



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE NUTRICIÓN

Asociación de adenovirus 36 con la inflamación de bajo grado en tejido adiposo humano.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

P R E S E N T A

Licenciada en Biología Maria de la Luz Karina Reyes Olivas

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. DELIA VANESSA LÓPEZ GUERRERO

CODIRECTOR DE TESIS:

DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA CONDE

COMITÉ TUTORAL:

DR. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA

DRA. OLLIN CELESTE MARTÍNEZ RAMÍREZ

DR. CARLOS SANDOVAL JAIME

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2021

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme cumplir un sueño más. Y a mi amada familia, sin los cuales no habría tenido oportunidad de llevar a cabo ningún proyecto de vida. Su apoyo y su gran participación son un pilar fundamental para cualquier logro.

A nuestra máxima casa de estudios mi querida Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Por siempre permitirme ser parte de sus estudiantes y lograr mis metas. A la Facultad de Nutrición por esta gran oportunidad de continuar con mi carrera profesional y a los laboratorios de inmunología viral de la Facultad de medicina y de virología del CIDC por otorgarme un espacio y todo lo necesario para el desarrollo de este proyecto.

Agradecimiento especial a CONACyT, por brindarme la oportunidad de ser becaria y de participar dentro de los proyectos BMBF-CONACyT 267746, SRE-CONACyT 280365.

A mis tutores: Dra. Vanessa López Guerrero y Dr. Ramón A. González García-Conde, por sus sabios consejos, su constancia y paciencia conmigo. Sin los cuales la realización de este proyecto no habría sido posible. Su invaluable participación ha sido pieza fundamental en mi formación dentro de un laboratorio experimental y como profesionista.

A los docentes: Fernando Esquivel Guadarrama, Celeste Martínez Ramírez y Carlos Sandoval Jaime por sus sabias palabras, por compartir sus conocimientos conmigo y siempre hacer aportaciones virtuosas a este proyecto.

Al Dr. Luis Omar Araujo Montes y al personal administrativo y de enfermería de la clínica de cirugía estética y reconstructiva RENOVANCE. A mis compañeros: mil gracias por permitirme ser parte de ustedes y muy en especial a ti M. en C. Verónica Márquez Vergara por tu gran colaboración. A los técnicos de los laboratorios: Bióloga Grisel Ballesteros Hernández y al M. en C. Juan Carlos Villegas García.

RESUMEN

En la actualidad vivimos en un ambiente obesogénico en el que la población cada vez se encuentra más expuesta a padecer sobrepeso y obesidad. La obesidad ha demostrado ser un importante factor de riesgo en enfermedades como son disfunción endotelial, dislipidemia aterogénica, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo II e incluso cáncer. Los pacientes obesos padecen un estado agravado de la enfermedad debido a la inflamación de bajo grado que persiste en ellos. La inflamación crónica de bajo grado conduce a la activación de células del sistema inmune las cuales desempeñan un papel en la perpetuación de las enfermedades crónicas y una deficiente resolución de enfermedades infecciosas.

Si bien la obesidad es una enfermedad directamente ligada a la sobrenutrición y escasa actividad física, actualmente se sabe que existen patógenos capaces de propiciar adipogénesis tanto en animales como en humanos. Tal es el caso de adenovirus 36, perteneciente a un extenso grupo de virus con más de 100 serotipos capaces de causar infecciones en humanos. Se ha observado, que después de la inoculación de adenovirus 36 en pollos, ratones, o primates la grasa corporal aumenta hasta un 150%, y los lípidos séricos son paradójicamente más bajos. *In vitro*, la transfección con adenovirus 36 acelera la diferenciación de preadipocitos a adipocitos. Además, el DNA de adenovirus 36 se ha detectado en los tejidos adiposos humanos de sujetos con obesidad y sobrepeso. En este estudio se analizó el tejido adiposo subcutáneo de 21 pacientes femeninas donde se encontró 33% del total positivas para DNA de adenovirus 36 sin diferencias significativas ($p > 0.05$) de edad, IMC y parámetros bioquímicos entre positivas y

negativas. La presencia de DNA de adenovirus 36 mostró ser un factor de riesgo para padecer sobrepeso (OR= 2.5) y un factor protector para tener niveles saludables de parámetros bioquímicos (OR< 1). Además, se determinó la expresión de IL-6 encontrándose mayor expresión de la citocina en el grupo de positivas que en el de negativas y una correlación negativa entre interleucina 6 y el IMC y la edad de las pacientes positivas para adenovirus 36, mientras que se tuvo una correlación positiva entre interleucina 6 y glucosa, triglicéridos y colesterol total, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Palabras clave: obesidad, inflamación, adenovirus 36, DNA, citocina.

