



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL  
E SAÚDE PÚBLICA**

**Ana Carla Peixoto Guissoni**

---

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE CÉLULAS A-549 INFECTADAS  
POR ADENOVÍRUS ESPÉCIE F – SOROTIPO 40 (HAdV-40)**

---

**Goiânia  
2015**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, 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.

**1. Identificação do material bibliográfico:**     Dissertação     Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

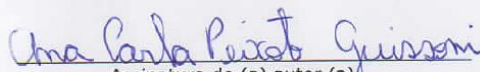
Nome completo do autor: Ana Carla Peixoto Guissoni

Título do trabalho: ANÁLISE PROTEÔMICA DE CÉLULAS A-549 INFECTADAS POR ADENOVÍRUS ESPÉCIE F – SOROTIPO 40 (HAdV-40)  
Goiânia

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 06 / 08 / 2015.

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**Ana Carla Peixoto Guissoni**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE CÉLULAS A-549 INFECTADAS POR  
ADENOVÍRUS ESPÉCIE F SOROTIPO 40 (HAdV-40)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública, área de concentração Microbiologia.

Orientadora: Profa. Divina de Dores de Paula Cardoso.

**Goiânia  
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Guissoni, Ana Carla Peixoto  
ANÁLISE PROTEÔMICA DE CÉLULAS A-549 INFECTADAS POR  
ADENOVÍRUS ESPÉCIE F – SOROTIPO 40 (HAdV-40) [manuscrito] /  
Ana Carla Peixoto Guissoni. - 2015.  
xxi, 106 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Dra. Divina de .Dores de Paula Cardoso.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós  
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2015.  
Bibliografia. Anexos.  
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras,  
lista de tabelas.

1. Adenovirus. 2. Células A-549. 3. Proteômica. I. Doris de Paula  
Cardoso, Dra. Divina de ., orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050  
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: [ppgmtsp.ufg@gmail.com](mailto:ppgmtsp.ufg@gmail.com)

**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE ANA CARLA PEIXOTO GUISSONI** - Aos seis dias do mês de agosto do ano de 2015 (06/08/2015), às 9:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. DIVINA DAS DÓRES DE PAULA CARDOSO, JOSÉ PAULO GAGLIARDI LEITE, CÉLIA REGINA MONTE BARARDI, MENIRA BORGES DE LIMA DIAS E SOUZA e FABIÓLA SOUZA FIACCADORI, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **“ANÁLISE PROTEÔMICA DE CÉLULAS A-549 INFECTADAS POR ADENOVÍRUS ESPÉCIE F – SOROTIPO 40 (HADV-40)”**, em nível de **DOCTORADO**, área de concentração em **MICROBIOLOGIA**, de autoria de **ANA CARLA PEIXOTO GUISSONI**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora Profa. Dra. DIVINA DAS DÓRES DE PAULA CARDOSO, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução n.º. 1081/2012 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovada** ou **Reprovada**:

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Divina das Dóres de Paula Cardoso  
Dr. José Paulo Gagliardi Leite  
Profa. Dra. Célia Regina Monte Barardi  
Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza  
Profa. Dra. Fabíola Souza Fiaccadori

**Aprovada / Reprovada**

APROVADA  
APROVADA  
Aprovada  
Aprovada  
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata HABILITADA, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOCTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **MICROBIOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 13h00 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.  
A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Profa. Dra. Divina das Dóres de Paula Cardoso (IPTSP/UFG) Divina das Dóres de Paula Cardoso  
Dr. José Paulo Gagliardi Leite (FIOCRUZ/RJ) José Paulo Gagliardi Leite  
Profa. Dra. Célia Regina Monte Barardi (UFSC/SC) Célia Regina Monte Barardi  
Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza (IPTSP/UFG) Menira Borges de Lima Dias e Souza  
Profa. Dra. Fabíola Souza Fiaccadori (IPTSP/UFG) Fabíola Souza Fiaccadori  
Secretário da Pós-Graduação: José Clementino de Oliveira Neto

**BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO**

**Aluno (a): Ana Carla Peixoto Guissoni**

---

**Orientador (a): Divina Das Dores de Paula Cardoso**

---

**Membros :**

**Titulares**

**1. Divina das Dores de Paula Cardoso (Orientadora)**

**2. José Paulo Gagliardi Leite (FIOCRUZ)**

**3. Célia Regina Monte Barardi (UFSC)**

**4. Fabíola Souza Fiaccadori (IPTSP/UFG)**

**5. Menira Borges de Lima Dias e Souza (IPTSP/UFG)**

**Suplentes**

**1. Clayton Luiz Borges (IPTSP/UFG)**

**2. Wília Marta Elsner Diederichsen de Brito (IPTSP/UFG)**

**3. Sinji Tauhata (ICB/UFG)**

**4. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro (IPTSP/UFG)**

*Desistir...*

*Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei muito a sério;  
É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas,  
Mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros,  
Mais estradas no meu coração do que medo em minha cabeça.*

*(Cora Coralina)*

*Dedico,*

*A Deus,*

*Ser transcendental e perfeito; substância infinita e soberana, imanente a todo real, que certamente: "...se fez presente em todos os momentos firmes e trêmulos. E, meu gesto, existe o Seu gesto e, em minha voz, a Sua voz."*

*(Vinícius de Moraes)*



*Pos meus pais Carlos Alberto e Antônia,*

*Hoje, gostaria de enxergar com seus olhos. Assim, veria sob um céu benevolente e sincero toda a minha euforia. Enfrentei um mundo que diariamente me coloca obstáculos e cujas decisões são cada vez mais difíceis e sérias, mas venci. Gostaria, também, de ceder-lhe meu lugar, para que vocês pudessem alcançar o tamanho da vontade de retribuir. Mais do que lhes render homenagens por uma vida inteira de dedicação, é fundamental agora fazer com que vocês tenham a certeza de que estão comigo em cada atitude. Então, nós, parceiros de longa data, poderíamos ser um só, como antes, quando vocês traçavam meus planos e fracassavam por mim e triunfavam por nós. Hoje, eu sou eu em minhas particularidades, mas em tudo o que faço há muito mais de vocês do que um dia eu poderia suportar.*

***Amo muito vocês!!!***

*Ao Gustavo,*

*Se hoje comemoro uma conquista, esta se deve também*

*a você que esteve ao meu lado em todos os momentos.*

*A você, que me ofereceu sempre o melhor através do olhar de apoio,*

*de sua palavra de incentivo, de seu gesto de compreensão, de*

*sua atitude de segurança, mesmo quando me veio o*

*desânimo. Nos momentos importantes, suportou minha*

*ausência; nos dias de fracasso, respeitou meus*

*sentimentos e me incentivou a buscar a vitória. Se hoje estou aqui é*

*porque você acreditou em meu sucesso e caminhou ao meu lado!*

*Obrigado pelo amor, pela paciência e pelo companheirismo!*

***Te amo!***

*A Professora Divina,*

*Você me ensinou a voar, mas não voarei o teu voo. Ensinou a sonhar, mas não sonharei o teu sonho. Ensinou a viver, mas não viverei a tua vida. Porém, em cada voo, em cada sonho e em cada período de minha vida, permanecerá para sempre os rastros dos teus ensinamentos.*

*(Autor desconhecido)*

*Obrigada pela orientação na vida e no meu doutorado!!!*

## **AGRADECIMENTOS**

---

Á Deus , por mais uma conquista, pela oportunidade da vida e do aprendizado.

Aos meus pais e minhas irmãs, que compartilharam dos meus ideais, compreenderam-me, incentivaram-me, mesmo que no silêncio e na distância.

As minhas sobrinhas Isabella e Maria Fernanda, a chegada de vocês durante minha jornada de mestrado e doutorado iluminou os meus dias, apresentou um sentimento nunca antes vivido e preencheu minha vida de alegria...

Ao meu noivo, Gustavo Henrique , que deu a paz e a tranquilidade que eu precisava para superar os momentos de inquietude e ansiedade. Por me fazer acreditar em mim e transpor os obstáculos que foram surgindo ao longo do caminho.

A minha orientadora, professora Dra. Divina das Dores de Paula Cardoso, pela confiança em mim depositada, por todos os ensinamentos, pela oportunidade de ter realizado este trabalho, por toda a paciência e bondade nos momentos mais complicados e por toda a compreensão nos momentos que errei. Muito Obrigada!!!

A professora Dra. Célia Maria Soares, pela paciência e grande colaboração durante todo o trabalho, pelo suporte técnico e científico no desenvolvimento deste estudo. Agradeço também a excelente equipe do laboratório da Professora Célia, professores e alunos, em especial a Dra. Juliana Parente, Dra. Ana Flávia Parente e a Dra. Lilian Baeza, que contribuíram muito para a realização desse trabalho.

As amigas e colegas, Greyciele Almeida, Greice Japolla e Keili Sousa, pela amizade, pelo auxílio e pela agradável convivência.

A professora Fabíola Fiaccadori, Laboratório de Virologia Humana do IPTSP, pelo auxílio e disponibilidade nos momentos de dúvidas.

Aos Colegas de curso Kareem, Teresinha e Marize pela amizade e colaboração.

A todos os professores do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública pelos ensinamentos ao longo da minha jornada de graduação, mestrado e doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da UFG pela oportunidade.

A banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição para o trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPQ, pela bolsa concedida e pela taxa de bancada.

Ao apoio financeiro do Pronex Edital MCT / CNPQ / FNDCT / FAPs / MEC/ CAPES / PRO CENTRO-OESTE nº 031/ 2010. Processo nº 563998 / 2010 - 5.

## SUMÁRIO

---

<b>Lista de figuras, quadros e anexos</b> .....	XIV
<b>Lista de Símbolos, Siglas e Abreviações</b> .....	XVI
<b>Resumo</b> .....	XX
<b>Abstract</b> .....	XXI
<b>1.0 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	01
1.1 Adenovírus .....	03
1.1.1 Histórico .....	03
1.1.2 Classificação .....	03
1.1.3 Propriedades genômicas, proteicas e morfológicas .....	03
1.1.4 Biossíntese viral .....	10
1.1.5 Patogenia e Sintomatologia .....	15
1.1.6 Epidemiologia .....	18
1.1.7 Resposta do hospedeiro à infecção por adenovírus .....	20
1.1.8 Métodos para estudo dos adenovírus .....	22
1.2 Proteômica .....	24
1.2.1 Eletroforese bidimensional (2D) .....	26
1.2.2 Cromatografia Líquida (CL) .....	28
1.2.3 Espectrometria de massas (MS) .....	29
1.2.4 Identificação de proteínas por espectrometria de massas .....	32
<b>2.0 JUSTIFICATIVA</b> .....	34
<b>3.0 OBJETIVO</b> .....	35
<b>4.0 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
4.1 Material de Estudo .....	35
4.2 Cultivo Celular .....	35
4.3 Cultivo Viral: determinação do tempo de cultivo, procedimento de cultivo e confirmação da infecção pelo vírus .....	35
4.4 Análise do perfil proteico induzido por HAdV-40 em células A-549.....	38
4.5 Análise dos dados por Bioinformática .....	41
4.6 Ensaios de Validação.....	42
<b>5.0 RESULTADOS</b> .....	44
5.1 Determinação do melhor tempo de cultivo de HAdV-40 em células A-549.....	44

5.2 Confirmação da infecção HAdV-40 em células A-459.....	44
5.3 Análise do perfil proteico induzido por HAdV-40 em células A-549.....	45
5.4 Dados de Validação .....	60
5.4.1 AnnexinV- FIT C .....	60
5.4.2 Mitotracker Green FM.....	61
<b>6.0 DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>7.0 CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>8.0 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>
<b>9.0 ANEXOS .....</b>	<b>93</b>
Tabela 1: Proteínas induzidas pela infecção por HAdV-40 em células A-549 .....	93
Tabela 2: Proteínas reprimidas pela infecção por HAdV-40 em células A-549 .....	98
Parecer do Comitê de Ética .....	102
Artigo I .....	105

## Lista de Figuras e Quadros

---

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática do genoma de adenovírus .....	04
<b>Figura 2:</b> (A) Separação e identificação das proteínas do HAdV em SDS-PAGE; (B) Representação esquemática da partícula do adenovírus e localização das suas proteínas .....	08
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática do ciclo de replicação do adenovírus .....	15
<b>Figura 4:</b> Efeito Citopático observado a partir das células infectadas A-549 por HAdV-40 em relação a células controle nos tempos de 0, 12, 24, 30 horas após a infecção .....	44
<b>Figura 5:</b> Detecção do DNA de HAdV-40 por Nested-PCR em gel de agarose .....	45
<b>Figura 6:</b> Percentual de proteínas diferencialmente expressas em células A-549 classificadas de acordo com sua função biológica (UniProt): A- Proteínas diferencialmente expressas (n=336- <i>Up</i> e <i>down</i> reguladas) em células A-549; B- Proteínas induzidas em células A-549 infectadas por HAdV-40 (n=206 <i>Up</i> reguladas). .....	46
<b>Figura 7:</b> Modelo proposto para infecção de HAdV-40 em células A-549.....	51
<b>Figura 8:</b> Diagrama das proteínas induzidas em células A-549 infectadas por HAdV- 40 envolvidas da Glicólise/ Gliconeogenese .....	53
<b>Figura 9:</b> Diagrama das proteínas induzidas em células A-549 infectadas por HAdV- 40 envolvidas no Ciclo de Krebs.....	54
<b>Figura 10:</b> Diagrama das proteínas induzidas em células A-549 infectadas por HAdV- 40 envolvidas na Degradação de Ácidos Graxos... ..	55
<b>Figura 11:</b> Precisão da identificação de massa dos peptídeos induzidos por HAdV40 em células A-549 a partir da cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas.....	57
<b>Figura 12:</b> Percentual de identificação de tipos de peptídeos provenientes de células A-549 infectadas com HAdV-40 .....	58
<b>Figura 13:</b> Interação entre proteínas diferencialmente expressas identificadas em células A-549 infectadas com HAdV- 40. ....	59
<b>Figura 14:</b> Visualização das células tratadas com AnexinaV-FITC por microscópio de fluorescência.....	61



<b>Figura 15:</b> Visualização das células tratadas com MitoTracker® Green FM por microscópio de fluorescência.....	62
<b>Quadro 1:</b> Proteínas de HAdV: Localização e função.....	10
<b>Quadro 2:</b> : Distribuição e classificação dos sorotipos de adenovírus humanos em relação às síndromes clínicas .....	18
<b>Quadro 3:</b> Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e nested-PCR .....	38
<b>Quadro 4:</b> Proteínas diferencialmente expressas em células A-549 infectadas por HAdV-40 relacionadas à via de organização celular.....	48
<b>Quadro 5:</b> Proteínas diferencialmente expressas em células A-549 infectadas por HAdV-40 relacionadas à resposta ao estresse .....	49
<b>Quadro 6:</b> Proteínas diferencialmente expressas em células A-549 infectadas por HAdV-40 relacionadas a apoptose .....	49
<b>Quadro 7:</b> Proteínas diferencialmente expressas em células A-549 infectadas por HAdV-40 relacionadas ao metabolismo de produção de energia.....	50
<b>Quadro 8:</b> Proteínas que mostraram interação significativa pelo STRING 10 considerando os processos biológicos .....	60

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

μm	Micrometro
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
2D	eletroforese bidimensional
A-549	Linhagem celular de carcinoma de pulmão humano
ADP	Proteína Morte dos Adenovírus ( <i>Adenovirus Death Protein</i> )
AIF	Fator indutor de Apoptose ( <i>Apoptosis inducing factor</i> )
ATP	Adenosina trifosfato
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BM	Banho Maria
BSA	Soro Albumina Bovina ( <i>Bovine serum albumin</i> )
CAR	Coxsackie Adenovirus Receptor
CD46	Marcador de células nucleadas humanas
DABCO	1,4-diazabicyclo -2,2,2-octano
DNApol	DNA polimerase
dsDNA	DNA fita dupla
DSG-2	Desmogleina-2
DTT	Ditiotreitol
dNTP	Desoxinucleotídeos (A, C, G, T) trifosfato
DBP	Proteína de ligação ao DNA de adenovírus ( <i>DNA binding protein</i> )
ECP	Efeito Citopático
EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
ESI	Ionização por eletron spray ( <i>Electron Spray Ionization</i> )
EROS	Espécie Reativa de Oxigênio

EV	Eletrón volt
fmol	Femtomol
FITC	Fluoresceína Isotiocianato ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )
PS	fosfatidilserina
FWHM	Largura Total – Meia Máxima ( <i>Full-Width Half-Maximum</i> )
GFP	Proteína Fluorescente Verde ( <i>Green Fluorescence Protein</i> )
GEA	Gastroenterite aguda
HAdV	Adenovírus Humano
HeLa	Linhagem celular de carcinoma de cérvix uterina humana
Hep-2	Linhagem celular de carcinoma epidermóide de laringe humana
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSP	Proteína de choque térmico
Huh-7.5	Linhagem celular de Hepatoma Humano
ICTV	Comitê internacional de taxonomia viral ( <i>International Committee of Taxonomy Viral</i> )
IEF	Focalização isoeétrica ( <i>Isoelectric focalization</i> )
IFN	interferon
ITR	região repetitiva terminal invertida ( <i>Inverted terminal repeat</i> )
KDa	Kilo Dalton
KEGG	Enciclopédia Kyoto de Gene e Genoma ( <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> )
MEM	Meio mínimo essencial
m/z	Relação massa/carga
mL	Mililitro
MLP	Promotor tardio principal ( <i>Major Late Promoter</i> )
MLTU	Unidade de transcrição tardia principal ( <i>Major Late Transcription Unit</i> )
mg	miligrama

MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
NaCl	Cloreto de Sódio
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio
NF	Fator nuclear ( <i>Nuclear factor</i> )
NPC	Complexo do Poro Nuclear
NK	Células matadoras naturais ( <i>natural killer cell</i> )
nano-ESI-UPLC-MS <sup>E</sup>	Fonte de ionização eletronspray acoplada em cromatografia líquida de alta eficiência
nL	Nanolitro
nm	Nanômetro
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de Amônio
ORF	Região de leitura aberta ( <i>Open Reading Frame</i> )
pb	Pares de base
PI3K	Fosfatidilinositol-3-OH-quinase
PBS	Solução salina fosfatada ( <i>Phosphate Saline Buffer</i> )
PCR	Reação em cadeia pela polimerase ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
PLGs	<i>ProteinLynx Global Server</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PML	Corpos de leucemia promielocítico
dsRNA	RNA de fita dupla ( <i>double strand</i> )
siRNA	RNA silenciador
RGD	Arginina, Glicina, Asparagina
SFB	Soro fetal bovino
SDS	Sulfato dodecil de sódio
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCA	Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos

TFA	Ácido Trifluoroacético
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
<i>Tof</i>	Tempo de voo ( <i>Time of flight</i> )
TP	Proteína terminal ( <i>Terminal protein</i> )
UV	Ultravioleta
UFF	Unidades Formadora de Foco
V	Volts
VA RNA	RNA associado a vírus

## RESUMO

---

Adenovírus humano (HAdVs) são agentes causadores de diversas síndromes clínicas como gastroenterite, doenças respiratórias, oculares e cistite. A infecção por adenovírus pode levar a alterações na homeostase celular a partir da interação com a célula hospedeira pela indução de proteínas de diversas vias metabólicas. O conhecimento resultante desta interação vírus-célula pode auxiliar na elucidação da patogenia destes vírus e na resposta do hospedeiro contra a infecção viral. Para o estudo desta interação, uma metodologia que tem sido bastante utilizada é a proteômica, ferramenta esta usada no presente estudo, que tem como finalidade a identificação de proteínas induzidas a partir da infecção viral. Foram utilizadas células A-549 infectadas por adenovírus humano da espécie F, sorotipo 40 (HAdV-40). Para o procedimento, a partir de células infectadas e controles, procedeu-se à extração de proteínas por lise osmótica, as quais foram quantificadas pelo método de Bradford e a seguir digeridas com tripsina. Os peptídeos foram separados em sistema de cromatografia líquida em duas dimensões. A ionização dos peptídeos foi realizada em fonte nano-eletronspray e a análise destes através do sistema ToF-MS<sup>E</sup>, possibilitando a identificação das proteínas. Foram identificadas 336 proteínas, sendo 206 induzidas pela infecção por HAdV-40 e 130 reprimidas. As principais vias afetadas pela infecção viral foram: energia, organização celular, resposta ao estresse e apoptose. Observou-se alteração do metabolismo da célula com o aumento da via glicolítica,  $\beta$ -oxidação e da cadeia respiratória. Além disso, os resultados sugerem reorganização do citoesqueleto e indução de apoptose. Esses dados podem contribuir para o conhecimento da patogenia dos adenovírus considerando as proteínas relacionadas com vias metabólicas distintas induzidas pela infecção viral.

Palavras-chave: Adenovírus, Células A-549, proteômica.

## ABSTRACT

---

Human adenovirus (HAdVs) are causative agents of different clinical syndromes such as gastroenteritis, respiratory diseases, eye diseases and cystitis. Adenovirus infection can modify the cellular homeostasis through the interaction with the host cell by inducing proteins of several metabolic pathways. The resulting knowledge of this virus-cell interaction may aid the elucidation of the pathogenic mechanisms caused by adenovirus and the host response against viral infection. To study this interaction, a methodology that has been widely used is proteomics, a tool used in this study, which aimed to identify induced proteins due to viral infection. In this context we used cells A-549 infected with human adenovirus of type F, serotype 40 (HAdV-40). Infected cells and non-infected cells were used for the osmotic lysis, which were quantified by the Bradford method and then digested with trypsin. Peptides were separated on the LC system in two dimensions. The ionization of the peptides was performed by nano-electrospray source and through analysis of ToF-MS<sup>E</sup> system aiming the protein identification. A sum of 336 proteins were identified, 206 of them induced and 130 suppressed by the infection with HAdV-40. The main pathways affected by viral infection were: energy, cellular organization, stress response and apoptosis. It was observed alteration of cell metabolism with increase of the glycolytic pathway,  $\beta$ -oxidation and respiratory chain. Also, the results suggest cytoskeleton reorganization and apoptosis induction. The data can contribute knowledge about adenovirus pathogenesis considering the proteins related to distinct metabolic pathways induced by viral infection.

Keywords: Adenovirus, A-549 cells, proteomics.

# **1- INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA**

---

## **Introdução**

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que necessitam da maquinaria celular para sua multiplicação e manutenção na natureza o que pode trazer como consequência alterações na célula e no organismo do hospedeiro (ANDREW et al., 2009).

No homem, os vírus podem causar tanto infecções inaparentes quanto subclínicas ou clínicas as quais são inicialmente de caráter agudo, mas, podem evoluir para persistência, latência ou cronicidade (SOEUR et al., 1991). Assim, quando da infecção, os vírus podem atingir todos os sistemas e órgãos, incluindo, o sistema nervoso central, o trato gastrointestinal, o trato respiratório inferior e superior, o fígado, coração, pele e tecido linfático (LJUNGMAN, 2004). Deste conjunto de possibilidades resultam várias morbidades como meningoencefalite, gripe, pneumonia, resfriado comum, gastroenterite, hepatite, dentre outras. As infecções podem ocorrer em situações de surto ou não, com probabilidade de mortalidade, dependendo do vírus e da população (GHEBREMEDHIN, 2014). No contexto da infecção latente, quando da reativação, estes podem ser de grande importância, principalmente em casos de deficiência imune do hospedeiro (GARNETT et al., 2009). Ademais, em situações de cronicidade os vírus podem levar a formação de tumores (SOEUR et al., 1991).

Dentre as doenças causadas por vírus, como já referido, a gastroenterite aguda (GEA), é de grande importância, principalmente para a população infantil além de adultos imunocomprometidos, dentre outros (ECHAVARRÍA, 2008). Os principais vírus admitidos como responsáveis pela síndrome são os Rotavírus do grupo A, Norovírus, Sapovírus, Astrovírus e Adenovírus (MIDDLETON, 1996; WILHELMI et al., 2003; YAMASHITA et al., 1998; YAMASHITA et al., 2001).

Os adenovírus além de sua implicação na GEA também levam a quadros de conjuntivite, doença respiratória e urinária com a característica ainda de latência no hospedeiro, situação em que se tornam muito importantes em pacientes imunocomprometidos e/ou transplantados (HUMAR et al., 2005, ECHAVARRÍA, 2008).

Muitos estudos têm sido realizados com adenovírus no contexto da sua epidemiologia, aspectos genômicos, de estrutura e função proteica (SAIKRUANG et



al., 2014, SAN MARTÍN, 2012; ZHAO et al., 2003). Não obstante, apesar da importância de tais investigações pouco se tem feito objetivando o conhecimento da relação vírus-célula tendo como parâmetro o perfil protéico induzido na célula do hospedeiro. Ao nosso conhecimento, um estudo desta natureza só foi realizado com o sorotipo 5 de adenovírus (HAdV-5) (LAM et al., 2010).

Em assim sendo, visando aumentar o conhecimento a respeito da relação adenovírus-célula, este estudo foi realizado utilizando como ferramenta de estudo a análise proteômica de células A-549 infectadas por Adenovírus Humano, espécie F, sorotipo 40.

## 1.0 Revisão da Literatura

### 1.1 Adenovírus

#### 1.1.1 Histórico

Em 1945, Hilleman e Werner, analisando material clínico proveniente de soldados americanos com infecção respiratória observaram um agente capaz de induzir efeito citopático em cultura de células humanas. Esses vírus foram reconhecidos como agentes de degeneração da adenóide bem como de doença respiratória aguda. Posteriormente, em 1953, Rowe e colaboradores observaram a degeneração de células primárias de adenóides humanas em cultura, o que foi atribuído à replicação de um vírus não identificado. Em 1956, esses agentes foram denominados adenovírus, devido ao tecido em que foram descobertos (ROWE et al., 1953; HILLEMANN; WERNER, 1945).

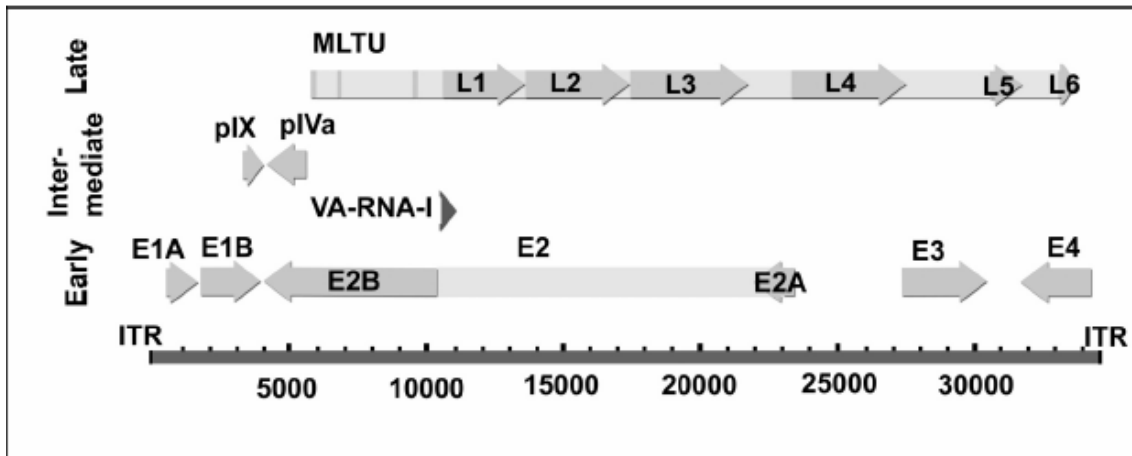
#### 1.1.2 Classificação

Os adenovírus pertencem à família *Adenoviridae*, a qual é dividida em cinco gêneros: *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Siadenovirus*, *Ichtadenovirus* e *Mastadenovirus*. Os *Mastadenovirus* infectam mamíferos incluindo o homem e com base em características biológicas, imunológicas, genômicas e bioquímicas, são subdivididos em sete espécies (A-G) que compreendem 56 sorotipos (ICTV – *International on taxonomy of Viruses*) sendo que outros sorotipos já têm sido propostos (PUNSINEE et al., 2013; WALSH et al., 2011).

#### 1.1.3 Propriedades genômicas, proteicas e morfológicas:

Os adenovírus possuem genoma DNA de fita dupla linear (*dsDNA*), de aproximadamente 30.000 a 45.000 pares de bases (pb), dependendo da espécie. O genoma conta com oito unidades de transcrição que codificam aproximadamente 40 proteínas reguladoras e estruturais. Essas unidades de transcrição são divididas em cinco unidades codificantes iniciais (E1A, E1B, E2, E3 e E4), duas unidades intermediárias (pIX e pIVa2) e uma grande unidade de transcrição tardia (MLTU) que gera cinco famílias de mRNAs (L1 ao L5) (DAVISON et al., 2003). O genoma viral possui ainda

de 1 a 2 pequenos RNAs não traduzíveis (VA RNA), transcritos pela RNA polimerase III celular (SHENK, 1996) (Figura 1).



**Figura 1:** Representação esquemática do genoma dos adenovírus (MEI et al., 2003)

A expressão das unidades de transcrição inicial, intermediária e tardia é sincronizada. As duas fitas de DNA são transcritas: na fita na qual a transcrição ocorre no sentido da direita para a esquerda (5' para 3') resultam os transcritos E1A, E1B, IX, MLTU, VA-RNA e E3; e naquela onde a transcrição ocorre no sentido da esquerda para a direita (3' para 5') resultam os transcritos E4, E2 e IVa2 (Shenk, 1996).

### Unidades de transcrição inicial:

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

Os primeiros transcritos genômicos de adenovírus são os da unidade inicial E1A. O gene E1A codifica duas proteínas, E1A-289R e E1A-243R que possuem papel importante na infecção produtiva e na transformação celular. Estas proteínas modulam o metabolismo celular fazendo com que a célula fique susceptível à replicação viral (RUSSEL, 2000). No contexto, produtos da região E1A se ligam à proteína celular pRB (proteína do retinoblastoma), liberando o fator de transcrição celular E2F, o qual ativa genes celulares com a finalidade da progressão do ciclo celular (fase G1 - fase S) com consequente favorecimento para a replicação do DNA viral (SHENK, 1996). A

expressão dos produtos de E1A leva também à transcrição dos genes E1B, E2, E3 e E4, que desencadeiam diferentes eventos no contexto do ciclo celular e viral (SHENK, 2001). Assim este gene promove a expressão de alguns genes celulares, interferindo no processo de divisão celular e na regulação da proteína p53 (RUSSEL, 2000).

O gene E1B contribui para a replicação viral eficiente, bloqueando a apoptose e inibindo o crescimento celular (TÄUBER; DOBNER, 2001) o que ocorre durante a fase tardia da infecção, quando se dá o bloqueio no transporte de mRNA da célula hospedeira com conseqüente inibição da tradução de proteínas celulares possibilitando que mRNAs tardios virais sejam sintetizados, transportados para o citoplasma e traduzidos (BLANCHETTE et al., 2008). Esse gene codifica duas proteínas, 19KDa e 55KDa. A 55KDa bloqueia a apoptose mediado pela proteína p53 (ZHAO, 2003), o que é danoso para a célula já que a p53 é uma proteína supressora de tumor, com a função de regular a transcrição de diversos genes envolvidos no ciclo celular e na apoptose. Para este bloqueio, a 55KDa forma um complexo com o produto do gene E4, a E4-ORF 6 (*open reading frame*/região de leitura aberta) e ubiquitina celular, promovendo a degradação da p53 nos proteossomos (HARADA et al., 2002).

A unidade E2 codifica proteínas necessárias para a replicação do DNA: a DNA polimerase (Pol), a proteína pré terminal (pTP) e a proteína de ligação ao DNA (DPB). A DNA polimerase é uma proteína bastante conservada entre os sorotipos de adenovírus e tem atividade 3'-5' exonuclease. A DNA-DBP estabiliza a hélice de DNA durante sua alongação e replicação (LIU et al., 2003) e proteína terminal (TP), se liga covalentemente à extremidade 5' do DNA viral, atuando como origem de replicação (WEBSTER et al., 1994).

E3 codifica proteínas imunomoduladoras de 14,7KDa, 10,4KDa, 14,5KDa, 11,6KDa e 19KDa, que têm como função impedir o reconhecimento e eliminação do vírus pelo sistema imunológico do hospedeiro (WINDHEIM et al, 2013). A proteína 14,7KDa desempenha a função de proteger as células infectadas da morte celular mediada por TNF $\alpha$  e FasL (Wang et al., 1988). As proteínas 10,4KDa e 14,5KDa são conhecidas por regular alguns receptores de apoptose da superfície da célula e afetar a indução da sinalização por TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose tumoral  $\alpha$ ) (NILSSON et al., 2011). A proteína 11,6KDa, também chamada de ADP (*adenovirus death protein* - proteína de morte dos adenovírus) é expressa tardiamente, sob ação do MLP e é relacionada à lise celular (TOLLEFSON et al., 1996). A 19KDa retém o MHC classe I, que atuam no reconhecimento e na apresentação de antígenos ao linfócito T, no retículo

endoplasmático das células infectadas, suprimindo desse modo o reconhecimento do vírus por linfócitos T citotóxicos (HORWITZ et al., 2009), além de ativar células matadoras naturais (*killer* -NK) (SESTER et al. 2010).

A região E4 é altamente conservada e possui similaridade organizacional em todos os adenovírus. A região produz no mínimo seis polipeptídeos, denominados de acordo com sua ORF correspondente, 1-6. As ORFs 3 e 6 formam um complexo com a E1B-55K e aumentam a taxa de replicação do DNA viral e a síntese de proteínas virais tardias. A ORF6/E1B-55K também desliga seletivamente a expressão de genes celulares, facilitando a exportação nuclear dos mRNAs virais, enquanto simultaneamente inibe a exportação da maioria dos transcritos celulares (FLINT;GONZALEZ, 2003). Esse complexo também degrada a p53 (SCHREINER et al., 2012). Ademais os produtos das ORFs 3 e 6 de E4 inibem a atividade da proteína quinase DNA dependente (DNA-PK), que é essencial para o sistema de reparo de DNA.

A ORF 4 parece inibir a transdução de sinal de genes celulares (MANNERVIK et al., 1999) e também pode induzir a apoptose (KLEINBERGER, 2000). Embora os papéis das ORFs 1e 2 de E4 ainda não estejam bastante elucidados, a proteína E4-ORF1 tem sido relacionada com o aumento do fluxo glicolítico celular pela ativação do fator de transcrição celular MYC levando ao aumento da transcrição de genes glicolíticos (THAI, 2014).

### **RNAs associados aos vírus (VA-RNA)**

VA- RNAs são pequenos transcritos de RNA gerados pela RNA polimerase III que formam estruturas de dsRNA. Os VA-RNAs se ligam a proteínas quinase (PKR) dependentes de dsRNA gerando efeito abortivo do mecanismo de defesa antiviral induzido por IFN tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ) (KATZE et al.1987). Ao se ligar a PKR, os dsRNAs ativam a enzima Dicer (RNase III dsRNA específica) que os cliva em pequenos RNAs, denominados RNA silenciadores (siRNAs). Esses siRNAs se ligam ao denominado complexo RNA silenciado induzido (RISC) que cliva RNAs complementares ao siRNA. Dessa forma, qualquer dsRNA formado no citoplasma terá seus RNAs complementares destruídos. Em adição, os VA- RNAs são produzidos em quantidades suficientes para sobrecarregar o sistema de defesa via PKR e dessa forma, impedem que haja a degradação dos mRNAs virais, permitindo que ocorra uma tradução eficiente dos mRNAs virais tardios (THIMMAPPAYA et al., 1982).

