

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO: BIOMEDICINA

MAYUMI RIBEIRO SEBATA

**PADRONIZAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA AS REGIÕES HEXON PENTON E
FIBRA DE ADENOVÍRUS HUMANO**

GOIÂNIA - GO
2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)s autor(a)(es)(as): Mayumi Ribeiro Sebata/ Menira Borges de Lima Dias e Souza

Título do trabalho: Padronização de PCR multiplex para as regiões hexon penton e fibra de adenovírus humano

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)s autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Menira Borges De Lima Dias E Souza, Professora do Magistério Superior**, em 06/08/2024, às 10:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mayumi Ribeiro Sebata, Discente**, em 06/08/2024, às 15:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4716523** e o código CRC **ED89A2E5**.

MAYUMI RIBEIRO SEBATA

**PADRONIZAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA AS REGIÕES HEXON PENTON E
FIBRA DE ADENOVÍRUS HUMANO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza

GOIÂNIA - GO
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Sebata, Mayumi Ribeiro
PADRONIZAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA AS REGIÕES HEXON
PENTON E FIBRA DE ADENOVÍRUS HUMANO [manuscrito] /
Mayumi Ribeiro Sebata. - 2024.
xxxv, 35 f.

Orientador: Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Biomedicina,
Goiânia, 2024.

1. Adenovírus humano. 2. Reação em cadeia da polimerase. 3.
Reação multiplex. I. Souza, Menira Borges de Lima Dias e, orient. II.
Título.

CDU 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao dois dias do mês de agosto do ano de 2024 iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado " Padronização de PCR multiplex para as regiões hexon penton e fibra de adenovírus humano " de autoria de Mayumi Ribeiro Sebata, do curso de Biomedicina, do(a) ICB da UFG. Os trabalhos foram instalados pela Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /UFG com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Me. Pedro Soares Porto - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /UFG e Dra. Erika Regina Leal de Freitas - IFG/Campus Goiânia. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de (9,5 - nove e meio) , tendo sido o TCC considerado (aprovado).

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Menira Borges De Lima Dias E Souza , Professora do Magistério Superior**, em 02/08/2024, às 11:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Megmar Aparecida Dos Santos Carneiro, Professora do Magistério Superior**, em 02/08/2024, às 13:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erika Regina Leal de Freitas, Usuário Externo**, em 02/08/2024, às 19:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Soares Porto, Usuário Externo**, em 07/08/2024, às 09:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4701782** e o código CRC **3D176350**.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo à minha orientadora, Prof. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza por toda paciência e dedicação para me orientar no processo de escrita e realização de todas as etapas do projeto, estando sempre a disposição quando preciso e agradeço ao Laboratório de Virologia e Cultivo Celular (LABVICC) que me acolheu de braços abertos. Em seguida, deixar também o meu agradecimento ao Pedro e José Arthur por me acompanharem nas atividades práticas e auxílio na escrita, sem vocês a realização e conclusão deste trabalho não aconteceria.

Agradeço também a Ester, Izabela, Arthur e Geovana, meus amigos do LABVICC que sempre fizeram mesmo os dias mais difíceis e cansativos se tornarem mais leves e divertidos, vocês fizeram essa experiência no laboratório valer muito mais. Rebeca e Elisandra, também agradeço vocês por toda amizade durante esses últimos.

Agradeço a minha família por todo apoio durante esses mais de 4 anos de curso, por sempre me apoiarem e me incentivarem em tudo que me proponho a fazer, por nunca terem medido esforços para me proporcionar as melhores condições na vida. Todo apoio e incentivo que recebi durante esses 23 anos me deram forças para chegar onde estou. Agradeço meu namorado, Gustavo, por ser o meu maior companheiro mesmo nos momentos mais difíceis, você também fez toda a diferença.

Por fim, gostaria de agradecer a Universidade Federal de Goiás (UFG) por todas as oportunidades e por todo o meu conhecimento adquirido durante o período de graduação. Fazer parte dessa universidade será sempre um orgulho.

RESUMO

Os adenovírus humanos (HAdV), são membros da família Adenoviridae e estão classificados no gênero Mastadenovirus. Dentro deste gênero, existem sete espécies de adenovírus, identificadas de A a G, com mais de 100 genótipos conhecidos. Os adenovírus são vírus não envelopados e apresentam um capsídeo icosaédrico composto principalmente pelas proteínas hexon, penton e fibra. Os HAdV podem causar infecções respiratórias, gastrointestinais e oculares, apresentando sintomas como febre, vômitos e diarreia, cuja gravidade tende a variar de acordo com o sistema imunológico do hospedeiro. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do tipo multiplex, utiliza múltiplos pares de iniciadores em uma única reação, destacando-se pela sua eficiência e custo benefício. Dessa forma, a PCR multiplex se apresenta como alternativa eficaz para o aprimoramento da pesquisa e diagnóstico laboratorial da infecção por adenovírus. O presente estudo tem como objetivo realizar a padronização e validação de um ensaio de PCR multiplex para a detecção das regiões hexon penton e fibra de adenovírus humanos em diferentes tipos de amostras. Para tal, foram desenhados pares de iniciadores que foram usados para pesquisar as referidas regiões do genoma em amostras controle de adenovírus espécie 2 cultivado em cultura de células A-549 e amostras de pacientes submetidos a transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas previamente positivos para HAdV. A padronização do ensaio de PCR multiplex para os genes penton e fibra foi bem sucedida, entretanto houve maior dificuldade para a amplificação eficiente do gene hexon. Os dados obtidos no estudo funcionarão como ferramenta para futuros estudos das regiões de recombinação entre adenovírus e análises mais aprofundadas em relação ao genoma viral dos adenovírus.

Palavras-chave: Adenovírus Humano. Reação em Cadeia da Polimerase. Reação Multiplex.

ABSTRACT

Human adenoviruses (HAdV) are members of the Adenoviridae family classified within the genus Mastadenovirus. Within this genus, there are seven species of adenoviruses identified from A to G, comprising over 100 known genotypes. Adenoviruses are non-enveloped viruses with an icosahedral capsid primarily composed of hexon, penton, and fiber proteins. HAdV can cause respiratory, gastrointestinal, and ocular infections, manifesting symptoms such as fever, vomiting, and diarrhea, varying in severity based on the host's immune system. Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) utilizes multiple primer pairs in a single reaction, noted for its efficiency and cost-effectiveness. Thus, multiplex PCR represents an effective alternative for enhancing research and laboratory diagnosis of adenovirus infections. This study aims to standardize and validate a multiplex PCR assay for detecting hexon, penton, and fiber regions of human adenoviruses across various sample types. Primer pairs were designed to target these genome regions in control samples of adenovirus species 2 cultured in A-549 cells and in samples from patients who underwent allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation and were previously positive for HAdV. Standardization of the multiplex PCR assay for penton and fiber genes was successful; however, amplifying the hexon gene proved more challenging. The data obtained in this study will serve as a tool for future investigations into adenovirus recombination regions and deeper genomic analyses of adenoviruses.