ABSTRACT

We currently live in an obesogenic environment in which the population is increasingly prone to become overweight and obese. Obesity has been shown to be an important risk factor in diseases such as endothelial dysfunction, atherogenic dyslipidemia, insulin resistance, type II diabetes mellitus, and cancer. Obese patients suffer from an aggravated state of the disease due to the persistent low-grade inflammation. Low-grade inflammation leads to the activation of cells of the immune system which play a role in the perpetuation of chronic diseases and a poor resolution of infectious diseases. Although obesity is a disease directly linked to overnutrition and low physical activity, it's currently known that there are pathogens capable of promoting adipogenesis in both animals and humans. Such is the case of adenovirus 36, belonging to a large group of viruses of more than 100 types capable of causing infections in humans. It has been observed that after the inoculation of adenovirus 36 in chickens, mice, or primates, the body fat increases up to 150%, and serum lipids are paradoxically lower. *In vitro*, adenovirus 36 transfection accelerates the differentiation of preadipocytes into adipocytes. Furthermore, adenovirus 36 DNA has been detected from human adipose tissues from obese and overweight subjects. In this study, the subcutaneous adipose tissue of 21 female patients was analyzed, where 33% were found to be positive for adenovirus 36 DNA without significant differences ($p > 0.05$) in age, BMI and biochemical parameters between positive and negative. The presence of adenovirus DNA was shown to be a risk factor for being overweight (OR= 2.5) and a protective factor for having healthy levels of biochemical

parameters (OR < 1). In addition, the expression of interleukin 6 was determined, finding greater expression of the cytokine in the group of positive than in the negative group and a negative correlation between interleukin 6 and the BMI and the age of the positive patients to adenovirus 36, while there was a positive correlation between interleukin 6 and glucose, triglycerides and total cholesterol, although no statistically significant differences ($p > 0.05$).

Key words: obesity, inflammation, adenovirus 36, DNA, cytokine.

ÍNDICE GENERAL

	Pag.
Agradecimientos	I
Resumen	II
Abstract	IV
Índice general	VI
Siglas y abreviaturas	IX
Índice de figuras	XII
Índice de tablas.	XIII
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Obesidad	1
1.2 Obesidad e infecciones virales.	4
1.3 Adenovirus.	5
1.3.1 Generalidades.	5
1.3.2 Clasificación.	6
1.3.3 Epidemiología.	6
1.3.4 Estructura.	8
1.3.5 Ciclo de replicación.	9
1.3.6 Patogénesis.	11
1.4 Adenovirus 36 y obesidad.	12
1.4.1 Adenovirus y obesidad en animales.	12
1.4.2 Anticuerpos contra HAdV-36 y obesidad en humanos.	14
1.4.3 Presencia de DNA de HAdV-36 en tejido adiposo humano.	18
1.5 Mecanismos adipogénicos de HAdV-36.	20
1.5.1 La proteína E4 orf-1 de HAdV-36.	20
1.5.2 Estudios <i>in vitro</i> de transfección con HAdV-36.	22

1.5.2 Estudios <i>in vivo</i> de infección con HAdV-36.....	24
1.6 Respuesta inmune en obesidad con HAdV-36.....	24
1.7 Inflamación de bajo grado.....	28
1.7.1 TNF.....	30
1.7.2 IL-6.....	31
1.7.3 Interferón gamma (INF gamma).....	31
1.8 Tejido adiposo.....	33
2. JUSTIFICACIÓN:	35
3. HIPÓTESIS.....	36
4. OBJETIVOS.....	36
4.1 Objetivo general.....	36
4.2 Objetivos específicos.....	36
5. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	37
5.1 Diseño de estudio.....	37
5.2 Universo de trabajo y muestra.....	37
5.3 Instrumento de investigación.....	39
5.4 Desarrollo del proyecto.	41
5.4.1 Determinación de la presencia del DNA de HAdV-36 en tejido adiposo humano por PCR.....	41
5.4.2 Extracción de RNA total obtenido de tejido graso subcutáneo.....	45
5.4.3 Síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA) de los mRNA por reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR).....	46
5.4.4 Amplificación del gen de β -actina en cDNA obtenido a partir de RNA total de tejido graso.....	47
5.4.5 PCR punto final para cDNA de citocinas IL-6, TNF e INF gamma.....	48
5.4.6 Análisis de imágenes con el software ImageJ.	50
5.4.7 Diseño de análisis estadístico.	50
6. RESULTADOS.....	51
6.1 Características del grupo de estudio.	53
6.2 Detección de DNA de HAdV-36.....	54
6.3 Citocinas IL-6, TNF e INF gamma.....	63
6.3.1 Amplificación de β -actina.....	63
6.4 Expresión de citocinas IL-6, TNF e INF gamma.....	66