### **Unidade de transcrição intermediária**

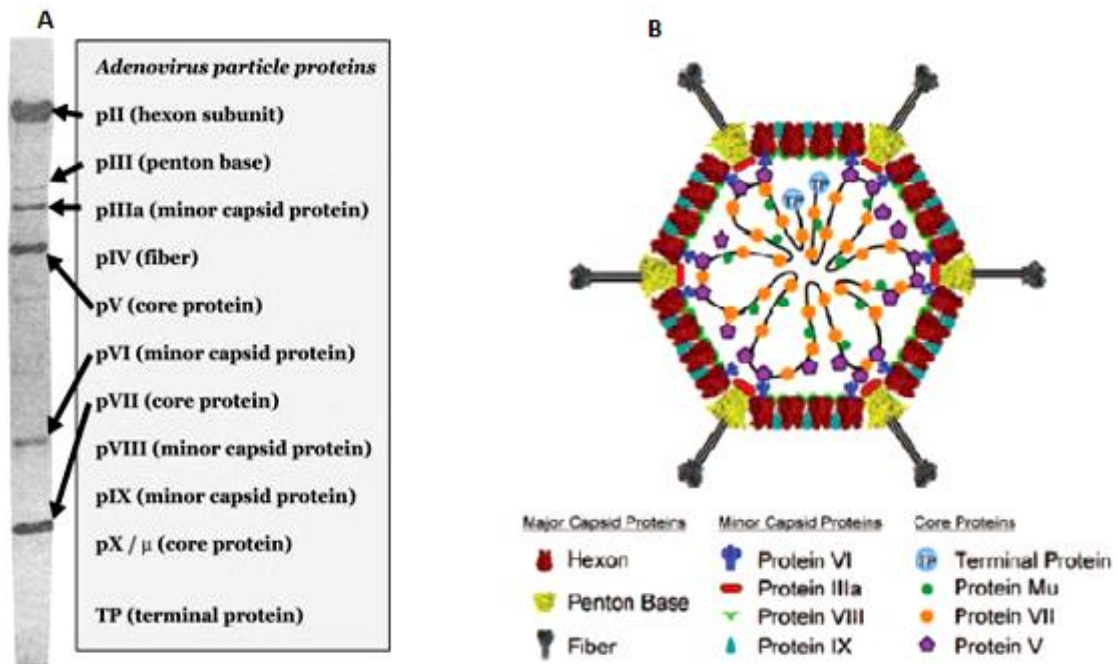
Os genes da região intermediária são expressos imediatamente após a replicação do DNA e antes do início da expressão dos genes tardios. Essa região conta com dois genes cuja expressão gera duas proteínas multifuncionais, pIX e pIVa2. A pIX, além de seu papel na estrutura do capsídeo viral, auxilia no empacotamento do DNA. Esta também contribui na reorganização nuclear da célula e media o sequestro da proteína PML (corpos de leucemia promielocítico) para dentro do núcleo, o que é admitido como facilitador para a proliferação viral (ROSA-CALATRAVA et al, 2003). A pIVa2 é necessária para o início da montagem viral (TRIBOULEY et al, 1994).

### **Unidade de transcrição tardia**

O processo de replicação do HAdV estimula significativamente a atividade da MLP, que controla a unidade de transcrição tardia. O MLP gera um único transcrito, o MLTU. Este conta com cinco diferentes sítios de poliadenilação e em combinação com excisão (*splicing*) alternativa, gera cinco famílias de mRNAs (L1-L5) cujos produtos são proteínas estruturais: L1 - proteínas IIIa; L2 - proteínas III, VII, V; L3 - proteínas penton base, VI, hexon e protease 23K; L4 - proteína VIII; e L5: proteína fibra (MEI et al., 2003; YOUNG, 2003).

### **Morfologia dos Adenovírus**

Os adenovírus possuem simetria icosaédrica, são não envelopados e têm aproximadamente 90nm de diâmetro. O vírus é composto por 12 proteínas: II-IX, IIIa, IVa,  $\mu$ , proteína terminal (TP) e a protease viral (p23) (Figura 2, quadro1). A numeração destas proteínas se deu a partir de suas migrações em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme ilustrado na figura 2A. Sete destas proteínas formam o capsídeo (II, III, IV, IIIa, VI, VIII e IX).



**Figura 2:** (A) Separação e identificação das proteínas do HAdV em SDS-PAGE; (B) Representação esquemática da partícula do adenovírus e localização das suas proteínas (RUSSEL, 2000; NEMEROW et al., 2009).

O hexon é o principal componente do capsídeo viral e é formado por 240 trímeros de pII que circunda o genoma viral e proteínas associadas (BURNETT, 1985). Os trímeros de hexon assumem forma hexagonal. Os elementos pentagonais situam-se a cada vértice do icosaedro e são formados por um pentâmero de base penton, pIII, que se complexa com um trímero que forma a fibra, pIV e se projeta. Quatro trímeros hexon acrescido de um monômero base penton, forma o icosaedro sendo o hexon o principal componente do capsídeo (SAN MARTÍN, 2001).

A fibra, pIV, projeta-se a partir de cada 12 vértices do icosaedro enquanto que a base penton repousa na base de cada fibra. Essas proteínas contribuem para a maioria das atividades requeridas para os estágios iniciais da infecção pelo vírus. O homotrímero formador da fibra contém um domínio N-terminal que interage com a base penton e uma protuberância globular C-terminal. Estes dois domínios são separados por um eixo de tamanhos diferentes dependendo do sorotipo (SAN MARTÍN et al., 2008).

A base penton é composta de um homopentâmero que se liga a cada vértice do capsídeo bem como ao domínio caudal da fibra. O conjunto base penton e fibra formam os capsômeros do vértice que têm papel chave no estágio inicial da infecção sendo a protuberância distal C-terminal da fibra responsável pela ligação inicial à célula (STEWART et al., 1997).

As proteínas IIIa, VI, VIII, IX também constituem o capsídeo e estão associados ao hexon (VELLINGA et al., 2005).

A partícula icosaédrica conta com 60 cópias de IIIa sendo que cinco monômeros de IIIa são arranjados em um anel abaixo de cada vértice na superfície interna do capsídeo. Dois possíveis papéis têm sido propostos para IIIa no ciclo viral: estabilização da região do vértice e empacotamento do genoma e liberação quando do desnudamento (LIU et al., 2010; SABAN et al. 2006). A pIIIa situa-se no vértice do icosaedro e junto com hexon formam faces triangulares, determinando o formato do vírus (STEWART et al. 1993).

A proteína VI é multifuncional e exerce vários papéis quando da infecção pelo vírus. Durante a entrada do vírus na célula, sua hélice N-terminal altera a curvatura da membrana endossomal permitindo o escape do vírus para o citoplasma. A proteína atua também como um ativador da expressão gênica viral e ademais, a partir de um sinal de localização nuclear, localizado no C-terminal de pVI, interage com importina  $\alpha/\beta$  da célula, para promover o transporte de novos hexons sintetizados para o núcleo (MOYER et al., 2011).

A proteína VIII tem-se admitido contribuir para a formação do capsídeo. Além disso interage com a IVa2, que tem função no empacotamento viral, o que lhe sugere função similar (LIU et al., 1985).

A menor proteína de adenovírus é a pIX que é localizada na parte externa do capsídeo viral. Por microscopia eletrônica tem sido visto que a pIX forma uma espécie de rede sobre o lado externo do vírus, mantendo juntos os trímeros de hexon (LIU et al., 2010).

O *core* é composto pela molécula de dsDNA, associada às proteínas V, VII, X e à TP covalentemente ligada à terminação 5' do genoma. A clivagem da proteína X gera a proteína  $\mu$ , presente somente em partículas maduras. As proteínas V, VII e  $\mu$  são proteínas básicas de ligação ao DNA e são importantes para o empacotamento e posicionamento correto da molécula de DNA dentro do capsídeo enquanto que a TP serve como um iniciador para a replicação do DNA. O *core* também contém a protease viral p23 que tem a função de clivar precursores de várias proteínas durante a montagem e maturação da partícula do vírus e na desmontagem e escape do vírus a partir de endossomas durante o processo de infecção (SAN MARTÍN et al., 2008). O quadro 1 apresenta as proteínas presentes na partícula viral, bem como o número de cópias de cada proteína, localização e função.



**Quadro 1:** Proteínas de HAdV: Número de cópias, localização e função.

<b>Proteína</b>	<b>Número de cópias</b>	<b>Localização</b>	<b>Função</b>
II (hexon)	240 trímeros	Superfície externa do Capsídeo	Estrutural
III (penton base)	12 pentâmeros	Superfície externa do Capsídeo	Penetração viral
IIIa	60 monômeros	Superfície externa do Capsídeo	Estabilização e empacotamento do genoma
IV (fibra)	12 trímeros	Superfície externa do Capsídeo	Penetração
IVa2	~ 10	Vértice do icosaedro	Empacotamento do genoma
V	~ 157	<i>Core</i>	Histona-like
VI	60 hexâmeros	Superfície interna do Capsídeo	Estabilização do genoma
VII	~ 830	<i>Core</i>	Empacotamento do genoma
VIII	120	Superfície interna do Capsídeo	Estabilização genoma
IX	240	Superfície interna do Capsídeo	Estabilização genoma
$\mu$	~ 100	<i>Core</i>	Ligação ao DNA viral
TP	2	<i>Core</i>	Iniciador para a replicação do DNA
p23	~ 10	<i>Core</i>	Protease

#### 1.1.4 Biossíntese viral

##### Adsorção viral

Para que haja a interação de adenovírus com a célula há exigência de uma ligação inicial que depende de receptores primários na superfície da célula. Por outro lado, há necessidade do reconhecimento destes receptores inicialmente pela fibra, seguido pela ligação secundária da base penton com integrinas da superfície da célula, acionando a endocitose com subsequente escape endossomal e trânsito intracelular para o núcleo (SMITH et al., 2010a).

O primeiro receptor primário identificado foi o coxsackievirus/adenovirus (CAR). CAR é uma proteína de 46 kDa, membro da superfamília das imunoglobulinas, utilizada como receptor tanto pelos coxsackievirus B quanto pelos adenovirus (PHILIPSON;PETTERSON, 2004). Além disso, o CAR é um componente das proteínas de adesão celular (*tight junctions*), localizado, nas membranas basolaterais de células

epiteliais, mantendo a integridade juncional do epitélio (COHEN et al., 2001). Esse receptor pertence a superfamília das imunoglobulinas e é expressa em células do coração, cérebro, pâncreas, intestino, pulmão e a baixos níveis no fígado. Interage com a protuberância da fibra de todas as espécies de HAdV com exceção da B (ROELVINK et al., 1998). Outros receptores primários são os marcadores de células nucleadas humanas (CD46), heparina sulfato, ácido siálico e desmogleina-2.

CD46 é expresso por todas as células nucleadas de humanos, inclusive as células de defesa (BARILLA-LABARCA et al. 2002). É requerido para ligação a células epiteliais e hematopoiéticas das espécies HAdV-B e HAdV-D. Tem sido visto que todos os HAdV-B ligam à célula via protuberância da fibra que reconhece o domínio extracelular de CD46, embora com diferentes afinidades (GREENWALD et al., 2005).

Desmogleina-2 (DSG-2) pertence à família da caderina de glicoproteínas transmembrana de ligação ao cálcio e é um componente dos complexos de adesão entre as células epiteliais. A afinidade das fibras para DSG-2 é fraca (ZHANG; BERGELSON, 2005).

Glicoproteínas ou glicolipídeos são estruturas abundantes da superfície da célula e podem ser negativamente carregadas com ácido siálico (ARNBERG et al., 2000) o que permite a interação com HAdV que possuem carga positiva nas protuberâncias da fibra, como é o caso de HAdV-D. Essa interação, entretanto, não responde para o tropismo ocular dessa espécie já que ácido siálico não é específico para células da conjuntiva. Admite-se que a ligação viral a ácido siálico aumente a ligação a outros sítios de baixa afinidade, a partir dos quais sinais são transduzidos para a célula hospedeira. Outros sítios de baixa afinidade são sulfato de heparano contendo proteoglicanas da matriz extracelular (ARNBERG et al. 2002).

### **Entrada do vírus na Célula e Trânsito Intracelular**

Para que ocorra a entrada do vírus na célula deve haver agrupamento de partículas virais na superfície celular o que se dá em consequência à ligação a integrinas que são receptores de adesão e que apresentam duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , com papel de sinalização interna e externa. As integrinas melhor caracterizadas para entrada de HAdV-5 são  $\alpha\beta3$  e  $\alpha\beta5$ , que são expressadas em muitos tipos de células epiteliais. Ambas promovem a internalização do vírus dependendo do RGD (arginina-glicina-aspartato) da base penton, o que sugere que o envolvimento das integrinas pela base

penton induz sinais, incluindo a ativação de fosfatidilinositol-3-OH-quinase (PI3K) (LI et al. 1998), importantes para os rearranjos do citoesqueleto de actina e início da interiorização do vírus. PI3K atua também em processos celulares importantes, como a ativação de pequenas proteínas de ligação a GTPases Ras, Rho, Rac e Cdc42 (HALL, 1998; TAPON;HALL, 1997). A ativação das GTPases induz a polimerização da actina monomérica, resultando na formação de uma malha densa de filamentos da proteína subjacentes à membrana. Os filamentos de actina polimerizados mantêm a arquitetura das saliências da superfície celular e facilita a endocitose do vírus pelas vesículas revestidas por clatrina (LI et al. 1998).

A entrada de HAdV na célula é admitida ocorrer por endocitose e à medida em que o vírus adentra a célula este começa a liberar sequencialmente as proteínas do capsídeo iniciando com as fibras (GREBER et al., 1996) o que se dá em função da acidificação do endossomo, quando a base penton sofre mudanças conformacionais, expondo domínios hidrofóbicos, os quais interagem com a membrana do endossomo, ocorrendo assim a sua ruptura e o escape do vírus para o citoplasma (LI et al., 1998).

Uma vez que o vírus tenha penetrado no citoplasma ele é capaz de se associar a proteínas celulares para transitar ao longo de microtúbulos em direção ao núcleo o que se dá por intermédio de proteínas motoras como a dineína (ENGELKE et al., 2011). A entrada do genoma viral no núcleo da célula é mediada pela interação da proteína hexon com proteínas do complexo do poro nuclear (NPC), CAN/Nup214, que ancoram a partícula viral ao poro, iniciando o desnudamento (TROTMAN et al., 2001). A interação entre capsídeo-proteína nuclear pode ser auxiliada por duas outras proteínas: Hsp-70 (proteína de choque térmico 70KDa) e Histonas classe H1. Foi sugerido que Hsp-70 desempenha um papel na desmontagem do capsídeo e liberação do genoma viral para permitir a importação nuclear (SAPHIRE et al., 2000) e que a Histona H1 liga-se ao *hexon* contribuindo para a importação nuclear do DNA viral (TROTMAN et al., 2001)

### **Transcrição gênica e Tradução de proteínas:**

Uma vez que o genoma viral tenha sido transportado para o núcleo, a transcrição dos genes iniciais é direcionada para alcançar três objetivos principais: 1- a célula hospedeira deve ser estimulada a entrar na fase S do ciclo celular para proporcionar um ambiente adequado para a replicação viral; 2- a célula deve ser protegida da resposta

imune do hospedeiro; e 3- as proteínas virais produzidas devem ser usadas, juntamente com as proteínas celulares, para a replicação do DNA viral.

Como já referido, os primeiros genes a serem transcritos são os constituintes da unidade de transcrição inicial, sendo o primeiro destes o gene E1A, cujos produtos ativam a transcrição dos outros genes da unidade como o gene E1B, cujo produto bloqueia o transporte de mRNA da célula hospedeira com conseqüente inibição da tradução de proteínas celulares possibilitando que mRNAs tardios virais sejam sintetizados, transportados para o citoplasma e traduzidos (BLANCHETTE et al., 2008). Uma vez produzidas, as proteínas codificadas pelo gene E2, a DNA polimerase, proteína pré-terminal e proteína de ligação ao DNA, atuarão na replicação do DNA viral (LIU et al., 2003).

A fim de realizar e concluir com êxito o ciclo infeccioso, os adenovírus possuem proteínas responsáveis pelo controle da resposta imune do hospedeiro que são codificadas pelo gene E3. Por sua vez, as proteínas expressas pelo gene E4 são importantes para a replicação do DNA viral, aumentando a expressão dos genes tardios e inibindo expressão celular, a fim de facilitar a exportação nuclear dos mRNAs virais, enquanto simultaneamente inibem a exportação da maioria dos transcritos celulares (FLINT; GONZALEZ, 2003). Durante a fase tardia do ciclo viral, os mRNAs virais são traduzidos e os polipeptídeos virais são imediatamente liberados dos ribossomos e transportados ao núcleo para a formação da partícula viral (RUSSEL, 2000).

### **Replicação do DNA viral:**

A velocidade da replicação do DNA do HAdV depende do sorotipo do vírus, do tipo de célula e do número de partículas virais infecciosas (m.o.i). Resultante a essas variáveis, tem sido visto que para HAdV-5 quando da infecção de células HeLa com um m.o.i. de cinco partículas infecciosas por célula ocorre as seguintes etapas: detecção da expressão dos genes de transcrição inicial a 4h após a infecção (PI); replicação do DNA em 10h PI; produção de proteínas estruturais em torno de 18 h PI; e a liberação de partículas infecciosas em torno de 30 horas (SHENK, 2001).

A replicação do DNA de HAdV é o resultado de uma interação organizada entre proteínas virais e fatores de transcrição nucleares (NF I, NF II, NFII/ Oct-1) que ocorre dentro do denominado sítio de replicação (HAY et al., 1995). O DNA de adenovírus contém regiões terminais repetitivas (ITRs), que atuam como origens de replicação. A

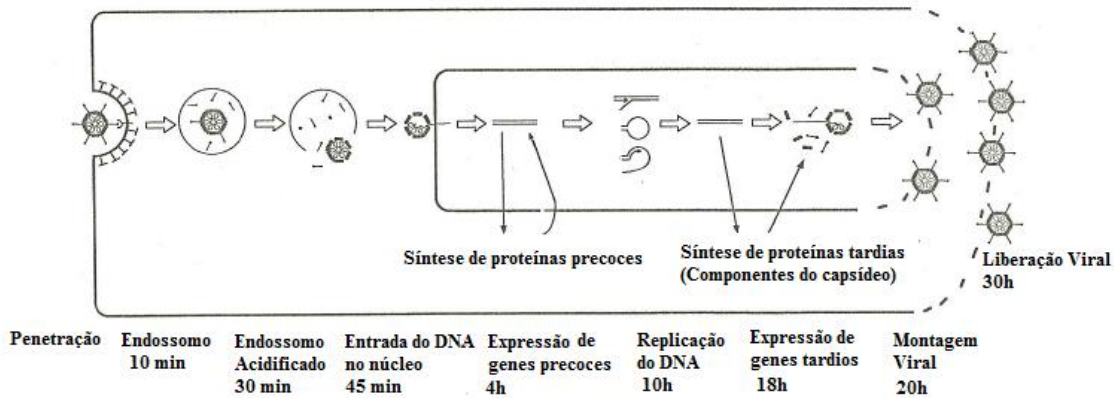
extremidade 5' de cada cadeia do DNA é covalentemente ligada a TP, que é sintetizada em forma precursora, pTP, e nessa forma atua como um iniciador para a replicação do DNA viral (VAN DER VLIET, 1995). Para que ocorra a replicação, a DBP e a TP estabilizam o complexo pré-iniciação no núcleo para que haja a elongação do DNA onde há requerimento da DBP e a topoisomerase celular com função de mediar e manter dsDNA desenrolado, passo importante para que a DNA-pol possa iniciar a síntese de outro genoma viral (OSTAPCHUK; HEARING, 2003).

No interior do núcleo, ocorrem as seguintes etapas: formação dos capsômeros com subsequente formação do capsídeo e incorporação do DNA viral no seu interior (RUSSEL, 2000). Para o processo admite-se inicialmente a formação de capsídeos vazios quando então são inseridas as moléculas de DNA. De modo geral, as regiões repetitivas devem estar localizadas próximas ao final do genoma para mediar a encapsidação do DNA (OSTAPCHUK; HEARING, 2003). No processo, as proteínas sintetizadas no citoplasma são transportadas para o núcleo, onde ocorre a formação dos capsômeros pela junção de subunidades monoméricas dos diferentes polipeptídeos. Após a formação das faces do icosaedro, pelo agrupamento das proteínas pII e pIX em unidades monoméricas e estabilização da estrutura pelas proteínas pIIIa, pVI e pVIII, ocorre a trimerização da fibra que se insere na base. Então o DNA genômico é inserido dentro do capsídeo o qual é acabado com a colocação dos pentons nos vértices (HORWITZ, 2001).

A montagem de novos vírus é acompanhada por grandes mudanças na arquitetura nuclear e da permeabilidade da membrana nuclear (RAO et al. 1996). Isto ocorre para facilitar a saída dos vírus para o citoplasma seguido da desintegração da membrana plasmática para que haja a liberação dos vírus da célula (RUSSEL, 2000). Alguns processos têm sido admitidos que facilitem a liberação do vírus das células infectadas e a sua propagação para outras células. No contexto, ao final do ciclo infeccioso a protease viral L3-23K cliva a queratina celular K7 e K18 o que gera uma proteína "decapitada" que não é capaz de polimerizar e formar filamentos e ao invés disso, ela se acumula em aglomerados citoplasmáticos (CHEN et al., 1993). As redes de queratinas e de outras proteínas dos filamentos intermediários ajudam a manter a integridade mecânica da membrana da célula (WINDOFFER et al., 2011).

O segundo sistema que facilita a liberação da progênie viral envolve a proteína E3-11,6 kDa. Esta proteína, que é também referida como a proteína morte de adenovírus (ADP), mata as células quando se acumula durante a fase tardia da infecção (JEULIN et

al. 2011). Adenovírus da espécie F (HAdV-40 e HAdV-41) não expressam esta proteína e neste sentido a não observação de lise celular por estes vírus tem sido admitido em função da não expressão desta quando da infecção. A figura 3 sumariza o ciclo de replicação dos adenovírus.



**Figura 3:** Representação esquemática do ciclo de replicação dos adenovírus (RUUSKANEN et al., 1997 - modificado).

### 1.1.5 Patogenia e sintomatologia

As possíveis consequências para a relação célula/ hospedeiro resultantes da infecção viral são:

**Infecção produtiva:** Geralmente ocorre em células epiteliais onde o vírus completa seu ciclo de multiplicação e em geral levando a morte celular com liberação de novos vírus (RUSSEL, 2000); **Infecção latente:** O vírus persiste de uma forma “não infecciosa” com períodos intermitentes de reativação (GARNETT et al., 2009); e **Transformação celular:** neste tipo de interação pode haver ou não integração do genoma viral ao da célula hospedeira e em geral a transformação ocorre pela desrepressão de um gene celular ou pela repressão de uma proteína celular reguladora. Processo oncogênico resultante da infecção por adenovírus tem sido visto em animais de experimentação (roedores) e este tem sido admitido em função da interação da proteína retinoblastoma celular com produtos do gene E1A do vírus (RUSSEL, 2000; CAO et al., 2007)

A eficácia da transmissão de HAdV para um indivíduo suscetível varia entre os sorotipos embora o contato próximo seja considerado essencial para a propagação de uma pessoa para outra. Assim a transmissão de HAdV pode se dar a partir de gotículas de aerossol em suspensão ou por fômites contaminados, considerando os vírus com tropismo respiratório ou conjuntivo e, neste caso, a infecção em geral se inicia a partir

das vias aéreas superior e conjuntiva, respectivamente. No caso dos adenovírus entéricos, a transmissão é admitida ocorrer pela rota fecal-oral. (GINSBERG, 1999).

Desta forma, diferentes sítios do organismo suportam a replicação de HAdV sendo os principais o trato respiratório, o gastrointestinal e a conjuntiva e, menos frequentemente, a bexiga, fígado, pâncreas, coração e sistema nervoso central (CARTER et al., 2002, FILHO et al., 2007, LEMA et al., 2005). As infecções mais comuns são as respiratórias causadas principalmente pelas espécies C e B (KAJON et al., 2007, LOUIE et al., 2008). Sorotipos da espécie B são também relacionados a infecções do trato urinário e sorotipos da espécie D têm tropismo ocular bem como os da espécie E. Sorotipos da espécie A são relacionados a infecção do trato respiratório mas são também encontrados no trato gastrointestinal, enquanto sorotipos da espécie F (40 e 41) e G têm o tropismo apenas para este trato (JONG;OSTERHAUS, 2008; KAJON et al. 2007).

Neste contexto, em termos de sintomatologia, os HAdVs podem levar a diferentes quadros clínicos incluindo doenças do trato respiratório inferior e superior, conjuntivite e gastroenterite além de cistite e meningoencefalite (CARTER et al. 2002, FILHO et al., 2007, LEMA et al., 2005). Ainda, quando da infecção em indivíduos recém-natos estes podem levar a doença disseminada, frequentemente fatal (RUUSKANEN et al., 1997), além de poderem trazer transtornos graves a transplantados (ECHAVARRÍA, 2008; HOFFMAN, 2009).

Considerando as vias aéreas, os HAdV causam infecção tanto da via superior quanto da inferior principalmente em crianças na faixa etária entre seis meses e cinco anos de idade sendo no entanto a maioria das infecções da via superior são de pequena gravidade e autolimitada e em geral, indistinguível daquelas causadas por outros vírus. A amigdalite é o achado mais característico destas infecções, frequentemente acompanhada de exsudato (DOMINGUEZ et al., 2005). Quando da infecção da via inferior os quadros clínicos principais são a pneumonia, bronquite, bronquiolite e laringotraqueobronquite (HONG et al., 2001). A pneumonia causada por estes vírus tem como sintomas tosse, febre, dispnéia, alterações à ausculta pulmonar, incluindo crepitações, o que torna difícil a distinção de pneumonias de outras etiologias. Este quadro pode estar associado à infecção disseminada envolvendo o coração, fígado, rins e sistema nervoso central. A taxa de mortalidade pode chegar a 30% (LARRAÑAGA et al., 2000).

Considerando a infecção do sistema ocular tem-se como doença clínica a ceratoconjuntivite que tem como sinais clínicos importantes o lacrimejamento, edema palpebral que ocasionalmente pode deixar cicatrizes na córnea (RAJAIYA, 2006).

Adenovírus como patógeno oportunista, pode causar uma variedade de doenças em pacientes imunocomprometidos, situação em que o indivíduo é incapaz de desenvolver uma resposta imune satisfatória. Esta condição ocorre quando um ou mais componentes do sistema imune se encontra alterado, resultante de situações subjacentes, tais como em casos de transplantes onde se necessita terapia imunossupressora com fármacos citotóxicos, uso de corticosteróides, terapia por radiação bem como em função de agentes virais imunossupressores (HIV- AIDS) além de outros processos de injúria para o organismo como queimaduras graves (WALLS et al. 2003).

Considerando os transplantados, o sucesso do transplante depende do controle de complicações eventuais, incluindo infecções, no período pós-transplante onde tem sido visto que a taxa de infecção por esses vírus varia de 5% a 47%, dependendo da idade do paciente, regime de condicionamento, o método de diagnóstico utilizado bem como da amostra clínica analisada (ECHAVARRÍA, 2008)

A gastroenterite causada por adenovírus resulta em lesões no trato gastrointestinal que levam a atrofia e descamamento das vilosidades e hiperplasia das criptas, com subsequente má-absorção e perda de fluidos, água e eletrólitos (TIEMESSEN; KIDD, 1995). As manifestações clínicas mais comuns são diarreia, febre e vômitos (RUUSKANEN, 1997) e, em geral, o quadro é de gravidade moderada, embora haja relato de óbito. Por outro lado, nenhum achado clínico em especial diferencia a gastroenterite por HAdV daquela induzida por outros vírus, exceto pela duração média da diarreia que é de três a onze dias, significativamente maior que a induzida por rotavírus (REINA et al., 1994). O quadro 2 sumariza as diferentes síndromes relacionadas aos HAdV considerando os diferentes sorotipos.



**Quadro 2-** Distribuição dos sorotipos de HAdVs em relação às síndromes clínicas.

<b>Espécie</b>	<b>Sorotipo</b>	<b>Síndromes clínicas</b>
<b>A</b>	12, 18, 31	Doenças do trato respiratório, urinário e gastrointestinal
<b>B</b>	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55	Doença de conjuntiva, respiratória, urinária e do sistema nervoso central
<b>C</b>	1, 2, 5, 6,	Doenças respiratórias e do trato gastrointestinal
<b>D</b>	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56	Doença de conjuntiva
<b>E</b>	4	Doenças do trato respiratório e de conjuntiva
<b>F</b>	40, 41	Doença do trato gastrointestinal
<b>G</b>	52	Doença do trato gastrointestinal

### 1.1.6 Epidemiologia

HAdV ocorre em todo o mundo de forma endêmica podendo no entanto levar a surtos epidêmicos. Tem sido visto que entre os sorotipos responsáveis por infecção respiratória os sorotipos 1, 2, 5 e 6 são geralmente endêmicos enquanto que os tipos 4, 7, 14 e 21 causam pequenas epidemias (RUUSKANEN, et al.,1997). Além disso, os sorotipos 8, 19 e 37, que causam infecções oculares, são frequentemente endêmicos em países em desenvolvimento com condições de higiene precária (AOKI et al., 1994; CHANG et al., 2003).

Os adenovírus têm sido associados a casos de diarreia infantil com índices que variam de 3,1 a 13,5% em países da África, Europa, Ásia, América do Norte e do Sul (BROWN, 1990; GRIMWOOD et al. 1995). Dos sorotipos que infectam o trato gastrointestinal, 40 e 41 ocorrem endemicamente em todo o mundo (TSUNG-PEI et al 2012; UHNOO, 1984 ). As infecções por estes vírus (40 e 41) são mais comuns em crianças com idade entre seis meses e cinco anos de idade embora possam infectar indivíduos de todas as faixas etárias (COOPER et al., 2000).

Considerando a população infantil, a gastroenterite é uma das principais causas de morbidade em todo mundo. Estudos mostram positividade para adenovírus em 8% dos casos de diarreia aguda infantil em hospitais e ambulatórios clínicos (MA; HEARING, 2011). Assim, estudo realizado na Ásia (Japão, Coréia e Vietnã) a partir de 3.577 amostras de fezes de bebês e crianças com quadro de gastroenterite aguda mostrou que no Japão, Coréia e Vietnã, uma positividade média de 4,4%, sendo a taxa maior na Coréia (8,7%), seguido de 5,0% no Japão e 2,8% no Vietnã. Observou-se que 63% dos isolados era HAdV-41(LI et al. 2005). Na África do sul estudo realizado com 616 amostras fecais coletadas de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda mostrou que 6,5% das amostras eram positivas sendo a maior prevalência para sorotipos da espécie F (10,1%) (MOORE et al. 2000).

No Brasil, na região Norte, estudo realizado em Belém, Pará, mostrou que de 380 amostras fecais provenientes de crianças menores que 3 anos de idade, 6,3% eram positivos para HAdV e que os sorotipos 40 e 41 estavam presentes em 3,7% das amostras analisadas (MULLER et al. 2010). Na região Nordeste, estudo realizado em São Luis, Maranhão, com 245 amostras diarréicas e não diarréicas, os HAdV foram detectados em 8,6% das amostras sendo que os adenovírus entéricos estavam presentes em 3,3% das amostras (FERREIRA et al. 2004). Na região Sudeste durante um estudo feito com um total de 3.060 amostras de fezes, 61 (2%) foram positivas para adenovírus, das quais HAdV-40 e 41 foram responsabilizados por 62% e 38% dos casos, respectivamente (FILHO et al., 2007).

Adenovírus tem também sido investigado no contexto ambiental. Assim, na região Sul (Santa Catarina), amostras coletadas de água do mar foram avaliadas quanto à presença de adenovírus bem como de outros vírus como poliomavírus, hepatite A e norovírus tendo sido observado que de 132 amostras analisadas, 55% foram positivas para HAdV (MORESCO et al. 2012), o que levou à sugestão de o agente se constituir em importante indicador de contaminação ambiental.

Na região Centro Oeste (Campo Grande, MS), estudo realizado com crianças hospitalizadas de até três anos de idade com gastroenterite aguda mostrou positividade para adenovírus em 3,6% das amostras fecais analisadas (ANDREASI et al. 2008). Índice menor de detecção (2,1%) foi observado na cidade de Goiânia, Goiás, por análise de 557 amostras fecais de crianças hospitalizadas com até cinco anos de idade, (CARDOSO et al. 1992). Estudo posterior visando caracterização molecular de amostras de adenovírus mostrou que de 39 amostras, 30 (76,9%) foram classificados

como espécie F, seis (15,4%) espécies C, duas (5,1%) eram espécie A e uma (2,6%) mostrou padrão misto F e C. Quando se procedeu à definição de sorotipos foi observado que 14 (41,2%) amostras eram HAdV-41, 15 (44,1%) HAdV-40 e cinco (14,7%) eram HAdV-5 (FREITAS et al. 2010).

### 1.1.7 Resposta do hospedeiro à infecção por adenovírus

O organismo humano conta com diferentes estratégias para se proteger contra a invasão de patógenos. No decurso da infecção por HAdV, tem-se, tem-se as respostas imunes denominadas inata e adaptativa. Com relação à defesa inata tem-se a liberação de peptídeos antimicrobianos a partir de células epiteliais os quais são denominados defensinas e que podem proporcionar significativa proteção contra infecção por estes vírus. No entanto tem sido visto que as  $\alpha$ -defensinas podem neutralizar sorotipos de HAdV das espécies A, B, C e E, mas não das espécies D e F (SMITH; NEMEROW, 2008; SMITH et al. 2010a). Admite-se que a neutralização do vírus depende da ligação das defensinas nas proteínas fibra e/ou *penton*-base mas, adicionalmente, as defensinas ligam-se a partículas de HAdV fora da célula e assim também podem restringir a liberação do vírus das vesículas endocíticas (SMITH et al. 2010b).

Outros mecanismos de defesa inata envolve o recrutamento de macrófagos, ativação do sistema complemento e das células natural *killer* que também desempenham papel importante no combate à infecção por HAdV (RUSSELL, 2000). Foi observado, a partir de modelos animais, que macrófagos alveolares e células de Kupffer são importantes para a eliminação de HAdV do pulmão e do fígado (TULLIS et al., 1992; O'HARA et al., 2009). Admite-se que essas células reconhecem o vírus rapidamente e secretam citocinas inflamatórias, tais como TNF e interleucinas 6 e 8 (IL-6,8) (O'HARA et al., 2009).

A resposta imune celular para os adenovírus é basicamente efetuada por linfócitos T citotóxicos CD8+ e linfócitos T auxiliares CD4+ (LEEN et al., 2004; RUSSEL, 2000). Os linfócitos TCD8 atuam no reconhecimento do antígeno viral (hexon) quando os mesmos estão associados com moléculas MHC classe I, podendo resultar na lise celular, eliminando assim as células infectadas ainda numa fase inicial, antes que o vírus possa completar o seu ciclo infectivo (MOLINIER-FRENKEL et al., 2002; RUSSEL, 2000).

A função dos linfócitos TCD4 parece ser mediada pelo reconhecimento de epítopos antigênicos virais associadas a moléculas MHC-classe II que liberam citocinas responsáveis por estimular a proliferação de linfócitos B, responsáveis pela produção de imunoglobulinas, resposta imune (RUSSEL, 2000). Neste sentido, a resposta imunológica adaptativa humoral é um importante componente da estratégia de defesa do hospedeiro e depende da capacidade das células B de produzir imunoglobulinas, reconhecendo de antígenos do vírus, importante para neutralizar a infecção pelo vírus de forma eficiente. Dessa forma, anticorpos neutralizantes para adenovírus são dirigidos contra epítopos da fibra e da base penton. Os antígenos do hexon também induzem anticorpos neutralizantes e estes parecem funcionar inibindo a adsorção viral (HARVEY et al., 1999). Assim, em termos clínicos, os anticorpos são importantes para avaliar a resposta do paciente quando da suspeita de infecção por adenovírus (BALS et al. 1999) sendo que os neutralizantes são duradouros e conferem proteção à reinfeção pelo mesmo sorotipo de vírus (RUSSEL 2000).