Keywords: Human Adenovirus. Polymerase Chain Reaction. Multiplex Reaction.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 1.1 Breve histórico..... | 10 |
| 1.2 Classificação viral..... | 10 |
| 1.3 Estrutura viral..... | 11 |
| 1.4 Patogenia e manifestações clínicas..... | 13 |
| 1.5 Recombinação genética..... | 16 |
| 1.6 Epidemiologia..... | 16 |
| 1.7 Diagnóstico e detecção viral..... | 18 |
| 1.8 Controle prevenção e tratamento..... | 19 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 21 |
| 3 OBJETIVOS..... | 22 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 22 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 22 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 23 |
| 4.1 Metodologia..... | 23 |
| 4.1.1 Material de estudo..... | 23 |
| 4.1.2 Extração de amostras..... | 23 |
| 4.1.3 Pesquisa de adenovirus por PCR..... | 24 |
| 5 RESULTADOS..... | 25 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 28 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 29 |
| REFERÊNCIAS..... | 31 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve histórico

Em 1953, durante uma investigação com o objetivo de pesquisar o agente causador de uma infecção respiratória aguda, o virologista americano Wallace Prescott Rowe, junto a seus colaboradores, observou um efeito citopático causado por um organismo ainda não identificado que demonstrava possuir a capacidade de causar degeneração espontânea em células de tecido adenóides cultivadas *in vitro*. Esse achado levou à identificação do agente como um vírus com capacidade citopática e foi também observado que esse patógeno estava presente em células adenóides humanas. Assim, o estudo do seu potencial patológico, principalmente para infecções respiratórias do trato superior, foi instigado. Posteriormente, em 1954, Hilleman e Werne, ao estudarem uma infecção respiratória aguda em recrutas militares nos Estados Unidos, isolaram um vírus semelhante ao achado por Rowe. Esse vírus, então, por ter sido isolado inicialmente em células provenientes do tecido adenóide, foi nomeado de “adenovírus” (Ginsberg, 1999). Ao longo dos anos, outros vírus com características semelhantes foram identificados e classificados na mesma família viral pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus.

1.2 Classificação viral

Os adenovírus são vírus pertencentes à família Adenoviridae e são classificados em 6 gêneros distintos, sendo eles os Atadenovirus, Aviadenovirus, Ichtadenovirus, Mastadenovirus, Siadenovirus e Testadenovirus. Contudo, somente os adenovírus do gênero Mastadenovirus possuem a capacidade de infectar seres humanos, sendo esses denominados adenovírus humanos (HAdV). Dentro do gênero Mastadenovirus, esses vírus estão distribuídos em sete espécies, identificadas de A a G, e atualmente são conhecidos mais de 100 genótipos distintos (Benkó *et al.*, 2022).

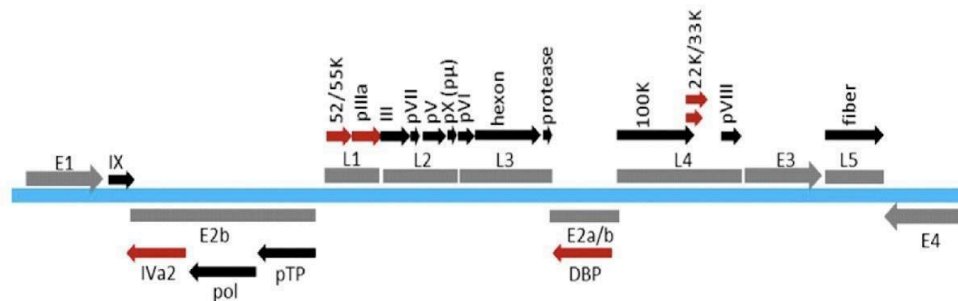
Levando em consideração a grande diversidade presente dentro do grupo dos HAdV, a sua subdivisão possui grande importância molecular e clínica, visto que diferentes espécies e genótipos podem possuir diferentes tropismos e manifestações clínicas. Essa diversidade molecular e clínica influencia diretamente a patogênese das

infecções por adenovírus, afetando sua transmissão e até a gravidade da doença. Além disso, a variação genética dos adenovírus também pode influenciar na resposta imune do hospedeiro, afetando a progressão da doença e a eficácia das estratégias terapêuticas. Portanto, compreender a diversidade genética e clínica dos adenovírus se mostra fundamental para o desenvolvimento de abordagens diagnósticas, terapêuticas e preventivas mais eficazes, bem como para uma melhor compreensão da epidemiologia e da evolução dessas infecções. (Dou *et al.*, 2018).

1.3 Estrutura viral

As partículas de adenovírus não possuem envelope e possuem diâmetro que varia de 70-100 nm. O seu genoma tem o tamanho de aproximadamente 34-36 kb e está altamente condensado e organizado em forma de cromatina, sendo composto por uma molécula de ácido desoxirribonucleico de fita dupla linear (dsDNA). O seu *core* viral é formado pelas proteínas estruturais V, VII, X e TP. A expressão gênica do adenovírus se inicia com a interação de proteínas precoces, como a E1A, que é responsável por ativar a transcrição de diversos genes e a expressão das primeiras proteínas viral, e a região EB1, que tem papel de bloquear o processo de apoptose. E2A e E2B, outras regiões precoces, estão envolvidas na replicação do genoma viral, E3 e E4 também funcionam como fatores que auxiliam na replicação do DNA viral e modulação da resposta imune contra a infecção (Pied; Wodrich, 2019). Já as proteínas IIIa, IV, VI, VIII e IX, são proteínas estruturais e estão relacionadas à estabilidade estrutural do capsídeo, que é montado e sofre maturação, após a replicação do genoma viral e a expressão dos genes tardios (Jennings; Parks, 2023) (Figura 1).

Figura 1: Esquema do genoma dos adenovírus (protótipo HADV-C5): genoma viral em azul, com destaque para as regiões precoces (E) e tardias (L) em cinza.

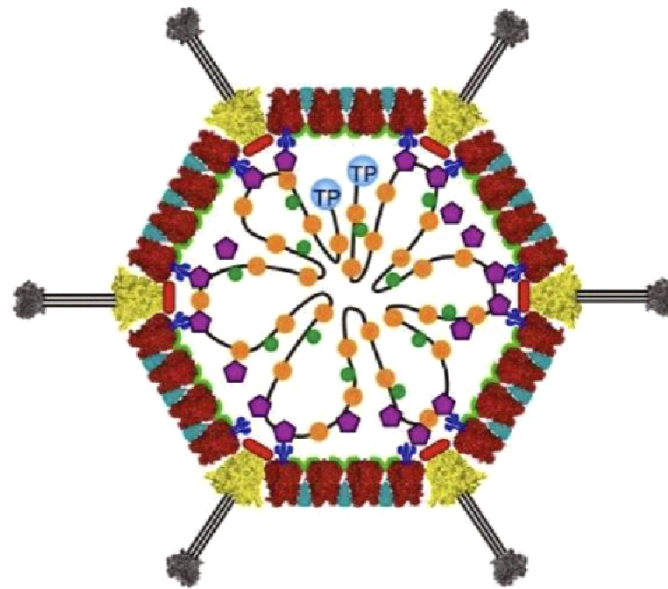


Fonte: Ahi, 2016.

