento foi ressuscitado em 500 µL de TE (10 mM de Tris e 1mM de EDTA) e adicionado de 30 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 % (Dodecil sulfato de sódio, Sigma-Aldrich). A solução foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e por mais 5 minutos a 60 °C. A seguir, foram adicionados 5µl de proteinase K a 10 mg/ml (Invitrogen), incubando a solução por uma hora a 65 °C. Foram adicionados 150 µl de NaCl a 5 M e a reação foi incubada por 24 horas a 4 °C para a precipitação do DNA celular. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 21250 x g por 1 hora. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e o sedimento foi descartado. Foram adicionados 5 µl de proteinase K 10 mg/ml e a reação incubada por 2 horas a 37 °C. A extração das proteínas virais foi feita com fenol-clorofórmio (LGC, Biotecnologia, São Paulo-Brasil). Para tanto, foi adicionado igual volume de fenol-clorofórmio à suspensão viral num tubo de 1,5 mL, agitando-o até a solução ficar esbranquiçada. Em seguida, a solução foi centrifugada a 21250 x g por 1 minuto a 4 °C e o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um tubo limpo. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de éter etílico saturado (MERCK, Frankfurt, Alemanha), agitado e centrifugado a 21250 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante (éter) foi desprezado e os tubos foram incubados a 37 °C para a evaporação total do éter. Para a precipitação do DNA viral, foram adicionados 20 µl de NaCl 5 M e 750 µL de etanol absoluto a 4 °C (MERCK). A mistura permaneceu por uma hora a -77 °C e após este período, a solução foi centrifugada a 21250 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi levado à estufa 35 °C por 5 minutos para a evaporação total do etanol. O sedimento (DNA viral) foi ressuscitado em 40 µl de TE contendo 30 µg/ml de RNase (Invitrogen). A solução foi incubada a 37 °C por duas horas para potencializar a ação da enzima. Finalmente, o DNA viral purificado foi armazenado a -20 °C para uso posterior.

## 2.2 TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

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

## 2.3 ELABORAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

A partir do genoma do HAdV-41-Tak, depositado no GenBank (NCBI- National Center for Biotechnology Information NIH, USA) sob o número de acesso DQ315364, foram elaborados diferentes oligonucleotídeos para os genes E1A, E1B(55K), E3(14K), fibra curta e hexon. Foram também elaborados oligonucleotídeos direcionados para genes constitutivos celulares, utilizados como controle extração e para a normalização da expressão gênica viral na célula. Esses oligonucleotídeos foram obtidos a partir das seqüências de seus genes depositadas no GenBank. Foi escolhido o gene GAPDH (número de acesso AF261085), como controle endógeno.

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

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

## 2.4 REAÇÃO DE PCR (*polymerase chain reaction*)

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

do gene hexon. A seguir, a relação dos oligonucleotídeos utilizados na PCR para a detecção de HAdV-41 (TABELA 1).

Tabela 1- Relação dos oligonucleotídeos utilizados na PCR para a detecção de HAdV-41.

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

Degenerações IUPAC: y (C ou T), k (G ou T) e r (A ou G)

([www.ncbi.nlm.nih.gov/class/MLAcourse/modules/MolBioReview/iupac\\_nt\\_abbreviation.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/class/MLAcourse/modules/MolBioReview/iupac_nt_abbreviation.html))

Na PCR foi utilizada a seguinte mistura: 10mM Tris-HCl (pH 8,3) contendo 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 50mM de KCl, 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTPs), 0,2mM de cada oligonucleotídeo, 1U de Tth (*Thermus thermophilus*) DNA polimerase (BIOTOOLS, Madri, Espanha) e 0,1% de Triton-X100 (Sigma-Aldrich). Como *template* foram utilizados 5µL de cada diluição seriada do DNA de HAdV-41. As amplificações foram realizadas com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento dos oligonucleotídeos a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto. Após o término dos 30 ciclos, obteve-se a extensão final do produto a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados (428pb) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % (Invitrogen) em tampão de Tris acetato EDTA (TAE) a 90 V e corados com solução de brometo de etídeo. A presença dos amplificados foi visualizada através de exposição à luz ultravioleta. A imagem foi obtida com o aparelho fotodocumentador Vilber Lourmat (Marne-la-Vallée, França).

## 2.5 NESTED-PCR

As condições de reação foram as mesmas estabelecidas para a PCR convencional. Visando a detecção seletiva do genoma de HAdV-41 por *Nested-PCR* foi necessário desenhar um par de oligonucleotídeos que reconhecesse as seqüências internas do produto da amplificação da PCR de gênero (XU e colaboradores 2000). Os oligonucleotídeos foram desenhados e, depois de verificada a especificidade, procurou-se o par de oligonucleotídeos que apresentava maior similaridade com a espécie F dentro da seqüência nucleotídica do amplificado gerado pela PCR na reação de XU e colaboradores (2000). Em seguida, os oligonucleotídeos foram aplicados na detecção do genoma viral em reação de *Nested-PCR*. Como *template* da reação, foram utilizados os produtos amplificados na PCR a partir da maior diluição detectada. Para confirmar a especificidade do par de oligonucleotídeos foi realizada uma PCR, utilizando como *templates* os DNAs de todas as espécies de adenovírus humanos, menos a espécie D. As condições de reação foram as mesmas estabelecidas para a PCR convencional. Os produtos amplificados (218pb) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % em tampão TAE a 90 V, corados com solução de brometo de etídeo e visualizados através de exposição à luz ultravioleta.