Algumas proteínas de adenovírus interagem com o sistema de defesa celular. As proteínas codificadas pela unidade de transcrição E3 podem proporcionar proteção contra a resposta antiviral do hospedeiro (HANSEN, BOUVIER 2009; LICHTENSTEIN et al., 2004; LUKASHOK, HORWITZ 2006). Em estudos realizados com HAdV-2 ou HAdV-5 foi observado que a proteína 19KDa se liga ao MHC-I, impedindo-o de ser transportado para a superfície celular levando conseqüentemente a morte das células infectadas com HAdV por Linfócito T citotóxico (Arnberg, 2009). A redução da expressão de MHC-I poderia tornar as células infectadas por adenovírus susceptíveis a morte pelas células assassinas naturais (NK). A E3-14.7KDa inibe o TNF e modula a atividade de NF-kB, bloqueando a apoptose (Li et al. 1999).

Arnberg N. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev Med Virol* 2009;19:165–178.

Hansen TH, Bouvier M. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nat Rev Immunol* 2009;9:503–513.

Li Y, Kang J, Friedman J, et al. Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF-kB activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor a-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1042–1047.

Lichtenstein DL, Toth K, Doronin K, et al. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int Rev Immunol* 2004;23: 75–111.

Lukashok S, Horwitz MS. Adenovirus persistence. In: Ahmed R, Chen I, eds. *Persistent Viral Infections*. Chinchester, UK: John Wiley & Sons; 2006:147–164.

### **1.1.8 Métodos para estudo dos adenovírus:**

O diagnóstico clínico é insuficiente para diferenciar a infecção causada por HAdV ou por outros patógenos sendo desta forma necessário o diagnóstico laboratorial virológico, que pode ser realizado por diferentes métodos. A escolha do método depende do espécime coletado que depende do local principal da infecção de modo a permitir resultado rápido e acurado.

Diferentes procedimentos podem ser utilizados para o diagnóstico laboratorial de HAdV o que inclui o isolamento do vírus, a detecção de antígenos e ácido nucleico além de anticorpos específicos. Ademais, estes agentes podem ser completamente caracterizados o que inclui a definição da amostra infectante, resultante do sequenciamento genômico seguido de análise filogenética, bem como pelo perfil de proteínas quando da infecção na célula hospedeira.

#### **Tipos de métodos:**

##### **1- Cultivo e isolamento viral:**

Para o isolamento de HAdV tem sido bastante utilizado culturas celulares que possuem permissividade para replicação destes vírus dentre as quais se incluem linhagens de células contínuas de natureza epitelial, como as células HeLa (Carcinoma de cérvix uterino humano), A-549 (Carcinoma de pulmão humano), HEK-293 (rim de embrião humano), KB (Carcinoma epidermóide humano) e HEP-2 (Carcinoma de laringe humana) (MAUTNER, 2007). Além disso, espécimes clínicos bastante utilizados incluem exudatos de nasofaringe, nariz e garganta, material fecal, material de conjuntiva, fluido cerebrospinal, sangue e urina, bem como material de biópsia.

A replicação do vírus em cultura celular pode levar a mudanças morfológicas, visualizadas por microscopia óptica, as quais são denominadas efeito citopático (ECP). Em geral, o ECP por adenovírus consiste no arredondamento das células podendo chegar a uma estrutura em forma de cacho de uva, além de inclusões nucleares. Alguns

sorotipos levam a lise das células infectadas deixando restos ou *debris* celulares. Admite-se que o ECP por adenovírus seja resultante do estágio final da infecção, quando o DNA viral, mRNA e proteínas virais estão sendo produzidas em grandes quantidades com conseqüente montagem do vírus no núcleo da célula. Para a maioria dos sorotipos o ECP ocorre em dois a sete dias, mas, para os sorotipos da espécie D este é mais demorado, até 28 dias (ARMSTRONG;PEREIRA, 1960; LIPSON et al., 1993).

A cultura celular, além de permitir o isolamento viral, possibilita a propagação viral que leva ao aumento do número de partículas, potencializando a caracterização do agente. Neste sentido tem-se também a possibilidade da visualização da partícula viral através da microscopia eletrônica ou imunomicroscopia eletrônica (ECHAVARRÍA, 2008).

## 2- Detecção de antígeno viral:

Os adenovírus podem ser detectados a partir do antígeno grupo-específico do hexon ou da fibra, o qual é compartilhado por todos os adenovírus humanos, caninos, suínos e bovinos (CEPKO et al., 1983). Anticorpos monoclonais ou policlonais dirigidos contra esses antígenos são usados para a detecção direta de HAdV a partir de espécimes clínicos. Diferentes metodologias têm sido utilizadas para detecção de antígenos de HAdV, o que inclui a imunofluorescência indireta (IF), soroneutralização (SN), inibição da hemaglutinação (IH), ensaio imunoenzimático (EIA), imunocromatografia (IC) e aglutinação em látex (AL) (AUGUST et al., 1987, GLEAVES et al., 1993, FUJIMOTO et al., 2004 ).

## 3- Detecção de ácido nucleico:

Diferentes procedimentos podem ser utilizáveis para detecção do DNA de HAdV. Um procedimento bastante utilizado é a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), que permite identificar qualitativamente o DNA viral. O PCR em tempo real por sua vez, permite quantificar o DNA viral amplificado, bastante útil principalmente em casos da doença disseminada e sempre que a quantificação do número de cópias genômicas virais seja recomendado como por exemplo em estudos de desinfecção viral.

A PCR permite a detecção viral a partir da amplificação de um pequeno número de cópias do DNA viral. No contexto, dependendo da região alvo do DNA a ser amplificado é possível a distinção entre espécies e sorotipos (XU et al., 2000). Por esta

metodologia, a definição de espécies tem sido feita pela utilização de iniciadores desenhados a partir da região do *hexon* (WU et al.1992) e para definição de sorotipos têm sido utilizados iniciadores desenhados para a região da unidade de transcrição inicial sendo que para HAdV-40 e HAdV-41 são bastante utilizados iniciadores desenhados para região E1B ( ALLARD et al 1992). O procedimento que reitera e complementa o ensaio de PCR é o de sequenciamento genômico seguido da análise filogenética que permite ainda comparar a amostra identificada a outras circulantes em diferentes partes do mundo (GRAY et al. 2007).

Outro procedimento utilizável para identificação do DNA viral é pelo uso de enzimas de restrição, o denominado ensaio de polimorfismo de fragmentos de DNA (RFLP) seguido à amplificação ou não do DNA viral (LERUEZ-VILLE et al. 2004, SAITOH-INAGAWA et al. 1996 ). Esta metodologia permite também a determinação de sorotipos de HAdV tendo como parâmetro a fragmentação do DNA viral por enzimas de restrição, que podem reconhecer e cortar o DNA onde quer que ocorra uma pequena sequência específica. Os fragmentos de DNA resultantes são então separados por tamanho através da eletroforese em gel de agarose e comparados a padrão de cortes específicos. Os fragmentos obtidos podem ademais serem transferidos para membrana de nitrocelulose, marcados com sonda, radioativa ou não, e visualizados em procedimento de hibridização molecular (SAITOH-INAGAWA et al., 1996). Quando da amplificação prévia do DNA viral pela PCR a metodologia resultante é denominada PCR-RFLP (SAITOH-INAGAWA et al. 1996, LI et al 2005).

#### 4- Avaliação da relação HAdV-célula por análise Proteômica:

A relação adenovírus-célula hospedeira pode ser avaliada pela análise da expressão de proteínas celulares induzidas pela infecção viral. Este procedimento é denominado análise proteômica o que pode permitir a compreensão da interação vírus-célula na perspectiva do entendimento dos processos celulares, metabólicos e reguladores, o que pode resultar também na melhor compreensão da patogenia viral.

### **1.2.0 Proteômica**

A proteômica é o estudo do conjunto de proteínas e suas isoformas contidas em uma amostra biológica. Historicamente, a proteômica surgiu no final de 1970 quando os pesquisadores começaram a criar as bases de dados para proteínas, usando naquela

época a técnica de eletroforese bidimensional (O'FARREL, 1975). O termo proteoma foi proposto por Wilkins e Willians em 1994, significando o conteúdo de proteínas expressas por um genoma ou, no caso de organismos multicelulares, ao complemento protéico expresso por um tecido ou células diferenciadas (WILKINS et al., 1996).

Enquanto o genoma de um organismo individual é essencialmente estático, o proteoma observado em uma única célula é extremamente dinâmico e variável, dependente do estado da célula. Assim o proteoma não é estacionário, mudando com o desenvolvimento do organismo e com qualquer mudança no seu ambiente e desta forma a análise proteômica permite observar a expressão de um gene, a concentração relativa do produto e as modificações que podem ocorrer nas proteínas após a sua síntese (GALDOS, 2009). Assim a proteômica é ferramenta apropriada para o entendimento da expressão de genes pois permite a análise de seu produto final. No contexto, a investigação de produtos dos genes é estratégia para estudo de doenças bem como de problemas biológicos complexos (PANDEY;MANN 2000).

A metodologia de proteômica permite documentar a distribuição geral de proteínas da célula, identificar e caracterizar proteínas individuais de interesse e principalmente elucidar as suas associações e funções. Sendo assim, o estudo da proteômica permite: (1) a descoberta de vias metabólicas nas diversas etapas celulares, contribuindo com novos conhecimentos na bioquímica; (2) a identificação de novas moléculas em extratos biológicos naturais, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos; (3) a identificação e caracterização de marcadores biológicos como moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico e assim extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da sua evolução e frente ao tratamento (CASH, 2002).

A Proteômica tem assim larga aplicação. No contexto do estudo de doenças pode proporcionar melhoria no entendimento do funcionamento da célula de um indivíduo doente em relação a um indivíduo saudável, tendo como premissa o fato de que muitos dos processos celulares, tendo como base o perfil proteico do indivíduo, podem ser relacionados a determinadas doenças (LE NAUR, 2001). Neste contexto também em estudo do câncer, pode-se fazer uma comparação do perfil proteico de uma célula cancerosa com o de uma célula sadia, ou de uma célula cancerosa cujo portador está sob tratamento médico (GONZALES-BUITRAGO, 2007; PETRICOIN et al., 2004).

A metodologia também tem sido útil em estudos de desenvolvimento de medicamentos considerando que as drogas podem produzir efeitos na expressão de



proteínas e assim o padrão de mudança proteico após a aplicação da droga fornece informação a respeito do seu mecanismo de ação (MYERS et al., 1997).

Na área da agronomia, a proteômica tem sido utilizada com a finalidade da identificação de proteínas de plantas com atividade inseticida (BERNAL et al., 2006) bem como das proteínas relacionadas ao mecanismo de resistência das plantas a pragas ou a microrganismo patogênicos ( ROCHA et al., 2007).

Em termos da microbiologia, a proteômica tem sido utilizada tendo com o objetivo de estudar a relação patógeno–hospedeiro. Assim diferentes microrganismos têm sido estudados como por exemplo as bactérias *Mycobacterium tuberculosis* (DENG et al. 2014) e *Helicobacter pylori* (JUNGBLUT et al., 2010), parasitos, *Plasmodium falciparum* (FLORENS et al., 2002) e vírus, Hepatite C (DIAMONT et al., 2010), Hepatite E (SHEN et al., 2014), Hepatite D (MENDES et al., 2013), Influenza H1N1 (COOMBS et al., 2010) e H5N1 (Liu et al., 2012) e Dengue-2 (PANDO-ROBLES et al., 2014, PATTANAKITSAKUL et al., 2007), além de HadV-5 (LAM et. al., 2010).

Em termos de técnica, a proteômica faz uso de duas plataformas metodológicas, que se complementam. A primeira plataforma tem com meta a separação dos componentes a serem analisados com o objetivo de facilitar o poder de resolução da segunda plataforma. As técnicas comumente usadas na primeira plataforma são a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D -PAGE) além de técnicas de cromatografia líquida (CL), de fase reversa (CLRF) e de troca iônica (TI). A segunda plataforma visa a caracterização dos compostos separados na primeira plataforma sendo a espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) considerada como metodologia adequada, (GALDOS, 2009).

### **1.2.1 Eletroforese bidimensional (2D):**

A eletroforese é uma técnica de separação de moléculas, tendo como base a sua migração por um campo elétrico. Em termos proteicos, a velocidade de migração de uma determinada proteína depende da intensidade do campo, da sua carga líquida e do coeficiente de atrito. No processo, a separação é feita em gel, geralmente de poliacrilamida, devido ao fato de os componentes serem quimicamente inertes e ao tamanho homogêneo dos poros formados (STRYER, 2004).

A eletroforese bidimensional foi inicialmente desenvolvida por O'Farrell e Klose em 1975 (KLOSE, 1975; O'FARRELL, 1975). Em géis bidimensionais, os

polipeptídeos, após coloração, aparecem sob forma de manchas (*spots*). Os *spots* podem conter isoformas de uma mesma proteína com diferentes especificidades de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM). Esta técnica pode ser usada para a obtenção de perfis bidimensionais completos de uma amostra como também para estudos comparativos entre amostras e assim o aparecimento ou desaparecimento de *spots* pode fornecer informações acerca de proteínas específicas de um determinado estágio enquanto a intensidade destes fornece informações quantitativas a respeito da expressão diferencial dos polipeptídios (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

Para separação de proteínas por eletroforese bidimensional, as moléculas devem ser inicialmente adequadamente extraídas do material biológico, sendo esta etapa crucial para obtenção de bons resultados. Em função da variedade de tipos e origens de amostras biológicas, o procedimento de extração necessita de otimização individual. Não obstante, na maioria dos casos as proteínas precisam ser solubilizadas, desnaturadas e submetidas a tratamento com agentes redutores de pontes dissulfeto (BARBOSA et al 2012).

No procedimento, as proteínas são separadas em duas dimensões: na primeira a separação se dá em função do seu pI e na segunda de acordo com o seu PM (CHROMY et al., 2004). Na primeira dimensão, denominada focalização isoelétrica (IEF), as moléculas migram no gel em forma de tira, com gradiente de pH imobilizado (IPG-immobilize pH gel) (BJELLQVIST et al., 1982) ou pelo uso de tampões anfotéricos (O'FARRELL, 1975) até atingirem um ponto de pH no qual sua carga é igual a zero. As tiras dos géis são feitas pela copolimerização da acrilamida com substância contendo tamponantes ácidos e básicos como o reagente comercial Immobiline™. Na segunda etapa, as proteínas são submetidas a SDS-PAGE e então são separadas de acordo com sua massa molecular. As proteínas são aplicadas no topo de um gel de poli(acrilamida) e submetidas a uma corrente elétrica, fazendo com que elas migrem através da malha de acrilamida em direção ao pólo positivo. Dependendo do seu tamanho, cada proteína se moverá diferentemente sendo que as proteínas menores migrarão mais rapidamente que as maiores (ROCHA et al. 2005).

Para visualização das bandas de proteínas, os géis são corados com azul de coomassie ou nitrato de prata (GORG et al., 2000, HERBERT et al. 2001). Adicionalmente pode-se proceder à digitalização das imagens dos géis com o auxílio de scanner específico, como por exemplo, o ImageScanner™ II, com posterior análise por software adequado como o ImageMaster™ 2D platinum v6.0 software.

### **1.2.2 Cromatografia Líquida (CL)**

A Cromatografia Líquida é uma técnica físico-química de separação bastante utilizada para o estudo de diferentes moléculas como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos além de outras substâncias como drogas e pesticidas. A metodologia é executada em cromatógrafo líquido o qual conta com os seguintes componentes: reservatório de fase móvel, sistema de bombeamento, sistema de injeção de amostra, colunas cromatográficas e detectores (SKOOG et al., 2002).

No procedimento, a amostra é transportada por uma fase móvel (líquida), a qual é ancorada por uma fase estacionária imiscível fixa, disposta em uma coluna ou numa superfície sólida. Os componentes da amostra que são mais fortemente retidos na fase estacionária movem-se mais lentamente no fluxo da fase móvel, enquanto os que se ligam mais fracamente movem-se mais rapidamente. Como consequência dessas diferentes mobilidades, ocorre uma separação dos componentes em bandas ou zonas (RIVIER;MCCLINTOCK, 1983).

### **Cromatografia líquida de fase reversa (CL-FR)**

A cromatografia líquida de fase reversa é uma ferramenta bastante utilizada para análise e purificação de biomoléculas sendo considerada de alta resolução. A metodologia permite separar pequenos peptídeos, grandes proteínas bem como polipeptídeos de sequências muito próximas (com diferença em apenas um aminoácido) (KUNITANI;JOHNSON, 1986). A técnica tanto pode ser usada para separação de peptídeos derivados de digestão enzimática (TEMPST et al., 1986) quanto para purificação de peptídeos naturais e sintéticos em grandes ou em pequenas quantidades (SCARBOROUGH et al., 1984).

A separação de moléculas por CL-FR envolve uma contínua partição das moléculas entre a fase móvel e a fase estacionária hidrofóbica. Quando para polipeptídeos, os quais são muito grandes para que haja partição, estes se adsorvem na superfície hidrofóbica até que a concentração de solvente orgânico na coluna atinja um valor crítico e que leve à dessorção (GENG; REGNIER, 1984). No contexto, somente uma parte da molécula do polipeptídeo, denominada “pé hidrofóbico”, fica em contato com a superfície da fase reversa, enquanto que a maior parte da molécula fica exposta à fase móvel. A metodologia consegue separar os polipeptídeos devido à sutil diferença

de carga elétrica existente na sua parte hidrofóbica em função de diferenças na sequência de aminoácidos (CARR, 2002).

### **Cromatografia de troca iônica**

A cromatografia de troca iônica é amplamente usada para purificação de polipeptídeos, pois emprega condições não-desnaturantes e próximas às condições fisiológicas. A técnica separa os polipeptídeos por interação eletrostática entre as cadeias laterais (carregadas com aminoácidos) e a superfície, também carregada, da resina de troca. A retenção leva em conta a carga total do polipeptídeo no pH da fase móvel (VYDAC, 1998). O procedimento tem como base resinas de troca iônica com caráter hidrofóbico que resulta em um modo misto de separação (interação eletrostática e hidrofóbica). Isso é possível devido aos espaços entre o substrato das partículas e o grupo responsável pela interação iônica. Para diminuir a interação hidrofóbica, a qual pode causar alargamento de picos e desnaturação do polipeptídeo, solventes orgânicos são adicionados a fase móvel (VYDAC, 1998; HOLM et al. 2005). A cromatografia de troca iônica pode ser feita tanto por troca de ânions (cromatografia de troca aniônica) como por troca de cátions (cromatografia de troca catiônica).

A metodologia de cromatografia líquida pode ser integrada com a espectrometria de massas constituindo-se em uma plataforma para análise do proteoma de um determinado organismo. Após a detecção das proteínas, o procedimento subsequente consiste em identificar as proteínas, o que pode ser feito por meio do uso da espectrometria de massas.

#### **1.2.3 Espectrometria de massas (MS)**

A espectrometria de massas (MS) surgiu no início do século XX e se tornou uma ferramenta analítica importante em pesquisa, envolvendo a identificação e/ou a quantificação de compostos orgânicos e inorgânicos. No entanto, com o desenvolvimento de técnicas de espectrometria de massas direcionadas para a análise de biomoléculas, passou a ser uma técnica analítica importante em pesquisas biológicas, como para investigação de proteoma. Ela é capaz de fornecer de modo rápido, preciso e sensível, a massa de compostos como proteínas e peptídeos (PIMENTA, 2003).

Um espectrômetro de massa é um instrumento que separa íons em movimento com base em sua relação entre a massa e a carga ( $m/z$ ) (GROSS, 2004). O equipamento utilizado compreende uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de massas e um detector. O primeiro componente é utilizado para gerar íons peptídicos ou proteicos,

geralmente transferindo prótons ( $H^+$ ) para as moléculas sem alterar sua estrutura química. O íon é acelerado por campo elétrico e separado por  $m/z$  no analisador de massas, ou então é selecionado de acordo com uma  $m/z$  previamente determinada e fragmentado em um processo denominado em *tandem* (MS2 ou MS/MS). Finalmente, os íons passam pelo detector, que é conectado a um computador com programas para análise de dados (MAY et al., 2011).

### **Técnicas para separação de íons - Ionização**

Os dois principais métodos de ionização utilizados em proteômica são: a espectrometria de massas com base na desorção e ionização das proteínas com laser, auxiliado por uma matriz (MALDI – *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*), e a espectrometria de massas baseada na ionização por pulsos elétricos em meio líquido (ESI – *ElectroSpray Ionization*) (ROCHA et al., 2005).

#### **Ionização por Electrospray (ESI)**

Em ESI todo o processo de ionização ocorre à pressão e temperatura atmosférica. No procedimento, uma solução levemente ácida ou básica contendo a amostra é bombeada a uma vazão de alguns microlitros por minuto através de um tubo capilar metálico submetido a uma alta diferença de potencial (3-5 kV) em relação ao eletrodo cilíndrico que circunda a saída do capilar. Assim, forma-se um spray com gotículas carregadas que passam através de um gás secante o que permite a evaporação do solvente e dessa forma essas gotículas tornam-se cada vez menores de modo que a densidade de carga torna-se tão alta que as moléculas aprisionadas nas gotículas são ejetadas para a fase gasosa seguindo para o analisador de íons (ARDREY, 2003).

#### **Ionização/desorção a laser assistida por matriz (MALDI)**

Na ionização do tipo MALDI, a solução contendo a amostra é misturada a uma solução supersaturada de matriz orgânica, a qual absorve forte radiação eletromagnética em um determinado comprimento de onda. A solução resultante dessa mistura é então aplicada a uma placa metálica de MALDI. Após evaporação do solvente ocorre a cristalização da amostra juntamente com o excesso de matriz. A placa é então transferida para dentro do espectrômetro e o cristal formado bombardeado por um feixe de laser de alta potência, com comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção de matriz. Essa energia é adsorvida em grande parte pela matriz, a qual esta

em excesso, e transferida de maneira branda para a amostra, resultando em íons em fase gasosa que seguirão para o analisador de massas (ZENOBI, KNOCHENMUSS; 1998).

### **Tipos de analisadores de massas**

Átomos e moléculas neutras necessitam ser ionizadas para que possam ser analisados por espectrometria de massas. Diferentes analisadores divergem em relação ao modo da aceleração dos íons e os separam de acordo com a relação  $m/z$  e não apenas em função das suas massas. As três principais características de um analisador são o limite de massa, a transmissão iônica e o poder de resolução em massa. O limite de massa significa o valor mais alto de massa que pode ser medido que é geralmente expresso em daltons (Da) para um íon de carga unitária, i.e,  $z=1$ . A transmissão é a razão entre o número de íons que chegam ao detector e os íons produzidos na fonte. O poder de resolução é a capacidade de produzir dois sinais distintos para dois íons com uma diferença de massa pequena (DE HOFFMANN et al., 1996; WATSON, 1997) e pode ser quantificado pela equação  $R=m/\Delta m$  onde  $\Delta m$  é a menor diferença de massa capaz de ser resolvida (DE HOFFMANN et al., 1996; WATSON, 1997).

Três tipos de analisadores bastante utilizados são: TOF (*Time Of Flight*- tempo de voo), quadrupolo (Qs) e o armadilha de íons (*ion trap*) (MAY et al. 2011). Nos analisadores TOF, os íons são acelerados por um potencial entre dois eletrodos e atravessam um tubo de vácuo com velocidade inversamente proporcional à sua massa. Quando os íons atingem o detector, o tempo decorrido entre a ionização e a detecção é utilizado para gerar o valor  $m/z$ . Em seguida, o detector converte o sinal da passagem do íon em sinal analógico sendo o resultado final expresso em gráfico de  $m/z$  versus intensidade (contagem de íons), referido como espectro MS (WOLLNIK, 1993). Os espectros gerados são comparados com informações disponíveis em bancos de dados como o MASCOT (PERKINS et al. 1999) e o SEQUEST (ENG et al., 1994), dentre outros, o que permite identificar a proteína de interesse.

Os analisadores quadrupolos apresentam um conjunto de quatro eletrodos em bastão que funcionam como filtros de massas. Entre esses eletrodos, um campo elétrico assegura que somente íons de uma determinada razão  $m/z$  sigam a trajetória ao detector enquanto os demais são desviados (CHERNUSHEVICH et al.; 2001).

Os analisadores do tipo *ion trap* filtram e aprisionam em um campo elétrico tridimensional íons de interesse, que são gradualmente liberados em ordem crescente de  $m/z$  (WANG et al. 1993). Um variante do analisador *ion trap* é o *orbitrap* no qual os

íons oscilam ao longo e ao redor de um eletrodo em forma de espiral. A frequência dessa oscilação é proporcional à raiz quadrada da razão  $m/z$  e pode ser determinada com alta precisão (WALTHER; MANN, 2010; HU et al., 2005).

#### 1.2.4 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Após a determinação da  $m/z$  do peptídeo, a espectrometria de massas é empregada na identificação das proteínas e quatro procedimentos têm sido bastante utilizados: Peptide Mass Fingerprint (PMF) ou *Peptide Mass Map Analysis* (Identidade de massa do peptídeo), Peptide Sequence Tag Query ou Peptide Sequence (Nomeação por etiqueta), MS/MS *Ion Search Analysis* (Análise por pesquisa iônica) e *De Novo Sequencing* (PAPPIN, 1997; MANN et al. 1993; HENZEL, 1993):

##### 1-Peptide Mass Fingerprint:

Neste procedimento, inicialmente, realiza-se a digestão enzimática da proteína a ser identificada para a produção dos seus respectivos peptídeos, seguindo-se à determinação de sua massa. As massas obtidas constituem uma espécie de impressão digital da proteína. Com auxílio de *softwares* específicos, é possível comparar essa impressão digital com aquelas geradas a todas as seqüências protéicas presentes em bancos de dados.

##### 2-Peptide Sequence Tag Query:

Para este procedimento emprega-se a espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS), a qual permite a fragmentação dos peptídeos, gerados por digestão enzimática e posterior identificação. Utilizando-se os espectros de fragmentação obtidos, pode-se conseguir, manualmente, via interpretação espectral, uma seqüência parcial de um ou mais peptídios das proteínas estudadas. Novamente, empregando-se *softwares* específicos, é possível identificar as proteínas pela comparação de uma seqüência parcial, aliada a massa total do peptídeo que gerou tal seqüência e a diferença de massa entre a seqüência parcial obtida e as porções não seqüenciadas do peptídeo, com aquelas presentes em banco de dados. Esta metodologia é considerada mais específica que a metodologia do *Peptide mass fingerprinting*.

##### 3-MS/MS Ion Search Analysis:

Por esta metodologia, espectro não interpretado seja para um simples peptídeo ou de uma série deles, podem ser comparados e quantificados pelo uso de *softwares* a partir da comparação a proteínas de banco de dados. Essa metodologia de identificação ocorre sem nenhuma interpretação manual de seqüência.

#### 4-*De Novo Sequencing*:

O procedimento envolve análise manual, assistida por *softwares*, dos espectros de MS/MS. É similar ao *Peptide Sequence tag query*, com a ressalva de que a análise manual não termina quando uma seqüência curta é obtida, uma vez que o objetivo é conseguir a seqüência total do peptídeo representado no espectro de MS/MS. Essa metodologia é empregada quando não há informações sobre a proteína, da qual o peptídeo sequenciado deriva, ou seja, quando se trata de proteína desconhecida.

Como acima referido, as três primeiras metodologias de identificação de proteínas usam *softwares* para a pesquisa em banco de dados e necessitam que a seqüência das proteínas para comparação esteja em banco de dados de boa qualidade (com dados confiáveis). Quando isso não ocorre, faz-se uso do procedimento *De novo sequencing* o qual requer espectros de MS/MS de alta qualidade. Por outro lado, as quatro metodologias apresentam alta sensibilidade.



## **2- JUSTIFICATIVA**

---

Os adenovírus são agentes causadores de diversas síndromes clínicas que são bastante relevantes para saúde pública. A importância deste vírus o tornou objeto de estudos no sentido não só da sua detecção como também de sua caracterização. Neste contexto, também em nossa região, estudos foram realizados objetivando a prevalência viral bem como a determinação da espécie e sorotipo destes vírus (FREITAS et al. 2010, ANDREASI et al. 2008, CARDOSO et al. 1992).

Por outro lado do ponto de vista da relação destes vírus com o hospedeiro pouco se sabe sobre a indução da expressão de proteínas quando da infecção da célula o que pode provocar alterações na homeostase celular. Assim, a análise da expressão protéica induzida por estes vírus é estratégia importante no sentido de proporcionar aumento da compreensão dessa relação vírus – célula.

Desta forma, a presente investigação se constituiu no primeiro estudo a ser realizado com a finalidade de analisar a expressão de proteínas diferencialmente expressas em células A-549, quando da infecção por Adenovirus da espécie F, sorotipo 40, utilizando como ferramenta a metodologia de proteômica.

### **3- OBJETIVOS**

---

- 1- Identificar proteínas diferencialmente expressas em células A-549 infectadas por HAdV, espécie F, sorotipo 40;
- 2- Relacionar as proteínas diferencialmente expressas nas células infectadas em relação às vias metabólicas da célula;
- 3- Avaliar a possível interação entre as proteínas diferencialmente expressas considerando as vias metabólicas específicas;
- 4- Correlacionar o perfil proteico induzido, nas diferentes vias metabólicas, à possível patogenicidade do vírus.

## **4- MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **4.1 Material de estudo**

Vírus: O material de estudo foi constituído de amostra de adenovírus da espécie F, sorotipo 40, previamente identificada a partir de espécimes fecais provenientes de crianças de Goiânia, menores de cinco anos de idade e que apresentavam quadro de gastroenterite aguda (FREITAS et al. 2010).

Cultura celular: Foi utilizado para o cultivo e propagação do vírus a cultura celular contínua A-549 (BCRJ-0033).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (136/12).

### **4.2 Cultivo Celular**

As células A-549 foram cultivadas em garrafas de poliestireno de 25cm<sup>2</sup> (Kasvi®) contendo meio mínimo essencial de Eagle (MEM-Gibco®) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB-Gibco®), 10.000 U/mL de penicilina e 10.000 µg/ mL de estreptomicina (Gibco®). Estas células foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> e repicadas na proporção de 1:5, a cada 5 dias, com solução de tripsina 0,25 % suplementadas com 0,5% de EDTA (Gibco®) e solução tamponada de fosfato (PBS) pH 7,4.

### **4.3 Cultivo Viral: determinação do tempo de cultivo, procedimento de cultivo e confirmação da infecção pelo vírus**

A determinação do melhor tempo de cultivo do vírus para posterior análise do perfil proteico induzido pela infecção viral foi feita por imunofluorescência indireta (IFI) utilizando anticorpos monoclonais como sistema de detecção. Foi avaliada a intensidade de infecção através do maior número de partículas fluorescentes na maior diluição. O vírus foi isolado à partir de fezes e foi confirmado que se tratava de HAdV-40. Dessa forma as células A-549 foram infectadas com inóculo de segunda passagem (amostra original) e analisadas por IFI bem como por o inóculo de cultivo de 30 horas, denominados de zero e 30 horas, respectivamente.

O procedimento para IFI seguiu preconização de Barardi et al. (1999). Assim, as células foram cultivadas durante 24 horas em câmara de 8 poços (Lab Tek, Nunc) a uma concentração de  $1,05 \times 10^5$  células/mL sendo o inóculo do vírus (200  $\mu$ L) diluído seriadamente ( $10^{-1}$  a  $10^{-14}$ ) em meio MEM. A seguir, 100 $\mu$ L de cada uma dessas diluições foi inoculado nos poços contendo a monocamada de células, procedimento feito em duplicata. Como controle negativo foi utilizado células inoculadas com meio MEM contendo 1% de soro fetal bovino. Após incubação por 1 hora, para adsorção viral, realizada em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, o inóculo foi removido quando então foi adicionado o meio de cultura. A seguir foi feita nova incubação por 72 horas nas mesmas condições anterior quando então o meio foi removido e as células lavadas com metanol gelado a -20°C (duas vezes por 5 minutos). A seguir, as células foram reidratadas com 300 $\mu$ L de PBS, mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos, e, então, adicionadas de 300 $\mu$ L da solução bloqueadora (PBS/BSA/tween-20-0,05%) com a finalidade de inibir possíveis reações inespecíficas o que foi seguido de nova incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. Após, foi adicionado 100 $\mu$ L dos anticorpos monoclonais MAB8052 (Millipore), diluídos a 1:200 na solução bloqueadora, seguido de incubação por 1 hora, também nas mesmas condições anterior.

As células foram então lavadas três vezes com 300 $\mu$ L da solução bloqueadora quando se adicionou, em ambiente escuro e sob agitação, o conjugado, anticorpo anti-IgG conjugado com FITC (Fluoresceína Isotiocianato -*Fluorescein isothiocyanate*) (Santa Cruz Biotech) diluído 1:100 em solução bloqueadora. A seguir as células foram lavadas na mesma condição anterior, secadas a temperatura ambiente e então se adicionou a solução de montagem (PBS/Glicerol/Formol/solução de NaCl 5M/DABCO) com posterior análise em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss). O título viral foi determinado através da contagem do número de células fluorescentes na maior diluição viral, sendo expresso em unidades formadora de foco UFF/mL.

Com a finalidade de análise do perfil proteico da célula infectada foi utilizado o cultivo de HAdV-40 em células A-549 com um tempo de 30 horas e célula A-549 controle. O tempo de 30 horas foi escolhido com base em estudos de cinética da replicação viral de HAdV-41(Siqueira-Silva et al., 2009), HAdV-5 (Ruuskanen et al., 1997), HAdV-2 (Greber et al., 1993) que descrevem esse tempo como sendo suficiente para término da biossíntese viral. Para o procedimento, a cultura celular A-549 com 70% a 80% de confluência foi inicialmente lavada por duas vezes com PBS pH 7,2 e posteriormente adicionada de 200 $\mu$ L do inóculo viral. Após se permitir a adsorção viral

(1 hora) foi adicionado o meio de cultura (MEM) sem soro fetal bovino. As células infectadas e não infectadas (controle negativo) foram então observadas em microscópio óptico (Carl Zeiss - Telaval) nos tempos de 0, 12, 24 e 30 horas para observação de efeito citopático (ECP). No tempo de 30 horas da infecção, as células foram colhidas através de *scraper*, centrifugadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso.

A confirmação da presença do vírus a partir da infecção nas células A-549 foi feita por PCR, realizada em duas etapas, primeira e segunda amplificação, tendo como comparação células não infectadas.

### **Extração do DNA viral: ( Vamos tirar a parte da PCR)**

Para extração do DNA de HAdV-40 a partir das células infectadas foi adicionado em tubos tipo eppendorf 500 $\mu\text{L}$  de cultivo viral, 5 $\mu\text{L}$  Proteinase K e 15 $\mu\text{L}$  de SDS 10%, seguido de agitação em vortex e incubação a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos em banho maria (BM). Após foi adicionado 500 $\mu\text{L}$  de fenol saturado ultrapuro (Invitrogen<sup>TM</sup>/ Life Technologies) e 30 $\mu\text{L}$  de NaCl 5M seguido de centrifugação a 16800 *g* por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi então transferido para outro tubo e adicionado de 500 $\mu\text{L}$  de cloroformio/álcool isoamílico (24:1) e após nova centrifugação nas condições já descritas, o sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo e adicionado de 1,0 mL de etanol absoluto gelado. O material foi incubado por 30 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  e novamente centrifugado. Finalmente foi a este adicionado 1,0mL de etanol 70%, novamente centrifugado e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi então ressuspenso com 50 $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e agitado em vortex e incubado por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  em BM. O produto foi então estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### **PCR**

A primeira amplificação do DNA de HAdV-40 foi feita utilizando o protocolo descrito por Allard et al. (1992), com os iniciadores hexAA1885 e hexAA1913 permitindo gerar um produto de 300pb. A segunda amplificação foi feita por *Nested-PCR*, utilizando o par de iniciadores nexAA1893 e nexAA1905 gerando um produto de 142pb conforme descrito por Puig et al. (1994). As sequências dos iniciadores utilizados estão descritas no quadro 3.