O capsídeo dos adenovírus exibe simetria icosaédrica e é composto, majoritariamente, por três proteínas de grande importância, as proteínas hexon, penton e fibra. A proteína hexon (proteína II) possui tamanho de 109 kDa, a proteína penton (proteína III) com 63.3kDa e a fibra (proteína IV) com 61.9kDa. Mais especificamente, o seu virion possui as proteínas II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X e TP sendo o capsídeo formado por 240 trimers de hexon, com formato hexagonal, 12 bases penton, com formato de pentâmero e em cada vértice do capsídeo, se projeta a proteína fibra (Lei et al., 2023; Benko *et al.*, 2022) (Figura 2).

A proteína hexon, a mais abundante proteína do capsídeo, possui 4 regiões conservadas (C1 - C4), 3 regiões variáveis (V1 - V3) e desempenha papel crucial para ligação a receptores celulares, possui grande parte dos epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes que são direcionados a sua região hipervariável. Além disso, a região hexon se mostra de grande importância para a classificação dos genótipos de adenovírus devido às suas regiões conservadas e hipervariáveis. Já as proteínas penton e fibra, estão associadas ao reconhecimento e ligação ao receptor primário da célula hospedeira e fazem o contato inicial. Em particular, as proteínas interagem com o receptor coxsackievírus (CAR) ou CD46 (dependendo do sorotipo), desempenhando papel crucial para os processos iniciais da infecção viral (Howley, 2021).

Figura 2: Cartoon da estrutura esquematizada da partícula de adenovírus com destaque para as principais proteínas do capsídeo.



Principais proteínas do capsídeo



Fonte: Howley, 2021.

1.4 Patogenia e manifestações clínicas

Os adenovírus iniciam o processo de infecção com a entrada no hospedeiro suscetível, por meio da entrada no organismo podendo esta acontecer pela via oral, por

meio de gotículas ou aerossóis, pela via fecal-oral ou via conjuntiva ocular. Já dentro do organismo, ocorre a sua ligação com receptores específicos na superfície celular mediada pela proteína fibra. Na literatura, são descritos uma grande variedade de receptores (Quadro 1), os principais para adenovírus sendo: o receptor CXADR (coxsackievirus e receptor de adenovírus) e o receptor CD46, sendo essa grande variedade de receptores, um fator que justifica as diferenças de tropismo entre diferentes tipos de adenovírus (Howley, 2021).

Após a ligação com o receptor, o fator de coagulação Fx se liga ao capsídeo do adenovírus e este processo é seguido de entrada por endocitose e a internalização do vírus se dá pela interação com integrinas avB3 e avB5 mediado pela proteína penton. Posteriormente, ocorre o desnudamento do vírus com a dissociação do capsídeo e, assim, o vírus é direcionado ao núcleo da célula hospedeira para iniciar os processos de replicação celular e construção da partícula vírion (Greber, 2020).

A infecção por adenovírus pode causar uma vasta gama de manifestações clínicas como infecção respiratória aguda (IRA), sintomas de gripe ou resfriado comuns, como febre e tosse. Pode causar também bronquite, pneumonia, ceratoconjuntivite e gastroenterite, com sintomas mais comuns sendo diarreia, vômito e náuseas (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 2024).

Na infecção do trato respiratório, as espécies de adenovírus associadas a essa infecção são predominantemente as espécies B, C e E, podendo a frequência de diferentes genótipos variar de acordo com a localização geográfica. Os sintomas mais associados são febre, tosse, inflamação na garganta, podendo evoluir para um quadro de pneumonia e, em casos mais graves, falência respiratória (Lynch III; Kajon, 2016).

Infecções oculares causadas por adenovírus são comuns e associadas principalmente aos adenovírus da espécie D, sendo os mais frequentes os genótipos HAdV- 8, HAdV-37 e HAdV-53, 54 e 56. Os sintomas gerais incluem irritação ocular, fotofobia e presença de secreção. Em casos mais graves, onde há infecção na córnea, ocorre a ceratoconjuntivite, causando inchaço da conjuntiva e formação de membrana inflamatória, o que pode limitar o movimento ocular (Rajaiya *et al.*, 2021).

Já na infecção gastrointestinal, destaca-se a espécie F e os genótipos HAdV-40 e HAdV-41, causando os sintomas de febre, vômito, diarreia e, em casos mais graves,

sendo causa de hospitalizações principalmente de crianças (Lee; Damon; Platts-Mills, 2020).

A intensidade e severidade dos sintomas varia de acordo com o estado imunológico e também de acordo com fatores de susceptibilidade genética do indivíduo infectado, sendo mais comum, em adultos, manifestações mais leves ou até mesmo assintomáticas. Porém, em crianças de até 5 anos ou em indivíduos imunossuprimidos, como com doenças respiratórias ou cardiovasculares já existentes ou indivíduos que passaram por transplante, a infecção por adenovírus possui maiores chances de apresentar manifestações clínicas mais severas, podendo até mesmo levar à óbito (Crenshaw *et al.*, 2019).

Quadro 1: Adenovírus e seus respectivos receptores celulares e tropismo.

| Espécie | Genótipo | Receptores | Tropismo |
|----------------|-----------------|--------------------------|-----------------------|
| A | 12 | CXADR | Gastrointestinal |
| B1 | 35 | CD46 | Respiratório |
| B2 | 3 | DSG-2 | Renal |
| B3 | 11 | CD46 E DSG-2 | Renal |
| C | 2 e 5 | CXADR | Respiratório |
| D | 19 | CXADR e ácido salicílico | Ocular |
| E | 4 | CXADR | Respiratório e Ocular |
| F | 40 e 41 | CXADR | Gastrointestinal |
| G | 52 | Desconhecido | Gastrointestinal |

CXADR: Coxsackievirus e receptor de adenovírus; DSG-2: Desmogleína-2.

Fonte: Yokada et al., 2018

1.5 Recombinação genética

As mutações decorrentes de erros no processo de replicação, recombinações homólogas e rearranjos no genoma viral, são parte do processo evolutivo e de aquisição de variabilidade genética dos adenovírus. Dependendo da espécie, diferentes adenovírus tendem a sofrer diferentes tipos de processos para gerar variabilidade. Sendo assim, possíveis recombinações no genoma viral podem resultar potencialmente na diversidade de tropismo celular e aumento da virulência (Robinson *et al.*, 2013). Com isso, a detecção dessas recombinações são importantes para a identificação e classificação de diferentes HAdV recombinantes (Wu *et al.*, 2022).