## 2.6 PCR EM TEMPO REAL

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

As condições de reação foram as mesmas estabelecidas para a PCR convencional, utilizando como *template* as diluições seriadas do DNA de HAdV-41, previamente preparadas. Para a quantificação do *template* foi feita uma curva padrão de detecção, construída com as diluições seriadas do DNA viral, previamente quantificadas por espectrofotometria. A quantificação absoluta das amostras foi feita por comparação da quantidade de fluorescência emitida, durante a reação, pelas amostras de concentração de DNA viral conhecidas e desconhecidas. A quantidade de fluorescência emitida está associada ao ciclo de amplificação na qual foi detectada, chamado de *threshold cycle* CT (CTthreshold cycle). O CT é considerado como o ponto a partir do qual o sistema começa a detectar o aumento de fluorescência, diretamente associada ao aumento exponencial dos produtos da PCR, durante a fase logarítmica. A curva padrão foi construída baseada na relação entre os CT das diluições com a mesma concentração de DNA e os desvios padrões dos CT esperados para essas amostras. A eficiência da reação foi calculada a partir da quantidade de DNA indicada para cada diluição testada. Dessa forma, para as amostras que tenham o dobro de DNA em relação à outra, é esperado que o CT gerado seja 1 ciclo maior que o outro, pois a quantidade de DNA, em uma reação de PCR, dobra de um ciclo para outro. Assim, reações com 100% de eficiência apresentam esse padrão de detecção. As reações de PCR em tempo real são consideradas satisfatórias quando apresentam eficiência (R<sub>2</sub>) maior que 0,9. O *slope* da fase log linear reflete a eficiência da amplificação. Para valores entre 90 e 100% de eficiência o *slope* deve variar -3.6 a -3.1. Este pode ser calculado pela seguinte fórmula:  $R_2 = 10^{(-1/slope)} - 1$ .

## 2.7 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÓPIAS DE HADV-41 DETECTÁVEIS

Os resultados obtidos nas reações de PCR, Nested-PCR e PCR em tempo real foram utilizados para determinar o número de cópias de genoma de HAdV-41 detectáveis em cada método. Para isso, o DNA viral purificado e quantificado, por espectrofotometria, foi transformado em números de cópias com base no número de pares de bases e pesos moleculares dos mesmos. Para isso, foram utilizadas as seguintes fórmulas de análise:  $DNA = (A_n \times 313,21) + (T_n \times 304,2) + (C_n \times 289,18) + (G_n \times 329,21)$ . A<sub>n</sub>, T<sub>n</sub>, C<sub>n</sub> e G<sub>n</sub> representam as quantidades dos respectivos nucleotídeos dentro de cada polinucleotídeo, seguidos pelos pesos moleculares de cada base. Após obter a molaridade do DNA alvo, o número de cópias foi determinado da seguinte forma: Número de cópias = mol de DNA x 6,02 x 10<sup>23</sup>.

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

Como era esperado que a quantidade de IEL (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.

As células foram ressuspensas em 100 µL de PBS pH 7,4 e o DNA total foi extraído como já descrito e submetido à detecção do genoma viral por PCR, *Nested*-PCR e PCR em tempo real.

Concomitantemente, 40.000 PBMC (células morfonucleares do sangue periférico) 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 como descrito anteriormente.

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

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

## 2.11 REMOÇÃO DO DNA GENÔMICO VIRAL e CELULAR

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

## 2.12 OBTENÇÃO DE cDNA

Para a reação de desnaturação foram utilizados 10,5 µL de RNA total, 0,5µL de oligodT primers (250 µg/mL) (Applied Biosystems®) e 1 µL (10 mM) de dNTP mix (VJR comercial, São Paulo- Brasil). Em seguida, a solução foi incubada a 65°C por 5 minutos e a 4°C por mais um minuto para a estabilização da estrutura do RNA. Após esse processo, foram adicionados ao produto desnaturado: o tampão da enzima transcriptase (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 37,5 mM KCl e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 4 U de inibidor de ribonuclease (Invitrogen®) e 0,02 M ditioneitol (DTT- Invitrogen®), para a ativação do inibidor de ribonuclease. Por fim, foi adicionado 1 µL (200 U) da enzima transcriptase reversa MoMLV (Moloney murine leukemia virus) (Invitrogen®).

A solução foi incubada para a extensão a 50°C por uma hora para a extensão e, em seguida, para a inativação da enzima, as amostras foram incubadas a 70°C por 15 minutos. Finalmente, o cDNA obtido foi submetido aos testes de detecção de expressão gênica viral, utilizando oligonucleotídeos desenhados para os genes precoces do HAdV-41: E1A, E1B (55K); E3 (14K) e VARNA (MA e MATHEWS, 1996) e para os genes de expressão tardia: fibra curta (L6) e Hexon. A expressão gênica específica foi detectada por PCR em tempo real e para a quantificação relativa da expressão foi utilizado como controle endógeno a expressão do gene celular constitutivo GAPDH.

### 2.13 PADRONIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CADA GENE VIRAL EM ESTUDO

Após a obtenção do cDNA, este foi analisado em PCR em tempo real utilizando os pares de oligonucleotídeos desenhados. Para tanto, foi necessário padronizar a reação para cada gene para maximizar a eficiência da reação e diminuir a formação de primer dimers que dificultariam a interpretação dos resultados. Como mistura de reação utilizou-se o kit Quantimix easy SYBR Green (Biotools®), com 10 µL de SYBR Green, 6,75 µL de água ultra-pura (MilliQ®); 0,5 µL de cada par de oligonucleotídeo (10 pmol/µL); 0,25 µL do corante ROX e 2 µL de *template*. Apenas para a detecção da expressão de VARNA e fibra curta foram utilizados 0,25 µL (5 pmol/µL) dos oligonucleotídeos VARNA e Fibra curta na mistura de reação, a fim de diminuir a formação de *primers dimers*. As condições de termociclagem foram as mesmas para todos os pares de oligonucleotídeos, variando apenas a temperatura de anelamento que é específica para cada um deles. O ciclo consistiu de 2 minutos a 50°C para incubação de UDG e dUTP que previnem a reamplificação de produtos de PCR carregados entre as reações. dUTP assegura que nenhum DNA que contenha dU sirva de *template* em futuras PCRs. A incubação com UDG, antes da PCR, destrói qualquer produto que contenha dU na reação. Para a inativação da UDG incubou-se 10 minutos a 94 °C. Em seguida, a ciclagem foi feita em 40 ciclos a 94°C por um minuto, 30 segundos para o anelamento dos Oligonucleotídeos (TABELA 2), extensão a 72 °C por 30 segundos. Após o término da ciclagem, obteve-se a extensão final do produto a 72 °C por 5 minutos.