7. DISCUSIÓN.....	71
8. CONCLUSIÓN.....	81
9. PERSPECTIVAS.....	82
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

SIGLAS Y ABREVIATURAS

HAdV-36	Adenovirus 36
AGL	Ácidos grasos libres
A549	Células humanas de epitelio alveolar basal
CAR	Receptor de coxsackie de adenovirus
cDNA	Cadena complementaria de Ácido desoxirribonucleico
CELO	Virus letal huérfano de los embriones de pollo
CT	Colesterol total
DICLIM	Diagnóstico clínico y molecular
dL	decilitro
DM tipo II	Diabetes mellitus tipo II
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DLG1	Drosophila disc large-1
ECNT	Enfermedades Crónicas No Transmisibles
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ENS	Ensayo de neutralización en suero
E4-orf1	Proteína temprana de HAdV-36 con marco de lectura abierto
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos
GLUT1	Transportador de glucosa 1
GLUT4	Transportador de glucosa 4
hASC	Células madre hematopoyéticas
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
INF gamma	Interferón gamma
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal

InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IRA	Infección respiratoria aguda
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina 1
JAK/STAT	Vía de señalización JAK-STAT
Kg	Kilogramo
KO	Knock-out
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
LPS	Lipoproteinlipasa
M	Metro
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos
Mg	Miligramo
Min	Minutos
mL	Mililitros
NF- κ B	Factor nuclear de transcripción kappa B o NF- kappa B
NK	Asesinas naturales
NOM-015-SSA2-2010	Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus
NOM-037-SSA2-2012	NORMA Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias
Oligo dT	oligonucleótido sintético de polideoxitimidina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PI3K	Vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa
PKB	Proteína quinasa B
PPAR γ	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa
Seg	Segundos
SM	Síndrome metabólico
SMAM-1	Adenovirus aviar
T	Temperatura
TG	Triglicéridos
TLR	Receptor tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
U.A.	Unidades arbitrarias
UCP1	Proteína desacoplante
U1	Ribonucleoproteína U1
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WT	Tipo silvestre
3T3-L1	Línea celular derivada de células 3T3 de ratón que se utiliza en la investigación biológica del tejido adiposo.
°C	Grados centígrados
μ L	Microlitros

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Porcentaje de población con sobrepeso y obesidad mayor de 20 años según su sexo en México.	3
Figura 2. Morfología y estructura del virión en los adenovirus humanos.	9
Figura 3. Ciclo de replicación de adenovirus.	10
Figura 4. Mecanismos adipogénicos de HAdV-36 sobre células madre.	22
Figura 5. Estrategia experimental.	40
Figura 6. Amplificación de los genes de HAdV-36 y U1 en DNA genómico de tejido graso humano.	56
Figura 7. Características clínicas de las pacientes DNA de HAdV-36 positivas y DNA de HAdV-36 negativas.	60
Figura 8. Amplificación del gen β -actina humana a partir de muestras de RNA total de tejido adiposo.	64
Figura 9. Amplificación del gen IL-6 humana en muestras de RNA total de tejido adiposo.	65
Figura 10. Amplificación de los genes TNF e INF gamma humanos en muestras de RNA total de tejido adiposo.	66
Figura 11. Expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF e INF gamma por parte del tejido adiposo de las pacientes.	68
Figura 12. Comparación de la expresión de IL-6 en las pacientes DNA de HAdV-36 positivas contra DNA de HAdV-36 negativas.	68

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Oligonucleótidos para PCR punto final.	43
Tabla 2. Reactivos de PCR para amplificar U1.	43
Tabla 3. Reactivos de PCR para amplificar β -actina	47
Tabla 4. Reactivos de PCR punto final para citocinas.	49
Tabla 5. Características generales del grupo de estudio de acuerdo con número y clave de muestra asignados.	52
Tabla 6. Variables predictoras del grupo de estudio.	53
Tabla 7. Categorización de las variables continuas.	54
Tabla 8. Frecuencias de las pacientes y el OR para cada parámetro clínico y su asociación con la presencia de DNA de HAdV-36.	57
Tabla 9. Características clínicas y parámetros bioquímicos en las pacientes positivas para el DNA de HAdV-36.	61
Tabla 10. Comparación entre las características clínicas y los parámetros bioquímicos de las pacientes HAdV-36 positivas y HAdV-36 negativas. . .	62
Tabla 11. Correlación entre IL-6 y las variables predictoras del grupo DNA de HAdV-36 positivo y DNA de HAdV-36 negativo.	70