Nos adenovírus, as recombinações podem ocorrer em casos onde há a coinfeção de uma célula com dois ou mais adenovírus diferentes, pela recombinação entre as regiões hexon penton e fibra, gerando, assim, novos genótipos virais. Além disso, é possível observar esse tipo de recombinação em adenovírus da mesma espécie e também entre espécies diferentes. Tendo em vista o papel fundamental dos genes hexon, penton e fibra para identificação de regiões de hipervariabilidade e para a identificação de diferentes genótipos de adenovírus, a pesquisa dessas regiões por PCR, seguido de sequenciamento genômico e análise filogenética, se mostra de extrema utilidade para a caracterização molecular de recombinantes (Wang *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2020)

1.6 Epidemiologia

Como referido, os adenovírus podem ser transmitidos pela via respiratória, por meio de gotículas aerossóis, pela via fecal-oral, principalmente pelo contato com um indivíduo infectado, podem também ser transmitidos pelo contato do vírus com a conjuntiva ocular e, além disso, o contato com objetos e ou superfícies contaminadas com o vírus também podem servir de fonte de infecção (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 2024).

Surtos de infecção por adenovírus ocorrem comumente em populações fechadas como hospitais, dormitórios, escolas, creches, unidade de tratamento intensivo (UTI) pediátrico, casas de cuidado e em populações de recrutas militares. Acometem principalmente crianças menores de cinco anos, pelo desenvolvimento

incompleto do sistema imunológico e conseqüentemente baixa imunidade, indivíduos imunossuprimidos e população idosa (Lynch III; Kajon, 2016). O período de incubação do vírus, dependendo do seu genótipo, pode durar de 4-8 dias e após o período de incubação, o indivíduo pode ou não manifestar sintomas (Crenshaw *et al.*, 2019).

A incidência de infecções por adenovírus em diferentes partes do mundo é variável, sendo o vírus responsável por 2% a 15% dos casos de doenças diarreicas em crianças e a causa de 3% a 6% dos casos de resfriados também em crianças (Shieh, 2022). Em relação aos casos de gastroenterite aguda ocasionadas por HAdV, um estudo feito no Canadá no período entre 2014 e 2018 utilizando 3.347 amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda em sua grande maioria entre 12-18 meses apontou uma positividade de 18,8% para HAdV, demonstrando sua relevância como patógeno gastrointestinal (Pabbaraju *et al.*, 2020).

No sul do Brasil, de 2004-2018, foram analisados 43,514 casos de infecção respiratória aguda (IRA) na população geral, tendo uma positividade de 2.8% para HAdV sendo 80,4% dos casos crianças menores de 6 anos, enfatizando, assim, a necessidade de maior vigilância e atenção para a população pediátrica no país (Pscheidt *et al.*, 2020).

Em 2014, um estudo semelhante realizado em São Paulo com um grupo de crianças hospitalizadas que também apresentavam IRA, mostrou, com a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), uma positividade de 9.1% para HAdV. No mesmo estudo, uma população de crianças também hospitalizadas, portadoras de doença cardíaca congênita (DCC), a positividade para HAdV foi de 19,2%, mostrando a influência de um sistema imune suprimido na infecção por HAdV (Puerari *et al.*, 2014).

Em um estudo publicado em 2019, é demonstrado o impacto do transplante de células tronco hematopoiéticas no sistema imune do receptor e como isso afeta na susceptibilidade de uma infecção por adenovírus. O estudo visou analisar uma população entre o período de 2013-2016 e concluiu que a incidência anual de infecções por adenovírus em centros diferentes de transplante variou de 5.8%-9%, tendo essa variação devido ao tipo de população, sendo mais incidente na população pediátrica do que na população adulta (Cesaro *et al.*, 2019).

1.7 Diagnóstico e detecção viral

O diagnóstico e detecção de HAdV pode ser realizado por várias técnicas, como isolamento viral por meio de cultura seguido de detecção, pesquisa de antígenos ou anticorpos por imunofluorescência, imunocromatografia ou ensaios imunoenzimáticos e pelo teste de inibição da hemaglutinação para algumas espécies. Para esses testes, diferentes tipos de amostras clínicas podem ser utilizadas: soro, aspirado ou swab nasofaríngeo, fezes e urina. Porém, com o tempo, devido a sensibilidade limitada e a demora das técnicas sorológicas e de isolamento, essas foram sendo substituídas gradativamente pelas técnicas moleculares, como PCR e PCR tempo real (qPCR), que agora são consideradas o padrão para pesquisa e diagnóstico das infecções por adenovírus (Buller, 2013).

Tendo em vista a relevante importância das infecções de adenovírus nas populações pediátricas e de imunossuprimidos, o avanço das técnicas de detecção desse patógeno é fundamental para o melhor diagnóstico dessas infecções. A PCR, uma técnica com alta sensibilidade e especificidade, possui um melhor custo-benefício e uma melhor eficiência na detecção dos HAdV, permitindo assim um diagnóstico e, combinada a processos de sequenciamento, pode levar a até mesmo uma caracterização mais confiável dos adenovírus (Lion, 2014).

Com isso, a PCR e suas variações se tornaram o padrão ouro na detecção dos HAdV, tendo como alvo as regiões, principalmente, hexon e, também, penton e fibra (Das, Dunbar, Tang, 2018). Um dos tipos de PCR, a PCR multiplex, emprega diversos pares de primers simultaneamente em uma única reação, conseguindo, assim, amplificar mais de uma região alvo e destaca-se pela sua sensibilidade, rapidez, e um bom custo-benefício sem comprometer a sua reprodutibilidade (Nikiforova; Laframboise; Nikiforov, 2015).

Com os eventos de recombinação e o surgimento de novos genótipos de HAdV, o avanço e emprego de técnicas moleculares se mostra muito necessário para a detecção desses novos genótipos (Ismail et al., 2018). Ademais, o sequenciamento genômico, seguido da análise filogenética, é ferramenta necessária para que se possa identificar com precisão a ocorrência de recombinações genômicas entre diferentes adenovírus (Houldcroft, 2018).

1.8 Controle prevenção e tratamento

Medidas de higiene pessoal e saneamento básico são recomendados para prevenir infecções respiratórias, oculares e gastrointestinais, entretanto, não são suficientes para impedir a circulação viral. Na maioria dos casos, não são recomendados tratamentos específicos para conter a infecção de HAdV. Atualmente, o protocolo seguido possui objetivo de tratar e controlar os sintomas, visto que grande parte das infecções não necessitam de intervenção clínica específica. A severidade da infecção por adenovírus e a intensidade de seus sintomas estão diretamente relacionadas ao perfil imunológico dos indivíduos infectados, sendo mais comumente visto casos mais graves em indivíduos imunossuprimidos e/ou com doenças já existentes. Com isso, a reconstituição imunológica apresenta papel fundamental no controle e prevenção da infecção, tendo como objetivo principal aumentar a contagem de linfócitos ou CD4 para que haja eliminação do patógeno (Lynch III, 2016).