Tabela 2- Temperatura de anelamentos dos pares de oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de cinética de infecção.

Par de oligonucleotídeo	Temperatura de anelamento (Tm)
GADPDH	56°C
E1A	58°C
E1B	59°C
14K (E3)	60°C
VARNA	55°C
Hexon	67°C
Fibra Curta	45,8°C

Foi realizada a padronização do Real Time com a confecção da curva de *melting* (dados não mostrados).

### 2.14 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 39 $\mu$ L de água dietil pirocarbonato (DEPC).

## 2.15 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA VIRAL

Para estudar o comportamento da expressão gênica do HAdV-41 em células HEK 293 e em PBMC, foi realizada uma análise quantitativa dessa expressão. Para isso, utilizou-se o método de quantificação relativa da expressão gênica, baseada no nível de expressão gênica de um gene constitutivo em relação a um gene alvo. Como gene constitutivo foi utilizado o gene GAPDH. O método se baseia no número de ciclos amplificação necessários para detectar uma amostra (Ct). Os Ct gerados para o gene constitutivo e os genes alvos são comparados para normalizar cada amostra, gerando o  $\Delta$  Ct:  $\Delta$  Ct = Ct do gene alvo – Ct do GADPH. Essa normalização foi feita para cada amostra da triplicata, a fim de corrigir determinadas variáveis, tais como: variação de volume pipetado, número de celular contido em cada cavidade, perda de material durante o processo de extração do RNA total e eficiência das reações de RT-PCR e PCR em tempo real. Após essa normalização, foi calculada a média dos  $\Delta$  Ct de cada triplicata: Média de cada ponto =  $\Delta$  Ct1 +  $\Delta$  Ct2 +  $\Delta$  Ct3. Após a obtenção da média de cada ponto, a expressão gênica de um determinado gene, em cada ponto da análise, foi comparada com a expressão desse mesmo gene em um ponto específico escolhido como homogenizador. O resultado dessa análise é chamado de  $\Delta\Delta$  Ct:  $\Delta\Delta$  Ct = média  $\Delta$  Ct do ponto alvo – média  $\Delta$  Ct do ponto homogenizador. Após a homogeneização de cada ponto da análise, aplicou-se a seguinte fórmula para determinação da quantidade relativa de expressão gênica. Quantidade relativa =  $2^{-\Delta\Delta$  Ct}. Os dados da quantificação relativa de cada gene foram colocados em um gráfico gerado pelo programa Excell (Microsoft- Office) para uma melhor visualização dos resultados.

## 2.16 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DO NÚMERO DE PARTÍCULAS VIRAIS DE HAdV-41 ENCONTRADAS EM CÉLULAS INFECTADAS.

Para determinar a eficiência de penetração do HAdV-41 em células HEK-293 e PBMC infectados, foram semeadas 20.000 células HEK 293 e 40.000 PBMC por cavidade em uma microplaca de 96 cavidades. Após o período de adsorção das células, essas foram inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado. Às 10h p.i., as células foram coletadas e centrifugadas a 500 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi lavado com 1mL de PBS pH7.4 e centrifugado novamente. Este procedimento foi repetido 5 vezes para a eliminação de qualquer partícula viral no sobrenadante. Em seguida as células foram lisadas e o DNA total foi extraído como já descrito. Esse DNA foi quantificado em PCR em tempo real, utilizando uma curva padrão construída como já descrito. Após a determinação da quantidade de DNA viral encontrada, o número de partículas virais foi determinado. Para obter uma melhor interpretação dos resultados, a quantidade de partículas virais contidas em 1MOI de inoculo (vírus purificado) também foi quantificada pelo mesmo método.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 DETERMINAÇÃO DO LIMAR DE DETECÇÃO DE HADV-41 EM CÉLULAS HEK-293 INFECTADAS POR PCR, NESTED-PCR E PCR EM TEMPO REAL

#### 3.1.1 PADRONIZAÇÃO DA PCR CONVENCIONAL

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

### 3.1.2 PADRONIZAÇÃO DA NESTED – PCR

Para a realização da reação de Nested-PCR foi desenhado o par de oligonucleotídeo hexon F. O alinhamento do produto amplificado pela reação de Xu e colaboradores (2000) com o gene hexon de todas as espécies de adenovírus mostrou maior similaridade entre a espécie A e F. Na reação de PCR o par de oligonucleotídeos Hexon F, inicialmente, não mostrou especificidade para a espécie F ao detectar, também, o gene hexon das espécies A e B. Para melhorar a especificidade do par de oligonucleotídeos foi realizada uma PCR em gradiente de temperatura, na qual, a partir de 68°C a reação passou a ser específica para a espécie F (dados não mostrados).

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

### 3.1.3 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÓPIAS DE HADV-41

Foi possível a detecção de DNA viral nas três MOI testadas. No entanto, na análise do último PBS de lavagem, também foi possível a detecção de DNA viral em todas as células inoculadas (TABELA 3).

Tabela 3: Resultados obtidos na reação de PCR em tempo real expressos em número mínimo de ciclos necessários (TC) para a detecção de DNA viral em cada amostra testada. ND – não detectável.

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

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

Mesmo minimizando a lise celular durante o processo de lavagem, foi observada a presença de genoma viral no PBS de lavagem das células inoculadas com 1MOI. Porém, foi possível observar duas bandas distintas e um padrão de fluorescência bem menos evidente do que os apresentados pelas células inoculadas. Essas amostras foram analisadas por PCR em tempo real.