Para a primeira amplificação foi utilizado uma mistura de reação para um volume final de 25 $\mu\text{L}$ : 14,95 $\mu\text{L}$  de água MiliQ; 2,5 $\mu\text{L}$  do tampão da enzima; 0,75 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  15mM; 0,5 $\mu\text{L}$  desoxinucleotídeos trifosfatado (dNTPs); 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq DNA

polimerase (Invitrogen™/ Life Technologies ); 0,5µL de cada iniciador; e 5µL do material proveniente da célula infectada (no tempo de 30 horas) bem da célula controle. A reação foi processada na seguinte ciclagem: 94°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 45 segundos, 72° C por 1 minuto seguido da extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para a reação de *nested*-PCR foi utilizado 1 µL do produto amplificado na primeira reação e utilizando a mesmas condições da mistura de reação exceto pela utilização dos iniciadores (nexAA18893 e nexAA1905). A ciclagem da reação consistiu de 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, 57 °C por 1 min para anelamento e 72 °C por 45 segundos para extensão, seguido de uma extensão final de 5 min a 72 °C. Em ambas as reações foi utilizado água como controle negativo.

Os produtos amplificados na segunda amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, em tampão de corrida TRIS/Borato/EDTA (TBE) 1X e corados com brometo de etídeo (1µg/mL). A visualização dos produtos amplificados foi feita em fotodocumentador (BioRad®) sendo a amostra viral considerada a partir da visualização de um produto de 142 pb por comparação ao padrão de peso molecular 100 pb ( Invitrogen™/ Life Technologies). Todas as etapas de ambas as reações foram realizadas em ambientes separados com a finalidade de se evitar a ocorrência de contaminação.

**Quadro 3:** Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e *nested*-PCR

	Iniciadores	Sequência 5'- 3'
Externos	hexAA1885 ( <i>forward</i> )	GCCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC
	hexAA1913 ( <i>reverse</i> )	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT
Internos ( <i>nested</i> )	nexAA1893( <i>forward</i> )	GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG
	nexAA1905( <i>reverse</i> )	TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC

#### 4.4 Análise do perfil proteico induzido por HAdV-40 em células A-549

A análise das proteínas diferencialmente expressas foi feita utilizando a metodologia da Proteômica tendo como ferramenta NanoUPLC-MS<sup>E</sup>.

#### Extração e Quantificação das Proteínas:

Inicialmente o sedimento obtido das culturas celulares (infectada e não infectada) foi centrifugado a 4200 g por 5 minutos e então ressuspensão em tampão Tris-Cálcio (Tris-HCL 2M, pH 8,8/CaCl<sub>2</sub> 1M). Em seguida foram transferidos aproximadamente 600µL da suspensão para um tubo ao qual era adicionadas pérolas de vidro (5mm). O material foi então agitado (*beat beader*) por 30 s e centrifugado a 1400g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo, centrifugado, na mesma condição anterior, e transferido para outro tubo visando a quantificação das proteínas, feita pelo método de Bradford (1976).

### **Preparação e digestão das amostras proteicas para NanoUPLC-MS<sup>E</sup>**

O procedimento de digestão foi feito utilizando tripsina (Promega), conforme descrito por MURAD et al. (2011). Para a digestão foi utilizado 600µg de extrato de proteínas obtidas tanto das células infectadas com HAdV-40 quanto das não infectadas. Assim, inicialmente, foi adicionado ao extrato protéico 50 µL de bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) a 50mM pH 8,5 e 25 µL de RapiGest SF 0,2% (Waters Corporation) como agente surfactante de amostra (MURAD et al., 2011) o que foi seguido de aquecimento em termobloco por 15 minutos à 80°C. Foi então adicionado ao material 2,5 µL de DTT 100 mM (para redução de pontes dissulfeto) e este foi novamente aquecido (termobloco) por 30 minutos à 60°C e adicionado de 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM (para alquilação das proteínas) seguido de incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir foi adicionada a enzima tripsina, a um volume de 20µL para cada amostra e incubado em termobloco (37°C) por 16 horas. Após a digestão trípica, 10 µL de uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich) a 5% (v/v) foi adicionado (hidrólise e precipitação do RapiGest<sup>TM</sup> SF) com incubação a 37°C por 90 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13000 g a 6°C durante 30 minutos e o sobrenadante foi seco em um concentrador de vácuo (*speed vacuum*) por 5 horas. As amostras foram então ressuspensas com 30 µL de uma solução de formiato de amônia a 20 mM e 200 fmol de fosforilase b (MassPREP<sup>TM</sup> protein), normalizador/padrão interno da amostra. Em seguida as amostras foram transferidas para um frasco de recuperação total (Waters Corporation, Milford, MA, USA) para posterior análise por NanoUPLC MS<sup>E</sup>.

## Análise por NanoUPLC-MS<sup>E</sup>

A separação dos peptídeos foi realizada segundo descrito por Schenauer et al. (2012), utilizando o aparelho nanoACQUITY UPLC (Waters) com tecnologia 2D. A cromatografia de primeira dimensão foi realizada numa coluna XBridge C18 NanoEase BEH 130 (5  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$  x 50 mm; Waters, EUA) que permite o fracionamento dos peptídeos. Nesta fase foram utilizados dois solventes: A (formiato de amónio -  $\text{NH}_4\text{HCO}_2$  20 mM, pH 10,0) e B (acetonitrila- ACN). O sistema foi operado a 2  $\text{mL}/\text{min}^{-1}$ , com uma condição inicial de 3% de solvente B. A mistura de peptídeos foi fracionada cinco vezes (F1-F5), em diferentes concentrações do solvente B: F1-10,8%; F2-14%; F3-16,7%; F4-20,4% e F5-65%. Todas as frações de primeira dimensão foram diluídas posteriormente numa coluna de captura (*Trap Symmetry* C18 -5  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$  x 20 mm; Waters, EUA) antes da segunda dimensão, cromatografia analítica.

A cromatografia de segunda dimensão foi realizada a partir da eluição dos peptídeos de cada fração a partir da coluna de captura e separação na coluna analítica (BEH 130 C18 -1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  x 100 mm; Waters, EUA). Nesta etapa foi utilizado como solvente A a água e ácido fórmico a 0,1% e como solvente B a ACN e 0,1% de ácido fórmico (pH 2,4). A coluna foi operada a 0,9  $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$  a 35 ° C.

Para a obtenção dos espectros de massas foi utilizado o espectrômetro de massas modelo *Synapt G1 HDMS*<sup>TM</sup> (Waters, Manchester, UK), utilizando *nanoelectrospray* como fonte de ionização e dois analisadores - quadrupolo e tempo de voo (*nanoESI-TOF*, Waters). A proteína *Glu-Fibrinopeptide B* (GFB, Sigma) foi utilizada como padrão para calibração de massa, sendo mensurada a cada 30 segundos. Quantidades iguais de peptídeos foram fracionados e triplicatas experimentais foram obtidas para cada amostra.

O processamento dos espectros gerados e pesquisa em banco de dados, foi feito utilizando o servidor ProteinLynx Global Server (PLGs) versão 2.4. 1. As proteínas obtidas foram organizadas pelo algoritmo Expression E (PLGs). Os dados foram computados em Microsoft Office Excel, onde foram tabulados de acordo com a sua função biológica. A largura dos picos cromatográficos e resolução em MS-TOF foram configurados em modo automático. Para cada clivagem perdida pela tripsina foi aplicado modificações fixas utilizando carbamidometil (C), acetil N-terminal e oxidação da metionina (M). As condições de pesquisa taxonômica das proteínas foram baseados



em taxonomia *Homo sapiens* (humanos) sendo esta realizada utilizando o banco de dados do genoma humano, UniProt (<http://www.uniprot.org/>).

#### 4.5 Análise dos dados por Bioinformática

Os seguintes recursos de bioinformática foram utilizados para organização e interpretação dos dados gerados pelo NanoUPLC-MS<sup>E</sup>:

UniProt e KeGG: utilizados para classificação das proteínas de acordo com sua função biológica - UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>).

Programas FBAT *software* (Laird et al, 2000), MassPivot (gentilmente cedido por Dr. André M. Murad), Spotfire® (TIBCO *Software* Inc.©) e Microsoft Office Excel (Microsoft©): foram usados em conjunto para confecção de gráficos considerando a qualidade da detecção e a precisão da identificação de massa dos peptídeos.

STRING 10.0: utilizado para identificação das interações entre proteínas. O banco de dados STRING 10.0 (<http://string-db.org>) é composto por recursos globais de interações entre proteínas conhecidas e previsíveis derivadas do contexto genômico a partir de experimentos comparados a dados da literatura (VON MERING et al.,2003; FRANCESCHINI et al., 2013), que facilitam a compreensão dos processos biológicos realizados pelas proteínas identificadas sendo os dados resultantes considerados significativos com  $p < 0,05$ . Para minimizar a taxa de descoberta falsa (FDR), possível erro em comparações múltiplas, foi utilizado o banco de dados do KEGG (Enciclopédia Kyoto de genes e genomas).

*Search & Color Pathway*: essa ferramenta de mapeamento é uma via do KEGG ([http://www.kegg.jp/kegg/tool/map\\_pathway2.html](http://www.kegg.jp/kegg/tool/map_pathway2.html)). Permite mapear diferentes dados (genes, proteínas, drogas, etc.) com resultados apresentados na forma de gráficos cujos componentes são mostrados em diferentes cores. Cada mapa é desenhado manualmente utilizando o *software* *KegSketch* a partir da comparação dos dados obtidos aos da literatura publicada.

## **4.6 Ensaios de Validação**

A validação da expressão protéica foi feita considerando o grupo funcional das proteínas. Neste sentido foi realizado procedimentos de validação para as proteínas das vias de obtenção de energia e indução da apoptose.

### **4.6.1 Validação de proteínas diferencialmente expressas relacionadas a via da apoptose quando da infecção por HAdV-40 em células A-549.**

Para comprovar que a infecção por HAdV-40 é capaz de induzir a apoptose em células epiteliais, foi realizado o ensaio da marcação de células apoptóticas por anexina V (kit Annexin V- FIT C).

#### **AnexinV- FIT C**

A marcação de células apoptóticas por anexina V tem como estratégia a dosagem de fosfatidilserina (PS), que é predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol. A anexina V possui alta afinidade por PS e no experimento isto é observado pela mudança na assimetria da membrana celular via medição da aderência. Para o experimento, células A-549 infectadas com HAdV-40 e controle foram tratadas com Annexin V-FITC®. Após 30 horas, as células foram colhidas com scraper, centrifugadas 4200g por 5 minutos a 4°C e lavadas com PBS 1X. O sedimento foi lavado também com PBS por duas vezes seguido de centrifugação. Em seguida, foi adicionado 1mL de solução bloqueadora (BSA 5% e tween 20) e deixado em incubação por uma hora. Após, as células foram centrifugadas e lavadas, como feito anteriormente quando então foi adicionado 1mL da solução bloqueadora e 3,0µL de FITC Annexin V. Após incubação por uma hora, as células infectadas e controle foram observadas em microscópio de fluorescência Axio Scope A1 (Carl Zeiss) em campo claro e em comprimento de onda 495nm / 525nm. As imagens digitais foram obtidas através do *software* Axion Vison (Carl Zeiss).

### **4.6.2 Validação de proteínas diferencialmente expressas relacionadas a via de energia quando da infecção por HAdV-40 em células A-549.**

Para comprovar que a infecção por HAdV-40 alterou o metabolismo energético foi realizada a avaliação de atividade mitocondrial pelo kit *MitoTracker® Green FM*.

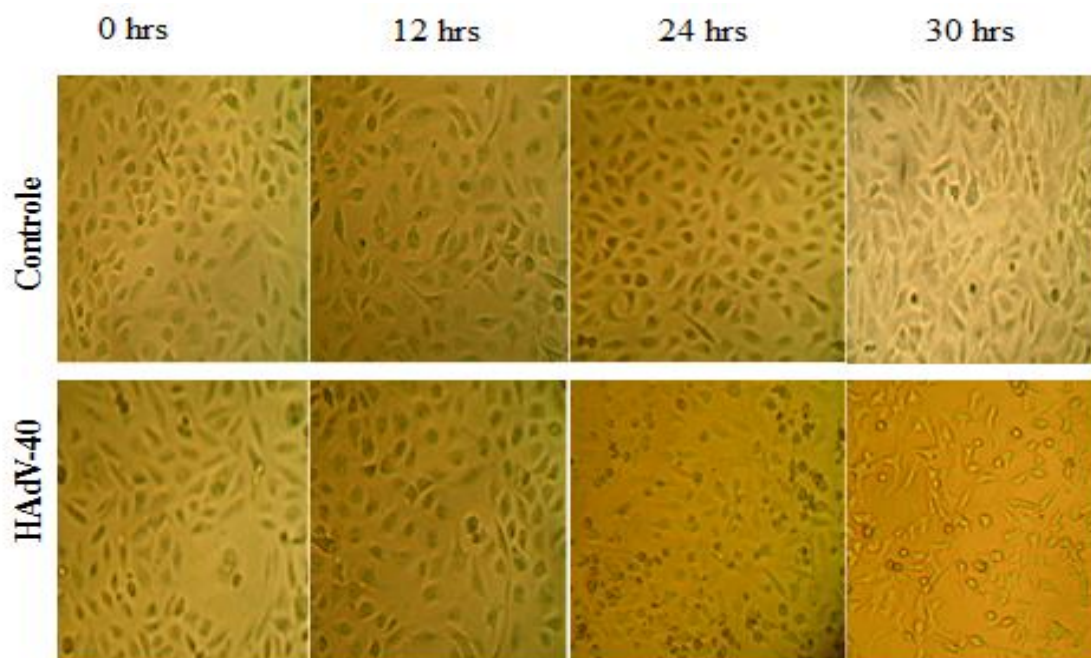
### **MitoTracker® Green FM**

O ensaio foi feito utilizando o *kit MitoTracker® Green FM* (Invitrogen™). O procedimento baseou-se na emissão de cor onde o Mitotracker probe (verde) marca todas as mitocôndrias e a rosamina (vermelha) marca seletivamente as mitocôndrias ativas. Para o experimento, células infectadas com HAdV-40 e controle (Figura 4) foram colhidas e então centrifugadas 4200g por 5 minutos. Após, as células foram ressuspensas em 500µL de PBS, seguida de nova centrifugação na mesma condição anterior. Em seguida o material foi tratado com MitoTracker® Green FM e adicionado de 1,25µL do corante rosamina e 1,25µL do Mitotracker probe, com posterior incubação a temperatura ambiente por 30 minutos. Após incubação, 10µL das células infectadas e controle foram gotejadas em lâmina e observadas em microscópio de fluorescência. A visualização das células foi feita através de microscópio de fluorescência AxioScope A1 (Carl Zeiss) em comprimento de onda 579/599 para rosamina e 490/516 para Mitotracker. As imagens foram geradas em sistema fotográfico AxioCamMR (Carl Zeiss). Para o procedimento de avaliação da atividade mitocondrial foi utilizado o *kit MitoTracker® Green FM* (Invitrogen™) que tem como característica de Mitotracker probe (verde) marcar todas as mitocôndrias presentes e a rosamina (vermelha) as mitocôndrias ativas. Atividade mitocondrial foi quantificada com base na avaliação da intensidade de fluorescência da rosamina.

## 5- RESULTADOS

### 5.1 Determinação do melhor tempo de cultivo de HAdV-40 em células A-549

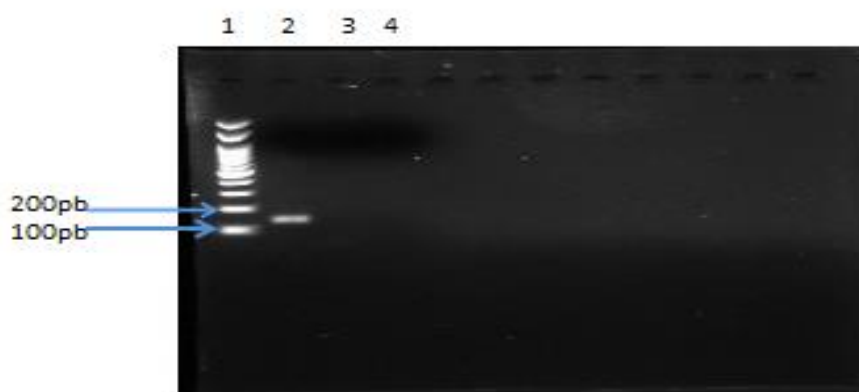
Por IFI foi observado um título viral em tempo de 30 horas de  $2 \times 10^{12}$  UFF/mL em relação a  $2,5 \times 10^{11}$  UFF/mL do inóculo original. Morfologicamente foi observado ECP na cultura celular infectada, evidenciado por arredondamento das células, iniciada a partir de 24 horas de cultivo e a desagregação de algumas células da monocamada celular em tempo de 30 horas (Figura 4). O cultivo viral de 30 horas foi utilizado para a análise proteômica



**Figura 4:** Efeito Citopático observado a partir das células infectadas A-549 por HAdV-40 em relação a células controle nos tempos de 0, 12, 24, 30 horas após a infecção.

### 5.2 Confirmação da infecção por HAdV em cultivo celular.

A confirmação da presença de HAdV nas células A-549 em comparação às células não infectadas foi feita pela reação em cadeia pela polimerase (PCR- *Nested* PCR) considerando a detecção do genoma viral observado pelo fragmento de tamanho esperado de 142 pb a partir das células infectadas (Figura 5).



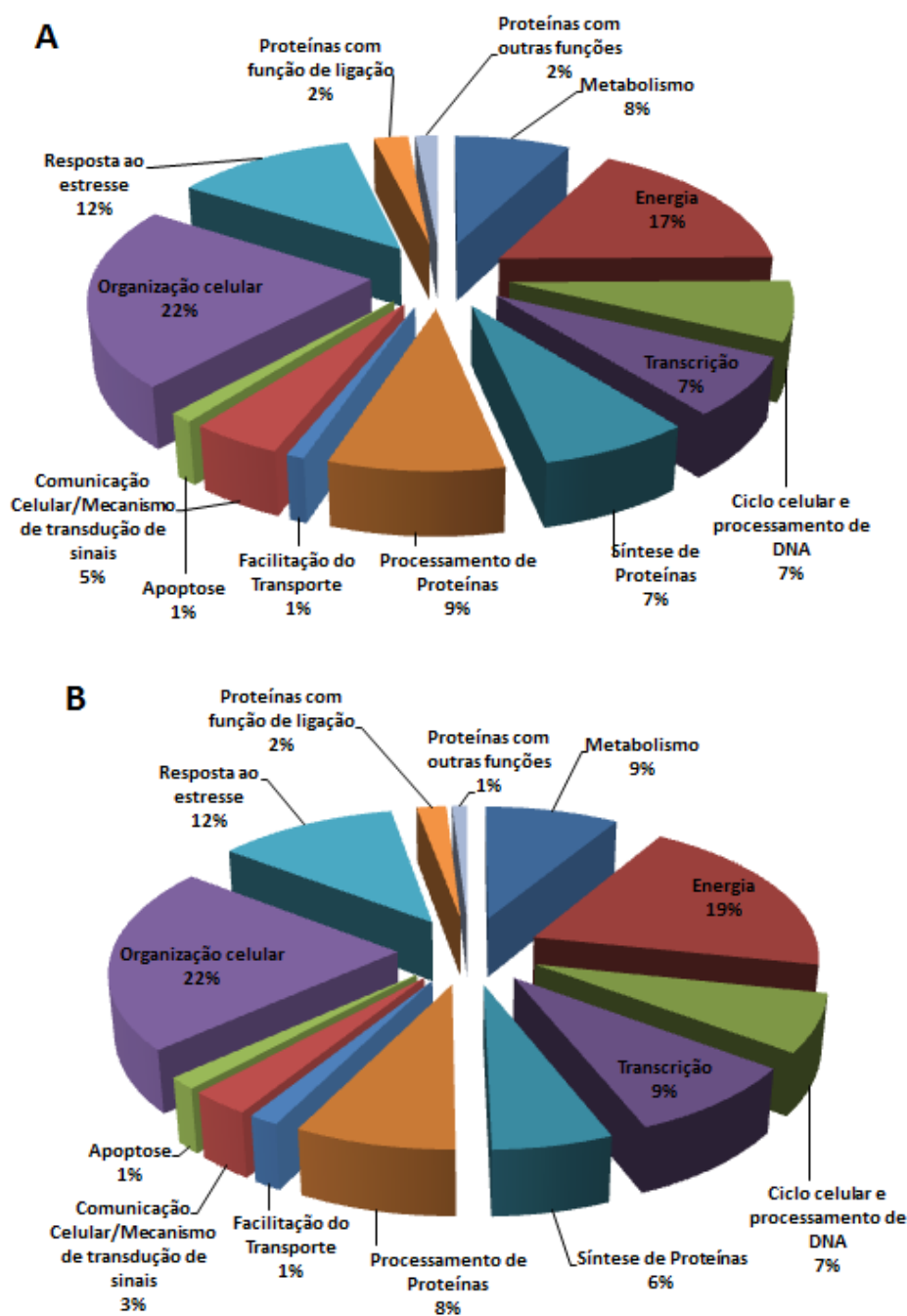
**Figura 5:** Detecção do DNA de HAdV-40 por *Nested-PCR* em gel de agarose a 1,5%: linha 1- peso molecular (100pb); linha 2- positividade de HAdV-40 – fragmento de 142pb a partir da cultura celular A-549 infectada; linha 3 - cultura celular A-549 não infectada; e linha 4 - controle negativo (água).

### 5.3 Análise do perfil proteico induzido por HAdV-40 em células A-549

Para o procedimento proteômico as células não infectadas e infectadas foram colhidas, em tempo de 30 horas de cultivo. Assim foram identificadas por análise proteômica NanoUPLC-MS<sup>E</sup>, 336 proteínas, sendo 206 destas induzidas (*up* reguladas >1,2-fold) e 130 reprimidas (*down* reguladas < 0,83-fold). Essas proteínas foram organizadas e classificadas de acordo com suas categorias funcionais usando o programa UniProt (<http://www.uniprot.org>).

Em termos da funcionalidade foi observado que as proteínas diferencialmente expressas pertenciam a diferentes categorias: metabolismo, via de energia, ciclo celular e processamento de DNA, transcrição, síntese de proteínas, processamento de proteínas, facilitação de transporte, comunicação celular e mecanismo de transdução de sinal, apoptose, organização celular, resposta ao estresse e proteínas com função de ligação (Tabelas suplementares 1 e 2).

Considerando o total de proteínas identificadas (n=336), observou-se maior percentual de identificação para proteínas envolvidas nas vias de organização celular (22%), energia (17%) e resposta ao estresse (12%) (Figura 6A). Similar distribuição foi vista para proteínas diferencialmente expressas quando da infecção das células A-549 por HAdV-40: organização celular (22%A), energia (19%) e resposta ao estresse (12%) (Figura 6B).



**Figura 6:** Percentual de proteínas diferencialmente expressas em células A-549 infectadas por HAdV-40 classificadas de acordo com sua função biológica (UniProt): A- Proteínas diferencialmente expressas (n=336 - *Up* e *down* reguladas) em células A-549; B- Proteínas induzidas em células A-549 infectadas por HAdV-40 (n=206- *Up* reguladas).

A Tabela 1 (Anexo) descreve as proteínas induzidas em células infectadas, em comparação com o controle. As enzimas da glicólise, ciclo de Krebs e de transporte de electrón mitocondrial é induzida, sugerindo que estes processos são aumentados pela infecção viral. De relevância, todas as enzimas de beta-oxidação são induzidas nas

células após infecção viral, sugerindo fortemente que este ciclo de produção de energia pode predominar nessas células. As proteínas também induzidas em abundância foram aquelas relacionados à organização celular. Nesta classe isoformas de actina, anexina, queratina predominam. Como esperado, as proteínas relacionadas com a resposta ao estresse celular são induzidas nas células infectadas.

A Tabela 2 descreve as proteínas reprimidas em células infectadas, em comparação com o controle Isoformas de clatrina, cofilina, miosina e tropomiosina entre as proteínas reprimidas.

Em relação às proteínas diferencialmente expressas em células A-549 quando da infecção por HAdV-40, foi observado expressão de importantes proteínas relacionadas às vias: (i) organização celular (ii) resposta ao estresse; (iii) apoptose (iv) energia – via glicolítica, ciclo de Krebs, transporte de elétrons e oxidação de ácidos graxos; e apoptose (Quadros 4,5,6 e 7).

Quadro 4 - Proteínas diferencialmente expressas em células A-549 infectadas por HAdV-40 relacionadas à via de organização celular.

Nome do gene	Proteína	Fold change T/C <sup>1</sup>
ACTA1	Actin alpha 1 skeletal muscle	13,07
ACTG1	Actin cytoplasmic 2	55,15
ACTG2	Actin gamma enteric smooth muscle	**2
ACTN1	Alpha actinin 1	1,27
ACTN4	Alpha actinin 4 short isoform	4,76
ACTBL2	Beta actin like protein 2	1,24
INA	Alpha internexin	1,46
FETUA	Alpha 2 HS glycoprotein	**
ANXA1	Annexin A1	1,41
ANXA2	Annexin A2	7,77
ANXA4	Annexin A4	**
DPYSL2	Dihydropyrimidinase related protein	1,25
FLNA	Filamin A	1,63
FLNB	Filamin B	3,90
ITGB1	Integrin beta 1	**
KRT75	Keratin type II cytoskeletal 5	1,71
KRT72	Keratin type II cytoskeletal 72	**
KRT80	Keratin type II cytoskeletal 80	**
KRT9	Keratin type I cytoskeletal 9	2,66
KRT6B	Keratin type II cytoskeletal 6B	2,27
KRT75	Keratin type II cytoskeletal 75	1,73
KRT8	Keratin type II cytoskeletal 8	1,62
KRT1B	Keratin type II cytoskeletal 1b	1,77
KRT78	Keratin type II cytoskeletal 78	**
KRT79	Keratin type II cytoskeletal 79	1,90
KRT7	Keratin type II cytoskeletal 7	1,95
KRT18	Keratin type I cytoskeletal 18	**
KRT10	Keratin type I cytoskeletal 10	3,94
KRT1	Keratin type II cytoskeletal 1	4,26
KRT2	Keratin type II cytoskeletal 2 epidermal	3,90
KRT84	Keratin type II cuticular Hb4	1,82
KRT85	Keratin type II cuticular Hb5	**
MYOF	Myoferlin	**
MAP4	Microtubule associated protein 4	1,32
NEFH	Neurofilament heavy polypeptide	1,44
NEHM	Neurofilament medium polypeptide	1,46
NEFL	Neurofilament light polypeptide	1,47
PLEC	Plectin	**
PFN1	Profilin 1	3,06
SPTN4	Spectrin beta chain non erythrocytic 4	**
TPM3	Tropomyosin alpha 3 chain	1,23
TPM4	Tropomyosin alpha 4 chain	1,24
TUBA1A	Tubulin alpha 1A chain	**
TUBA1B	Tubulin alpha 1B chain	**
VIM	Vimentin	1,61

<sup>1</sup>Tratado (induzidas na infecção por HAdV-40) sobre Controle; <sup>2</sup> Proteína exclusiva da condição *up* regulada



Quadro 5– Proteínas diferencialmente expressas em células A-549 infectadas por HAdV-40 relacionadas à resposta ao estresse.

Nome do gene	Proteína	Foldchange (T/C) <sup>1</sup>
PRDX5	Peroxiredoxin 5 mitochondrial	1,52
PRDX4	Peroxiredoxin 4 mitochondrial	1,82
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1 cytoplasmatic	**2
PDRX3	Thioredoxin dependent peroxide reductase	1,95
SOD1	Superoxide dismutase Cu Zn	**
PAIA1	Protein disulfide isomerase A1	2,03
PDIA3	Protein disulfide isomerase A3	1,80
PDIA4	Protein disulfide isomerase A4	1,71
PDIA6	Protein disulfide isomerase A6	1,64
HSP60	60 KDa heat shock protein mitochondrial	2,01
HSPA9	Stress 70 protein mitochondrial fragment	3,13
HSPA1A	Heat shock 70 KDa protein 1A 1B	1,50
HSPA1L	Heat shock 70 KDa protein 1 like	**
HSPA6	Heat shock 70 KDa protein 6	5,42
HSPA7	Putative heat shock 70 kDa protein	1,50
HSP90AB4P	Putative heat shock protein HSP 90-beta 2	**
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	6,09
PARK7	Protein DJ 1 fragment	**
C1QBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	2,31
SERPINH1	Serpin H1	**
CD59	CD59 glycoprotein fragment	**
HLAA	HLA class I histocompatibility antigen A 23 alpha chain	**
SLC3A2	4F2 cell surface antigen heavy chain	**
HLAG	HLA class I histocompatibility antigen alpha chain G	**

<sup>1</sup>Tratado (induzidas na infecção por HAdV-40) sobre Controle; <sup>2</sup> Proteína exclusiva da condição *up* regulada

Quadro 6- Proteínas diferencialmente expressas em células A-549 infectadas por HAdV-40 relacionadas a apoptose.

Nome do gene	Proteína	Fold change T/C <sup>1</sup>
AIFM1	Apoptosis inducing factor 1 mitochondrial	**2
ERO1L	EROS1 like protein alpha	**
ANXA5	Annexin A5	**

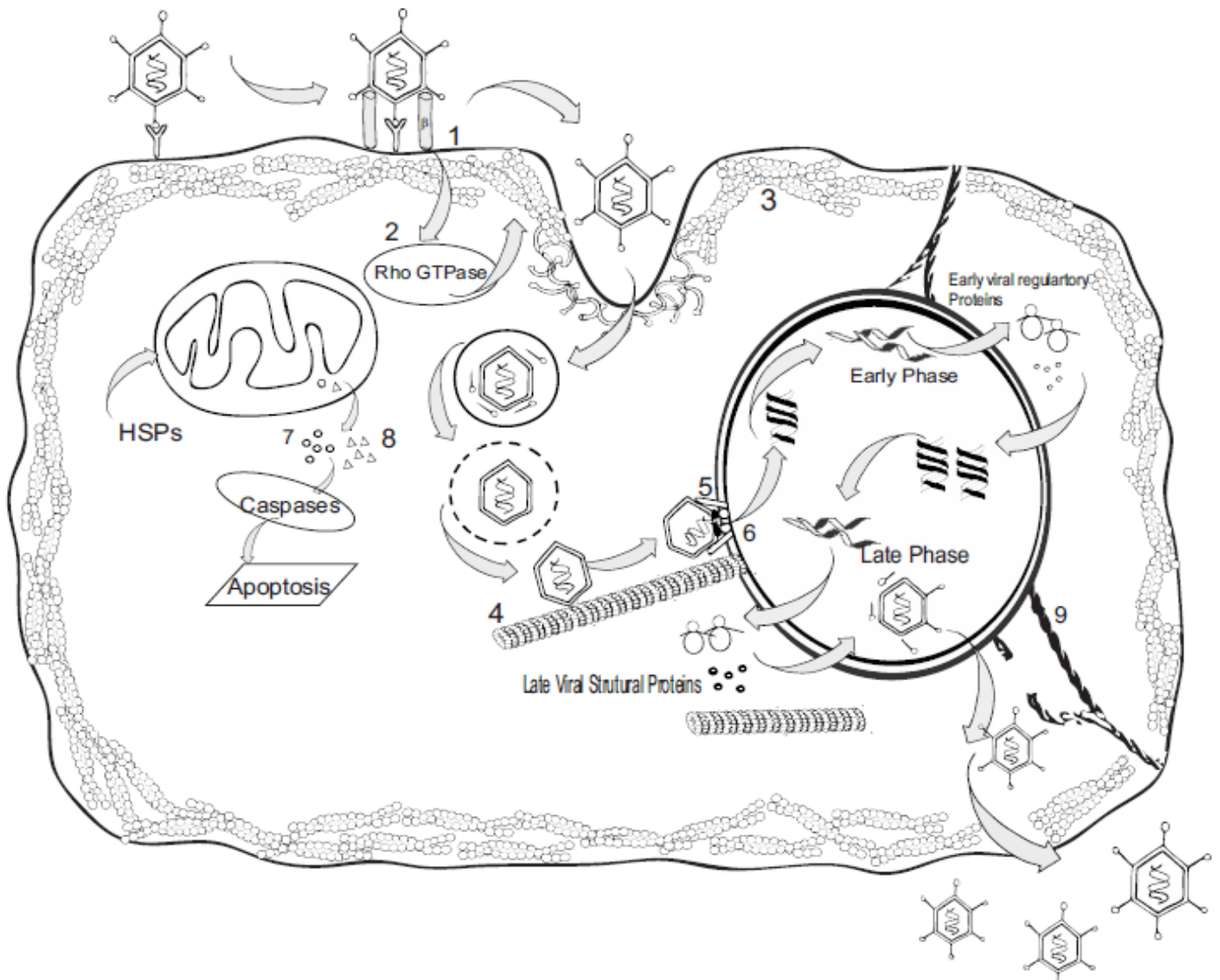
<sup>1</sup>Tratado (induzidas na infecção por HAdV-40) sobre Controle; <sup>2</sup> Proteína exclusiva da condição *up* regulada

Quadro 7 – Proteínas diferencialmente expressas em células A-549 infectadas por HAdV-40 relacionadas ao metabolismo de produção de energia.