Para casos em que a infecção é persistente ou mesmo disseminada com elevadas cargas virais no sangue, para doenças já preexistentes e para os indivíduos imunossuprimidos existe a possibilidade de tratamento com antivirais. Cidofovir é um fármaco antiviral, análogo à citosina e age inibindo a replicação viral, possui na literatura estudos que sustentam seu uso para o controle de infecções graves por adenovírus, porém, efeitos adversos como náusea, vômitos e lesão renal foram observados, especialmente na população pediátrica (Vora; Brothers; Englund, 2017).

Em 2020, um estudo publicado na Bélgica, apresentou o brincidofovir, um antiviral análogo ao cidofovir, como opção ao tratamento de infecções por adenovírus, evidenciando uma menor toxicidade e maior espectro antiviral, porém, ainda é um campo que necessita de mais estudos (Van Genechten *et al.*, 2020).

Atualmente, uma vacina para adenovírus existe e funciona contra os vírus dos tipos 4 e 7. O seu uso é feito por via oral por meio de tabletes. Porém, a vacina está disponível apenas para recrutas militares nos Estados Unidos devido ao ambiente fechado em que se encontram, o que facilita a transmissão do vírus. Assim, essa vacina reduz o risco de infecções respiratórias para esses recrutas militares (Crenshaw, 2019). Um estudo feito em 2022 demonstrou a administração da vacina contra

adenovírus em 294 militares da guarda costeira nos Estados Unidos e concluiu que após 90 dias do seu uso, não houve relato de eventos adversos, apoiando, assim, o seu uso em militares (Iskander *et al.*, 2023).

2 JUSTIFICATIVA

Os adenovírus humanos (HAdV) são vírus que acometem os seres humanos causando uma vasta gama de manifestações clínicas, como infecções respiratórias, oculares e gastrointestinais. Em populações de risco, como idosos, crianças menores de 5 anos e indivíduos imunossuprimidos, os adenovírus podem causar manifestações mais graves e severas, podendo até mesmo levar a óbito. Por isso, são patógenos que possuem relevância médica, tornando o seu estudo e pesquisa importantes para melhorar a sua detecção e melhorar seu diagnóstico.

Diante da significativa relevância do diagnóstico de infecções virais e caracterização genômica de seus agentes, a padronização do PCR multiplex se apresenta como uma importante ferramenta no aprimoramento da pesquisa e no diagnóstico clínico. Ao estabelecer a padronização de um novo ensaio de PCR multiplex para HAdV, estaremos não apenas contribuindo para avanços nas técnicas diagnósticas para a detecção molecular dos adenovírus, mas também otimizando o ensaio no que tange à sensibilidade e melhor custo benefício.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Padronizar e validar um protocolo de PCR multiplex e demonstrar sua sensibilidade e especificidade para a amplificação das regiões hexon, penton e fibra de adenovírus humanos

3.2 Objetivos específicos

- Testar novos pares de iniciadores desenhados em nosso laboratório quanto à especificidade para as regiões hexon, penton e fibra do genoma de adenovírus humanos
- Padronizar um ensaio de PCR multiplex para as regiões hexon, penton e fibra, utilizando amostras positivas para adenovírus humano (amostras de indivíduos imunocomprometidos e de adenovírus 2 proveniente de cultivo celular).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Metodologia

4.1.1 Material de estudo

Um estudo feito anteriormente em nosso laboratório, sobre adenovírus humanos em pacientes submetidos a transplante de células progenitoras hematopoiéticas, foi analisada e monitorada uma coorte de 21 pacientes. Foram encontrados 4 pacientes positivos para mais de uma espécie de adenovírus humano (Santos *et al.*, 2016). Então, para o presente estudo, foram utilizadas essas amostras positivas de HAdV. As amostras foram recuperadas de biorrepositório para a utilização na padronização da técnica de pcr multiplex. Essas amostras positivas foram amostras de fezes e soro de pacientes submetidos a transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas (alo-TCPH) e foram coletadas entre o período de 2012 a 2014, na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital Araújo Jorge em Goiânia-GO (CAE:67782917.3.0000.5083). Além disso, foram também utilizados controles extraídos de adenovírus espécie 2 cultivados em células A-549.

4.1.2 Extração de amostras

As extrações de amostras positivas para HAdV foram recuperadas e extraídas utilizando o kit comercial (*QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN*) seguindo protocolo do fabricante presente na bula com adaptações. As amostras foram estabilizadas em temperatura ambiente, adicionados 560ul de tampão AVL (tampão de lise) e 5,6 ul do carreador em cada tubo tipo eppendorf e foram homogeneizados. Em seguida foi adicionado em cada tubo 140ul de respectiva amostra, homogeneizado, incubado em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado. Na sequência, foi adicionado 560ul de etanol P.A e homogeneizado. Na coluna de extração, foram adicionados 630ul da solução preparada e cada tubo centrifugado a 8.000 rpm (rotações por minuto) por 1 minuto e descartando o filtrado e seguindo para um novo tubo coletor. Esse passo foi realizado 2 vezes. Em seguida, foram realizados os passos de lavagem, com 500ul do tampão de lavagem AW1, com centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto e 500ul do tampão de lavagem AW2, com centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos, descartando o filtrado sempre após cada centrifugação. Por fim, foi feita uma centrifugação a rotação

máxima (14.000) rpm para eliminação dos tampões da coluna de extração e, em seguida, a coluna foi inserida em um novo eppendorf já identificado, junto a 60 ul de tampão AVE (tampão de eluição), centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto e o DNA extraído ao fim armazenado a -20°C. Para as amostras de fezes, o protocolo foi adaptado e adicionada uma etapa a mais de lavagem.

4.1.3 Pesquisa de adenovirus por PCR

Para a reação de PCR, os iniciadores utilizados para amplificar as regiões penton e fibra foram descritos por Wu *et al.* (2022) (Quadro 2). Já o gene hexon, foi dividido em oito regiões diferentes e seus pares de iniciadores foram desenhados em nosso laboratório (Quadro 3). A enzima utilizada para o processo foi a Q5® *High-Fidelity DNA Polymerase*, seguindo o protocolo do fabricante para a reação de PCR, com alterações feitas para alcançar o processo de padronização necessário para a reação. Para a mistura de reação, foram utilizados 12,5 ul de Q5® *High-Fidelity DNA Polymerase* (0.02 U/ul), 2,5 ul de um mix dos iniciadores específicos para as regiões alvo (0.5 uM) e 5ul de água livre de nuclease para um volume final de 25 ul. Para as reações de controle positivo, foi utilizado 1 ul do extraído de cultura de células. Para as reações com amostras, foi utilizado 5 ul do extraído. Para ciclagem na etapa de PCR, o protocolo utilizado para a enzima Q5® *High-Fidelity DNA Polymerase* foi adaptado inicialmente para 98°C por 1 minuto na desnaturação inicial e 40 ciclos (94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 40 segundos) e extensão final de 72°C por 10 minutos. Posteriormente, especificamente para a temperatura de anelamento da reação, foram testadas e comparadas as temperaturas de 56°C e 52°C.