A MOI de 0,1 apresentou  $C_T$  de 28,5; MOI de 0,5 apresentou  $C_T$  de 24 e a MOI de 1 apresentou  $C_T$  de 19,8. No controle positivo foi observado um  $C_T$  de 16,4. Por volta do ciclo 33

pode-se observar o PBS de lavagem das células inoculadas com 1 MOI. Foi possível observar a formação de apenas um pico de temperatura de desnaturação do produto amplificado, o que evidencia a especificidade da reação (dados não mostrados). Como o número de células inoculadas não variou de um experimento para outro, é possível verificar, indiretamente, a infectividade do HAdV-41 em células HEK-293. Cada  $C_T$ , em uma eficiência de reação de 100%, significa o dobro de material detectado. Desse modo, nas células inoculadas com uma MOI de 1 era esperado encontrar 10 vezes mais genoma viral do que nas células inoculadas com uma MOI de 0,1, se os HAdV-41 utilizados no inóculo fossem todos infectivos. Nossos resultados permitiram verificar 8 vezes mais material viral nas células inoculadas com MOI de 1 do que nas células inoculadas com MOI de 0,1. Essa variação está dentro dos padrões aceitáveis, pois mesmo quando se utiliza vírus purificados em gradiente de CsCl como inóculo em ensaios de infecção, pode ocorrer quebra das fibras de algumas partículas durante o processo de purificação, dificultando o vírus de adsorver-se à célula. Assim, pôde-se afirmar que esta metodologia pode ser aplicada para o estudo da infectividade do HAdV-41 em linfócitos.

### 3.2 ENSAIO DE INFECÇÃO DE PBMC COM HAdV-41

Após a extração do material genético foi feita uma *Nested-PCR* para a detecção de HAdV-41 em PBMC inoculados. Os resultados da PCR mostram que o HAdV-41 foi capaz de infectar PBMC. No entanto, o PBS de lavagem do PBMC inoculado com 1 MOI apresentou resquícios de DNA viral no sobrenadante. Por isso, a infecção de HAdV-41 em PBMC foi analisada através da detecção do RNA viral em células inoculadas. Após 48 horas, o RNA total foi extraído e submetido à reação de transcrição reversa. O cDNA formado foi submetido à PCR em tempo real, utilizando oligonucleotídeos para os genes E1A, E1B, VARNA e Hexon de HAdV-41. A especificidade dos oligonucleotídeos foi analisada através dos gráficos de temperatura de desnaturação dos produtos amplificados de cada gene específico. Essa temperatura permaneceu a mesma para todas as amostras testadas com o mesmo par de oligonucleotídeos, demonstrando somente um tipo de produto amplificado. Ademais, os produtos de amplificação foram checados em eletroforese em gel de agarose para confirmação do tamanho do produto amplificado formado.

### 3.3 CINÉTICA DE INFECÇÃO DO HAdV-41 EM CÉLULAS HEK-293

A quantificação relativa da expressão gênica do adenovírus 41 (em células HEK) foi estimada e está representada nos gráficos das figuras 1 a 6. A expressão dos genes precoces E1A, E1B (55K) e E3 (14K) foram detectados 11h pós-infecção indicando que o vírus leva mais de 10h para completar as etapas de adsorção, penetração, lise do endossomo, transporte até o núcleo, desnudamento, exposição do DNA e início da expressão gênica (FIGURAS 1 a 6). As expressões gênicas dos genes tardios hexon e fibra curta foram detectadas 13h e 14h p.i. respectivamente. A expressão de VA RNA foi detectada 14h p.i.

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

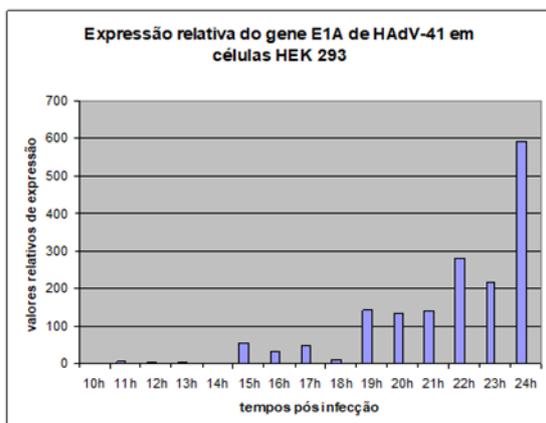


Figura 2: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene E1B (55K) em células HEK 293 inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

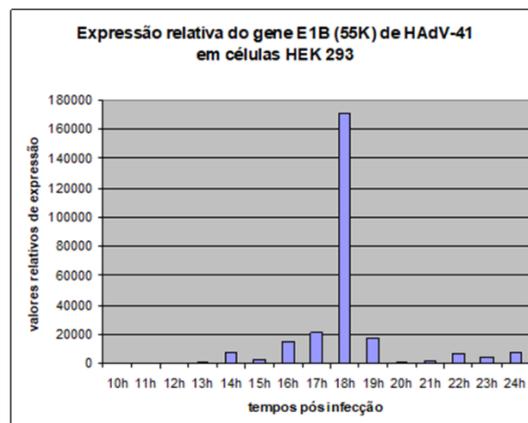


Figura 3: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene E3 (14K) em células HEK 293 inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