1. ANTECEDENTES

1.1 Obesidad

La obesidad y el sobrepeso se caracterizan por una acumulación del tejido graso y un aumento en el peso corporal. El índice de masa corporal (IMC) se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos entre el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2), el IMC es un parámetro en donde se relaciona el peso y la talla, y es usado frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en las personas; para adultos la organización mundial de la salud (OMS) define sobrepeso como un IMC mayor o igual a $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ y obesidad como un IMC corporal mayor o igual a $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ (1). La obesidad es un factor de riesgo para para desarrollar otras enfermedades metabólicas no transmisibles como: las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus tipo II (DM tipo II), los trastornos del aparato locomotor, algunos cánceres como el de endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon, eventos cerebrovasculares, hígado graso y alteraciones en el sistema inmunológico, cuyas consecuencias pueden ser fatales en procesos infecciosos como en la COVID-19 y la influenza, enfermedades virales que presentan una alta tasa de mortalidad en personas con obesidad, ya que el riesgo de complicaciones se incrementa considerablemente conforme el tejido adiposo aumenta su tamaño y el IMC se acerca a $26 \text{ kg}/\text{m}^2$ (2,3). En décadas recientes la incidencia de obesidad ha aumentado dramáticamente,

convirtiéndose en una epidemia con graves consecuencias para la salud humana en donde existe una asociación con el aumento en las tasas de mortalidad, morbilidad y discapacidad. El sobrepeso y la obesidad representan el quinto riesgo de muerte a nivel mundial (2).

La prevalencia de obesidad se ha duplicado en adultos y triplicado en niños durante los últimos 20 años aún en países con una tasa baja de la enfermedad, en 2016 más de 1,9 billones de adultos tenían sobrepeso a nivel mundial. De estos más de 650 millones eran obesos. Alrededor del mundo la prevalencia de obesidad para niños menores de 5 años era de 41 millones los cuales tenían sobrepeso o eran obesos (4).

De acuerdo con la OMS cada año 2.8 millones de personas mueren por sobrepeso u obesidad y en nuestro país se les atribuyen más de 50,000 muertes por año. En los últimos 30 años la prevalencia de obesidad en México se ha incrementado de manera acelerada lo que ha llevado a nuestro país a ocupar actualmente el segundo lugar en obesidad en adultos y el primero en población infantil (5).

En México, los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018-2019, llevada a cabo por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) muestran que la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en niños de 5 a 11 años es de 33.2% (3 de cada 10 niños), en adolescentes es de 36.3% (4 de cada 10 adolescentes), en adultos de 20 años y más el porcentaje con sobrepeso y obesidad es de 75.2% (39.1% sobrepeso y 36.1% obesidad), porcentaje que en 2012 fue de 71.3% (Figura 1) (5).

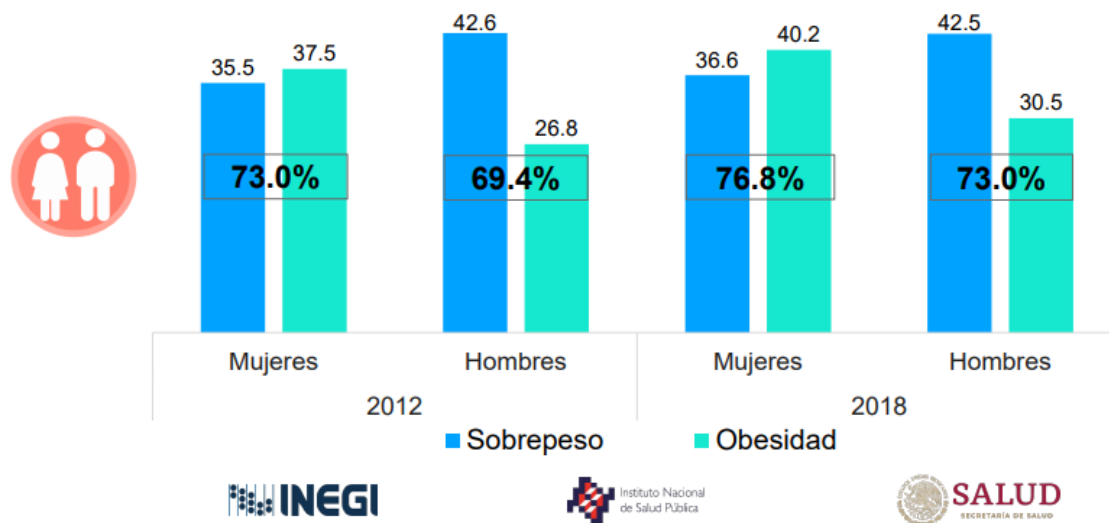


Figura 1. Porcentaje de población con sobrepeso y obesidad mayor de 20 años según su sexo en México. Fuente: ENSANUT 2018 (5).

Existen diferentes factores que han sido propuestos como causales de la obesidad, entre ellos se encuentran: el consumir alimentos con una alta densidad energética, el sedentarismo, la raza, el sexo, la genética entre otros (4), convirtiéndose en una enfermedad con componentes ambientales, fisiológicos y emocionales, lo cual complica su tratamiento. Los cambios en el tejido adiposo se deben principalmente a la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, lo cual provoca un desbalance en la producción de la leptina y otras adipocinas, causando una alteración en la regulación que ocurre entre la ingesta de alimentos y la saciedad, acompañado de una inflamación crónica de bajo grado favoreciendo el desarrollo de síndrome metabólico (SM) y enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) (6).