Nome do gene	Proteína	Fold change T/C <sup>1</sup>
<b>Glicólise, Gliconeogênese e Via Pentose Fosfato</b>		
GPI	Glucose 6 phosphate isomerase	**2
ALDOA	Fructose biphosphate aldolase A	**
ALDOB	Fructose biphosphate aldolase B	**
ALDOC	Fructose biphosphate aldolase C	**
GAPDH	Glyceraldehyde 3 phosphate	**
PGK2	Phosphoglycerate kinase	**
ENOA1	Alpha enolase	8,25
PKLR	Pyruvate kinase	**
PKM	Pyruvato Kinase isozymes M1 M2	2,14
LDHA	L lactate dehydrogenase A chain	3,78
LDHB	L lactate dehydrogenase B chain	8,08
UGDH	Glucose 6 dehydrogenase	**
PGD	6 phosphogluconate dehydrogenase	**
TKTL1	Transketolase	**
<b>Ciclo de Krebs</b>		
CS	Citrate synthase	**
OGDH	2 oxoglutarate dehydrogenase mitochondrial	**
ODO2	Dihydrolipoyllsine residue succintransferase componente of 2 oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	**
DLD	Dihydrolipoyl dehydrogenase	**
SUCLG2	Succinyl CoA ligase GDP forming subunit beta mitochondrial	**
MDH2	Malate dehydrogenase mitochondrial	1,93
ME2	NAD dependent malic enzyme mitochondrial	**
<b>Transporte de elétrons</b>		
COX6B1	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	**
SQRDL	Sulfide quinone oxidoreductase mitochondrial	**
ETFA	Electron transfer flavoprotein subunit alpha mitochondrial fragment	**
ATP5A1	ATP synthase subunit alpha	**
ATPM	ATP synthase subunit alpha mitochondrial	**
ATP5B	ATP synthase subunit beta	**
<b>Oxidação de ácidos graxos</b>		
ACOT1	Acyl coenzyme A thioesterase 1	**
ECHS1	Enoyl CoA hydratase mitochondrial	2,20
ECII	Enoyl CoA delta isomerase 1 mitochondrial fragment	**
ECH1	Delta (3,5) delta (2,4) dienoyl CoA isomerase mitochondrial	**
ACADVL	Very long chain specific acyl CoA dehydrogenase mitochondrial	**
AKR1C1	Aldo keto reductase family 1 member C1	**
AKR1C2	Aldo keto reductase Family 1 member C2	**
AKR1C3	Aldo keto reductase family 1 member C3	
AKR1B10	Aldo keto reductase family 1 member B10	**
HADH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	**
ACAA2	3 ketoacyl CoA thiolase	1,78
THIL	Acetyl CoA acetyltransferase mitochondrial	**

<sup>1</sup>Tratado (induzidas na infecção por HAdV-40) sobre Controle; <sup>2</sup> Proteína exclusiva da condição *up* regulada

Considerando as proteínas induzidas no contexto das vias da organização celular, resposta ao estresse e apoptose foi feita a proposição de um modelo para a infecção de HAdV-40 nas células A-549 (Figura 7). Assim se propôs que o vírus tenha iniciado a sua internalização na célula a partir da ligação da proteína base penton com integrina  $\beta$  (ITGB1), levando a indução de Rho (RHOA) e a polimerização da actina (ACTG1), seguindo-se o tráfico até o poro nuclear em associação a microtúbulos (TUBA1A, TUBA1B) e a entrada do DNA viral no núcleo auxiliado por Hsp70 (HSPA9, HSPA1A, HSPA1L, HSPA6) e Histona H1 (HIST1H1C). Como resposta da célula à infecção viral foi observada a presença de citocromo c (COX6B1) e AIF (AIFM1) no citosol, a partir da mitocôndria, com provável indução de apoptose da célula com desarranjo de filamento intermediários do citoesqueleto (KRT7, KRT18, VIM).

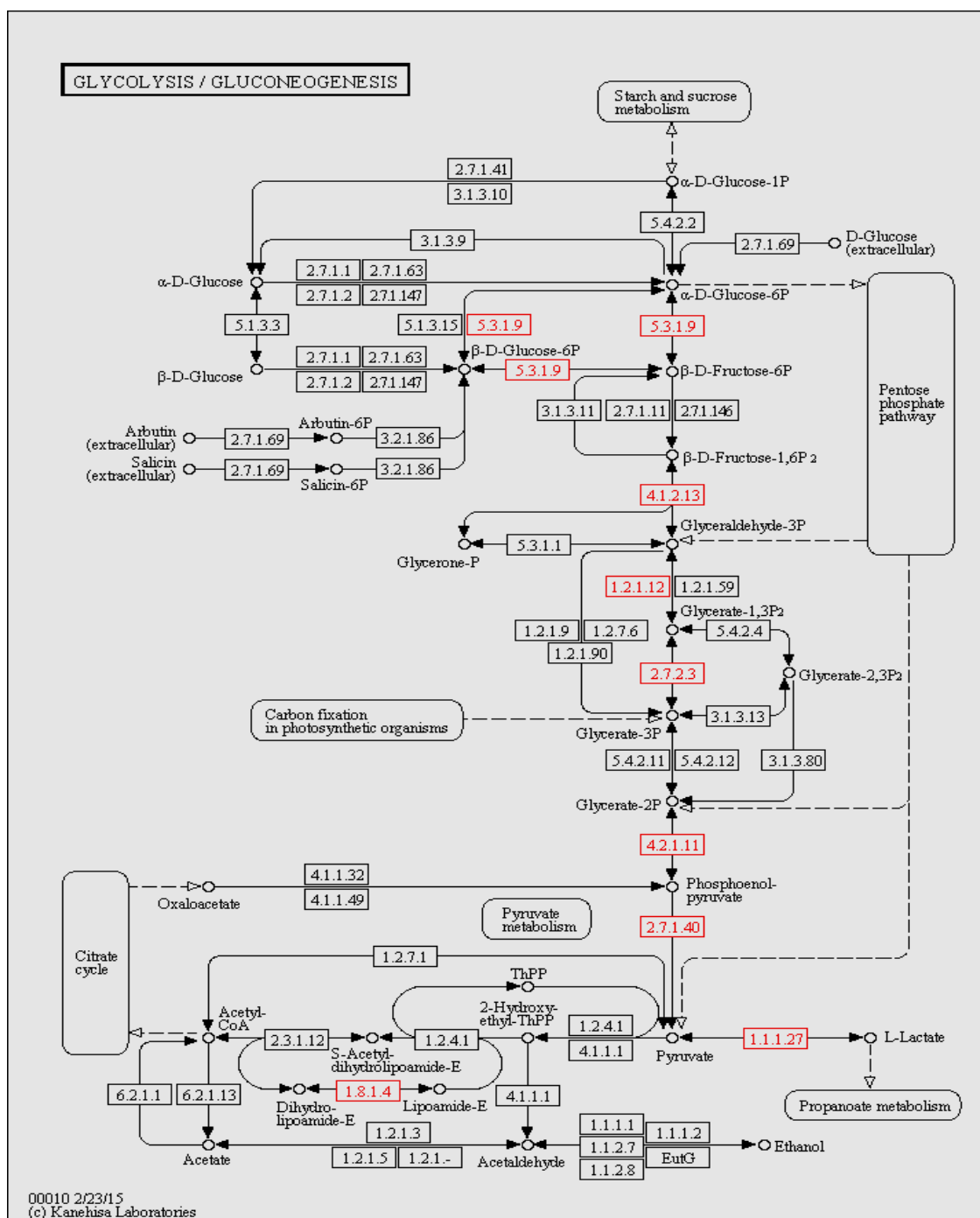


**Figura 7:** Modelo proposto para a modulação da expressão gênica de células A-549 quando infectadas pelo HAAdV-40. 1. ITGB1 (Integrin beta 1); 2. RHOA (Transforming protein RhoA) ; 3. ACTG1(Actin cytoplasmic 2); 4. TUBA1A (Tubulin alpha 1A chain), TUBA1B(Tubulin alpha 1B chain); 5. HSPA1A (Heat shock 70 KDa protein 1A 1B), HSPA1L (Heat shock 70 KDa protein 1 like ), HSPA6 (Heat shock 70 KDa protein 6); 6. HIST1H1C (Histone H1 2); 7. COX6B1 (Cytochrome c oxidase subunit 6B1); 8. AIFM1 (Apoptosis inducing factor 1); 9. KRT7 (Keratin type II cytoskeletal 7), KRT18 (Keratin type I cytoskeletal 18), VIM (Vimentin).

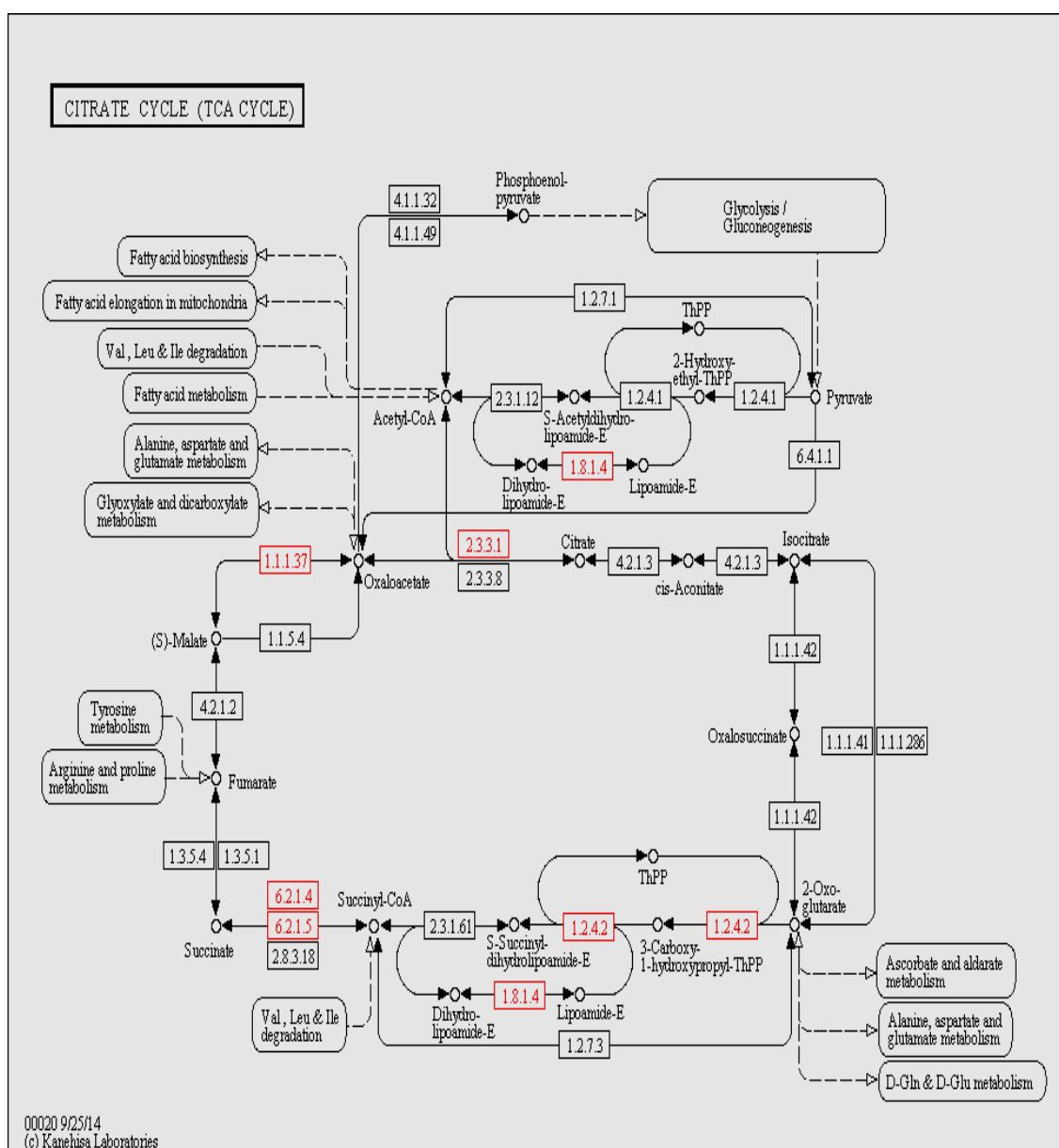
Considerando a via de energia relacionada à glicólise, observa-se (Figura 8) a indução nas células infectadas por HAdV-40 das seguintes proteínas: 1- Glicose 6-fosfato isomerase (5.3.1.9), catalisa a conversão da glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato; 2- Frutose bifosfatada aldolase (4.1.2.13), catalisa a conversão da frutose-6-fosfato em frutose- 1,6 difosfato; 3-gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (1.2.1.12 ), catalisa a conversão da gliceraldeído 3-fosfato em 1,2 bifosfoglicerato; 4- fosfoglicerato quinase (2.7.2.3), catalisa a conversão da 1,3-bifosfoglicerato em 3-fosfoglicerato; 5- alfa enolase (4.2.1.11), converte 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato e após, a piruvato; 6- lactato desidrogenase (1.1.1. 27), converte o piruvato em lactato.

Também em termos da via de energia, considerando o ciclo de Krebs (Figura 9), observa-se que a infecção pelo HAdV-40 levou a indução nas células A-549 das seguintes proteínas: 1-Citrato sintase (2.3.3.1), converte o citrato em  $\alpha$ -cetoglutarato; 2- Oxoglutarato desidrogenase (1.2.4.2) e Diidrolipoil dehydrogenase (1.8.1.4), converte 2-oxoglutarato em Succinil CoA; 3-Succinil CoA ligase (6.2.1.4/ 6.2.1.5 ), converte a Succinil-CoA em succinato; e 4- Malato desidrogenase (1.1.1.37), converte a Malato em Oxaloacetato.

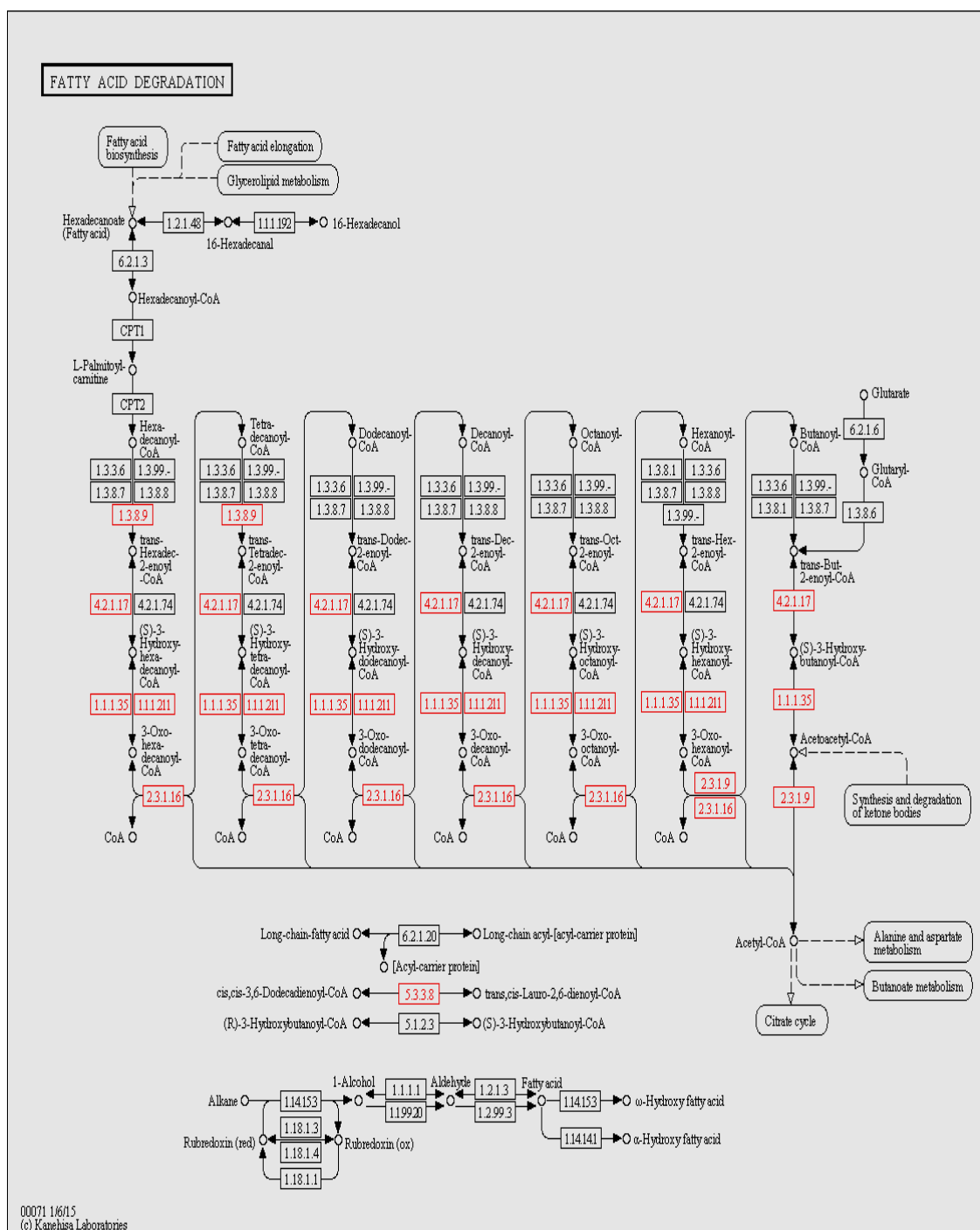
Finalmente considerando a via da degradação de ácidos graxos ( $\beta$ -oxidação) (Figura 10) observou-se a expressão importante das seguintes proteínas: 1- Acyl Coa desidrogenase (1.3.8.9), converte o palmitoil-CoA em Trans- $\Delta^2$ -Enoil-CoA (1ª etapa); 2- Enoil CoA hidratase (4.2.1.17), catalisa a conversão da Trans- $\Delta^2$ -Enoil-CoA em L- $\beta$ -Hidroxiacil-CoA (2ª etapa); 3- Hidroxiacil-coenzime A desidrogenase (1.1.1.35), converte a L-  $\beta$ -Hidroxiacil-CoA em  $\beta$ -Cetoacil-CoA (3ª etapa); 4- Acetyl CoA acetiltransferase (tiolase) (2.3.1.9) e 3-Cetoacil CoA tiolase(2.3.1.16), converte a  $\beta$ -Cetoacil-CoA a Acil-CoA que pode ser oxidada a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O no ciclo do ácido cítrico.



**Figura 8:** Diagrama das proteínas induzidas em células A-549 infectadas por HAdV-40 envolvidas da Glicólise/ Gliconeogênese. **5.3.1.9** – GPI (Glicose 6 fosfato isomerase); **4.1.2.13**-ALDOA, ALDOB, ALDOC (Frutose bisfosfato aldolase A,B,C); **1.2.1.12** – GAPDH (Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase); **2.7.2.3** – PGK2 (Fosfoglicerato quinase); **4.2.1.11** – ENOA1 (Alpha enolase), **1.1.1.27** – LDHB, LDHA (Lactato desidrogenase A,B), **1.8.1.4** – DLD (Diidrolipoil desidrogenase); recurso utilizado: *Search&Color Pathway* do KEGG tendo como parâmetro de pesquisa o número de classificação enzimática (EC). O número dos respectivos EC foram pesquisados no UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e no *Enzyme Nomenclature* (<http://www.chem.qmul.ac.uk/>); as caixas em vermelho correspondem às enzimas encontradas no estudo.



**Figura 9:** Diagrama das proteínas induzidas em células A-549 infectadas por HAdV- 40 envolvidas no Ciclo de Krebs (TCA). **1.8.1.4** – DLSDH (Diidrolipoil dehidrogenase); **2.3.3.1** - CS (Citrato sintase); **1.1.1.37**- MDH2 (Malato desidrogenase); **6.2.1.4/ 6.2.1.5** – SUCLG2 (Succinil CoA ligase); **1.2.4.2** –ODO2 (oxoglutarate desidrogenase (succinil-transferring)); recurso utilizado: *Search&Color Pathway* do KEGG tendo como parâmetro de pesquisa o número de classificação enzimática (EC). O número dos respectivos EC foram pesquisados no UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e *Enzyme Nomenclature* (<http://www.chem.qmul.ac.uk/>); as caixas em vermelho correspondem às enzimas encontradas no estudo.



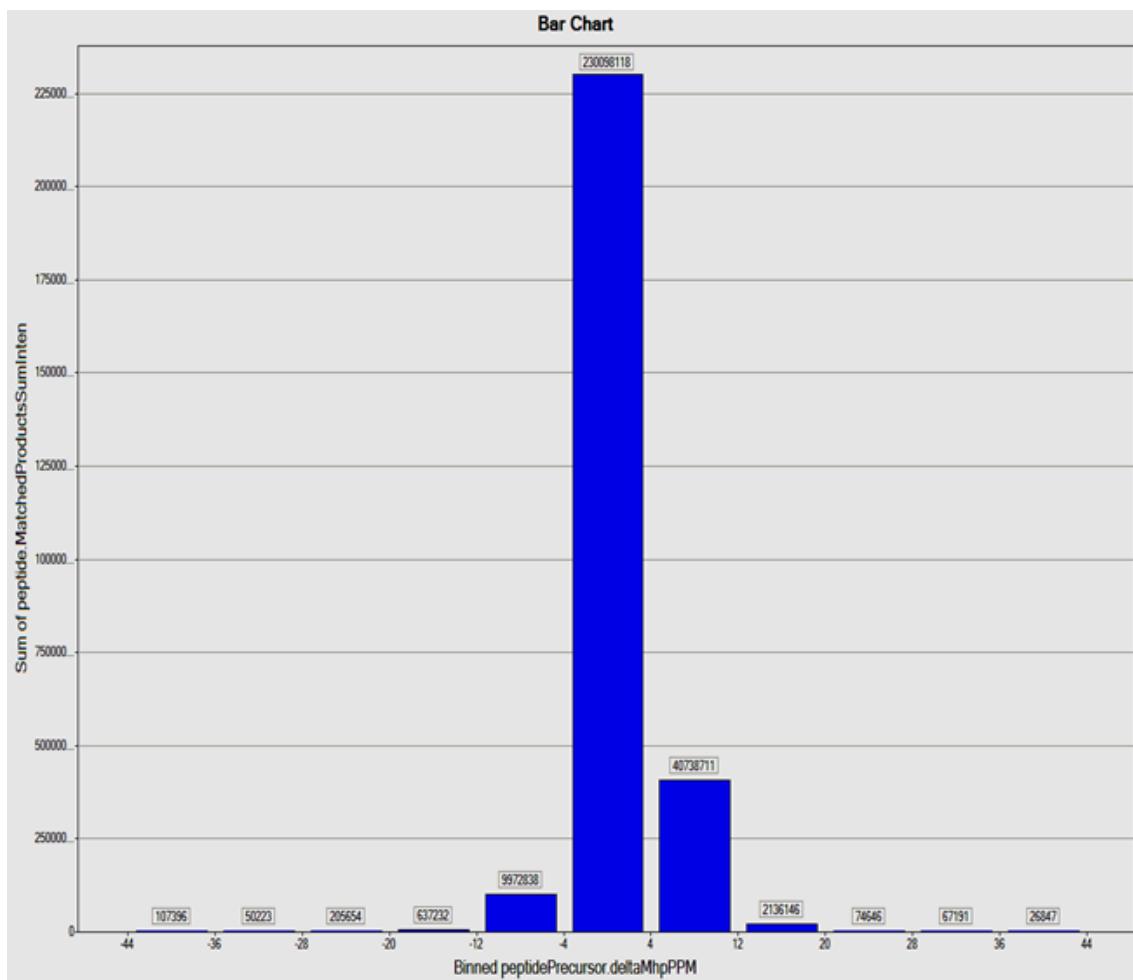
**Figura 10:** Diagrama das proteínas induzidas em células A-549 infectadas por HAdV- 40 envolvidas na degradação de ácidos graxos. Nota: **1.3.8.9** – ACADVL (Very long chain specific acyl CoA dehydrogenase); **4.2.1.17** – ECHS1 (Enoil CoA hidratase); **1.1.1.35** – HADH (Hidroxiacil-coenzime A desidrogenase); **2.3.1.16** – ACAA2 (3 ketoacil CoA thiolase); **2.3.1.9** – THIL (Acetyl CoA acetyltransferase); **5.3.3.8** – ECH1 (Delta (3,5) delta (2,4) dienoyl CoA isomerase); recurso utilizado: *Search&Color Pathway* do KEGG tendo como parâmetro de pesquisa o número de classificação enzimática (EC). O número dos respectivos EC foram pesquisados no UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e *Enzyme Nomenclature* (<http://www.chem.qmul.ac.uk/>); as caixas em vermelho correspondem às enzimas encontradas no estudo.



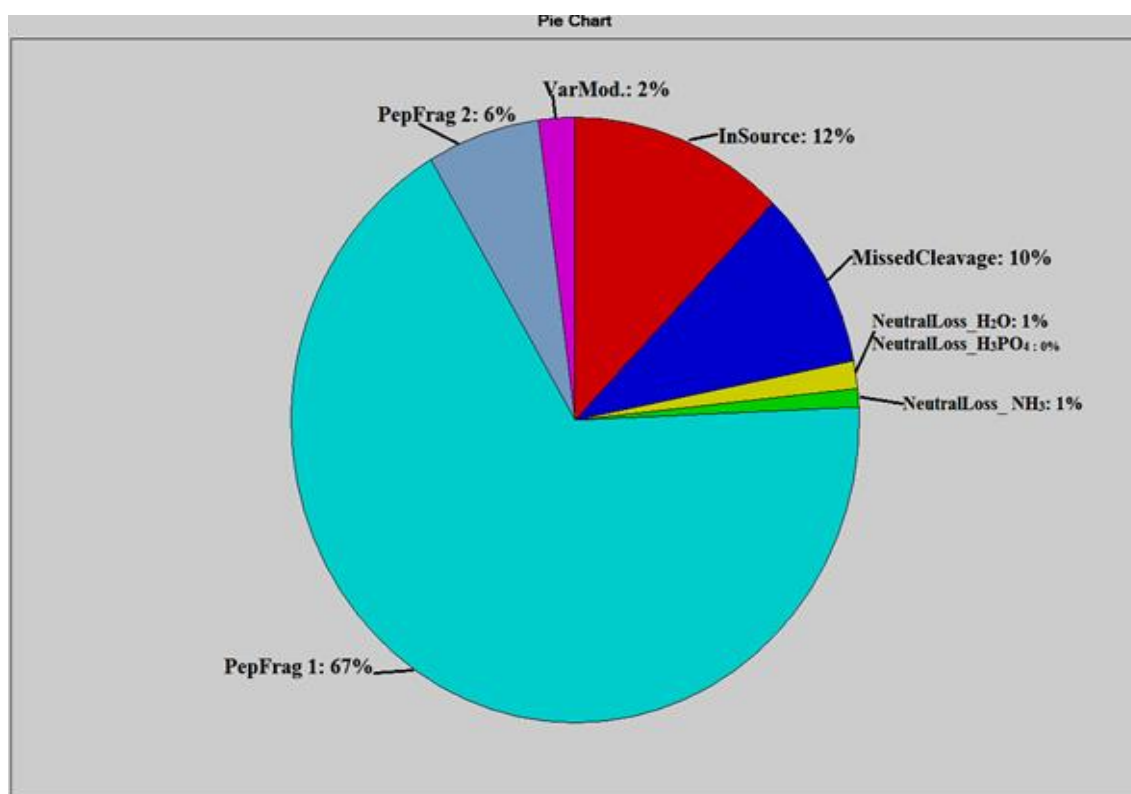
A precisão dos dados obtidos pela análise proteômica foi garantida pela realização desta em triplicatas experimentais e duplicatas biológicas onde valores  $p < 0,05$  foram considerados significativos. No procedimento, os dados de qualidades gerados pelo aparelho foram representados em gráficos de análise da precisão de detecção de massa dos peptídeos (Figura 11) e do tipo de detecção dos peptídeos identificados (Figura 12).

Assim, a figura 11 traduz a precisão da detecção de massa de cada peptídeo com erro permitido de até 50 ppm tendo sido observado que a maioria dos peptídeos foram identificados com erro entre 15-10 ppm correspondendo 95% dos 15.230 peptídeos identificados. A figura 12 mostra os tipos de peptídeos identificados tendo sido observado que 10% dos peptídeos tiveram perda na clivagem pela tripsina e apresentaram uma taxa de fragmentação na fonte de 12%, condição adequada para a fragmentação na fonte e de perda de clivagem ( $< 20\%$ ). Observa-se que os dados obtidos para os peptídeos, 67%, são de boa qualidade, sem grandes perdas, considerando a identificação considerada adequada pelo PepFrag 1 ( $> 50\%$ ).

O conjunto de dados observados, considerando os dois parâmetros, confirmam a qualidade dos resultados obtidos e a reprodutibilidade do método usado para avaliar o proteoma de células A-549 infectadas com HAdV-40.

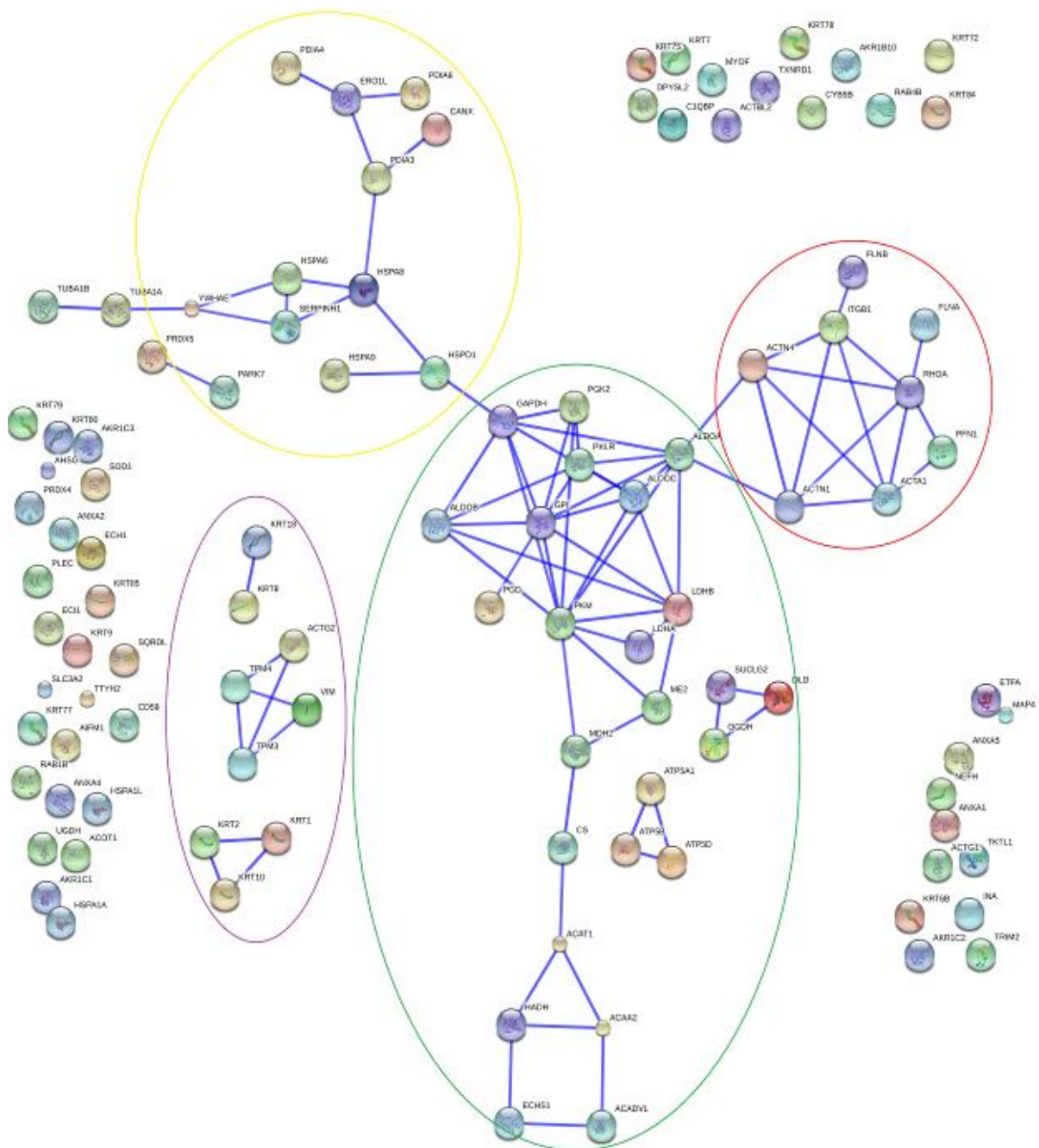


**Figura 11:** Precisão da identificação de massa dos peptídeos induzidos por HAdV-40 em células A-549 a partir da cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas: Eixo X corresponde ao erro calculado com base no peptídeo precursor e o eixo Y à identificação da massa dos peptídeos.



**Figura 12:** Percentual de identificação de tipos de peptídeos provenientes de células A-549 infectadas com HAdV-40: 1- PepFrag1 e PepFrag2 indicam o tipo de detecção utilizado para identificação do peptídeo; 2- VarMod: modificações variáveis; 3- *InSource*: corresponde a fragmentação ocorrida na fonte de ionização; 4-*MissedCleavage*: perda de clivagem pela tripsina; 5-NeutralLoss H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub> e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: correspondente às perdas de precursores de água, amônia e ácido fosfórico, respectivamente.

A análise relativa à interação entre proteínas (*software* STRING 10.0) utilizando o modo máximo de confiança (Score 0,9 e  $p < 0,05$ ), considerando as proteínas *up* reguladas, mostrou os seguintes graus de relacionamento entre elas: 1- via de energia- interação entre 24 das 39 proteínas relacionadas à glicólise, uma da via pentose fosfato, sete do ciclo de Krebs e seis relacionadas a oxidação de ácidos graxos; 2- via organização celular- observou-se interação entre 16 das 45 proteínas diferencialmente expressas sendo nove relacionadas a organização do citoesqueleto e sete à regulação do citoesqueleto de actina; e 3- resposta ao estresse- foi observado interação entre dez das 25 proteínas diferencialmente expressas (Quadro 8 e Figura 14 ). Com relação às três proteínas diferencialmente expressas da via de apoptose não foi observado interação entre elas.



**Figura 13:** Interação entre proteínas diferencialmente expressas identificadas em células A-549 infectadas com HAdV- 40. Análise feita utilizando STRING 10.0. O modo de confiança e a associação da proteína-proteína são evidenciados pela espessura da linha de ligação. A interação entre proteínas da via de resposta ao estresse são visualizadas dentro do círculo de linha em amarelo; via de energia no círculo de linha em verde; organização do citoesqueleto no círculo de linha em violeta; e regulação do citoesqueleto de actina em círculo de linha em vermelho. As designações dos nomes das proteínas utilizados na análise são listados no quadro 8.

**Quadro 8:** Proteínas que mostraram interação significativa pelo STRING 10 considerando os processos biológicos.

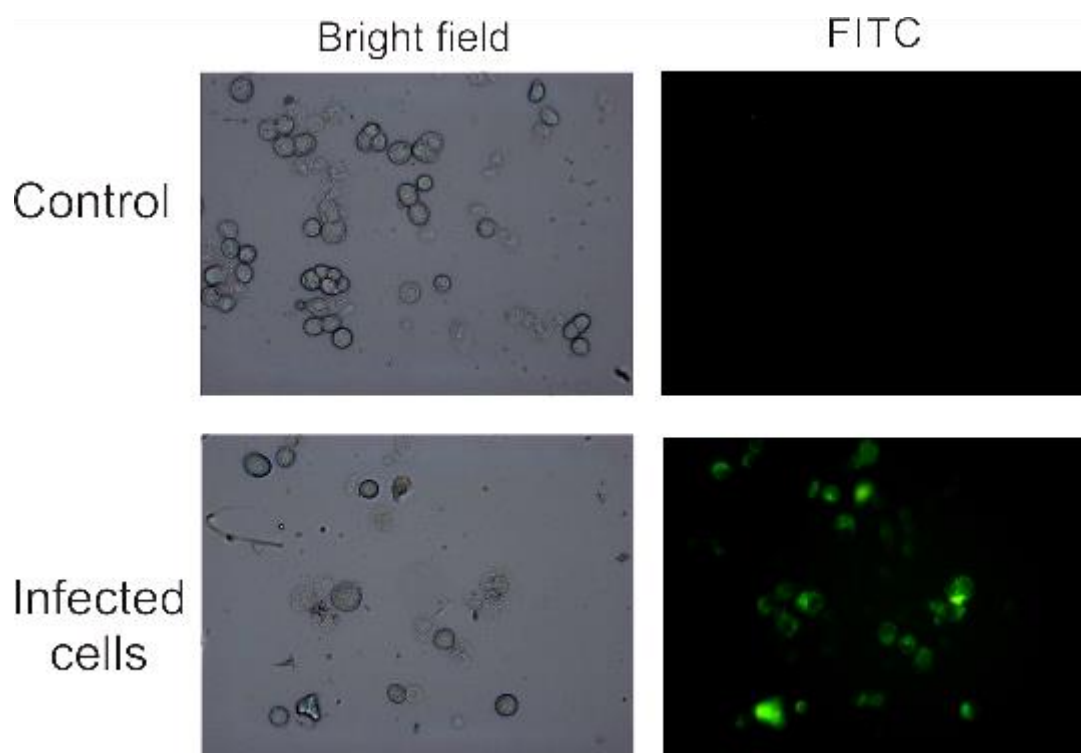
Vias biológicas -KEGG	Valor de <i>p</i>	Nome do Gene	Nº de Proteínas
Resposta ao estresse	1,298e <sup>-6</sup>	PRDX5,PRDX4,PDRX3,PDIA4, PDIA6, HSP60, HSPA8, PARK7, C1QBP, SERPINH1	10
Vias de energia			
Glicólise/ gliconeogênese	8,680e <sup>-11</sup>	GPI, ALDOA, ALDOB, ALDOC, GAPDH, PGK2, PKLR, PKM, LDHA, LDHB	10
TCA ciclo			
Via das Pentose fosfato	2,359e <sup>-4</sup>	CS, DLD, SUCLG2, MDH2, OGDH, ME2	6
	3,729e <sup>-6</sup>	PGD	1
	3,319e <sup>-6</sup>	ECHS1, ACADVL, AKR1C3, AKR1B10, HADH, ACAA2,ACOT1	7
Oxidação de ácido graxo			
Organização do citoesqueleto	3,979e <sup>-7</sup>	ACTG2, TPM3, TPM4, VIM, KRT18,KRT8,KRT2,KRT1,KRT10	9
Regulação do citoesqueleto de actina	1,459e <sup>-3</sup>	ACTN1, ACTN4, ITGB1, CDC42, PFN1, RHOA, ACTN1.	7

Nota: A interação das proteínas em seus processos biológicos respectivos foi determinada utilizando banco de dados KEGG. O valor de *p* foi obtido a partir da correção da taxa de falsa descoberta (FDR) para minimizar erros de comparações múltiplas.