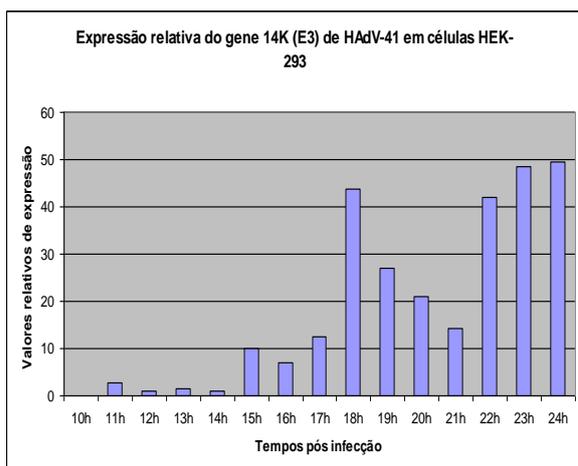


Figura 4: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene E1B (55K) em células HEK 293 inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

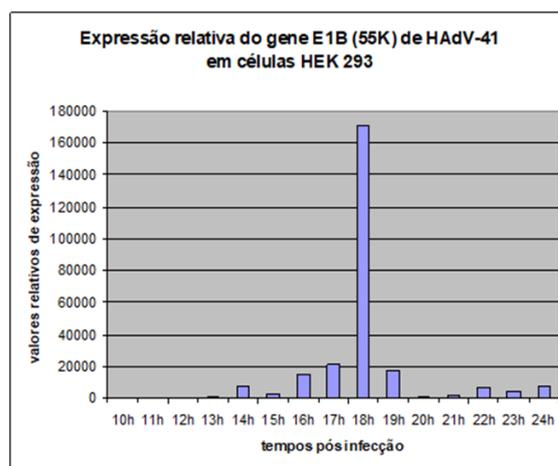


Figura 5: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene E3 (14K) em células HEK 293 inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.

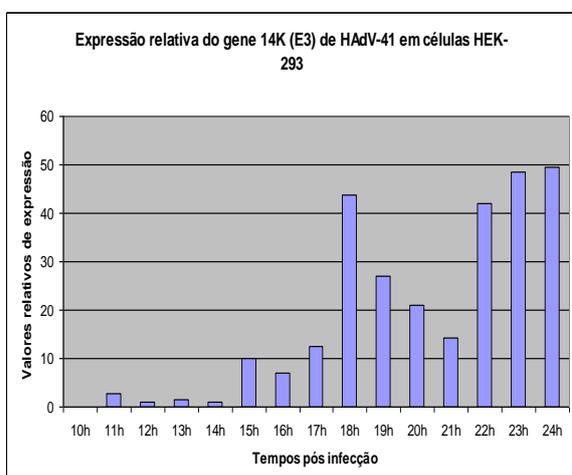
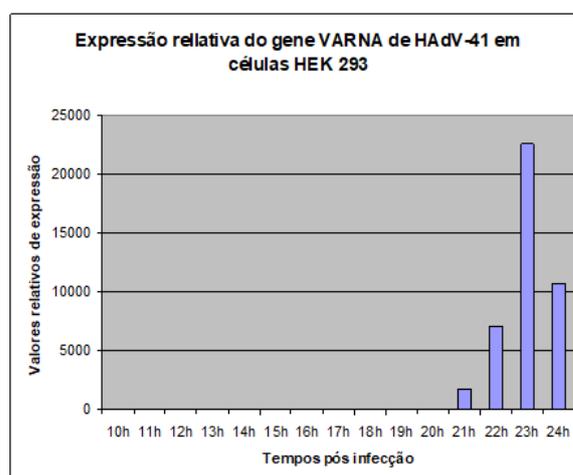


Figura 6: Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene VARNA em células HEK 293 inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.



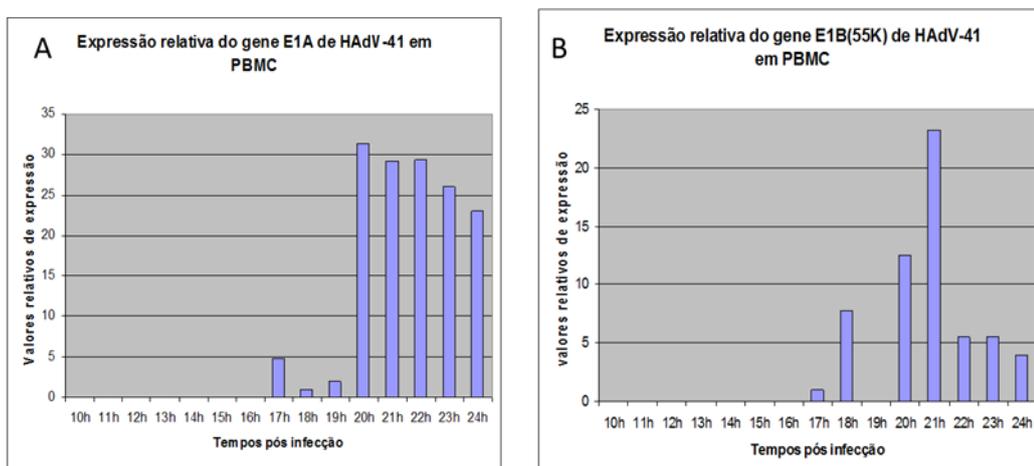
A expressão do gene E1A que se inicia às 11h p.i. atinge seu maior nível de expressão 24h p.i. (SIQUEIRA-SILVA et al., 2009). O gene E1B (55K) atinge seu maior nível de expressão 18h p.i (FIGURA 5). O gene VARNA possui maior nível de expressão as 23h p.i (SIQUEIRA-SILVA et al.,2009), 14K (E3) as 24h p.i., assim como o gene hexon e a fibra curta possuem maior nível de expressão às 17h p.i. Convém ressaltar que a cinética foi feita até 24h p.i (FIGURA 6).