1.2 Obesidad e infecciones virales.

El estudio de la obesidad se ha dirigido a causas de origen dietético y de hábitos, así como algunos genes y algunas condiciones psicológicas-emocionales que podrían favorecer este padecimiento. Sin embargo, existen factores medioambientales que podrían influir en la etiología de este padecimiento, tales como la microbiota, el uso de ciertos antibióticos algunos fármacos esteroideos, entre otros.

Recientemente se ha establecido el vínculo entre ciertos virus con la aparición y propagación de la obesidad tanto en animales como en humanos. Sin embargo, la posibilidad de que la actual epidemia de obesidad pueda ser debida a un agente infeccioso ha sido vagamente considerada (7,8). Existen evidencias de que algunas infecciones podrían ser un factor causal de obesidad, incluyendo virus humanos y no humanos, bacterias e incluso la microbiota intestinal. Estos hallazgos llevaron a acuñar el término “infectoobesidad”, para describir un posible agente infeccioso de la obesidad, un nuevo concepto que ofrece una nueva perspectiva sobre la etiología infecciosa de esta enfermedad (9). A principios de la década de los 80's Wigand, *et al.*, 1980 reportaron la identificación de un nuevo tipo de adenovirus humano perteneciente al grupo D al que se sugirió fuera nombrado adenovirus 36 (HAdV-36), este fue aislado de las heces de una niña alemana de 6 años que padecía diabetes y enteritis (10). Aunque en ese tiempo se desconocía la importancia patógena del nuevo virus, veinte años más tarde este virus en particular, se empezó a mencionar como posible agente etiológico en

la obesidad. Desde entonces, la mayoría de los estudios sobre obesidad infecciosa se han centrado en adenovirus especialmente en el tipo 36, ya que se ha encontrado una mayor prevalencia de anticuerpos contra HAdV-36 en personas obesas (11).

Entre los virus que se han asociado a obesidad en varios modelos experimentales se ha encontrado evidencia de infectoobesidad por cinco agentes virales: adenovirus, herpesvirus, bacteriófagos, y virus causantes de encefalitis y hepatitis. Entre estos, los adenovirus, HAdV-5 y HAdV-36 son los que presentan una mayor asociación con obesidad (12).

1.3 Adenovirus

1.3.1 Generalidades.

Los adenovirus fueron descritos por primera vez en 1953 por Rowe y colaboradores, durante el establecimiento de cultivos celulares de amígdalas y tejido adenoideo, encontrando un agente transmisible que destruía las células epiteliales (13).

1.3.2 Clasificación.

Los adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae*, existen cinco géneros de adenovirus Mastadenovirus, Aviadenovirus, Atadenovirus, Siadenovirus e Icthadenovirus. Hasta la fecha del género Mastadenovirus se han identificado más de 100 genotipos causales de infección en humanos clasificados en siete grupos que van de la A–G, basados en propiedades de hemaglutinación y parentesco genético (14).

1.3.3 Epidemiología.

Los adenovirus son ubicuos, poseen una distribución mundial y son inusualmente resistentes a agentes físicos y químicos y a condiciones adversas de pH lo que permite una supervivencia prolongada fuera del organismo soportando incluso radiación UV. Se encuentran asociados con diferentes enfermedades clínicas incluidas enfermedades respiratorias, gastroenteritis y conjuntivitis. La infección puede ser asintomática o grave en pacientes inmunocomprometidos causando insuficiencia respiratoria, infección diseminada, cistitis hemorrágica, enfermedad neuronal y muerte. La enfermedad puede ocurrir esporádicamente y parecen no tener una estacionalidad reconocida (14–17).

Aunque las características epidemiológicas del serotipo de adenovirus difirieren, todos se transmiten por contacto directo, transmisión fecal-oral y, en ocasiones, por transmisión ambiental (agua contaminada) (15,18). Además, pueden

propagarse a través de fómites y por el aire a través de estornudos y tos y todas las edades son susceptibles a infección (15,19).

Los tipos 1, 2, 5, 6 y 7 pertenecientes al grupo C son los principalmente reportados en la mayoría de las poblaciones para infecciones del tracto respiratorio en niños. Algunos tipos del grupo D 8, 19 y 37 se asocian a queratoconjuntivitis endémica, aunque por lo general causan infecciones asintomáticas. La infección respiratoria aguda (IRA) es la más frecuente y está asociada con el tipo 4 miembro único del grupo E (14). Se sabe que en invierno los serotipos 4 y 7 causan enfermedades respiratorias en reclutas militares donde alrededor del 25% requieren hospitalización debido a fiebre y dolor (15,19). Los adenovirus entéricos causantes de gastroenteritis generalmente en niños son de los serotipos 40 y 41 correspondientes al grupo F. Adenovirus del grupo B tipo 11 causa enfermedades como cistitis y nefritis (14). Se ha sugerido que existe una conexión entre adenovirus D tipo 36 y obesidad (14,15,19). Según datos del sistema de notificación de tipos de adenovirus, los tipos de adenovirus humanos más comúnmente reportados durante 2003 a 2016 en los Estados Unidos fueron los serotipos 1, 2, (grupo C), 4 (grupo E) y 3, 7 y 14 (grupo B), los cuales representaron el 85.5% de todos los tipos reportados (n=1,283), y siendo los más comúnmente reportados los del tipo 2 y tipo 3 (16). En Argentina las infecciones del tracto respiratorio parecen contribuir con un 20 a 30% del total de los casos. Estas infecciones pueden provocar complicaciones como bronquitis necrotizante aguda, bronquiolitis, meningitis y encefalitis que pueden ser fatales (15,19).