Quadro 2: Iniciadores específicos para os genes penton e fibra de adenovirus humano (HAdV) e suas respectivas sequências.

| Gene | Primer | Sequência do Primer | Produto da PCR |
|--------|----------|--------------------------------|------------------|
| Penton | Penton-F | 5'-CTATCAGAACGACCACAGCAACTT-3' | 1,000 - 1,300 bp |
| | Penton-R | 5'-TCCCGTGATCTGTGAGAGCRG-3' | |
| Fibra | Fibra-F | 5'-CCCTCTTCCCAACTCTGGTA-3' | 1,500 bp |
| | Fibra-R | 5'-CCCTCTTCCCAACTCTGGTA-3' | |

Fonte: Wu et al., 2022

Quadro 3: Lista de iniciadores para o gene hexon de HAdV (sentido 5'-3') desenvolvidos em nosso laboratório.

| Primer | Sequência do Primer | Produto da PCR |
|------------|------------------------------|----------------|
| Frag1.F1.1 | 5'AGATGGCCACCCCCTCGATG | 350 bp |
| Frag1.R1.1 | 5'GTGCCCGARTAGGGTTTGAARC | |
| Frag2.F1.1 | 5'GGATCGCGAGGACACCACGTAC | 407 bp |
| Frag2.R1.1 | 5'TITCTGTCTTGCAAGTCVACCAC | |
| Frag3.F1.1 | 5'AARATGAARCCHTGYTATGG | 413 bp |
| Frag3.R1.1 | 5'ACAGAAAACCTCTICCACAGG | |
| Frag4.F1.1 | 5'GACTTGCAAGACAGAAAYAC | 339 bp |
| Frag4.R1.1 | 5'GAGTACAGAAAACCTCCACAG | |
| Frag5.F1.1 | 5'TGGAAGATGARCTTCCHAAYTATTG | 536 bp |
| Frag5.R1.1 | 5'TCCACTCGTAGGTGTAGGAG | |
| Frag6.F1.1 | 5'GASTACATGAAYGGCCGCGTGG | 785 bp |
| Frag6.R1.1 | 5'GGACGAGGAACCAGTCCTTGGTC | |
| Frag7.F1.1 | 5'CTGCGCAACGACACCAACGACC | 411 bp |
| Frag7.R1.1 | 5'CGAGGAACCAGTCCTTGGTCATG | |
| Frag8.F1.1 | 5'CTACCTCAACCACACCTICAAGAAG | 654 bp |
| Frag8.R1.1 | 5'GCACTCTGACCACGTCGAAAACCTTC | |

Por fim, os produtos da amplificação e o marcador de peso molecular (DNA ladder 1kb) foram misturados com 2 ul de tampão corante para amostra (Azul de bromofenol; Xilenocianol; Glicerol) e foram aplicados ao gel de agarose, que foi preparado a 1% com brometo de etídeo e tampão TBE 1X (Tris/Borato/EDTA). Os géis foram submetidos à corrida eletroforética a 80V em tampão de corrida e os resultados foram então analisados em transluminador ultravioleta para a visualização dos fragmentos de DNA).

5 RESULTADOS

Para a padronização da reação de pcr multiplex para os genes hexon, penton e fibra, um controle positivo foi extraído de adenovírus da espécie 2 cultivado em células A-549. Após a eletroforese em gel e visualização em transluminador ultravioleta, a reação de PCR com o controle de cultura, mostrou-se eficiente para apenas os genes penton e fibra, sendo produzidas duas bandas no gel, uma de aproximadamente 1200 pares de base (correspondente ao fragmento penton), e outra de aproximadamente 2000 pares de bases (correspondente a fibra) (Figura 3). Com a utilização do controle, a amplificação do gene da proteína hexon resultou em múltiplas bandas, das quais uma se encontra próximo a altura esperada para o fragmento que desejava-se amplificar com aproximadamente 3000 pares de base, porém de fraca intensidade e com a presença de bandas inespecíficas (Figura 4).

As reações de PCR, tanto penton/fibra, quanto hexon, utilizando amostras previamente positivas para HAdV não retornaram resultados constantes, e o padrão de bandas não foi reproduzível entre as amostras.

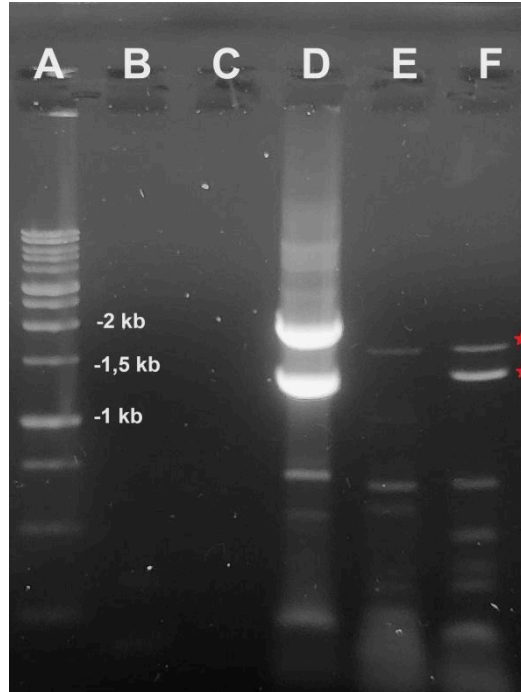
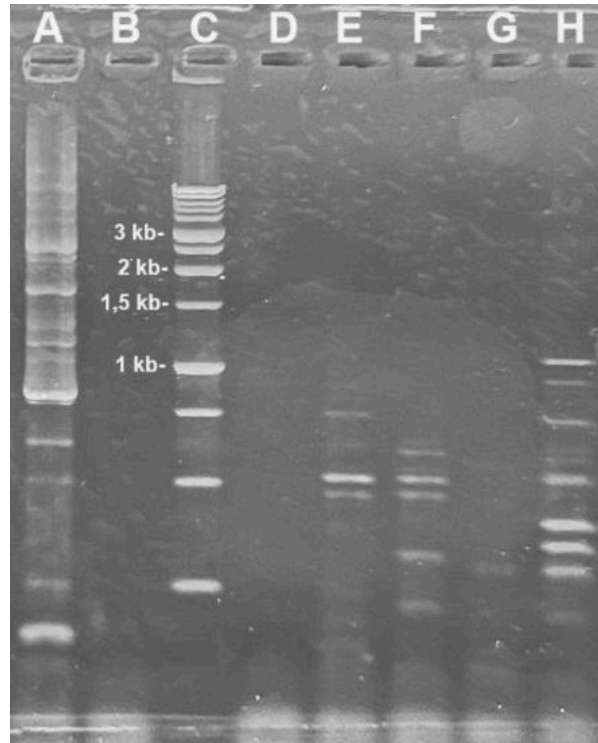


Figura 3: Eletroforese em gel dos produtos da reação de PCR para o multiplex penton fibra: A - Marcador de peso molecular (1Kb DNA ladder PROMEGA); **B e C -** Reação com volume total de 20ul realizada com temperatura de anelamento a 52°C e 56°C e amostras positivas para HAdV; **D -** Reação com volume total de 25ul realizada com controle extraído de cultura; **E -** Reação com volume total de 25ul

realizada com a temperatura de anelamento a 52°C e amostra positiva para HAdV; **F** - Reação com volume total de 25ul realizada com a temperatura de anelamento a 56°C e amostra positiva para HAdV.