Nossos resultados mostram que o ciclo infectivo do HAdV-41 em células HEK-293 inicia-se após 10h de infecção, evidenciada pela expressão do gene precoce E1A. A expressão de E1A e E3 (14K) que se iniciaram concomitantemente, (11h p.i.) atingiram níveis equiparáveis de expressão, com E1A mostrando uma tendência de ascensão no nível de expressão. E3 (14K) mostrou uma tendência de equilíbrio, como observou-se no platô (dados não mostrados). Por sua vez, o gene E1B (55K) que também iniciou sua expressão às 11h p.i. teve seu nível de expressão aumentado drasticamente, no início da expressão, e após atingir um pico, teve sua expressão diminuída e voltou a se comportar como o gene E1A. O gene VARNA teve sua expressão inicial baixa e logo após a queda da expressão de E1B, ocorreu um pico de expressão que pareceu se manter, pelo menos até o tempo observado (24h). Os genes hexon e fibra curta apresentaram um aumento geométrico no nível de suas expressões praticamente ao mesmo tempo, mas o gene hexon apresentou o maior pico de expressão, atingindo níveis superiores a 100.000 vezes em relação aos outros genes (FIGURA 8).

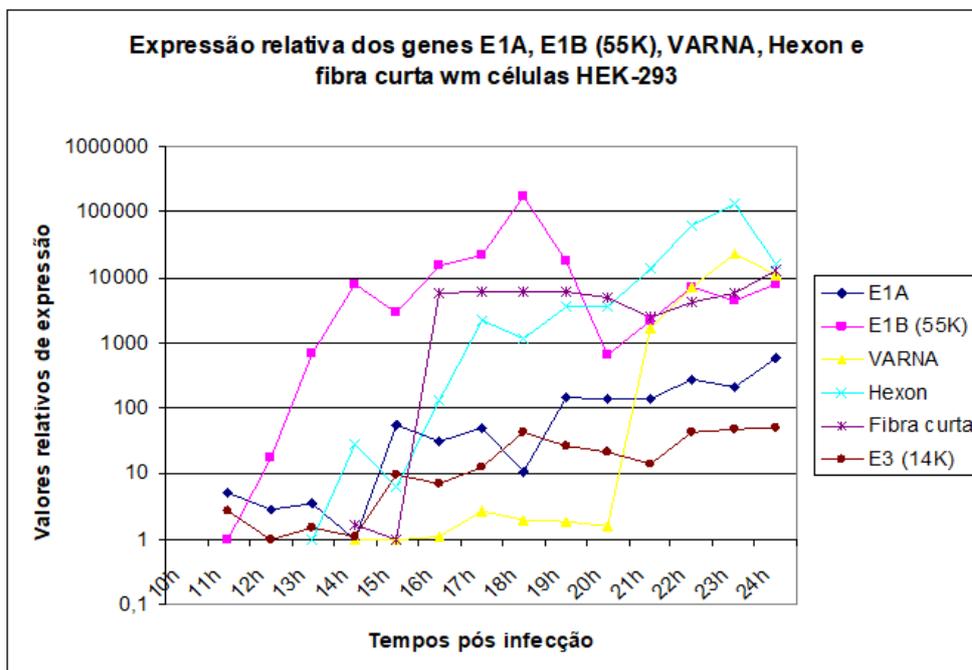
### 3.4 CINÉTICA DE INFEÇÃO DO HAdV-41 EM PBMC

A expressão gênica viral em PBMC foi detectada a partir de 17 horas pós-infecção (FIGURA 7). A expressão de hexon foi detectada a partir de 18h p.i e a fibra curta 20h p.i. Essa diferença temporal entre, a expressão genes precoces e tardios, também foi observada na cinética feita em células HEK-293, no entanto a expressão de VARNA, em células HEK 293, só foi detectada 3h após a detecção da expressão de E1A (FIGURA 8).

Figura 7: **(A)** Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene E1A em PBMC inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado. **(B)** Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene E1B (55K) em PBMC inoculadas com 1 MOI de HAdV-41 purificado.



**Figura 8:** Curva logarítmica para visualização da dinâmica de expressão gênica de HAdV-41. Quantificação relativa da expressão dos genes E1A, E1B (55K), E3 (14K), VARNA, *hexon* e fibra curta de HAdV-41 em células HEK 293, inoculadas com 1MOI de HAdV-41 purificado.



O gene E1A apresentou maior nível de expressão 20h p.i.; E1B às 21h p.i. e o gene VARNA às 20h p.i. Por sua vez, o gene Hexon e fibra curta foram mais expressos às 24h p.i. Vale ressaltar que não podemos inferir nada sobre a dinâmica de expressão do HAdV-41 após 24h p.i., porque não houve análise das células após este ponto. Os valores relativos de expressão dos genes analisados em PBMC mantiveram, mais ou menos, o mesmo nível de expressão. O gene hexon mostrou uma tendência ascendente que não foi verificada na expressão dos genes VARNA, E1A e E1B, que apresentaram um platô. A expressão do gene fibra curta não mostrou nenhuma tendência definida.

### 3.5 ENSAIO DE INFEÇÃO DE HAdV-41 EM IEL

Após a inoculação de IELs (oriundos de dois voluntários distintos) com HAdV-41, foram encontrados os seguintes resultados: a expressão temporal de cada gene do HAdV-41 foi condizente com sua posição no genoma viral. Assim, era de se esperar que os primeiros genes a serem expressos fossem E1A e E1B seguidos pelos genes L1 a L6 respectivamente, e a região E3 mais tardiamente. A quantificação relativa dos diversos genes analisados mostrou-se coerente, com exceção ao pico de expressão apresentado pelo gene E1B (55K) às 18h p.i. (Figuras 9 e 10). Embora o experimento tenha sido feito em triplicata, esse é um ponto que merece uma atenção maior para maiores conclusões.

Um fato interessante foi o pico de expressão de VARNA sucedido pela baixa da expressão de E1B. Uma das funções de E1B (55K) é bloquear o transporte de MHC de classe I para a superfície celular e assim tornar a célula infectada “invisível” os linfócitos T citotóxicos, responsáveis pela eliminação de células senescentes e infectadas. Dessa forma, E1B previne que os adenovírus sejam destruídos até que VARNA esteja disponível em quantidades suficientes para subverter a defesa celular, baseada em IFN $\alpha$ . Assim, esse dois genes trabalham

em sinergia para garantir uma proteção mínima à replicação dos adenovírus até que todos os mecanismos de defesa do adenovírus, situados na região E3, estejam em funcionamento.