## 5.4 Dados de Validação:

### 5.4.1 AnexinV FIT C ®

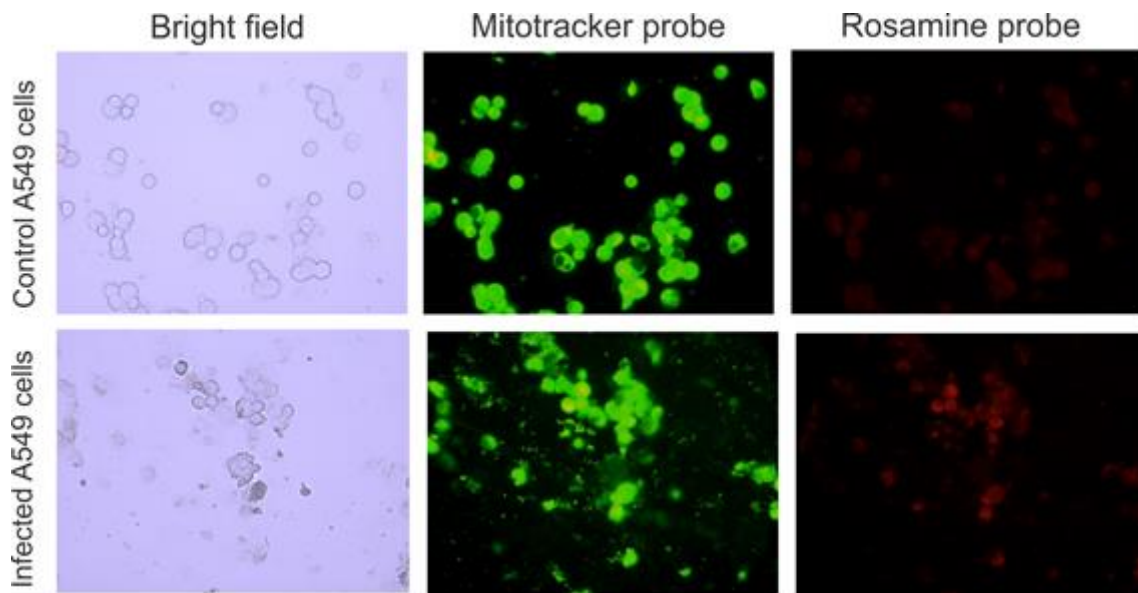
Foi avaliada a indução da apoptose nas células epiteliais A-549 tendo como base células infectadas por HAdV-40 e não infectadas. Após 30 horas de infecção, os eventos iniciais da apoptose foram evidenciados pela marcação e quantificação da anexinaV-FITC sendo possível identificar e quantificar as células apoptóticas por imunofluorescência nas infectadas por HAdV-40 (Figura 14).



**Figura 14:** Visualização das células tratadas com anexinaV-FITC por microscópio de fluorescência (Carl Zeiss), no comprimento de onda 495nm / 525nm. As células com PS exposta foi possível a visualização por sua ligação a anexinaV-FITC, tal como evidenciado no campo das células infectadas.

#### 5.4.2 Mitotracker® Green FM

Foi avaliada a atividade da cadeia respiratória considerando a viabilidade mitocondrial tendo como base células infectadas por HAdV-40 e não infectadas. Foi possível observar, no citoplasma, a distribuição mitocondrial como um aumento de zonas de intensidade de fluorescência bem como coloração verde (Mitotracker probe) para o total de mitocôndrias presentes e coloração vermelha (rosamina) para as mitocôndrias ativas (Figura 15).



**Figura 15:** Visualização das células tratadas com MitoTracker® Green FM por microscópio de fluorescência (Carl Zeiss) no comprimento de onda 579/599 para rosamina e 490/516 para Mitotracker. As imagens foram geradas no sistema fotográfico AxioCamMR (Carl Zeiss) a Mitotracker probe(verde) marca todas as mitocôndrias e rosamina (vermelho) marca apenas mitocôndrias ativas.

## 6- DISCUSSÃO

---

Proteínas celulares diferencialmente expressas resultantes de uma infecção viral, são de grande interesse por permitir uma melhor compreensão da interação vírus-célula-hospedeiro (LIU et al. 2012). Muitas dessas proteínas celulares auxiliam no processo de entrada do vírus na célula, na síntese e replicação do genoma viral bem como na liberação de novos vírus formados. A identificação destas classes de proteínas foi feita por análise proteômica, ferramenta utilizada no presente estudo, que teve por objetivo a observação de proteínas em células A-549 infectadas por HAdV-40 utilizando como instrumentação o sistema Nano-UPLC-MS<sup>E</sup>.

Desta forma foi possível identificar e classificar 336 proteínas diferencialmente expressas das quais 206 foram provenientes das células infectadas (*up* reguladas). Estas proteínas enquadraram-se em importantes vias funcionais da célula, com destaque para as vias de energia, organização celular, resposta a estresse e apoptose, permitindo melhor compreensão de estratégias utilizadas por HAdV-40 para eficiente infecção na célula hospedeira.

Em termos da patogenia do HAdV-40, tem sido visto que este replica em células epiteliais do trato gastrointestinal as quais são células polarizadas, caracterizadas pela separação distinta de domínio apical e basolateral. Características similares são vistas e mantidas em culturas celulares contínuas como a A-549 (DELORME-AXFORD; COYNE, 2011).

No contexto, as células epiteliais tornam-se polarizadas através de interações com o citoesqueleto de actina bem como a outras proteínas sinalizadoras. Anatômica e fisiologicamente tem-se: as superfícies da membrana plasmática apical de células epiteliais polarizadas são fortemente associadas à rede do citoesqueleto de actina e em epitélios de absorção intestinal, a superfície da célula apical contém projeções semelhantes a dedos, denominadas microvilosidades, que são compostas de feixes paralelos de actina (GIBSON;PERRIMON, 2003; SAOTOME et al.,2004). Em células epiteliais polarizadas, a endocitose ocorre preferencialmente na base das microvilosidades (APODACA, 2001). A capacidade das células para alterar a sua forma ou motilidade é fortemente regulada pelas proteínas do citoesqueleto, que são por sua vez regulados pelas GTPases da família Rho, importantes proteínas de transdução



de sinal. A proteína Rho ativa a polimerização da actina, evento necessário para coordenação dos movimentos celulares permitindo assim a entrada de macromoléculas na célula (SCHMITZ et al., 2000; HEASMAN;RIDLEY, 2008).

Considerando a entrada do vírus na célula, a barreira imposta pela a malha de actina deve ser superada o que envolve a estimulação da remodelação do citoesqueleto de actina (DELORME-AXFORD;COYNE, 2011). No contexto, os adenovírus têm como receptores primários e secundários, respectivamente, o CAR e integrinas ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Neste sentido tem sido visto que a partir dessas ligações iniciam-se eventos de sinalização que promovem mudanças na superfície celular e ativam a endocitose. Ainda, o envolvimento do vírus com as integrinas de superfície celular induzem a remodelação do citoesqueleto de actina, a partir da estimulação da Rho, o que facilita a entrada do vírus na célula (WICKHAM et al.,1993).

Em assim sendo, foi observado no presente estudo a presença de integrina de superfície celular (ITGB1), bem como de GTPases (CDC42 e RHOA), as quais regulam outras proteínas de vias de sinalização celular interagindo com as actinas do citoesqueleto (ACTN1 e ACTN4) além da profilina (PFN1), que é relacionada à polimerização da actina em resposta a sinais extracelulares e finalmente a filamina (FLNA), que regula a reorganização do citoesqueleto de actina a partir da interação com integrinas (Figuras 7 e 13).

Segundo-se à entrada de adenovírus na célula tem sido visto papel importante de proteínas da organização celular, com atividades que incluem a internalização do endossoma e o trânsito interno além da liberação viral (STAUFENBIEL et al., 1986). No contexto, a manutenção da integridade celular bem como o trânsito intracelular de macromoléculas, têm como base três tipos de filamentos citosólicos – filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários – que são regulados por proteínas quinases e fosfatases (TAYLOR et al. 2011, STAUFENBIEL et al., 1986).

As actinas são consideradas um dos principais componentes do citoesqueleto em todos os tipos de células sendo necessária para a divisão celular, motilidade, resistência mecânica e a integridade da célula e endocitose (POLLARD, 2010). Estudos sobre o papel da actina na internalização de HAdV-2 na célula, mostrou que durante o processo da ligação da fibra a integrinas pela base penton, ocorre indução na sinalização para ativação da fosfatidilinositol-3-OH-cinase (PI3K) sendo tal ativação importante para os rearranjos do citoesqueleto de actina com a finalidade de permitir a interiorização do vírus. PI3K atua como segundo mensageiro para processos celulares importantes, como

a ativação de pequenas proteínas de ligação a GTPases Ras, Rho, Rac e Cdc42. Foi mostrado que, nas células infectadas por HAdV-2 a indução da actina facilita a endocitose do vírus pelas vesículas endossômicas revestidas por clatrina (LI et al., 1998).

Sun e Whittaker (2007) ao estudar o papel do citoesqueleto de actina durante a internalização do vírus Influenza (H1N1) em células epiteliais polarizadas, mostrou que a malha de actina tem papel indispensável na entrada desse vírus, um fato não compartilhado com células não-polarizadas. Favoreel et al. (2007) em estudo sobre endocitose do herpes vírus simples (HSV-1) a partir de células de fibroblastos humanos primários da córnea infectadas, observaram que durante a entrada do vírus houve associação a protuberâncias da membrana plasmática, seguido por captação semelhante a fagócitos, envolvendo rearranjo do citoesqueleto de actina. Além disso, foi observado que a GTPase RhoA foi ativada durante este processo. Ainda, Naghavi e Goff (2007) observaram que os filamentos de actina auxiliam na entrada e saída do HIV-1e que parece haver sequestro pelo vírus de proteínas motoras como dineínas para o transporte de longa distância no caminho para dentro ou para fora da célula. Assim a sugestão é de que presença de actina no presente estudo possa estar relacionada à entrada de HAdV-40 em células A-549 conforme também já sugerido para HAdV-2.

Com relação às células intestinais, alvo para replicação de adenovírus, as actinas têm papel importante na manutenção da sua arquitetura (SHEN;TURNER, 2005). Tem sido visto, que quando da infecção por adenovírus, há importante alteração desta arquitetura e que podem alterar a funcionalidade das células com consequente dano para o hospedeiro. Assim a presença de actinas observada no presente estudo pode facilitar na compreensão de mecanismos implicados na principal manifestação clínica causada por HAdV-40, a gastroenterite aguda (GEA). A GEA causada por adenovírus da espécie F (HAdV-40 e HAdV-41) resulta em lesões no trato gastrointestinal que levam a atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas, com subsequente má-absorção e perda de fluidos, água e eletrólitos (TIEMESSEN; KIDD, 1995).

Em termos fisiológicos, a parede intestinal é composta por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (KIERSZENBAUM, 2004). As funções motoras do intestino são realizadas pelas camadas do músculo liso sendo que a contração muscular ocorre em resposta a entrada de  $Ca^{2+}$  na fibra muscular. No músculo liso os íons  $Ca^{2+}$  atuam por meio do mecanismo da calmodulina, que ativam os filamentos da miosina, produzindo forças atrativas entre actina e miosina levando a contração

muscular. Assim o  $\text{Ca}^{2+}$  inicia as contrações musculares que requerem ATP, ao mesmo tempo em que ativa a degradação do glicogênio para o fornecimento de energia (GUYTON; HALL, 2006). No presente estudo foi observado decréscimo na expressão da calmodulina e das isoformas da miosina (Tabela 2) e ao contrário, indução de isoformas da actina. Neste contexto a sugestão de que se a calmodulina é pouco expressa, não ocorre contração da actina e miosina, favorecendo atrofia das vilosidades o que poderia ser considerado como um mecanismo de injúria pelo HAdV- 40 nas células A-549.

Filaminas A e B são conhecidas como proteínas de ligação à actina, por estarem entrelaçadas em forma de redes aos seus filamentos no citoplasma. Regulam a reorganização do citoesqueleto de actina, ligando-a a integrinas e glicoproteínas de membrana (LU et al., 2007). Essas proteínas interagem seletivamente com membros da família GTPases Rho e Ras (KAJITA et al. 2014). Um estudo realizado por Jiménez-Baranda et al. (2007) mostrou que filamina A pode ser considerada como uma proteína “adaptadora”, que liga os receptores de HIV-1 à maquinaria de remodelação do citoesqueleto de actina, os quais podem facilitar a infecção pelo vírus. Se feita a extrapolação para HAdV-40, a identificação de Filaminas A e B pode significar a possível interação a GTPases Rho e Ras, tendo como finalidade auxiliar a montagem do citoesqueleto de actina e desta forma facilitando a endocitose do vírus.

A Profilina-1, também identificada no estudo, é uma proteína de ligação a actina sendo facilitadora do rearranjo dessa proteína (WELCH;MULLINS, 2002). Estudo realizado por Bitko et al. (2003) visando elucidar o papel da profilina no contexto da interação entre o Vírus Respiratório Sincicial e a actina, tendo como suporte células A-549, mostrou que profilina é envolvida na formação de sincícios mediada pelo vírus bem como na indução de fibras de actina e na morfogênese viral.

Estudo feito com HAdV-5, mostrou que após penetração no citoplasma, o vírus é capaz de “sequestrar” proteínas celulares para transitar ao longo de microtúbulos em direção ao núcleo (BAILEY et al., 2003; LEOPOLD et al., 2000; KELKAR et al., 2004). Os microtúbulos são formados pela polimerização das proteínas tubulina as quais existem em duas formas:  $\alpha$  e  $\beta$ , em diferentes isoformas, e que por polimerização formam protofilamentos, sendo que 13 protofilamentos formam um microtúbulo (WEISENBERG,1972; CHRÉTIEN et al., 1992). HADV-5 se liga aos microtúbulos através da interação com a dineína citoplasmática, uma proteína motora que auxilia a motilidade do vírus em direção ao núcleo (KELKAR et al., 2004). No contexto também

Warren e Cassimeris (2007) através de análise por microscopia confocal mostraram que a infecção por HAdV-5 promove a formação de microtúbulos estáveis, pós-traducionalmente modificados por um mecanismo dependente de RhoA. Em assim sendo a identificação neste estudo de tubulinas  $\alpha$  1A e  $\alpha$  1B pode significar que o transporte de HAdV-40 até o núcleo possa ter se dado por mecanismo similar.

Tem sido visto que a entrada de adenovírus no núcleo da célula é mediada pela interação da proteína viral hexon com proteínas do poro nuclear, CAN/Nup214, que ancoram a partícula viral ao poro, iniciando o desnudamento (TROTMAN et al., 2001). Em adição, a interação entre capsídeo viral e PPNs pode ser auxiliada por duas outras proteínas: Hsp-70 e histonas H1. Neste contexto, a Histona H1 liga-se ao hexon contribuindo para a importação nuclear do DNA viral (TROTMAN et al., 2001) e a Hsp-70 desempenha papel na desmontagem do capsídeo e na liberação do genoma do adenovírus para o núcleo (SAPHIRE et al., 2000). Neste estudo foram identificadas isoformas da Hsp-70 e assim se postula que possam ter papel na importação do DNA de HAdV-40 ao núcleo da célula, auxiliado pela Histona H1, que se apresenta no lado interno do núcleo.

A infecção viral pode resultar em estresse celular com subsequente apoptose (PAYNE et al., 2012). Apoptose é um processo de morte celular que pode ocorrer por uma diversidade de estímulos fisiológicos e não fisiológicos, mediante a ativação de um processo bioquímico controlado e que requer energia (DUKE et al., 1996). As células apoptóticas podem ser identificadas por alterações morfológicas distintas como condensação da cromatina, nucléolo aumentado e presença de grânulos finos de origem incerta no centômero do núcleo. Além disso, as organelas se condensam por diminuição do volume celular podendo surgir protuberâncias na superfície celular (WYLLIE et al., 1980).

Por outro lado, as características bioquímicas da apoptose podem ou não estar associadas às modificações morfológicas. Em adição, embora alterações nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático muitas vezes não possam ser observadas morfolologicamente, estas organelas participam do processo apoptótico ( RAVAGNAN et al., 2001). Diferentes eventos bioquímicos ocorrem quando da apoptose: permeabilização de membranas mitocondriais com extravazamento de moléculas a partir desta organela, dentre os quais o citocromo c e o fator de indução da apoptose (AIF- *Apoptosis inducing factor*); aumento da produção de EROS (espécie reativa de

oxigênio), ativação de caspases com subsequente externalização celular de fosfatidilserina (PS) (PITHON-CURI et al., 2003; VERMES et al., 1995).

Sabe-se que durante apoptose, as células expõem a PS para sinalizar seu “suicídio” ao ambiente. A PS é um fofolípideo predominantemente observado na superfície interna da bicamada lipídica. No início da apoptose a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada lipídica, que então é reconhecida pelos fagócitos os quais então removem as células que estão morrendo (FADOK et al., 1992). No presente estudo foi observada a presença da proteína Anexina V que tem a habilidade de se ligar a PS. Neste sentido, foi observado a partir de experimento de marcação com anexina V-FITC a presença de células apoptóticas nas células infectadas por HAdV-40 (Figura 14).

O estresse celular pode também conduzir à apoptose e este pode ser motivado por diferentes fatores. Assim, quando da ativação para o estresse ocorre a indução de proteínas relacionadas que induzem a expressão das proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2(Bax) (LEVADA-PIRES et al., 2008). No processo, ocorre a migração dessas proteínas pró-apoptóticas do citoplasma para a mitocôndria o que altera a permeabilidade mitocondrial, permitindo a liberação de outras proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo-c e a AIF (PAROLIN; REOSAN, 2001). Essas proteínas são capazes de ativar a caspase, responsável pelo início da cascata de eventos que resulta em apoptose (GREEN; REED, 1998).

Neste estudo foi identificado o citocromo-c e as proteínas AIF (Figura 7) e EROS 1 *like protein alpha*, como proteínas relacionadas a indução à apoptose. EROS 1 pertence a família EROS, é uma enzima oxirredutase sendo formada como um subproduto natural do metabolismo do oxigênio com papel importante na sinalização e homeostase celular (DEVASAGAYAM et al., 2004). No entanto, durante períodos de estresse, os níveis desta proteína podem aumentar drasticamente, resultando em danos significativos às estruturas celulares, conhecido como estresse oxidativo. Um estudo realizado por MCGUIRE et al. (2011) com linhagem de células de monócitos humanos (THP-1) infectadas co HAdV-5, mostrou que a liberação de adenovírus dos endossomas provoca um sinal de alerta o qual promove a liberação de catepsina B dos lisossomas para o citoplasma, que por sua vez provoca a desestabilização da membrana mitocondrial gerando EROS durante a infecção.

AIF é uma flavoproteína, encontrada na membrana externa mitocondrial da célula e quando ocorre dano nesta organela esta proteína migra para o citosol. AIF é reconhecidamente envolvida na iniciação da apoptose via caspase e pode regular a

permeabilidade da membrana mitocondrial após a apoptose (Jozá et al. 2009). Em assim sendo, consideramos a possibilidade de que a presença dessas proteínas poderia significar estímulo à apoptose e desta forma resposta celular à infecção pelo HAdV-40.

Ainda considerando o estresse celular tem-se que dentre as proteínas relacionadas ao evento destacam-se as de choque térmico (Hsp) (RAVAGNAN et al. 2001). As Hsp desempenham papel importante na manutenção da integridade física e funcional da célula, garantindo, portanto, a sua sobrevivência. Entre as diferentes classes de Hsp, a família da Hsp-70 é considerada a mais conservada e estudada. Neste sentido Hsp-70 tem também função celular de proteção contra o estresse oxidativo e termotolerância ao choque térmico (GLOTZER et al., 2000). No presente estudo, como já referido, foi identificadas diferentes isoformas de Hsp-70 e desta forma esta ocorrência poderia também estar significando auxílio para a replicação efetiva do HAdV-40 nas células A-549.

Outras proteínas importantes de resposta ao estresse celular são as peroxirredoxinas, as quais são proteínas antioxidantes que atuam na resposta ao estresse oxidativo causado pelo acúmulo das espécies reativas de oxigênio (RHEE et al., 2005). Os mamíferos contam com seis tipos de peroxirredoxinas que se localizam em diferentes compartimentos celulares: I e II são citosólicas; III é específica da mitocôndria; IV é encontrada no retículo endoplasmático e lisossomos e secretada no espaço extracelular; V se localiza nos peroxissomos e mitocôndria; VI é citoplasmática e mitocondrial (ARCHER et al. 2008). Foi identificado no presente estudo as proteínas *peroxiredoxin mitochondrial 4* e *5* e assim, podem estar envolvidas com a resposta celular a infecção pelo vírus.

Para o seu ciclo replicativo, os adenovírus necessitam de energia provida pela célula. Admite-se que produtos do gene E4 concorram decisivamente para a produção de energia por parte da célula com destaque para o produto de E4-ORF1. Neste sentido estudo realizado por Thai e colaboradores (2014), mostrou que HAdV-5 foi capaz de reprogramar o metabolismo de glicose na célula hospedeira pela elevação do consumo da glicose e da produção de lactato ao longo de vários dias após a infecção. As células infectadas também apresentaram uma redução dramática na taxa de consumo de oxigênio, o que levou à sugestão de uma diminuição da dependência do metabolismo oxidativo pela célula. Foi admitido que o metabolismo da glicose foi reprogramado em função da ativação feita pela proteína viral E4-ORF1 que, ao ligar-se ao MYC (fator de

transcrição celular), o qual regula o metabolismo energético através da ativação direta de genes, levou ao aumento da transcrição de genes glicolíticos.

No presente estudo foram identificadas proteínas participantes da glicólise podendo sugerir que o vírus usou dessa via para obtenção de energia: glicose-6 fosfato isomerase, frutose bi-fosfato aldolase A, B e C, gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase,  $\alpha$ -enolase, piruvato quinase, piruvato quinase M1 M2, lactase desidrogenase A e B, glicose-6 desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, as quais mostraram entre si significativa interação (Figura 8). Deve ser lembrado que a oxidação do piruvato gera o grupo acetil da acetil-coenzima A e este é então oxidado a  $\text{CO}_2$  quando no ciclo de Krebs (Figura 9). Os elétrons originados dessas oxidações são então transferidos ao  $\text{O}_2$  por uma cadeia de transportadores e a energia liberada nessas reações de transferência leva à síntese de ATP na mitocôndria, energia para a célula.

A produção de energia pela célula também pode ser obtida pela oxidação de ácidos graxos. Neste sentido, a infecção por HAdV-40 induziu a expressão de importantes proteínas integrantes dessa via: acetil Co-A desidrogenase, hidroxiacil CoA desidrogenase, enoil CoA hidratase, aldo ceto redutase e acetil CoA acetiltransferase e que mostraram entre si boa interação. No processo de oxidação de ácidos graxos, elétrons são removidos e passam pela cadeia respiratória, levando também à síntese de ATP (Figura 10).

Neste estudo, foi possível observar-se a produção de energia pela célula (regulação positiva do ciclo de Krebs, da cadeia transportadora de elétrons e da oxidação de ácidos graxo) resultante da infecção viral em função da ativação mitocondrial se distribuíram no citoplasma tendo como base a intensidade de fluorescência o que se refletiu em aumento da atividade da organela (Figura 15).

A infecção por adenovírus também favorece a biossíntese de nucleotídeos, através da via pentose fosfato para gerar ribose-5-fosfato, a qual fornece nucleotídeos para a replicação do DNA viral. Essa condição tem sido admitida derivar da ativação do MYC pela proteína viral E4-ORF1 que promove o aumento do fluxo glicolítico (Thai et al., 2014; Diamond et al., 2010). Neste sentido foram identificadas nas células infectadas as proteínas Glicose-6-desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, que são parte da via pentose fosfato e desta forma, também a sugestão de que a replicação do genoma viral foi favorecida pela célula hospedeira. No conjunto estes dados também sugerem que HAdV-40 usou de mais de uma via para obtenção de energia e seus produtos secundários, a fim de alcançar com sucesso a replicação viral.

Também tem sido visto em casos de câncer invasivos a conversão da glicose em ácido láctico na presença de oxigênio o que tem sido denominado como glicólise aeróbica ou “Efeito Warburg” (WARBURG, 1956). O “Efeito Warburg” foi também observado quando da infecção do vírus da Hepatite C (VHC) em células Huh-7.5 (Células de Hepatoma Humano). No estudo, usando análise proteômica, observou-se aumento do fluxo da via glicolítica e uma possível mudança na direção da produção de lactato com aumento concomitante na concentração de LDHA e LDHB. Foi ainda observado aumento na abundância de enzimas do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA), bem como componentes da cadeia de transporte de elétrons, o que, segundo os autores, indica que as vias do metabolismo oxidativo da glicose permaneceram intactos (DIAMOND et al., 2010). Considerando os resultados do presente estudo em que durante a infecção por HAdV-40, a glicose pode ter sido convertida em ácido láctico na presença de oxigênio e considerando a presença da Lactato desidrogenase, pode-se postular que esta situação pode ter sido também semelhante ao “efeito Warburg”.

Seguindo o ciclo infectivo de HAdV-40, na fase tardia da infecção, ocorre a interrupção da síntese de proteínas celulares (ZHANG;SCHNEIDER, 1994; HALBERT et al., 1985) e a manifestação do ECP, que se caracteriza por alterações morfológicas dramáticas nas células infectadas, incluindo arredondamentos, despreendimento da monocamada e aglutinação, além de eventual lise celular. (DEFER et al. 1990; WHITE;CIPRIANI, 1990).

Admite-se que o ECP mediado por HAdV pode ser resultante de um colapso das redes de filamentos intermediário celulares, que é mediado por produtos dos genes virais. A rede formada pela proteína vimentina é degradada logo após o início da infecção por HAdV, aparentemente desencadeada por produto de genes virais (BELIN et al., 1985). Neste sentido tem sido admitido que produtos de E1B bloqueiam o transporte de mRNA da célula com consequente inibição da tradução de proteínas celulares. Além disso, durante a fase final da infecção por HAdV as queratins K18 e K7 são clivadas pela proteína tardia L3 23-kDa, gerando uma proteína "decapitada" que não é capaz de polimerizar e formar filamentos (CHEN et al., 1993), impossibilitando a rede intacta de queratina que é essencial para a manutenção da estrutura celular normal (HESSE et al., 2005).

A integridade do epitélio depende da presença de dois tipos de queratina que formam o filamento intermediário do citoesqueleto: queratina I (citoesquelética) e II (microfibrilar). Este conjunto de queratins protege a célula contra danos mecânicos e



contra e outros tipos de estresse (COULOMBE; OMARY, 2002). Neste sentido, estudo realizado por Chen et al. (1993) mostrou que HAdV-5 induziu reorganização do sistema de queratina o que foi correlacionado à facilitação para liberação do vírus das células infectadas. Zhang e Schneider (1994) mostraram que HAdV-2 promove a interrupção da tradução de proteínas do hospedeiro e a destruição da rede de filamentos intermediários, clivando as queratinas K7 e K18 pela ação da proteína tardia viral L3-23 kDa. Dessa forma, a integridade estrutural celular ficaria comprometida facilitando a lise celular e liberação da partícula viral.

No presente estudo, foram identificadas proteínas queratinas com diferentes níveis de expressão, além da vimentina (Figura7). Desta forma consideramos que, em acordo a literatura, a expressão dessas proteínas pode ser resultante da defesa ou resposta da célula na tentativa de manter a integridade estrutural quando da infecção por HAdV-40.

Tomado como um todo, os resultados do presente estudo demonstram alteração do metabolismo das células A-549 quando infectadas por HAdV-40, pelo aumento da via glicolítica,  $\beta$ -oxidação, cadeia respiratória além da reorganização do citoesqueleto e indução de apoptose.

Finalmente, ao nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo do proteoma de células A-549 infectadas por HAdV-40 e espera-se que este possa contribuir com a compreensão da patogenia deste vírus e da relação vírus-célula. Novos estudos são necessários para validar as outras vias metabólicas afetadas por HAdV-40.

## 7- CONCLUSÕES

---

A Análise do perfil proteico de células A-549 utilizando espectrometria de massas permitiu identificar 336 proteínas diferencialmente expressas, das quais 206 foram provenientes de células infectadas (*up* reguladas) por HAdV-40.

Dentre as proteínas *up* reguladas destacam-se as relacionadas às vias de organização celular, resposta ao estresse, apoptose e energia, vias metabólicas essenciais para promoção e manutenção do ciclo celular.

Considerando as proteínas *up* reguladas pertencentes a essas diferentes vias metabólicas, conclui-se que a infecção viral induziu um ambiente celular adequado para a replicação e propagação viral tendo como parâmetros essenciais a expressão diferencial de proteínas relacionadas à geração de energia, manutenção da integridade do citoesqueleto e inibição da atividade de defesa.

Espera-se que os resultados deste estudo possam contribuir para melhor conhecimento da relação de HAdV-40 com a célula hospedeira, com possível extrapolação à principal síndrome devida ao agente, a gastroenterite aguda.

## 8- REFERÊNCIAS

---

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, v.37, p.149-157, 1992.

ANDREASI, M.S.A. et al. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 741-744, 2008.

ANDREW, N.; ROGER J.; GRAND, A. Adenovirus E1B 55-Kilodalton Protein: Multiple Roles in Viral Infection and Cell Transformation. **Journal of virology**, v.83, p.4000–4012, 2009.

ARDREY, R. E. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction, Wiley. **Huddersfield**, p.296, 2003.

ARNBERG, N. et al. Initial interactions of subgenus D adenoviruses with A549 cellular receptors: sialic acid versus v integrins. **Journal of virology**. v.74, p.7691–7693, 2000.

ARNBERG, N.; PRING-AKERBLOM, P.; WADEL, G. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor on Chang C cells. **Journal of virology**, v.76, p.8834–8841, 2002.

ARCHER, S.L. et al. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 $\alpha$ -Kv1.5 O<sub>2</sub>-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. **American Journal of Physiology**, v. 294, n. 2, p.570–578, 2008.

ARMSTRONG, J.A; PEREIRA H.G. Significance of cytopathic effects observed during the growth of adenovirus. **Experimental Cell Research**. v. 21, n<sup>o</sup>1, p.144–150, 1960.

AOKI, A.; ISOBE, K.; OHNO, S. Nationwide surveillance program of epidemic conjunctivitis in Japan. In: Bialasiewicz AA, Schaal KP, editors. **Infectious diseases of the eye**, p. 309–316, 1994.

APODACA, G. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. **Traffic**, v.2, p.149–159, 2001.

AUGUST, M.J., WARFORD, A.L. Evaluation of a commercial monoclonal antibody for detection of adenovirus antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p.2233-2235, 1987.

BAILEY, C.J.; CRYSTAL, R.G.; LEOPOLD, P.L. Association of adenovirus with the microtubule organizing center. **Journal of Virology**, v.77, n<sup>o</sup> 24, p.13275-87, 2003.

BALS R.; et al. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. **Infect Immunology**, v.67, n.11, p. 6084-9, 1999.

BARBOSA, E.B.; et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**; v.58, n.3, p.366-375, 2012.

BARARDI, C.R.M.; et al. 1998. Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.49, p.9-18, 1998.

BARILLA-LABARCA, M. L. et al. Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. **Journal Immunology**, v. 168, n. 12, p. 6298-304, 2002.

BELIN, M.T.; BOULANGER, P.A. Cytoskeletal proteins associated with intracytoplasmic human adenovirus at an early stage of infection. **Experimental Cell Research**, v. 160, p. 356-370, 1985.

BERNAL, C.; et al. Aplicación de la proteómica comparativa para la identificación de proteínas en *Phaseolus vulgaris* asociadas a resistencia a plagas. **Agronomía Tropical** v.56 n.4, p. 555-559, 2006.

BITKO, V; et al. Profilin is required for viral morphogenesis, syncytium formation, and cell-specific stress fiber induction by respiratory syncytial virus. **BMC Microbiology**, v.3, p.9, 2003.

BJELLQVIST, B., et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 6, p. 317-339, 1982.

BLANCHETTE, P; KINDSMULLER, K; GROITL, P. Control of mRNA export by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins during productive infection requires E4orf6 ubiquitin ligase activity. **Journal of virology**, v.82, n.6, p. 2642–2651, 2008.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BROWN, M. Laboratory identification of adenoviruses associated with gastroenteritis in Canada from 1983 to 1986. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p.1525-1529, 1990.

BURNETT, R.M.; GRUTTER, M.G.; WHITE, J.L. The structure of the adenovirus capsid. 1. An envelope model of hexon at 6 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.185, p.105–123, 1985.

CARDOSO, D.D.P. et al. Rotavirus e adenovirus em crianças de 0-5 anos hospitalizadas com ou sem gastroenterite em Goiânia - GO., Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.34 no.5, 1992.

CARTER, B.A. et al. Intravenous Cidofovir therapy for disseminated adenovirus in a pediatric liver transplant recipient. **Transplantation**, v.74, p.1050–1052, 2002.

CARR, D. The handbook of analysis and purification of peptides and proteins by reversed-phase HPLC. p. 1-70, 2002.

CASH, P. Proteomics: the protein revolution. **Biologist**. v. 2, p. 49, 2002.

CAO, J. et al. Adenovirus E1A requires c-Ras for full neoplastic transformation or suppression of differentiation of murine preadipocytes. **Molecular Carcinogenesis**, v.46, p. 284-302, 2007.

CEPKO, C.L.; WHETSTONE, C.A.; SHARP, P.A. Adenovirus hexon monoclonal antibody that is group specific and potentially useful as a diagnostic reagent. **Journal of Clinical Microbiology**, v.17, n.2, p.360-4, 1983.

CHANG, C.H. et al.. The change of etiological agents and clinical signs of epidemic viral conjunctivitis over an 18-year period in southern Taiwan. **Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.241, n.7, p.554-60, 2003.

CHEN, PH; ORNELLES. DA; SHENK, T. The Adenovirus L3 23-Kilodalton Proteinase Cleaves the Amino-Terminal Head Domain from Cytokeratin 18 and Disrupts the Cytokeratin Network of HeLa Cells. **Journal of virology**, v. 67, N. 6, p. 3507-3514, 1993.