Eletroforese em gel dos produtos da reação de PCR para o multiplex hexon: **A** - Reação com volume total de 25ul realizada com controle extraído de cultura; **C** - Marcador de peso molecular (1kb DNA ladder PROMEGA); **B, D a H** - Reação com volume total de 25ul realizada com amostras positivas para HAdV.

6 DISCUSSÃO

De acordo com a literatura científica, os genes hexon, penton e fibra, sendo os principais componentes do capsídeo dos adenovírus, mostram-se como regiões genômicas importantes como alvo para a caracterização molecular e tipagem dos adenovírus, contribuindo, assim, para a identificação de recombinantes, auxiliando no entendimento e compreensão sobre o patógeno e também no seu diagnóstico. Em estudo recente, Wu *et al.* (2022) demonstrou a aplicação da amplificação e detecção das principais regiões do capsídeo para a identificação de adenovírus associados a doenças respiratórias. No estudo de Wu *et al.* (2022), foram utilizados pares de iniciadores específicos para cada gene pesquisado (hexon, penton e fibra).

Diferentemente, no presente estudo, além de também serem utilizados iniciadores específicos para os genes hexon, penton e fibra, foi testada uma reação multiplex, onde os múltiplos pares de iniciadores foram utilizados em uma única reação, visando a otimização do processo e a obtenção das sequências dos genes hexon, penton e fibra direto de amostras extraídas, sem a necessidade de se cultivar o vírus previamente. Porém, durante a padronização da técnica de PCR para a amplificação das regiões hexon, penton e fibra, o presente estudo foi capaz de amplificar, simultaneamente de forma eficaz, apenas as regiões penton e fibra.

Mais semelhante à metodologia utilizada no presente estudo, Lee *et al.* (2005) mostra a utilização da técnica de PCR multiplex, para as principais regiões do capsídeo de adenovírus, como sendo potencialmente eficaz para a otimização do processo de amplificação do material genético sem comprometer a eficácia da reação. Em estudo publicado sobre a identificação de subtipos diferentes de adenovirus humanos, Lee e seus colaboradores alcançaram com eficiência uma reação para a amplificação das regiões conservadas e hipervariáveis do gene hexon utilizando 3 pares de iniciadores diferentes em uma mesma reação, uma técnica que contribui para a detecção e também para o sequenciamento dos diferentes genótipos do vírus (Lee *et al.*, 2005).

Em outros estudos, é possível também encontrar formas eficientes de utilizar a reação de PCR multiplex para duas das grandes regiões do capsídeo dos adenovírus, como no estudo de 2005 em que Banik e colaboradores utilizaram PCR multiplex para

as regiões hexon e fibra do adenovírus e, mais recentemente, em 2018, Kajan *et al.* (2018) utilizou a técnica multiplex para amplificar os genes hexon e penton.

A padronização e otimização de uma reação de pcr multiplex pode encontrar desafios em seus processos. A utilização de muitos pares de iniciadores em uma mesma reação pode levar a formação de bandas inespecíficas, fazendo com que as regiões de interesse não sejam bem amplificadas. Além disso, concentrações diferentes de reagentes e variações de temperatura na ciclagem da reação também são fatores que interferem nos resultados da amplificação, assim como, também, a qualidade da amostra utilizada, em relação a, por exemplo, sua concentração de genoma viral (Elnifro *et al.*, 2000).

Em contraste aos estudos encontrados na literatura, a quantidade de pares de iniciadores utilizados neste estudo foi maior, sendo um par de iniciadores para a região penton, um para a região fibra, porém, para a região hexon, foram utilizados oito pares de iniciadores. Esse fator pode ter sido um dos responsáveis pela amplificação ineficiente da região hexon. Porém, devido à variabilidade genética do gene hexon entre os genótipos de HAdV, desenvolver, em nosso laboratório, um número menor de pares de iniciadores que sejam capazes de amplificar o gene em sua totalidade também se mostrou uma tarefa difícil.

Outro fator importante a ser considerado é que esse estudo utiliza regiões do genoma do adenovírus que se comportam como locais de recombinação, servindo, então, como um estudo de triagem para indicar possíveis recombinações no genoma viral. Vale ressaltar que, como o presente estudo funciona como forma de triagem, uma possível análise e estudo completo das regiões de recombinação apenas será possível com futuros estudos, com o sequenciamento completo do genoma dos adenovírus estudados. Novos pares de iniciadores foram desenhados e serão em breve testados almejando a padronização de uma reação multiplex para os principais genes do capsídeo do adenovírus, o que poderá contribuir para uma análise mais eficiente e rápida sobre a presença ou não dessas regiões de recombinação.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu a padronização de um ensaio de PCR multiplex tendo como alvo duas regiões genômicas do adenovírus, as regiões penton e fibra, entretanto, padronizar e validar uma reação de PCR multiplex para as regiões hexon, penton e fibra não foi possível. Mesmo com a amplificação não eficiente do gene hexon, a reação de amplificação dos genes penton e fibra já se mostra um avanço para a otimização da reação de PCR, reduzindo seu tempo, quantidade de amostra utilizada e contribuindo para futuros estudos de sequenciamento e análise do genoma viral.

REFERÊNCIAS

- AHI, Y. S.; MITTAL, S. K. **Components of Adenovirus genome packaging.** *Front. Microbiol.*, v. 7, p. 1503, 2016.
- BANIK, U. et al. **Multiplex PCR assay for rapid identification of ocular pathogenic adenoviruses by amplification of the fiber and hexon genes.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 3, p. 1064–1068, 2005.
- BENKŐ, M. et al. **ICTV Virus Taxonomy Profile: Adenoviridae 2022: ICTV Virus Taxonomy Profiles Collection.** *J. Gen. Virol.*, v. 103, n. 3, 2022.
- BULLER, R. S. **Molecular detection of respiratory viruses.** *Clin. Lab. Med.*, v. 33, n. 3, p. 439–460, 2013.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **About Adenovirus.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/adenovirus/about/index.html>.
- CESARO, S. et al. **A survey on incidence and management of adenovirus infection after allogeneic HSCT. Bone Marrow Transplant.**, v. 54, n. 8, p. 1275–1280, 2019.
- CHEN, Y. et al. **Human adenovirus (HAdV) infection in children with acute respiratory tract infections in Guangzhou, China, 2010–2021: a molecular epidemiology study.** *World J. of Pediatr.*, v. 18, n. 8, p. 545–552, 2022.
- CRENSHAW, B. J. et al. **Perspective on adenoviruses: Epidemiology, pathogenicity, and gene therapy.** *Biomedicines*, v. 7, n. 3, p. 61, 2019.
- DAS, S.; DUNBAR, S.; TANG, Y.-W. **Laboratory diagnosis of respiratory tract infections in children.** *Front. Microbiol.*, v. 9, p. 2478, 2018.