Figura 9: Gráfico da expressão gênica de HAdV-41 em IEL, obtidos do voluntário 1.

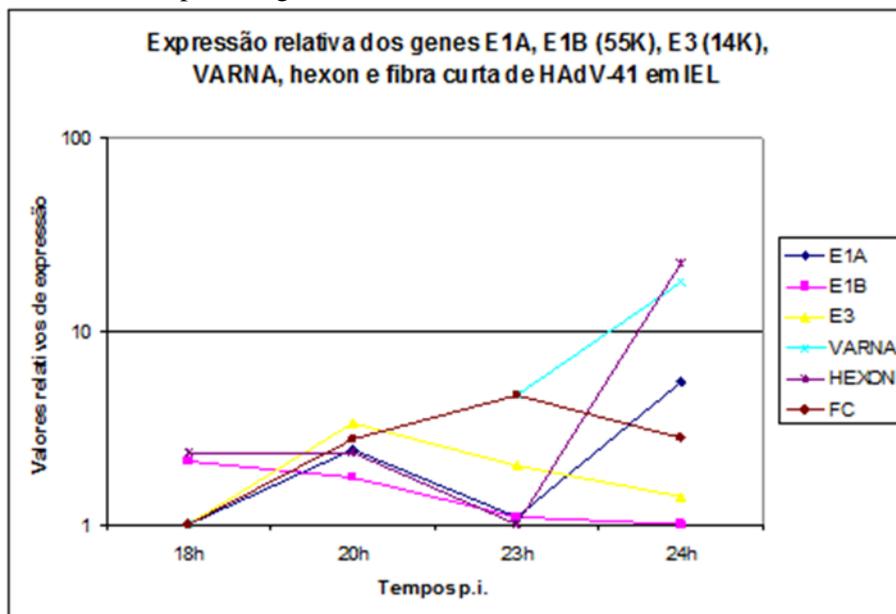
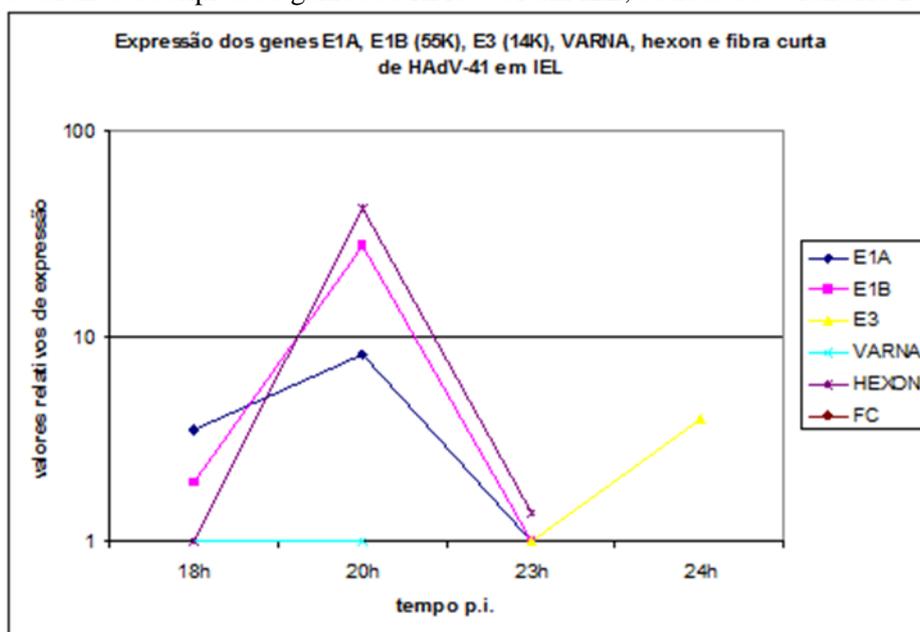


Figura 10: Gráfico da expressão gênica de HAdV-41 em IEL, obtidos do voluntário 2.



Outros autores já estudaram a cinética de infecção de adenovírus. No entanto, neste estudo os autores trabalharam com HAdV-5 que pertence a espécie C, em células HeLa e intervalo de análise de 2 horas. Como nesta época não estava disponível a tecnologia do PCR em tempo real, os autores analisaram a expressão gênica viral por *Northern Blotting*. Os autores

observaram que os mRNA virais E1A, E3 e E4 foram detectados de 4-6 h p.i.; E2A e E2B 8h p.i e L1 só foi detectado 10-12h p.i. Os membros das famílias de L3 (Hexon) e L5 (Fibra) aparecem 14h p.i. (MATHIAS et al, 1994).

Nossos resultados mostraram que o HAdV-41 apresenta um ciclo lento, tendo os primeiros genes expressos após 10h p.i., 6 horas após a detecção dos primeiros genes em HAdV-5. Esse atraso pode ser atribuído a adsorção, penetração e/ou transporte até o núcleo. A espécie C e F reconhecem CAR como receptor primário, embora com diferenças de afinidades, no entanto a espécie C penetra na célula por reconhecimento das integrinas  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha v\beta 5$  presentes na membrana celular. Como resultado desta interação, ocorre a internalização da partícula viral, por mecanismo de endocitose mediada por clatrin (MATHIAS et al, 1994). A espécie F não reconhece essas integrinas e não há conhecimento sobre quais proteínas são usadas na internalização viral ou quais vias de entrada utilizadas por essa espécie. Outra possível causa desse ciclo lento em adenovírus F pode estar na via de transporte até o núcleo. A espécie C lisa o endossomo inicial, através da liberação de suas fibras que são citotóxicas. Após a lise o vírus está livre para utilizar os mecanismos de transporte de vesículas para se direcionar ao núcleo. Na espécie F desconhece-se a via utilizada para o transporte até o núcleo.