En México, en un estudio se analizaron 118 muestras de exudados faríngeos que fueron referidas al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) de la Secretaría de Salud, del 2001 al 2003 que incluyeron muestras provenientes de los estados de la República Mexicana de pacientes con IRA, de cualquier edad y sexo. Del D.F y Nayarit se presentaron HAdV-1, HAdV-2 y HAdV-5, los estados de Michoacán HAdV-2 y HAdV-5, y Tamaulipas, Hidalgo y Yucatán HAdV-5. De los casos estudiados 22 de ellos fueron menores de 13 años (81%) y 4 adultos. López y colaboradores del InDRE, realizaron un estudio de 1995 al 2000, con muestras provenientes de pacientes con diagnóstico presuntivo de IRA; reportaron que de 8,029 muestras analizadas por inmunofluorescencia indirecta, 94 (1.17%) fueron positivas a adenovirus, además observaron que las infecciones por este virus no presentan un patrón estacional aparente (20).

1.3.4 Estructura.

Los adenovirus son virus de DNA de doble cadena de 36 Kb que codifica alrededor de 40 genes. La partícula viral está formada por 12 proteínas llamadas II-IX, IIIa, IVa, μ , proteína terminal y la proteasa viral p23 (Figura 2) (17).

La nucleocápside o core está rodeada por una cápside de proteínas con una geometría icosaédrica sin envoltura. La cápside se compone de 252 capsómeros: 240 hexones conformando los lados de la superficie icosaédrica y 12 pentones en los vértices del icosaedro. Cada pentón consiste en una base de pentón y una fibra que protruye a partir de estos. Las fibras consisten en un eje delgado con una

cabeza globular y están involucradas en el proceso de unión de la partícula viral a la célula huésped (Figura 2) (13,17,18).

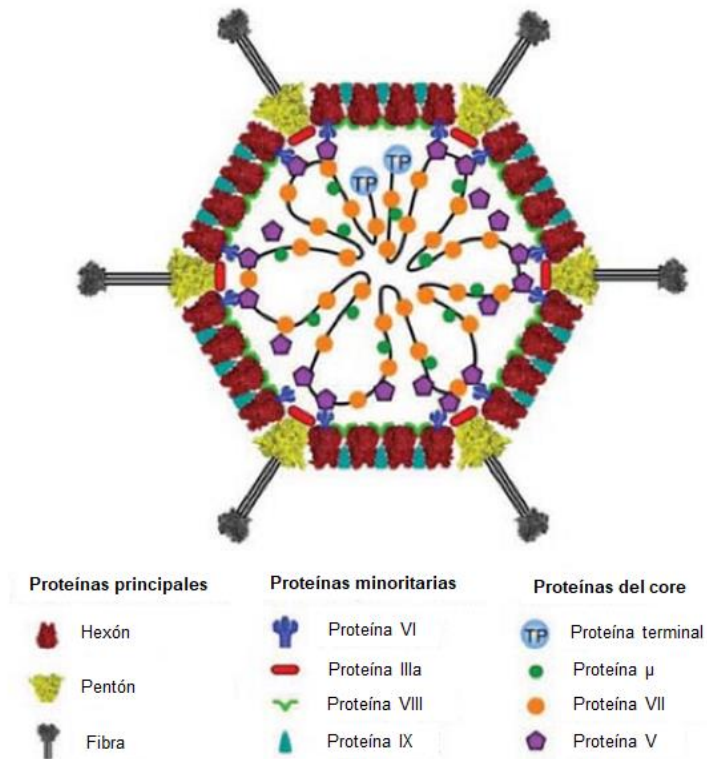


Figura 2. Morfología y estructura del virión en los adenovirus humanos (17).

1.3.5 Ciclo de replicación.

El ciclo replicativo de los adenovirus inicia cuando el virión interactúa con la célula a través de la interacción de la glicoproteína fibra con el receptor coxsackie-adenovirus (CAR) permitiendo la interacción del pentón con las integrinas α_v - β_3 y α_v - β_5 , lo que provoca la reorganización del citoesqueleto de β -actina y la entrada del virus por endocitosis mediada por clatrina.