DOU, Y. et al. **Rapid diagnosis of human adenovirus B, C and E in the respiratory tract using multiplex quantitative polymerase chain reaction.** Mol Medicine Rep, 2018.

ELNIFRO, E. M. et al. **Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88949/pdf/cm000559.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2024.

GINSBERG, H. S. **The life and times of adenoviruses.** Advances in virus research, v. 54, p. 1–13, 1999.

GREBER, U. F. **Adenoviruses – Infection, pathogenesis and therapy.** FEBS Lett., v. 594, n. 12, p. 1818–1827, 2020a.

HILLEMANN, M. R.; WERNER, J. H. **Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness.** Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v. 85, n. 1, p. 183–188, 1954.

HOULDCROFT, C. J. et al. **Use of whole-genome sequencing of Adenovirus in immunocompromised pediatric patients to identify nosocomial transmission and mixed-genotype infection.** J. Infect. Dis., v. 218, n. 8, p. 1261–1271, 2018.

HOWLEY, P. M. et al. **Fields virology: DNA viruses.** 7. ed. Baltimore, MD, USA: Wolters Kluwer Health, 2021.

ISKANDER, J. et al. **Enhanced Adenovirus vaccine safety surveillance in military settings, United States.** Emerg. Infect. Dis., v. 29, n. 6, p. 1283–1285, 2023.

ISMAIL, A. M. et al. **Genomic analysis of a large set of currently—and historically—important human adenovirus pathogens.** Emerg. Microbes. Infect., v. 7, n. 1, p. 1–22, 2018.

JENNINGS, M. R.; PARKS, R. J. **Human Adenovirus gene expression and replication is regulated through dynamic changes in nucleoprotein structure throughout infection.** *Viruses*, v. 15, n. 1, p. 161, 2023.

KAJÁN, G. L. et al. **A multigene typing system for human adenoviruses reveals a new genotype in a collection of Swedish clinical isolates.** *PloS one*, v. 13, n. 12, p. e0209038, 2018.

LEE, B.; DAMON, C. F.; PLATTS-MILLS, J. A. **Pediatric acute gastroenteritis associated with adenovirus 40/41 in low-income and middle-income countries.** *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v. 33, n. 5, p. 398–403, 2020.

LEE, J. A. et al. **Rapid identification of human Adenovirus types 3 and 7 from respiratory specimens via multiplex type-specific PCR.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 11, p. 5509–5514, 2005.

LEI, Y. et al. **Whole genomic sequence analysis of human Adenovirus species C shows frequent recombination in Tianjin, China.** *Viruses*, v. 15, n. 4, 2023.

LION, T. **Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients.** *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 27, n. 3, p. 441–462, 2014.

LYNCH, J. P., 3rd; KAJON, A. E. **Adenovirus: Epidemiology, global spread of novel serotypes, and advances in treatment and prevention.** *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, v. 37, n. 4, p. 586–602, 2016.

LYNCH, J. P., III; KAJON, A. E. **Adenovirus: Epidemiology, global spread of novel types, and approach to treatment.** *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, v. 42, n. 06, p. 800-821, 2021.

NIKIFOROVA, M. N.; LAFRAMBOISE, W. A.; NIKIFOROV, Y. E. **Amplification-based methods.** *Em: Clinical Genomics*. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 57–67.

PABBARAJU, K. et al. **A clinical epidemiology and molecular attribution evaluation of adenoviruses in pediatric acute gastroenteritis: A case-control study.** J. Clin. Microbiol., v. 59, n. 1, 2020.

PIED, N.; WODRICH, H. **Imaging the adenovirus infection cycle.** FEBS Lett., v. 593, n. 24, p. 3419–3448, 2019.

PSCHEIDT, V. M. et al. **Epidemiology of human adenovirus associated with respiratory infection in southern Brazil.** Rev. Med. Virol, v. 31, n. 4, 2021.

PUERARI, D. et al. **Aplicação de teste molecular para detecção de adenovírus em pacientes pediátricos distintos.** Revista paulista de pediatria: órgão oficial da Sociedade de Pediatria de São Paulo, v. 33, n. 2, p. 136–141, 2015.

RAJAIYA, J. et al. **Adenovirus and the cornea: More than meets the eye.** Viruses, v. 13, n. 2, p. 293, 2021.

ROBINSON, C. M. et al. **Molecular evolution of human adenoviruses.** Sci. Rep., v. 3, n. 1, 2013.

SAN MARTÍN, C. **Latest insights on Adenovirus structure and assembly.** Viruses, v. 4, n. 5, p. 847–877, 2012.

SCHAAR, K. et al. **Biological antivirals for treatment of adenovirus infections.** Antivir. Ther., v. 21, n. 7, p. 559–566, 2016.

SHIEH, W.-J. **Human adenovirus infections in pediatric population - An update on clinico–pathologic correlation.** Biomed. J., v. 45, n. 1, p. 38–49, 2022.

VAN GENECHTEN, T. et al. **Successful treatment of Adenovirus infection with Brincidofovir in an immunocompromised patient after hematological stem cell transplantation.** *Case Rep. Infect. Dis.*, v. 2020, p. 1–3, 2020.

VAN REGENMORTEL, M.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Family Adenoviridae.** San Diego, CA: Academic Press, 2000.

VORA, S. B.; BROTHERS, A. W.; ENGLUND, J. A. **Renal toxicity in pediatric patients receiving cidofovir for the treatment of Adenovirus infection.** *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.*, v. 6, n. 4, p. 399–402, 2017.

WANG, Y. et al. **Phylogenetic evidence for intratypic recombinant events in a novel human adenovirus C that causes severe acute respiratory infection in children.** *Sci. Rep.*, v. 6, n. 1, 2016.

WU, X. et al. **Molecular typing and rapid identification of human adenoviruses associated with respiratory diseases using universal PCR and sequencing primers for the three major capsid genes: Penton base, hexon, and fiber.** *Front. Microbiol.*, v. 13, 2022.

YOKODA, R.; NAGALO, B.; BORAD, M. **Oncolytic adenoviruses in gastrointestinal cancers.** *Biomedicines*, v. 6, n. 1, p. 33, 2018.

YU, J.; ZHAO, S.; RAO, H. **Whole genomic analysis of a potential recombinant human adenovirus type 1 in Qinghai plateau, China.** *J. Clin. Virol.*, v. 17, n. 1, 2020.