Por fim, nossos dados mostram que os adenovírus da espécie F apresentam um ciclo lento quando comparado com a espécie C. No entanto, a dinâmica de expressão foi quase idêntica, mostrando a clássica expressão dos genes precoces sucedidos pelos genes tardios. A cinética de expressão de HAdV-41 em PBMC apresentou um atraso em relação a cinética feita em células HEK-293. Esse atraso no ciclo infectivo em PBMC em comparação com HEK-293, pode ser atribuído a etapa de adsorção e/ou fatores celulares de transcrição. A adsorção é dependente do reconhecimento do receptor CAR, o qual é raramente encontrado em células mononucleares do sangue periférico. Se a infecção é decorrente do reconhecimento de outro receptor celular ainda não descrito, sua dinâmica de adsorção pode ser diferente daquela descrita para a proteína CAR. Na ausência do receptor primário (CAR), a entrada dos adenovírus pode ser feita por reconhecimento direto dos co-receptores (integrinas), mas neste caso ocorre um retardo na entrada do vírus na célula e sua eficácia é de aproximadamente 10 %. Fatores de transcrição celular também podem influenciar na dinâmica viral, tornando a célula mais ou menos permissiva a replicação do vírus, dependendo se permite uma maior ou menor expressão dos genes virais. A expressão temporal foi quase idêntica à observada em células HEK-293, com exceção do gene VARNA. Esse intervalo de tempo entre a expressão dos genes precoces e tardios, era esperado devido à localização dos genes no genoma do vírus. A expressão precoce de VARNA em PBMC pode indicar que, pode haver uma interação diferente dos mecanismos de regulação gênica viral e celular daquela encontrada em células HEK-293. Isto poderia acarretar em uma expressão precoce ou tardia de determinado gene viral.

Houve a replicação completa do HAdV-41, como mostrado pela expressão dos genes tardios. A expressão dos genes tardios é um marcador para indicar que houve replicação do genoma dos adenovírus. Nossos dados mostraram também, que os níveis de expressão gênica do HAdV-41 em PBMC é da ordem de 200 vezes menor que observado em células HEK-293, visto que foram utilizados o dobro de células na cinética em PBMC em relação à HEK-293. Isso pode indicar que poucas partículas virais entraram nessas células e, provavelmente, poucas estão sendo formadas. Essa estratégia de multiplicação inicial do inóculo pode ser um mecanismo de evasão, para que, depois de atingir níveis consideráveis, os adenovírus possam replicar em suas células alvos preferenciais. Esses resultados nos trazem indícios para que se faça uma inferência, pois, o modo pelo qual isso acontece *in vivo* necessita ser amparado com dados sobre outros parâmetros envolvidos.

#### 4 CONCLUSÃO

A expressão gênica de HAdV-41 em PBMC inoculadas mostrou ser 200 vezes menor do que em células HEK 293 inoculadas. A expressão gênica de HAdV-41 em IEL inoculados mostrou ser 10 vezes menor do que em PBMC inoculadas. A PCR convencional é capaz de detectar 217.500 partículas iniciais de HAdV-41. A reação de *Nested* PCR é capaz de detectar 21,75 partículas iniciais de HAdV-41. A PCR em tempo real é capaz de detectar 10,4 partículas iniciais de HAdV-41. O oligonucleotídeo Hexon F é capaz de diferenciar a espécie F dos demais adenovírus na reação de *Nested* PCR a partir do amplificado de uma PCR genérica para a região do gene hexon.

#### REFERÊNCIAS

- CHU, Y.; SPERBER, K., MAYER, L.; HSU, M.T. Persistent infection of human adenovirus type 5 in human monocytes cell lines. **Virology**, v.188, p793-800, 1992.
- DE JONG, J.C. et al. Adenovirus from human immunodeficiency virus infected individuals, including two strains that represented new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. **Journal Clinical Microbiology**, v.37, p.3940-5, 1999.
- FILHO, E.P. et al. 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. et al. Spontaneous persistent infection of B cell of lymphoma with adenovirus. **Journal of Medical Virology**, v.48, n.3, p.267-272, 1996.
- FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells. A manual of basic technique**. Ed. Wiley-Liss USA, p.157-163, 2000. **Revista Científica Intelletto** Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil v.2, n.1, 2017 p.41-51 ISSN 2525-9075 on-line
- GARNETT, C.T.; ERDMAN, D. XU, W.; GOODING, L.D. 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. 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.
- MATHIAS, P.; WICKHAM, T.; MOORE, M.; NEMEROW, G. Multiple adenovirus serotypes use  $\alpha\beta$  integrins for infections. **J. Virol.** v.68: p6811-6814, 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.

PAULINI, et al. Development of a prototype immunochromatographic test for rapid diagnosis of respiratory adenovirus infection. **Braz J Infect Dis**. 2017. Article In Press.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.03.023>

PIENIAZEK, D. et al. 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.

SILVA, M.L.; PAULINI, I.J.; SIQUEIRA-SILVA, J.; HARSI, C.M. Interação do adenovírus humano 41 com células de origem hematopoiética e linfócitos intestinais: estudo da permissividade celular. **Revista Científica Intelletto**. v.2, n.1, 2017 p.41-51.

SILVER, L.; ANDERSON, C.W. Interaction of human adenovirus serotype 2 with human lymphoid cells. **Virology**, v.165. p.377-387, 1988.

TIEMESSEN, C.T., KIDD, A.H. The subgroup F Adenoviruses. **Journal of General Virology**, v.76. p. 481-497, 1995.

**Recebido para publicação:** 13 de janeiro de 2017

**Aprovado:** 24 de novembro de 2017.