Una vez en el endosoma la partícula viral parcialmente desensamblada es liberada al citoplasma y ésta migra por medio de microtúbulos a los poros nucleares donde el DNA viral entra al núcleo. En el núcleo inicia la expresión del genoma viral, la cual es cronológicamente regulada, iniciando con la expresión de los genes virales tempranos E1A, E1B, E2, E3 y E4, que codifican para proteínas virales encargadas de establecer condiciones en la célula infectada que conducen a la replicación del genoma viral y la expresión de los genes tardíos. Estos codifican para las proteínas estructurales que se ensamblan con los nuevos genomas llevando a la producción de la progenie viral que es liberada por lisis celular. Los genes virales tempranos son además responsables de modificar el metabolismo y de inhibir las defensas anti-virales de la célula (Figura 3) (13,17).

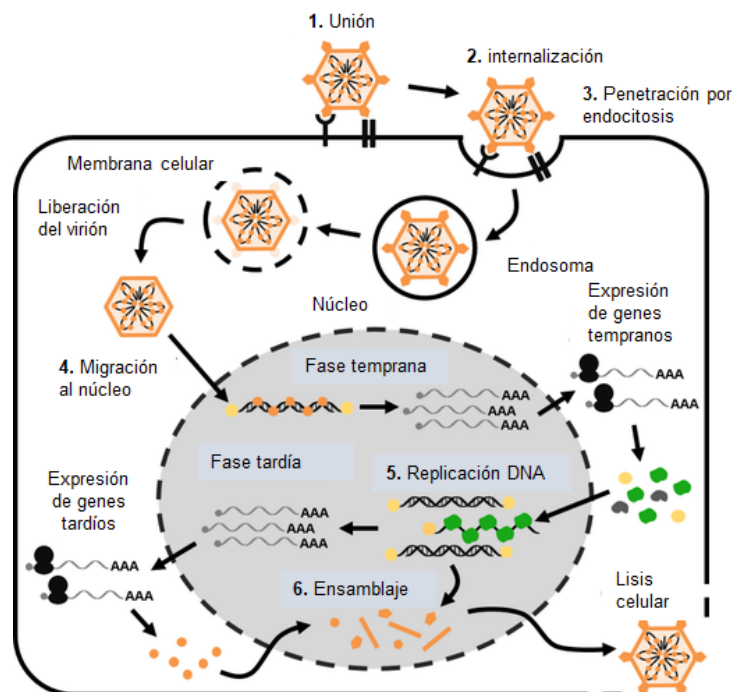


Figura 3. Ciclo de replicación de adenovirus. La entrada del virus y la importación del genoma viral al núcleo conducen a una reprogramación de la expresión génica de la célula

y a la expresión muy eficiente del genoma viral culminando con el ensamblaje de los nuevos viriones.

1.3.6 Patogénesis.

En el caso de los adenovirus se han descrito tres ciclos de infección.

Infección lítica: se da en células epiteliales humanas, conlleva el ciclo de replicación completo, hasta la lisis celular desencadenando la respuesta inmune inflamatoria por parte del huésped.

Infección crónica o persistente: generalmente cursa como asintomática y por lo regular ocurre en el tejido linfoide.

Transformación oncogénica: se ha determinado en ratones, donde las proteínas tempranas de adenovirus modifican la transcripción y el ciclo celular culminando en una transformación de tipo maligno. La proteína E1A interactúa con factores de transcripción y otras proteínas necesarias para la transcripción desregulando la apoptosis (13).

1.4 Adenovirus 36 y obesidad.

Los virus adipogénicos más ampliamente estudiados pertenecen a familia *Adenoviridae*, siendo el HAdV-36 junto con HAdV-9 y HAdV-37, los más asociados a procesos obesogénicos. Estos virus son antigénicamente diferentes y por lo tanto no hay inmunidad cruzada entre ellos ni con otros adenovirus humanos (21). Algunos datos de revisiones sistemáticas de artículos y meta-análisis epidemiológicos en humanos muestran una robusta asociación entre la presencia de anticuerpos séricos contra el HAdV-36 y la obesidad en humanos (11,12,18,21,22).

1.4.1 Adenovirus y obesidad en animales.

El efecto en la adiposidad de los adenovirus se ha estudiado desde 1990, cuando se observó por primera vez el papel adipogénico de un tipo de adenovirus aviar en pollos (SMAM-1) (23). SMAM-1 es antigénicamente similar al virus letal huérfano de los embriones de pollo (CELO), que es común entre las aves de corral en USA. SMAM-1 induce la acumulación excesiva de los depósitos de grasa visceral, aumentando de esta manera la adiposidad en los pollos al mismo tiempo que disminuye la función inmune en los animales que resultan infectados. Este adenovirus demostró ser infeccioso de manera significativa, causante de obesidad, con el incremento de la grasa visceral de los huéspedes aun sin que existan cambios en su ingesta alimentaria (23). En pollos que fueron infectados de

manera experimental con HAdV-36, éste fue altamente adipogénico existiendo una paradójica reducción de los niveles séricos de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG), además de ser altamente infeccioso lo que sugiere una transmisión horizontal de la obesidad inducida por el virus, donde después de la transfusión de una pequeña cantidad de sangre del pollo infectado con HAdV-36 a otro animal, o en aquellos que compartieron la misma jaula, los animales se volvieron obesos (24).