CHRÉTIEN, D. et al. Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules. **Journal of Cell Biology**, v. 117, n°5, p. 1031-40, 1992.

CHERNUSHEVICH, I.V.; LOBODA, A.V.; THOMSON, B.A. An introduction to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**; v.36, n.8, p.849-65, 2001.

CHROMY, B. A.; et al. Proteomic characterization of host response to *Yersinia pestis* and near neighbours. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 474-479, 2004.

COHEN CJ. et al. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p.15191-6, 2001.

COOMBS, K.M.; Quantitative Proteomic Analyses of Influenza Virus-Infected Cultured Human Lung Cells. **Journal of Virology**, v.84, n.20, p. 10888–10906, 2010

COOPER, R.J. et al. The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982-96. **Epidemiology & Infection**, v.125, n°2, p. 333–345, 2000.

COULOMBE, PA; OMARY, M.B. ‘Hard’ and ‘soft’ principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. **Current Opinion in Cell Biology**, v.14, p.110–122, 2002.

- DIAMOND, D.L. et al.. Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. **PLOS Pathogens**. 6, e1000719, 2010.
- DAVISON, A.J.; BENKO, M; HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. **Journal of General Virology**, 84, 2895–2908, 2003.
- DEFER, C. et al. Human adenovirus-host cell interactions: comparative study with members of subgroups B and C. **Journal of Virology**, v. 64, p.2661-2673, 1990.
- DELORME-AXFORD, E.; COYNE, C.B. The Actin Cytoskeleton as a Barrier to Virus Infection of Polarized Epithelial Cells. **Viruses**, v.3, p, 2462-2477, 2011.
- DENG, J. et al. Mycobacterium Tuberculosis Proteome Microarray for Global Studies of Protein Function and Immunogenicity. **Cell Reports**. v9, Issue 6, p2317–2329, 2014.
- DEVASAGAYAM, T.P.; et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of Association of Physicians of India**, v.52, p.794-804, 2004.
- DE HOFFMANN, E.; CHARETTE, J.; STROOBANT, V. Mass spectrometry: principles and applications. **Paris: Masson éditeur**, p. 340, 1996.
- DOMINGUEZ, O.; et al. Clinical presentation and characteristics of pharyngeal adenovirus infections. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.24, p.733-734, 2005.
- DUKE, R. C.; OJCIUS, D. M.; YOUNG, J. D. Cell suicide in health and disease. **Scientific American**, v. 275, p. 280–287, 1996.
- ECHAVARRÍA M. Adenoviruses in Immunocompromised Hosts. **Clinical Microbiology Reviews**, v.21, n° 4, p. 704–715, 2008.
- ENGELKE, M.F. et al. The Dynactin Complex Enhances the Speed of Microtubule-Dependent Motions of Adenovirus Both Towards and Away from the Nucleus. **Viruses**, v.3, p.233-253, 2011.
- ENG, J.K.; MCCORMACK, A.L.; YATES, J.R.I. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. **American Society for Mass Spectrometry**; v.5, p.976-989, 1994.
- FADOK, V.A.; et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal Immunology**, v. 148, n.7, p.2207-16, 1992.
- FAVOREEL, H.W; ENQUIST L.W; FEIERBACH, B . Actin and Rho GTPases in herpesvirus biology. **Science Direct**, Vol.15 N° 9, p. 426-433, 2007.
- FERREIRA, L.M.; et al. Detection of adenovirus type 40/41 in hospitalized children from São Luís, Maranhão. **Virus Reviews & Research**; vol. 9, n.1, 2004.

FRANCESCHINI, A.; et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. **Nucleic Acids Research**. 2013

FREITAS, E. R.L.; et al. Molecular characterization of adenovirus detected from fecal samples obtained from children in the Central West region of Brazil. **Archives of Virology**, v. 155, p. 1693-1696, 2010.

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.

FLINT, S.J.; GONZALEZ, . A. Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55-kDa and E4 Orf6 proteins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 272, p. 287-330, 2003.

FLORENS, L.; et al. A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle. **Nature**, v.419, p.520-526, 2002.

FUJIMOTO, T.; et al. Evaluation of a bedside immunochromatographic tests for detection of adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.5489-5492, 2004.

GAHÉRY-SÉGARD, H.; et al. Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity. **Journal of Virology**, v.72, n.3, p.2388-97, 1998.

GALDOS, A.C.R. Análise proteômica do saco vitelino de bovinos. [Proteomic analysis of bovine yolk sac]. 2009. 111 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.**

GARNETT, C.T.; et al. Latent Species C Adenoviruses in Human Tonsil Tissues. **Journal of virology**, v.83, n°6, p. 2417–2428, 2009.

GENG, X.; REGNIER, F. E. Retention Model for Proteins in Reversed-Phase Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 296, p. 15–30, 1984.

GLEAVES, C. A., MILITONI, J.; ASHLEY, R. L. An enzyme immunoassay for the direct detection of adenovirus in clinical specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.17, p.57-59, 1993.

GIBSON, M.C.; PERRIMON, N. Apicobasal polarization: Epithelial form and function. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, 747–752, 2003.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.: Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 39-63, 2002.

GRIMWOOD, K.; et al. Patients with enteric adenovirus gastroenteritis admitted to an Australian pediatric teaching hospital from 1981 to 1992. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.1, p.131–136, 1995.

GHEBREMEDHIN B. Human Adenovirus: viral pathogen with increasing importance, **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 41, p. 26–33, 2014.

GINSBERG, HS. Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy, edited by Prem Seth. ©1999 R.G. **Landes Company**, p.237-242,1999.

GLOTZER, J.B.; et al. Activation of heat-shock response by an adenovirus is essential for virus replication. **Nature**, v. 407, p.207–211, 2000.

GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M., Proteómica clínica, **SEQC**, Barcelona, 2007.

GÖRG, A.;et al. The current state of twodimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.**Electrophoresis, Weinheim, Germany**, v. 21, p. 1037-1053, 2000.

GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v.4, p.3665–3685, 2004.

Gray, G. C.; et al.Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. **Clinical Infectious Diseases**, v.45, p.1120-1131, 2007.

GREENWALD, R.J.; FREEMAN, G.J.; SHARPE, A.H. The B7 family revisited. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 515-48, 2005.

GROSS, B.A. Conf. Proc. IEEE **Engineering in Medicine and Biology Society**, BioMEMs., v. 7, p. 5129, 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.

GREBER, U.F.; WEBSTER, P.; WEBER, J.; HELENIUS, A. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. **Embo Journal**, v.15, nº 8, p.1766-77, 1996.

HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**, v. 279, p.509–514, 1998.

HALBERT, D. N.; CUTT, J. R.; SHENK, T. Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. **Journal of Virology** 56, 250-257, 1985.

HARADA, J.N.; et al. Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. **Journal of Virology**, v. 76, p.9194–9206, 2002.



- HARVEY, B.G.; et al. Variability of human systemic humoral immune responses to adenovirus gene transfer vectors administered to different organs. **Journal of Virology**, v.73, n.8, p. 6729-42, 1999.
- HAY, R.T.; et al. Molecular interactions during adenovirus DNA replication. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v.199, p.31-48, 1995.
- HEASMAN SJ, RIDLEY AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.690–701, 2008.
- HENZEL, W.J.; et al. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, p.5011-5015, 1993.
- HERBERT, B. R.; et al. What place for polyacrylamide in proteomics? **Trends in Biotechnology, Oxford**, v. 19, p. 3-9, 2001.
- HESSE, M; et al. Rescue of keratin 18/19 doubly deficient mice using aggregation with tetraploid embryos. **European Journal of Cell Biology**, v.84, p.355–361, 2005.
- HILLEMANN, M.R.; WERNER, J.R. Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** v.85, p.183-188, 1945.
- HSIEH, M.J.; WHITE, P.J; POUTON, C.W. Interaction of viruses with host cell molecular motors. **Current Opinion in Biotechnology**, v.21, p.633–639, 2010.
- HOFFMAN, J.A. Adenovirus infections in solid organ transplant recipients. Adenovirus infections in solid organ transplant recipients. **Current Opinion Organ Transplant**, v.14, n°6, p.625-33, 2009.
- HOLM, A.; et al. Combined solid-phase extraction and 2D LC-MS for characterization of the neuropeptides in rat-brain tissue. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p.751-759, 2005.
- HONG, J.Y.; et al Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.1423-1429, 2001.
- HORWITZ, M.S. Adenoviruses, In: Fields BN; Peter M.; Howley MD; Diane E; Griffin, Robert A; Lamb; Malcolm A ;Martin MD; Roizman B.; Stephen E, StrausD. – Virology. **Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers**. p. 1864-1885, 2001.

HORWITZ, M.S; et al. Adenovirus E3MHC inhibitory genes but not TNF/Fas apoptotic inhibitory genes expressed in beta cells prevent autoimmune diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v. 106, n°46, p. 19450–19454, 2009.

Hu, Q.; et al. The Orbitrap: a new mass spectrometer. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40(4):430-43, 2005.

HUMAR, A.; et al. A surveillance study of adenovirus infection in adult solid organ transplant recipients. **American Society of Transplantation**, v.5, p. 2555-2559, 2005.

ICTV - comitê internacional de taxonomia viral – The International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <[http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?msl\\_id=28](http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?msl_id=28)>. Acesso em: 3 Julho 2014  
Jennings, K. R., Collision-induced decompositions of aromaticmolecular ions. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 1968, 1, 227–235

JEULIN H.; et al. Diagnostic value of quantitative PCR for adenovirus detection in stool samples as compared with antigen detection and cell culture in haematopoietic stem cell transplant recipients. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.11, p.1674–1680, 2011.

JIMÉNEZ-BARANDA, S; et al. Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. **Nature Cell Biology**, v.9, p. 838–846, 2007.

JOZA, N. AIF: not just an apoptosis-inducing factor". **Annals of the New York Academy of Sciences**. V.1171, p.2–11, 2009.

JONG, J.C; OSTERHAUS, A.D.M.E. Human Adenovirus Type 52: a Type 41 in Disguise? **Journal of Virology**, v. 82, n° 7, p. 3809–3810, 2008.

JUNGBLUT, P.R.; et al. Helicobacter pylori proteomics by 2-DE/MS, 1-DE-LC/MS and functional data mining. **Proteomics**, v.10, n°2, p.182-93,2010.

KAJITA, M.; et al. Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells. **Nature Communications**. v.31, n° 5, p.4428, 2014.

KAJON, A.E.; MOSELEY, J.M.; METZGAR, D. Molecular epidemiology of adenovirus type 4 infections in US military recruits in the post vaccination era (1997–2003). **Journal of Infectious Diseases**, v.196, p.67–75, 2007.

KATZE, MG; et al. Adenovirus VA RNA complexes with the 68 000 Mr protein kinase to regulate its autophosphorylation and activity. **Embo Journal**, v. 6, n. 3, p. 689-97, 1987.

KELKAR, S.A; et al. Cytoplasmic dynein mediates adenovirus binding to microtubules, **Journal of Virology**, v.78, p.10122–10132, 2004.

- KLEINBERGER, T. Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein. **Apoptosis**, v. 5, n.3, p.211-5, 2000.
- KIERSZENBAUM, A.L.. Sistema digestório inferior. In: *Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia*. Rio de Janeiro: **Saunders Elsevier**, p.449-474, 2004.
- KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humagenetik**, v. 26, p. 231- 243, 1975.
- KUNITANI, M.; JOHNSON, D. Model of Protein Conformation in the Reversed-Phase Separation of Interleukin-2 Muteins. **Journal of Chromatography**, v. 371, p. 313–333, 1986.
- LAM, Y.W.; et al. Proteomics Analysis of the Nucleolus in Adenovirus-infected Cells. **Molecular & Cellular Proteomics**, 117-130, 2010.
- LARRAÑAGA, C.; et al. Adenovirus surveillance on children hospitalized for acute lower respiratory infections in Chile (1988-1996). **Journal of Medical Virology**, v.60, p.342-346, 2000.
- LEEN, A.M.; et al. Conserved CTL epitopes on the adenovirus hexon protein expand subgroup crossreactive and subgroup-specific CD8+ T cells. **Blood**, v.104, n.8, p.2432-40, 2004.
- LEMA, C.L.; CISTERNA, D.M.; FREIRE, M.C. Neurologic disease due to adenovirus infection. **Medicina buenos Aires**, v.65, p196–200, 2005.
- LE NAOUR, F. Contribution of proteomics to tumor immunology, **Proteomics**, v. 1, p. 1295–1302, 2001.
- LEOPOLD, P.L.; et al. Dynein-and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis, *Human Gene Therapy*, v.11, p. 151–165, 2000.
- LERUEZ-VILLE, M.; et al. Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. **Clinic Infect Disseas**, v.38, p.45–52, 2004.
- LI, E.; et al. Adenovirus Endocytosis Requires Actin Cytoskeleton Reorganization Mediated by Rho Family GTPases. **Journal of virology**, p. 8806–8812 ,Vol. 72, No. 11, 1998.
- LI L.; et al. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. **Microbiol Immunology**; v.49, n°2, p.121-128, 2005.
- LI, L.; MUZAHIM, Y.; BOUVIER, M. Crystal structure of adenovirus E3-19K bound to HLA-A2 reveals mechanism for immunomodulation. **Nature structural & molecular biology** , v.19, n°11, p.1176-1181, 2012.

- LIPSON, S.M; et al. Presumptive identification of common adenovirus serotypes by the development of differential cytopathic effects in the human lung carcinoma (A549) cell culture. **FEMS Microbiology Letters**, v.113, nº 2, p. 175–182, 1993.
- LIU, G.Q.; et al. A thermolabile mutant of adenovirus 5 resulting from a substitution mutation in the protein VIII gene. **Journal of Virology**, v.53, p.920–925, 1985.
- LIU, H; NAISMITH, JH; HAY, RT. Adenovirus DNA replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.272, p.131-64, 2003.
- LIU, H.; et al. Atomic structure of human adenovirus by cryo-EM reveals interactions among protein networks. **Science**, v.329, p.1038–1043, 2010.
- LIU, C; et al. Identification of Human Host Proteins Contributing to H5N1 Influenza Virus Propagation by Membrane Proteomics. **Journal of Proteome Research**, v.11, p.5396–5405, 2012.
- LU, J; et al. Filamin B mutations cause chondrocyte defects in skeletal developmen. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n.14, p. 1661–1675, 2007.
- LJUNGMAN, P. Treatment of adenovirus infections in the immunocompromised host. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, p.583-588, 2004.
- LOUIE, JK; KAJON, AE; HOLODNIY, M. Severe pneumonia due to adenovirus serotype 14: a new respiratory threat? **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 421–5, 2008.
- MA, H.C.; HEARING, P. Adenovirus structural protein IIIa is involved in the serotype speciicity of viral DNA packaging. **Journal of Virology**; v.85, p. 7849–7855, 2011.
- MANN, M.; HOJRUP, P.; ROEPSTORFF, P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. **Biological Mass Spectrometry**, v.22, p.338-345, 1993.
- MANNERVIK, M; et al. Adenovirus E4 open Reading frame 4- induced dephosphorylation inhibits E1A activation of the E2 promoter and E2F-1-mediated transactivation independently of the retinoblastoma tumor suppressor protein. **Virology**, v. 256, nº2, p.313-21, 1999.
- MAUTNER V. Growth and purification of enteric adenovirus type 40. *Methods in Molecular Medicine*, v.130, p.145-156, 2007.
- MAY, C.; et al. Instruments and methods in proteomics. **Methods in Molecular Biology**, v.696, p. 3-26, 2011.

MCGUIRE, K.A.; et al. Adenovirus Type 5 Rupture of Lysosomes Leads to Cathepsin B-Dependent Mitochondrial Stress and Production of Reactive Oxygen Species. **Journal of Virology**, v.85, nº 20, p. 10806–10813, 2011.

MEI, Y.F; et al. Comparative analysis of the genome organization of human adenovirus 11, a member of the human adenovirus species B, and the commonly used human adenovirus 5 vector, a member of species C. **Journal of General Virology**, v. 84, p.2061-71, 2003.

MEIER, O. Adenovirus endocytosis. **The journal of gene medicine**, v.6, p. 152–S163, 2004.

MENDES, M.; et al. Proteomic changes in HEK-293 cells induced by hepatitis delta virus replication, **Journal of proteomic**, v.89, p.24 – 38, 2013.

MYERS, T. G.; et al. A protein expression database for the molecular pharmacology of cancer. **Electrophoresis**, v.18, p. 647–53, 1997.

MIDDLETON, P.J. Viruses that multiply in the gut and cause endemic and epidemic gastroenteritis. **Clinical and Diagnostic Virology**, v.6, p.93-101,1996.

MOLINIER-FRENKEL, V.; et al. Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response. **Journal of Virology**, v.76,n.1, p.127-35, 2002.

MOORE, P.L.; STEELE, A.D.; ALEXANDER, J.J. Relevance of commercial diagnostic tests to detection of enteric adenovirus infections in South Africa. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, n.4, p.1661-3, 2000.

MORESCO, V.; et al . Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. **Mar Pollut Bull**. v.64, nº1, p.40-48, 2012.

MORRIS, S.J.; LEPPARD, K.N. Adenovirus serotype 5 L4-22K and L4-33K proteins have distinct functions in regulating late gene expression. **Journal of Virology**, v. 83, p.3049–3058, 2009.

MOYER, C.L.; et al. Functional genetic and biophysical analyses of membrane disruption by human adenovirus. **Journal of Virology**, v. 85, p.2631–2641, 2011.

MULLER, E.C.A; et al. Ocorrência de adenovírus em crianças com gastroenterite aguda grave na Cidade de Belém, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde** v.1, n.3, p. 49-55, 2010.

MURAD, A.M; et al. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MSE. **Journal of Separation Science**, v.34, p.2618–2630, 2011.

NAGHAVI, M.H; GOFF, S.P. Retroviral proteins that interact with the host cell cytoskeleton. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, p. 402–407, 2007.

- NEMEROW, G.R.; PACHE, L.; REDDY, V. Stewart PL. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. **Virology**, v.384, n.2, p.380-8, 2009.
- NILSSON, EC; et al. The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis. **Nature Medicine**, v. 17, n°1, p.105–109, 2011.
- O'FARRELL, PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.250, p.4007–4021, 1975.
- O'HARA, A.J.; CHUGH, P.; WANG, L. Pre-micro RNA signatures delineate stages of endothelial cell transformation in Kaposi sarcoma. **PLOS Pathogens**, 2009.
- OSTAPCHUK, P; HEARING, P. Minimal cis-acting elements required for adenovirus genome packaging. **Journal of Virology**, v.77, n°9, p. 5127-35, 2003.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p. 837-846, 2000.
- PANDO-ROBLESA, V.; et al. Quantitative proteomic analysis of Huh-7 cells infected with Dengue virus by label-free LC–MS. **Journal of Proteomic**, v.111, p. 16 – 29, 2014.
- PAPPIN, D. J. Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOFmass spectrometry. **Methods in Molecular Biology**, v.64, p.165-173,1997.
- PATTANAKITSAKUL, S.N.; et al. Proteomic analysis of host responses in HepG2 cells during dengue virus infection. **Journal of Proteome Research**; v.6, n.12, 4592–600, 2007.
- PAYNE,C.M; et al. Anti-Apoptotic and Pro-Apoptotic Molecular and Cellular Pathways Induced by Viral Agents of Human and Animal Gastroenteritis: A Comprehensive Review. **Biomedical Diagnostics and Research Inc.**, p. 1-93, 2012.
- PERKINS, D.N.; et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**; v.20, n.18, p.3551-67, 1999.
- PETRICOIN, E. F.; et al. Toxicoproteomics: Serum proteomic pattern diagnostics for earlydetection of drug induced cardiac toxicities and cardioprotection,**Toxicologic Pathology**, v.32, p. 122–130, 2004.
- PHILIPSON, L; PETTERSSON, R. F. The coxsackie-adenovirus receptor--a new receptor in theimmunoglobulin family involved in cell adhesion. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v.273, p.87-111, 2004.
- PITHON-CURI, T. C.;et al. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 284, n. 6, p.1355-1361, 2003.
- PIMENTA, A. M. C. Os desafios do proteoma. **Ciência Hoje**, v. 32, p. 16-22, 2003.

- PUIG, M.; et al. Detection of adenovirus and enterovirus in polluted waters by Nested PCR amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.8, p.2963-2970, 1994.
- PUNSINEE, S.; et al. Molecular characterization of human adenovirus infection in Thailand, 2009–2012. **Virology Journal**, 10:193, 2013.
- POLLARD, T.D. Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. **Current Opinion in Cell Biology** v. n.22, p.50–56, 2010.
- RAO, L; PEREZ, D; WHITE, E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v.135, p.1441-1455, 1996.
- RAJAIYA, J.; CHODOSH, J. New paradigms in infectious eye disease: adenoviral keratoconjunctivitis. **Archivos de la Sociedad Oftalmológica**, v.81, p.493-498, 2006.
- RAVAGNAN, L.; et al. Heat shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. **Nature Cell Biology**, v. 3, p.839-843, 2001.
- REINA J, HERVÁS J, ROS MJ. Differential clinical characteristics among pediatric patients with gastroenteritis caused by rotavirus and adenovirus. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. V.12, nº8, p.378-84, 1994.
- RHEE, S.; CHAE, H.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v.38, nº12, p. 1543–5, 2005.
- RIVIER, J.; MCCLINTOCK R. Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography of Insulins from Different Species. **Journal of Chromatography**, v.268, p. 112–119, 1983.
- ROCHA, T. L.; et al. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Comunicado Técnico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, n. 136, p. 1- 12, 2005.  
Tabela suplementar 1: Proteínas induzidas pela infecção por HAdV-40 em células A-549 . 85
- ROCHA, T. L.; et al. Análise proteômica de raízes de algodoeiro resistente e susceptível infectadas com *Meloidogyne incognita*. **Comunicado Técnico. Embrapa Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, n. 162, p.113-118, 2007.
- ROELVINK, P.W.; et al. The Coxsackie-Adenovirus receptor protein can function as acellular attachment protein for Adenovirus serotypes from Subgroups A,C,D,E and F. **Journal of Virology** , v.72, n.10, p.7909-7915, 1998.
- ROSA-CALATRAVA, M; et al. Adenovirus protein IX sequesters host-cell promyelocytic leukaemia protein and contributes to efficient viral proliferation. **EMBO Report**, v.4, n.10, p. 969-75, 2003.

ROWE, W.P.; et al. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v.84, p. 570–573, 1953.

RUSSELL WC. Update on adenovirus and its vectors. **Journal of General Virology** v.81, p.2573–2604. 2000.

RUUSKANEN, O.; MEURMAN, O; AKUSJÄRVI, G. Adenoviruses. In: RICHMAN, D. D. **Clinical Virology**. Churchill Livingstone, p.525-547, 1997.

SAITOH-INAGAWA, W; et al. Rapid diagnosis of adenoviral conjunctivitis by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of clinical microbiology**; v.34, n°9, p. 2113–2116, 1996.

SAIKRUANG, W; et al. Detection of diarrheal viruses circulating in adult patients in Thailand. **Archives of Virology**, v.159, n°12, p.3371-5, 2014.

SAPHIRE, A.C.S; et al. Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and Hsc70. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 4298-4304, 2000.

SAN MARTÍN, C.; et al. Combined EM/X-ray imaging yields a quasi-atomic model of the adenovirus-related bacteriophage PRD1, and shows key capsid and membrane interactions. **Structure**, v.9, p.917–930, 2001.

SAN MARTÍN C.; et al. Localization of the N-terminus of minor coat protein IIIa in the adenovirus capsid, **Journal of Molecular Biology**, v. 383, p. 923–934, 2008.

SAN MARTÍN C. Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly. **Viruses**, v.4, p.847-877, 2012.

SAOTOME, I.; CURTO, M.; MCCLATCHEY, A.I. Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. **Developmental Cell**, v.6, p.855–864, 2004.

SABAN, S.D.; et al. Visualization of  $\alpha$ -helices in a 6 Å resolution cryoEM structure of adenovirus allows refinement of capsid protein assignments. **Journal of Virology**, v. 80, p. 12049–12059, 2006.

SCARBOROUGH, R. M.; et al. Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 5575–5579, 1984.

SESTER, M.; et al. Conserved amino acids within the adenovirus 2 E3/19K protein differentially affect downregulation of MHC class I and MICA/B proteins. **The Journal of Immunology**, v. 184, n°1, p.255–267, 2010.



- SINGH, M.; SHMULEVITZ, M.; TIKOO, S.K. A newly identified interaction between IVa2 and pVIII proteins during porcine adenovirus type 3 infection. **Virology**, v.336, p.60–69, 2005.
- SINGH, A. "Pediatric Emergency Medicine Practice Acute Gastroenteritis — An Update". **Emergency Medicine Practice**, v.7, n.7, 2010.
- SCHREINER, S.; WIMMER, P.; DOBNER, T. Adenovirus degradation of cellular proteins. **Future Microbiology**, v.7, n.2, p. 211–225, 2012.
- SHEN, Q; et al. Changes in the cellular proteins of A549 infected with Hepatitis E virus by proteomics analysis. **BMC Veterinary Research**, v.10, p188, 2014.
- SHEN, L.; TURNER, J.R. Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, v.16, p.3919–3936, 2005.
- SHENK, T. Adenoviridae: the viruses and their replication. In: **Virology**. Knipe DM, Howley PM. Lippincott-Raven, NY, USA, 2265–2300, 2001.
- SHENK, T. Adenoviridae: the viruses and their replication. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), **Fields virology**, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa. , p. 2111-2148, 1996.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. Porto Alegre: **Bookman**, p.836, 2002.
- SMITH, J.G; NEMEROW, G.R. Mechanism of adenovirus neutralization by Human alpha-defensins. **Cell Host Microbe**, v. 3, pg. 11–19, 2008.
- SMITH, J.G.; et al. Adenovirus. **Current Topics in Microbiology and Immunology** v.343, p.195–224, 2010a.
- SMITH JG, SILVESTRY M, LINDERT S. Insight into the mechanisms of adenovirus capsid disassembly from studies of defensin neutralization. **PLoS Pathog** 2010b.
- SCHMITZ, A.A.; et al. Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. **Experimental Cell Research**, v.261, p.1–12, 2000.
- SCHENAUER, M.R.; FLYNN, G.C.; GOETZE, A.M.; Identification and quantification of host cell protein impurities in biotherapeutics using mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v.428, p.150-157, 2012.
- SOEUR, M; et al. Meningoencephalitis and meningitis due to an adenovirus type 5 in two immunocompetent adults. **Acta neurologica belgica**, v. 91, n°3, p.141-50, 1991.
- STAUFENBIEL, M.; EPPLE, P.; DEPERT, W. Progressive Reorganization of the Host Cell Cytoskeleton during Adenovirus Infection. **Journal of virology**, p. 1186-1191, 1986.

STEWART, P.L.; FULLER, S.D.; BURNETT, R.M. Difference imaging of adenovirus—Bridging the resolution gap between x-ray crystallography and electron-microscopy. **EMBO Journal**, v.12, p.2589–2599, 1993.

STEWART, P.L.; et al. Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. **EMBO Journal**, v.16, p.1189–1198, 1997.

STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L.; BERG, J. M. Bioquímica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 5 Ed. 2004. p. 513.

SUN, X; WHITTAKER, G.R. Role of the actin cytoskeleton during influenza vírus internalization into polarized epithelial cells. *Cellular Microbiology*, v. 9, nº7, p. 1672–1682, 2007.

TAPON, N.; HALL, A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin. **Current Opinion in Cell Biology**. V.9, p. 86–92, 1997.

TÄUBER, B; DOBNER, T. Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. **Gene**, v.278, p.1–23, 2001.

TEMPST, P.; et al. Microscale Structure Analysis of a High Molecular Weight, Hydrophobic Membrane Glycoprotein Fraction with Platelet-Derived Growth Factor-Dependent Kinase Activity. **Journal of Chromatography**, v. 359, p. 403–412, 1986.

TAYLOR, M. P; KOYUNCU, O.O; ENQUIST, L.W. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, nº6, p. 427–439, 2011.

THAI, M; et al. Adenovirus E4ORF1-Induced MYC Activation Promotes Host Cell Anabolic Glucose Metabolism and Virus Replication. **Cell Metabolism**, v. 19, p. 694–701, 2014.

THIMMAPAYA, B.; et al. Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. **Cell** v.31, n.3, p.543-51, 1982.

TIEMESSEN, C.T; KIDD, A.H. The subgroup F adenoviruses. **Journal of General Virology**, v.76, p.481- 49, 1995.

TRIBOULEY, C.; et al. The product of the adenovirus intermediate gene IVa2 is a transcriptional activator of the major late promoter. **Journal of Virology**, v. 68, nº7, p.4450-7, 1994.

TOLLEFSON, A.E., et al. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. **Journal of Virology**, v.70, n.4, p.2296-306, 1996.

TROTMAN, L.C.; et al. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. **Nature Cell Biology**, v.3, p.1092–1100, 2001.

TULLIS, G.E.; BURGER, L.R.; PINTEL, D.J. The trypsin-sensitive RVER domain in the capsid proteins of minute virus of mice is required for efficient cell binding and viral infection but not for proteolytic processing in vivo. **Virology**; v.191, p.846–857, 1992.

UHNOO, I.; et al. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. **Journal of Clinical Microbiology**. V.20, v.3, p. 365-72, 1984.

VAN DER VLIET, PC. Adenovirus DNA replication. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.199, p.1-30, 1995.

VASCONCELOS, D; NORRBY, E; OGLESBEE, M. The cellular stress response increases measles virus-induced cytopathic effect. **Journal of General Virology**, v.79, p.1769–1773, 1998.

VASTAG, L.; et al. Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism. **PLoS Pathog**. V. 7. N.7, e1002124, 2011.

VELLINGA, J.; et al. The coiled-coil domain of the adenovirus type 5 protein IX is dispensable for capsid incorporation and thermostability. **Journal of Virology**, v.79, p.3206–3210, 2005.

VERMES, I.; A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V". **Journal of Immunology**, v.184, n. 1, p. 39-51, 1995.

VON MERING, C.; et al. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. **Nucleic Acids Research** v. 31, p.258–61, 2003.

VYDAC, G. Principles and applications of high-performance ion-exchange chromatography for bioseparations. p. 1-14, 1998.

YAMASHITA T.; et al. Complete nucleotide sequence and genetic organization of aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. **Journal of Virology**, v. 72, p.8408-8412, 1998.

YAMASHITA, T.; et al. Identification of aichi virus infection by measurement of immunoglobulin responses in an enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal Clinic Microbiology**, v.39, p.4178-4180, 2001.

YOUNG, C.S. The structure and function of the adenovirus major late promoter. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.272, p.213-249, 2003.

Xu W, McDonough MC, Erdman DD. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. **Journal of Clinic Microbiology**,v.38, p.4114-20, 2000.

ZENOBI, R.; KNOCHENMUSS, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry., **Mass Spectrometry Reviews**, v. 17, p. 337-366, 1998.

ZHANG, Y.; BERGELSON J.M. Adenovirus Receptors. **Journal of Virology**, v.79, n.19, p.1212, 2005.

ZHANG, Y.; SCHNEIDER, R.J. Adenovirus Inhibition of Cell Translation Facilitates Release of Virus Particles and Enhances Degradation of the Cytokeratin Network. **Journal of Virology**, p. 2544-2555, 1994.

ZHANG, C. G., CHROMY, B. A., MCCUTCHEN-MALONEY, S. L., Host-pathogen interactions: a proteomic view. **Expert Review of Proteomics**, v.2, p.187–202, 2005.

ZHAO, H.; et al. Strategic Attack on Host Cell Gene Expression during Adenovirus Infection. **Journal of Virology**, v.77, n° 20, p. 11006–11015, 2003.

TSUNG-PEI T.; et al. Community Outbreak of Adenovirus, Taiwan, 2011. **Emerging Infectious Diseases** . Vol. 18; No. 11; p. 1825-32; 2012.

WALLS, T.; SHANKAR, A.G.; SHINGADIA, D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. **Lancet Infectious Diseases**, v.3, p.79-86, 2003.

WALSH, M.P.; et al. Computational analysis of two species C human adenoviruses provides evidence of a novel virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.3482–3490, 2011.

WALTHER, T.C.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. **J Cell Biology**;v.190, n.4, p.491-500, 2010.

WARREN, J.C.; CASSIMERI, L. The contributions of microtubule stability and dynamic instability to adenovirus nuclear localization efficiency. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, V. 64, n°9, p. 675–689, 2007.

WANG,Y.; FRANZEN, J.; WANCZEK, K.P. The non-linear resonance ion trap. Part 2. A general theoretical analysis. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**; v.124, n.1, p.125-44,1993.

WANG EW, SCOTT MO, RICCIARDI RP. An adenovirus mRNA which encodes a 14,700-Mr protein that maps to the last open reading frame of region E3 is expressed during infection. **Journal of Virology**; v.62, p.1456-9,1988.

WARBURG O. On the origin of cancer cells. **Science**. v.123, n.3191, p.309-14, 1956.

- WATSON, J. T. Introduction to mass spectrometry, United States, Philadelphia: **Lippincott-Raven Publishers**, 1997, p. 496.
- WEBSTER, A.; LEITH, I.R.; HAY,R.T. Activation of adenovirus-coded protease and processing of preterminal protein. **Journal of Virology**, v.68, p.7292-7300, 1994.
- WELCH, M.D.; MULLINS, R.D. Cellular control of actin nucleation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.18, p.247-288, 2002.
- WEISENBERG R.C. Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations". **Science** 177: 1104–5, 1972.
- WICKHAM, T.J; et al. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. **Cell**, v.73 p. 309–319, 1993.
- WILKINS, M.R.; et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v.13, p.19-50, 1996.
- WYLLIE, A.H.; KERR, J.K.R.;CURRIE, A.R. Cell death the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, v.68, p. 251-306,1980.
- WILHELMI I, ROMAN E, SÁNCHEZ-FAUQUIER A . Viruses causing gastroenteritis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, p. 247-262, 2003.
- WINDHEIM, M; et al. A unique secreted adenovirus E3 protein binds to the leukocyte common antigen CD45 and modulates leukocyte functions. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.110, n°50, p.1-10, 2013.
- WINDOFFER, R.; et al. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. **Journal of Cell Biology**, v.194, n.5, p. 669-678, 2011.
- WOLLNIK, H. TOF-MS. **Mass Spectrom Reviews**;v.12, n.1, p.89-114,1993.
- WOLD, W.S.; et al. Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. **Current Opinion in Immunology**, v. 11, p. 380–386, 1999.

## 9.0 ANEXOS

Tabela 1: Proteínas induzidas pela infecção por HAdV-40 em células A-549.

Uniprot ID	Nome do Gene	Identificação da Prtoteína	Score	Fold change
<b>METABOLISMO</b>				
<b>Metabolismo de Lipídeo</b>				
P07686	HEXB	Beta hexosaminidase subunit beta	510,58	**1
G3V2V8	NPC2	Epididymal secretory protein E1	3708,74	1,86
Q9H2U2	PPA2	Inorganic pyrophosphatase 2 mitochondrial	1912,88	**
<b>Metabolismo de Amino ácido</b>				
P00505	GOT2	Aspartate aminotransferase	1477,42	1,80
P00367	GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1 mitochondrial	1486,4	**
P49448	GLUD2	Glutamate dehydrogenase 2 mitochondrial	410,18	**
Q16719	KYNU	Kynureninase	1342,6	**
P04181	OAT	Ornithine aminotransferase mitochondrial	966,54	**
P49189	ALDH9A1	4 trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	1153,39	**
E9PKG1	PRMT	Protein arginine N methyltransferase 1	935	**
<b>Metabolismo de Carboidrato</b>				
P11217	PYGM	Glycogen phosphorylase muscle form	3576,21	1,75
P15121	ALDR1	Aldose reductase	53044,9	**
			5	
P30837	ALDH5	Aldehyde dehydrogenase mitochondrial	956,8	2,09
I3L3W9	ALDH3A1	Aldehyde dehydrogenase dimeric NADP preferring fragmente	22316,7	**
			6	
P49189	ALDH4	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	1153,39	**
P14314	G19P1	Glucosidase 2 subunit beta	1839,43	1,24
Q14697	GANAB	Neutral alpha glucosidase AB	3783,3	**
<b>ENERGIA</b>				
<b>Glicólise, gliconeogênese e a via das pentoses fosfato</b>				
P06744	GPI	Glucose 6 phosphate isomerase	9293,19	**
P04075	ALDOA	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase A	9738,26	**
P05062	ALDOB	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase B	653,29	**
P09972	ALDOC	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase C	1756,06	**
P04406	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	27674,9	**
P07205	PGK2	Phosphoglycerate Kinase	1988,85	**
P06733	ENOA1	Alpha enolase	14571,0	8,25
P30613	PKLR	Pyruvate kinase	2426,8	**
P14618	PKM	Pyruvato Kinase isozymes M1 M2	4932,17	2,14
P00338	LDHA	L lactate dehydrogenase A chain	8480,72	3,78
P07195	LDHB	L lactate dehydrogenase B chain	1953,09	8,08
O60701	UGDH	Glucose 6 dehydrogenase	614,33	**
P52209	PGD	6 phosphogluconate dehydrogenase	6094,91	**
P51854	TKTL1	Transketolase	5970,66	**
<b>Cyclo de Krebs</b>				
B4DJV2	CS	Citrate synthase	18811,3	**
Q02218	OGDH	2 oxoglutarate dehydrogenase mitochondrial	2680,16	**

<b>U6DE74</b>	ODO2	Dihydrolipoyllysine residue succintransferase componente of 2 oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	5990,63	**
<b>P09622</b>	DLD	Dihydrolipoyl dehydrogenase	2180,8	**
<b>E9PDQ8</b>	SUCLG2	Succinyl CoA ligase GDP forming subunit beta mitochondrial	2014,15	**
<b>P40926</b>	MDH2	Malate dehydrogenase mitochondrial	8194,36	1,93
<b>P23368</b>	ME2	NAD dependent malic enzyme mitochondrial	601,97	**
<b>Transporte de Eletróns</b>				
<b>P14854</b>	COX6B1	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	10173,58	**
<b>Q9Y6N5</b>	SQRDL	Sulfide quinone oxidoreductase mitochondrial	2488,31	**
<b>H0YLU7</b>	ETFA	Electron transfer flavoprotein subunit alpha mitochondrial	1697,27	**
<b>P25705</b>	ATP5A1	ATP synthase subunit alpha	9849,17	**
<b>P25705</b>	ATPM	ATP synthase subunit alpha mitochondrial	24222,32	**
<b>H0YH81</b>	ATP5B	ATP synthase subunit beta	5238,92	**
<b>P30049</b>	ATP5D	ATP synthase subunit delta mitochondrial	2140,64	**
<b>Oxidação de Ácido graxo</b>				
<b>P49748</b>	ACADVL	Very long chain specific acyl CoA dehydrogenase mitochondrial	595,27	**
<b>P30084</b>	ECHS1	Enoyl CoA hydratase mitochondrial	449,51	2,20
<b>Q16836</b>	HADH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	1111,66	**
<b>P24752</b>	THIL	Acetyl CoA acetyltransferase mitochondrial	1299,06	**
<b>P42765</b>	ACAA2	3 ketoacyl CoA thiolase	217,81	1,78
<b>G3V4F2</b>	ACOT1	Acyl coenzyme A thioesterase 1	1365,52	
<b>H3BS70</b>	ECH1	Enoyl CoA delta isomerase 1 mitochondrial	1747,52	**
<b>Q13011</b>	ECH1	Delta (3,5) delta (2,4) dienoyl CoA isomerase mitochondrial	2015,78	**
<b>Q04828</b>	AKR1C1	Aldo keto reductase family 1 member C1	6521,87	**
<b>B4DK69</b>	AKR1C2	Aldo keto reductase Family 1 member C2	5934,6	**
<b>P42330</b>	AKR1C3	Aldo keto reductase family 1 member C3	1362,54	
<b>O60218</b>	AKR1B10	Aldo keto reductase family 1 member B10	14196,95	**
<b>CICLO CELULAR E PROCESSAMENTO DE DNA</b>				
<b>P41219</b>	PRPH	Peripherin	989,74	1,56
<b>P16403</b>	HIST1H1C	Histone H1 2	1355,26	**
<b>H0YFX9</b>	H2AFJ	Histone H2A	2674,83	8,76
<b>P04908</b>	H2AFA	Histone H2A type 1 H	14606,21	**
<b>Q99878</b>	HIST1H2AJ	Histone H2A type 1 J	11403,14	**
<b>P68431</b>	HIST1H3A	Histone H3 1	2742,97	**
<b>Q71DI3</b>	HIST2H3A	Histone H3 2	6233,23	**
<b>K7EK07</b>	H3F3B	Histone H3	8838,49	
<b>Q04837</b>	SSBP1	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	2546,56	**
<b>P55072</b>	TERA	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	7999,63	**
<b>P13010</b>	XRCC5	X ray repair cross complementing protein	370,61	1,34
<b>P19338</b>	NCL	Nucleolin	1339,11	1,70
<b>P02545</b>	LMNA	Prelamin A C	413,83	**
<b>Q01105</b>	SET	Protein SET	1484,01	1,53
<b>TRANSCRIÇÃO</b>				

<b>P52597</b>	HNRPF	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	217,3	**
<b>D6R9D3</b>	HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	5494,8	**
<b>P31943</b>	HNRPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	812,74	1,84
<b>P61978</b>	HNRPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	706,13	1,55
<b>O60506</b>	HNRPQ	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	4176,69	**
<b>Q00839</b>	HNRPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	1142,75	1,97
<b>O43390</b>	HNRPR	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	1602,2	**
<b>P09651</b>	HNRPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A	2212,21	1,49
<b>P61978</b>	HNRPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	706,13	1,55
<b>Q14103</b>	HNRPD	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	1550,1	**
<b>P22626</b>	P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2 B1	679,51	3,53
<b>F8VTQ5</b>	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	8536,67	**
<b>PAIRB</b>	SERBP1	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	720,23	1,39
<b>P67809</b>	YBX1	Nuclease sensitive element binding protein 1	1386,63	1,63
<b>P80723</b>	BASP1	Brain acid soluble protein 1	1278,94	2,20
<b>P39687</b>	ANP32A	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	1304,16	**
<b>Q92688</b>	ANP32B	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	1126,87	**
<b>Q07955</b>	SRSF1	Serine/arginine-rich splicing factor 1	889,76	**
<b>SÍNTESE DE PROTEÍNAS</b>				
<b>P08865</b>	RPSA	40S ribosomal protein SA	2779,35	1,23
<b>F8VR69</b>	RPL6	60S ribosomal protein L6	1545,58	**
<b>P18124</b>	RPL7	60S ribosomal protein L7	284,89	1,25
<b>RPL29</b>	RPL29	60S ribosomal protein L29	793,61	1,50
<b>P15880</b>	RPS2	40S ribosomal protein S2	767,19	1,23
<b>P62241</b>	RPS8	40S ribosomal protein S8	1886,43	1,25
<b>P0CW22</b>	RPS17L	40S ribosomal protein S17 like	4829,67	1,39
<b>P08708</b>	RPS17	40S ribosomal protein S17	4829,67	1,42
<b>P62857</b>	RPS28	40S ribosomal protein S28	6871,99	1,66
<b>P05386</b>	RPLP1	60S acidic ribosomal protein P1	7589,21	1,34
<b>P05387</b>	RPLP2	60S acidic ribosomal protein P2	7911,27	1,61
<b>P27635</b>	RPL10	60S ribosomal protein L10	1598,45	**
<b>PROCESSAMENTO DE PROTEÍNAS (FOLDIND, MODIFICAÇÃO, DESTINAÇÃO)</b>				
<b>F8WE65</b>	PPIA	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	13637,4	**
<b>P62937</b>	CYPA	Peptidyl prolyl cis trans isomerase A	14622,44	**
<b>Q14019</b>	COTL1	Coactosin like protein	1987,56	**
<b>Q9BS26</b>	ERP44	Endoplasmic reticulum resident protein 44	2017,87	**
<b>H0Y875</b>	CALU	Calumenin	1869,05	3,29
<b>P11021</b>	GRP78	78 kDa glucose regulated protein	4605,42	1,80
<b>H0YMC1</b>	ANPEP	Aminopeptidase N	2705,8	**
<b>D6R956</b>	UCHL1	Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase isozyme L1	6928,94	**
<b>E9PCB6</b>	NLN	Neurolysin mitochondrial	476,87	**
<b>P07339</b>	CPSD	Cathepsin D	4701,19	1,44
<b>H7C1V0</b>	CTSD	Cathepsin D light chain fragment	1339,79	**
<b>P25786</b>	PSMA1	Proteasome subunit alpha type 1	1002,25	**
<b>O14818</b>	PSMA7	Proteasome subunit alpha type 7	1053,71	**
<b>U6DJS2</b>	E9PK47	Phosphorylase	890,04	**
<b>O00469</b>	PLOD2	Procollagen lysine 2 oxoglutarate 5 dioxygenase 2	2003,2	**
<b>Q9HAV7</b>	GRPEL1	GrpE protein homolog 1 mitochondrial	340,53	**



<b>FACILITAÇÃO DO TRANSPORTE</b>				
<b>P21796</b>	VDAC1	Voltage dependente anion selective channel protein 1	839,87	**
<b>O00299</b>	CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1	1213,75	**
<b>Q14764</b>	MVP	Major vault protein	311,77	2,11
<b>COMUNICAÇÃO CELULAR / MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS</b>				
<b>P61586</b>	RHOA	Transforming protein RhoA	5630,07	**
<b>Q9H0U4</b>	RAB1B	Ras related protein Rab 1B	2334,93	**
<b>P61018</b>	RAB4B	Ras related protein Rab 4B	2204,31	**
<b>P60953</b>	CDC42	Cell division control protein 42 homolog	1591,77	**
<b>P62258</b>	YWHAE	14 3 3 protein epsilon	2877,38	3,06
<b>P27824</b>	CANX	Calnexin	7789,07	**
<b>B4DKD1</b>	TTYH2	Protein tweety homolog 2	443,81	**
<b>APOPTOSE</b>				
<b>O95831</b>	AIFM1	Apoptosis inducing factor 1 mitochondrial	631,78	**
<b>G3V5B3</b>	ERO1L	EROS1 like protein alpha	1035,49	**
<b>P08758</b>	ANXA5	Annexin A5	872,03	**
<b>ORGANIZAÇÃO CELULAR</b>				
<b>P68133</b>	ACTA1	Actin alpha 1 skeletal muscle	7451,34	13,07
<b>P63261</b>	ACTG1	Actin cytoplasmic 2	7885,53	55,15
<b>P63267</b>	ACTG2	Actin gamma enteric smooth muscle	55594,9	**
<b>P12814</b>	ACTN1	Alpha actinin 1	1982,83	1,27
<b>O43707</b>	ACTN4	Alpha actinin 4 short isoform	796,6	4,76
<b>Q562R1</b>	ACTBL2	Beta actin like protein 2	15809,43	1,24
<b>Q16352</b>	INA	Alpha internexin	1552,72	1,46
<b>P02765</b>	FETUA	Alpha 2 HS glycoprotein	1696,05	**
<b>P04083</b>	ANXA1	Annexin A1	729,57	1,41
<b>P07355</b>	ANXA2	Annexin A2	18596,3	7,77
<b>P09525</b>	ANXA4	Annexin A4	869,35	**
<b>Q16555</b>	DPYSL2	Dihydropyrimidinase related protein	448,74	1,25
<b>P21333</b>	FLNA	Filamin A	1618,51	1,63
<b>O75369</b>	FLNB	Filamin B	1,4	3,90
<b>P05556</b>	ITGB1	Integrin beta 1	1192,88	**
<b>O95678</b>	KRT75	Keratin type II cytoskeletal 5	10,62	1,71
<b>Q14CN4</b>	KRT72	Keratin type II cytoskeletal 72	388,14	**
<b>Q6KB66</b>	KRT80	Keratin type II cytoskeletal 80	143,36	**
<b>P35527</b>	KRT9	Keratin type I cytoskeletal 9	836,84	2,66
<b>P04259</b>	KRT6B	Keratin type II cytoskeletal 6B	698,14	2,27
<b>O95678</b>	KRT75	Keratin type II cytoskeletal 75	906,6	1,73
<b>P05787</b>	KRT8	Keratin type II cytoskeletal 8	27866,53	1,62
<b>Q147W7</b>	KRT1B	Keratin type II cytoskeletal 1b	893,73	1,77
<b>Q8N1N4</b>	KRT78	Keratin type II cytoskeletal 78	78,85	**
<b>Q5XKE5</b>	KRT79	Keratin type II cytoskeletal 79	2672,01	1,90
<b>P08729</b>	KRT7	Keratin type II cytoskeletal 7	2213,63	1,95
<b>P05783</b>	KRT18	Keratin type I cytoskeletal 18	8152,03	**
<b>P13645</b>	KRT10	Keratin type I cytoskeletal 10	487,14	3,94
<b>P04264</b>	KRT1	Keratin type II cytoskeletal 1	280,32	4,26
<b>P35908</b>	KRT2	Keratin type II cytoskeletal 2 epidermal	2437,31	3,90
<b>Q9NSB2</b>	KRT84	Keratin type II cuticular Hb4	447,13	1,82
<b>P78386</b>	KRT85	Keratin type II cuticular Hb5	646,7	**
<b>Q9NZM1</b>	MYOF	Myoferlin	1094,52	**
<b>P27816</b>	MAP4	Microtubule associated protein 4	325,08	1,32

<b>P12036</b>	NEFH	Neurofilament heavy polypeptide	1355,35	1,44
<b>P07197</b>	NEHM	Neurofilament medium polypeptide	1379,56	1,46
<b>P07196</b>	NEFL	Neurofilament light polypeptide	1399,19	1,47
<b>PROF1</b>	PLEC	Plectin	677,56	**
<b>P07737</b>	PFN1	Profilin 1	10209,52	3,06
<b>Q9H254</b>	SPTN4	Spectrin beta chain non erythrocytic 4	40,32	**
<b>P06753</b>	TPM3	Tropomyosin alpha 3 chain	2779,35	1,23
<b>P67936</b>	TPM4	Tropomyosin alpha 4 chain	2740,53	1,24
<b>Q71U36</b>	TUBA1A	Tubulin alpha 1A chain	5271,2	**
<b>P68363</b>	TUBA1B	Tubulin alpha 1B chain	17343,14	**
<b>P08670</b>	VIM	Vimentin	22480,45	1,61
<b>RESPOSTA AO ESTRESSE</b>				
<b>P30044</b>	PRDX5	Peroxiredoxin 5 mitochondrial	6477,52	1,52
<b>Q13162</b>	PRDX4	Peroxiredoxin 4 mitochondrial	2273,16	1,82
<b>E9PIR7</b>	TXNRD1	Thioredoxin reductase 1 cytoplasmatic	3255,25	**
<b>P30048</b>	PDRX3	Thioredoxin dependent peroxide reductase	2717,99	1,95
<b>H7BYH4</b>	SOD1	Superoxide dismutase Cu Zn	9540,18	**
<b>P09211</b>	GSTP1	Glutathione S transferase P	3806,7	**
<b>P07237</b>	PAIA1	Protein disulfide isomerase A1	3879,1	2,03
<b>P30101</b>	PDIA3	Protein disulfide isomerase A3	1391,94	1,80
<b>P13667</b>	PDIA4	Protein disulfide isomerase A4	2051,57	1,71
<b>Q15084</b>	PDIA6	Protein disulfide isomerase A6	1044,65	1,64
<b>P10809</b>	HSP60	60 KDa heat shock protein mitochondrial	2505,72	2,01
<b>D6RA73</b>	HSPA9	Stress 70 protein mitochondrial	1234,54	3,13
<b>P08107</b>	HSPA1A	Heat shock 70 KDa protein 1A 1B	2706,59	1,50
<b>P34931</b>	HSPA1L	Heat shock 70 KDa protein 1 like	8124,87	**
<b>P17066</b>	HSPA6	Heat shock 70 KDa protein 6	15,54	5,42
<b>P48741</b>	HSPA7	Putative heat shock 70 kDa protein	1670,07	1,50
<b>Q58FF6</b>	HSP90AB4P	Putative heat shock protein HSP 90-beta 2	281,97	**
<b>E9PI65</b>	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	6719,39	6,09
<b>K7EN27</b>	PARK7	Protein DJ 1	2535,12	**
<b>Q07021</b>	C1QBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	8595,99	2,31
<b>P50454</b>	SERPINH1	Serpin H1	466,1	**
<b>H0YET2</b>	CD59	CD59 glycoprotein	8364,54	**
<b>P30447</b>	HSLA	HLA class I histocompatibility antigen A 23 alpha chain	603,28	**
<b>F5GZ10</b>	SLC3A2	4F2 cell surface antigen heavy chain	2052,91	**
<b>P17693</b>	HLAG	HLA class I histocompatibility antigen alpha chain G	653,93	**
<b>PROTEÍNA COM A FUNÇÃO DE LIGAÇÃO</b>				
<b>P00352</b>	ALDH1	Retinal dehydrogenase 1	10499,03	**
<b>A8MUF7</b>	HBE1	Hemoglobin subunit epsilon	7757,04	**
<b>Q02818</b>	NUCB1	Nucleobindin 1	596,14	**
<b>Q14257</b>	RCN2	Reticulocalbin 2	680,04	**
<b>PROTEÍNAS COM OUTRAS FUNÇÕES</b>				
<b>Q6S8J3</b>	POTEE	POTE ankyrin domain family member E	24665,89	1,23
<b>Q9P0S9</b>	TMEM14C	Transmembrane protein 14C	1219,13	**

<sup>1</sup> Proteína exclusiva desta condição *up regulada*.

**Tabela 2:** Proteínas reprimidas durante a infecção por HAdV-40 em células A-549.

Uniprot ID	Nome Gene	Identificação da Proteína	Score	Fold Change
<b>METABOLISMO</b>				
<b>Metabolismo de Lipídeo</b>				
<b>P07602</b>	PSAP	Proactivator polypeptide	854,45	**1
<b>I6L8B7</b>	FABP5	Fatty acid binding protein epidermal	6510,81	**
<b>O43776</b>	NARS	Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	503,48	0,09
<b>E5RG29</b>	ASPH	Aspartyl asparaginyl beta hydroxylase	3213,49	**
<b>P31939</b>	ATIC	Fragment Bifunctional purine biosynthesis protein	891,36	0,09
<b>Metabolismo de Carboidrato</b>				
<b>P23434</b>	GLDC	Glycine cleavage system H protein mitochondrial	1876,24	**
<b>P06737</b>	PYGL	Glycogen phosphorylase liver form	852,72	0,09
<b>P00352</b>	ALDH1	Retinal dehydrogenase 1	22669,18	0,09
<b>ENERGIA</b>				
<b>Glicólise, gliconeogênese e a via das pentoses fosfato</b>				
<b>E7EUT5</b>	GAPD	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	12393,08	**
<b>P09104</b>	ENO2	Gamma enolase	12723,5	0,09
<b>P07864</b>	LDHC	L lactate dehydrogenase C chain	6726,33	**
<b>P18669</b>	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	8336,39	0,09
<b>P37837</b>	TALDO1	Transaldolase	1738,99	**
<b>P11413</b>	G6PD	Glucose 6 phosphate 1 dehydrogenase	7211,06	0,09
<b>Q01813</b>	PFKP	6 phosphofructokinase type C	715,07	**
<b>Transporte de elétrons</b>				
<b>O43169</b>	CY5B	Cytochrome b5 typeB	1297,3	**
<b>P07919</b>	UQCRH	Cytochrome b c1 complex subunit 6 mitochondrial	2705,02	**
<b>Q5JTJ3</b>	COA6	Cytochrome c oxidase assembly factor 6 homolog	756,74	**
<b>P10606</b>	COX5B	Cytochrome c oxidase subunit 5B mitochondrial	11912,33	**
<b>P18859</b>	ATP5J	ATP synthase coupling factor 6 mitochondrial	6818,57	**
<b>Q99766</b>	ATP5A1	ATP synthase subunit d mitochondrial	12349,32	**
<b>P53396</b>	ACLY	ATP citrate synthase	413,79	0,09
<b>O75380</b>	NDUFS6	NADH dehydrogenase ubiquinone iron sulfur protein 6 mitochondrial	1447,75	**
<b>P15559</b>	NQO1	NADPH dehydrogenase quinone 1	6736,69	0,09
<b>P30043</b>	BLVRB	Flavin reductase NADPH	825,1	**
<b>CICLO CELULAR E PROCESSAMENTO DE DNA</b>				

<b>P29966</b>	MARCS	Myristoylated alanine rich C kinase substrate	2642,52	**
<b>P06748</b>	NPM1	Nucleophosmin	16304,89	0,21
<b>H0YN26</b>	ANP32A	Acidic leucine rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	3695,48	**
<b>E9PPH5</b>	ANP32E	Acidic leucine rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	1599,24	**
<b>C9JWS9</b>	CBX1	Chromobox protein homolog 1	2903,57	**
<b>P60903</b>	S100A10	Protein S100 A10	16057,68	**
<b>P06703</b>	S100A6	Protein S100 A6	6792,54	**
<b>P26447</b>	S100A4	Protein S100 A4	622,9	**
<b>P49184</b>	DNL1L	Deoxyribonuclease 1 like 1	460,03	**
<b>P04004</b>	VTN	Vitronectin	3430,41	**
<b>TRANSCRIÇÃO</b>				
<b>Q86U42</b>	PABP2	Polyadenylate binding protein 2	966,31	**
<b>P68104</b>	EEF1A1	Elongation factor 1 alpha 1	16307,62	0,09
<b>P68104</b>	EEF1A1	Elongation factor 1 beta	48457,13	**
<b>P48006</b>	EEF1D	Elongation factor 1 delta	1393,55	0,09
<b>Q01130</b>	SRSF10	Serine/arginine-rich splicing factor 2	1293,6	0,09
<b>Q32P51</b>	RA1L2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L2	3089,28	**
<b>SÍNTESE DE PROTEÍNAS</b>				
<b>P25398</b>	RPS12	40S ribosomal protein S12	2513,61	**
<b>P62857</b>	RPS28	40S ribosomal protein S28	3575,62	0,30
<b>P39019</b>	RPS19	40S ribosomal protein S19	1446,44	**
<b>P63220</b>	RPS21	40S ribosomal protein S21	6234	**
<b>Q01855</b>	RPS15	40S ribosomal protein S15	3772,36	**
<b>P62854</b>	RPS26	40S ribosomal protein S26	615,54	**
<b>P52815</b>	RM12	39S ribosomal protein L12 mitochondrial	3431,36	0,48
<b>P62269</b>	RPS18	40S ribosomal protein S18	1798,51	**
<b>P05387</b>	RPLA2	60S acidic ribosomal protein P2	79873,29	**
<b>I3L397</b>	EIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A 1	17710,8	**
<b>F8W7S5</b>	RRBP1	Ribosome binding protein 1	361,54	**
<b>Q13765</b>	NACA	Nascent polypeptide associated complex subunit alpha-2	747,98	**
<b>O43776</b>	NARS	Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	503,48	0,09
<b>PROCESSAMENTO DE PROTEÍNAS</b>				
<b>I3L3U6</b>	PDIA5	Protein disulfide isomerase	14194,09	**
<b>H0YIV0</b>	HSP90B1	Endoplasmic reticulum chaperone	772,18	**
<b>H0YI18</b>	CNPY2	Protein canopy homolog 2	45643,39	0,20
<b>P30040</b>	ERP29	Endoplasmic reticulum resident protein 29	5157,89	0,47
<b>P50990</b>	TCPQ	T complex protein 1 subunit theta	259,16	**
<b>Q58FF3</b>	GRP94B	Putative endoplasmic reticulum chaperone	451,81	**
<b>Q9HAV7</b>	GRPEL1	GrpE protein homolog 1 mitochondrial	952,92	**
<b>P04080</b>	CYTB	Cystatin B	10031,57	**
<b>J3QS39</b>	UBB	Ubiquitin	167407,5	0,28
<b>P62987</b>	UBA52	Ubiquitin 60S ribosomal protein L40	32749,85	0,09
<b>Q06323</b>	PSME1	Proteasome activator complex subunit 1	978,36	**

<b>E5RIZ5</b>	PIN4	Peptidyl prolyl cis trans isomerase A	5769,86	**
<b>Q13501</b>	SQSTM1	Sequestosome 1	1321,8	**
<b>COMUNICAÇÃO CELULAR/MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS</b>				
<b>P31947</b>	1433S	14 3 3 protein sigma	1699,42	**
<b>Q04917</b>	1433F	14 3 3 protein eta	2159,78	0,09
<b>P27348</b>	1433T	14 3 3 protein theta	4783,24	0,09
<b>P63104</b>	1433Z	14 3 3 protein zeta delta	16079,76	0,09
<b>P52565</b>	GDIR1	Rho GDP dissociation inhibitor 1	2974,5	0,09
<b>P15253</b>	CALR	Calreticulin	56933,85	0,44
<b>F8WBR5</b>	F8WBR5	Calmodulin	62212,1	0,21
<b>O75368</b>	SH3L1	SH3 domain binding glutamic acid rich like protein	4858,22	**
<b>Q9H299</b>	SH3L3	SH3 domain binding glutamic acid rich like protein 3	11779,67	**
<b>APOPTOSE</b>				
<b>I6L8B7</b>	I6L8B7	Bcl 2 like protein 13	6510,81	**
<b>ORGANIZAÇÃO CELULAR</b>				
<b>F5GXS2</b>	F5GXS2	Alpha actinin 4	752,57	**
<b>P09496</b>	CLTA	Clathrin light chain A	10194,8	**
<b>P53675</b>	CLTCL1	Clathrin heavy chain 2	1,24	**
<b>Q00610</b>	CLTC	Clathrin heavy chain 1	336,41	**
<b>Q13561</b>	H0YI98	Dynactin subunit 2	477,38	**
<b>P23528</b>	COF1	Cofilin 1	10886,5	0,09
<b>Q9Y281</b>	COF2	Cofilin 2	3285,35	0,09
<b>P60981</b>	DEST	Destrin	1551,73	**
<b>Q16658</b>	FSCN1	Fascin	355,58	**
<b>P08727</b>	K7EMS3	Keratin type I cytoskeletal 19	2203,13	**
<b>P78386</b>	KRT85	Keratin type II cuticular Hb5	551,81	**
<b>O43790</b>	KRT86	Keratin type II cuticular Hb6	752,64	**
<b>Q3SY84</b>	K2C71	Keratin type II cytoskeletal 71	9,98	**
<b>Q86Y46</b>	K2C73	Keratin type II cytoskeletal 73	10,62	**
<b>Q86UP2</b>	G3V4Y7	Kinectin	493,61	**
<b>P35749</b>	MYH11	Myosin 11	73,21	**
<b>P35580</b>	MYH10	Myosin 10	75,93	
<b>Q8VDD5</b>	MYH9	Myosin 9	607,11	**
<b>P19105</b>	ML12A	Myosin regulatory light chain 12A	6833,85	**
<b>P60660</b>	F8W1R7	Myosin light polypeptide 6	34606,38	0,26
<b>E9PKG6</b>	E9PKG6	Nefastin 1	10520,2	0,39
<b>P67936</b>	TPM4	Tropomyosin alpha 4 chain	18875,2	0,27
<b>H0YKX5</b>	H0YKX5	Tropomyosin alpha 1 chain	7996,3	0,48
<b>P07437</b>	TBB5	Tubulin beta chain	10886,5	0,09
<b>Q13509</b>	TBB3	Tubulin beta 3 chain	7667,58	0,09
<b>P37802</b>	TAGL2	Transgelin 2	8797,43	0,44
<b>P58546</b>	C9JL85	Myotrophin	7747,15	**
<b>Q8IWB7</b>	WDR1	WD repeat containing protein 1	363,09	**
<b>P07196</b>	NFL	Neurofilament light polypeptide	1964,04	**
<b>RESPOSTA AO ESTRESSE</b>				
<b>P61769</b>	B2MG	Beta 2 microglobulin	5232	**
<b>P04179</b>	B4E3K9	Superoxide dismutase Mn	37839	**

<b>O00244</b>	E5RGN3	Copper transport protein ATOX1	1215,85	**
<b>P00441</b>	SODC	Superoxide dismutase Cu ZN	5801	**
<b>P10599</b>	TXN	Thioredoxin	21833,39	0,22
<b>Q06830</b>	PRDX1	Peroxiredoxin 1	9232,59	**
<b>P00390</b>	GSHR	Glutathione reductase mitochondrial	608,09	**
<b>P06454</b>	PTMA	Prothymosin alpha	2060,18	**
<b>P55145</b>	MANF	Mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor	3935,91	**
<b>F5H783</b>	F5H783	Stress induced phosphoprotein 1	1669,32	**
<b>P07900</b>	HS90A	Heat shock protein HSP 90 alpha	9192,47	0,09
<b>P08238</b>	HS90B	Heat shock protein HSP 90 beta	12932,58	0,09
<b>P04792</b>	HSPB1	Heat shock protein beta-1	3459,18	0,09
<b>H0Y8S0</b>	H0Y8S0	Stress 70 protein mitochondrial	4008,78	**
<b>P09211</b>	GSTP1	Glutathione S transferase P	12042,43	0,09
<b>H0YD13</b>	H0YD13	CD44 antigen	4050	0,29
<b>P14174</b>	MIF	Macrophage migration inhibitory factor	14714,17	**
<b>PROTEÍNA COM A FUNÇÃO DE LIGAÇÃO</b>				
<b>P09382</b>	LEG1	Galectin 1	318126,82	0,17
<b>P21980</b>	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	2825,87	0,09
<b>Q99653</b>	CHP1	Calcineurin B homologous protein 1	2238,53	**
<b>J3KPG2</b>	J3KPG2	Translationally controlled tumor protein	663,31	**
<b>PROTEÍNAS COM OUTRAS FUNÇÕES</b>				
<b>O43399</b>	TPD54	Tumor protein D54	790,15	**
<b>P37235</b>	HPCL1	Hippocalcin like protein 1	1155,42	**
<b>Q9NQC3</b>	F8WAM	Reticulon 4	3844,16	**

<sup>1</sup> Proteína exclusiva desta condição *down regulada*.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Goiânia, 18 de Junho de 2012.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA,  
PROTOCOLADO NESTE COMITÊ SOB O Nº: 136/12**

**I – Identificação**

**Título do projeto:** Análise Proteômica de Proteínas induzidas por Adenovírus e Astrovírus em cultura de células.

**Pesquisador Responsável:** Ana Carla Peixoto Guissoni

**Orientador (quando necessário):** Divina das Dôres de Paula Cardoso

**Pesquisadores participantes:** Menira Borges L. D. Souza; Fabíola Souza Fiaccadori; Ana Fátima Alves Parente

**Instituição onde será realizado o estudo:** IPTSP e ICB/UFG

**Data de apresentação ao CEP/UFG:** 18 de Maio de 2012.

**Área Temática:** Grupo III.

Comentários do relator frente à Resolução CNS 196/96 e complementares em particular sobre:

**II – Estrutura do Protocolo** (verificação dos documentos solicitados)

CD; Folha de Rosto CEP/UFG; Folha de Rosto CONEP; Termo de compromisso assinado pelos pesquisadores; Projeto de Pesquisa completo; Documento da instituição responsável pela realização da pesquisa; IPTSP/UFG - Projeto aprovado em 29/03/2012.

**III – Projeto de pesquisa**

Descrição sucinta das justificativas e objetivos do projeto:

**Justificativa:** O projeto apresenta revisão da literatura coerente com a proposta da investigação a ser realizada no município de Goiânia-Go. Este trabalho visa avaliar as possíveis alterações na expressão proteica nas infecções por adenovírus e astrovírus, iniciando desta forma uma nova estratégia de estudo para os vírus gastroentéricos no contexto da compreensão da relação vírus hospedeiro.

**Objetivos:**

Geral:

Identificar as proteínas diferencialmente expressas em cultura de células infectadas por amostras da espécie C e F de adenovírus e amostras do genótipo 1 e 2 de astrovírus, comparadas com células não infectadas.

Específicos:

*Comitê de Ética em Pesquisa/CEP*

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1,  
Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.  
Email: cep.prppg.ufg@gmail.com



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Identificar as proteínas virais com expressão diferencial durante a replicação *in vitro* de amostras de adenovírus e astrovírus;  
Identificar as proteínas celulares expressão durante o ciclo celular em células não infectadas;  
Comparar a expressão diferencial das proteínas celulares em células não-infectadas com a expressão protéica (viral e celular) em células infectadas por adenovírus e astrovírus;  
Proceder à análise do perfil proteômico com vistas a obter informações relevantes para compreensão de aspectos associados à patogênese viral.

**Metodologias do projeto** (*análise da metodologia e sua adequação aos objetivos da pesquisa (item 3.5 do Protocolo)*);

Trata-se de um estudo análise laboratorial com utilização de amostras de adenovírus e astrovirus coletadas no período de 1989 a 2003 como parte do projeto intitulado: "Etiologia das Gastrenterites virais na região Centro-Oeste. Caracterização sorológica e molecular das amostras virais isoladas", já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa / UFG, sob o número 004/2000. O acesso a essas amostras se realizará após a aprovação desse projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, com previsão de início dos testes e análises laboratoriais em agosto de 2012, a serem realizados nos laboratórios do IPTSP E ICB/UFG.

**Referência sucinta aos critérios de participação** (*recrutamento, critérios de inclusão/exclusão, interrupção da pesquisa*);

Não se aplica.

**Identificação dos riscos e possíveis benefícios aos sujeitos.**

Riscos: Este estudo não oferece nenhum tipo de risco, a coleta de material biológico já foi realizada previamente, sendo aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Goiás sob o número 004/2000.

**Adequação das condições para realização da pesquisa** (*local e infra-estrutura; orçamento; anuência dos responsáveis pela instituição onde serão coletados os dados, curriculum vitae do pesquisador responsável e dos pesquisadores participantes*).

As condições apresentadas para realização da pesquisa encontram-se adequadas, incluindo cronograma, organização da coleta de dados e compromisso dos responsáveis. Quanto ao orçamento o projeto recebeu auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) edital 07/2009/Programa de Núcleos de Excelência/PRONEX/FAPEG/CNPq.

Os currículos dos pesquisadores apresentam com número de identificação e endereço da plataforma lattes/CNPq.

**IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Não se aplica.

Apresenta anuência da direção do IPTSP/UFG.

Comitê de Ética em Pesquisa/CEP

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.

Email: cep.prppg.ufg@gmail.com





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



V- **Parecer do CEP:** consideramos o Protocolo 136/12 com pendências, smj desse Comitê, as quais estão relacionadas abaixo:

1. Anexar autorização do responsável pela guarda do material biológico a ser utilizado nesta pesquisa.
2. Anexar declaração de autorização do ICB/UFG para realização dos testes laboratoriais.

VI – **Data da reunião:** 18 de Junho de 2012.

  
*Prof. João Batista de Souza*  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-PRPPG-UFG

*Prof. João Batista de Souza*  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFG

*Comitê de Ética em Pesquisa/CEP*  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1,  
Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.  
Email: cep.prppg.ufg@gmail.com

Artigo 1: Proteomic analysis of A-549 cells infected with Human adenovirus 40 by LC-MS reveals potential mechanisms of viral pathogenesis.

Sera submetido na revista VIROLOGY