Los adenovirus humanos HAdV-5 y HAdV-37 aumentan la adiposidad en animales, y reducen los niveles de TG séricos en estos modelos; mientras que otros adenovirus humanos como HAdV-2 y HAdV-31 no son adipogénicos (25,26). En modelos animales utilizando pollos, ratas, ratones y primates infectados con HAdV-36, se muestra que éste virus es adipogénico y que contrario a lo que se esperaba, la presencia del virus reduce significativamente las concentraciones de CT y TG, al mismo tiempo que aumenta la sensibilidad a la insulina en comparación con los controles no infectados (9,27–29). Algunos estudios mostraron que las ratas infectadas con HAdV-36 tenían un aumento de peso y además, mayor sensibilidad a la insulina y mejor captación de glucosa (28). Además, HAdV-36 en la infección con primates mostró que estos tuvieron un aumento de peso corporal del 15% al 30% y una reducción del CT sérico después de una infección natural con HAdV-36, por lo que se sugiere, que a pesar de que el virus puede causar un aumento en la adiposidad, genera un efecto protector previniendo las dislipidemias en los animales y personas que la padecen, debido a

los cambios en el metabolismo celular que permiten una mejor captación de glucosa y un mejoramiento en la utilización de la energía celular (25).

Se sabe que HAdV-36 se transmite fácilmente entre monos Rhesus mostrando una aparición de anticuerpos anti-HAdV-36 antes de 6 meses después de una infección experimental. Se obtuvieron resultados similares en los tíes y hámsteres con una disminución del CT en todos los modelos animales (27).

1.4.2 Anticuerpos contra HAdV-36 y obesidad en humanos

En humanos, HAdV-36 muestra mayor asociación con el desarrollo de obesidad (8,30). El primer estudio sobre la prevalencia de anticuerpos anti-HAdV-36 fue hecho en humanos adultos en los Estados Unidos y mostró que de 502 sujetos aproximadamente el 30% de los obesos y el 11% de los no obesos tendrían inmunidad previa hacia este virus, mostrando una tendencia mayor en las personas con obesidad. En este estudio, se tomaron en cuenta muestras de sangre para determinar la presencia de anticuerpos contra HAdV-36 en pacientes tanto normopeso como obesos, donde además fueron incluidas muestras de gemelos, quedando demostrada una asociación ($p < 0.001$) entre la presencia de anticuerpos séricos contra HAdV-36, su relación con un aumento del peso corporal y la paradójica disminución de los lípidos (CT y TG), en comparación con los sujetos negativos para anticuerpos de HAdV-36 ($p < 0.003$); independientemente de la edad, sexo y sitio de recolección de los sujetos de estudio. De este modo

HAdV-36 es asociado con un incremento en el peso corporal y una disminución de los niveles séricos lipídicos (29).

Actualmente, existen cuatro metanálisis que detallan las investigaciones hechas con anticuerpos séricos utilizando la técnica de ensayo de neutralización en suero (ENS) o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) contra HAdV-36 para determinar su relación con obesidad en humanos. El primer estudio es de 2012 por Yamada, *et al.*, considerando un total de diez estudios transversales observacionales de casos y controles y cohortes de países europeos, asiáticos y norteamericanos. Son 7 estudios de población adulta de entre 40 a 45 años y 3 estudios infantiles de entre 11 a 14 años, 8 estudios contemplan IMC, 7 CT, 6 TG, 5 lipoproteínas de alta densidad (HDL) y glucosa sérica y 4 de ellos lipoproteínas de baja densidad (LDL). Sólo las cohortes de Estados Unidos mostraron un riesgo mayor de aumentar el IMC en la infección con HAdV-36 en un (3.2 Kg/m²). No se encontraron diferencias en cuanto a IMC o parámetros bioquímicos en la población asiática entre aquellos seropositivos y seronegativos para HAdV-36. No se encontró relación en cuanto al tipo de sujeto (adulto o niño), sexo, posición geográfica con el riesgo de obesidad en ningún estudio. Se concluyó que existe un riesgo de obesidad significativamente mayor asociado a infección con HAdV-36 en personas con IMC ≥ 30 que aquellas con IMC menor (IMC ≥ 27 kg/m² vs. IMC < 27 kg/m²: OR= 3.59 vs.1.33). No se encontraron diferencias significativas entre seropositivos versus seronegativos en cuanto a parámetros bioquímicos y circunferencia de cintura sugiriendo que la infección con HAdV-36 se encuentra

mayormente asociada con acumulación de la grasa subcutánea que con de grasa visceral (31).

El segundo metanálisis es del año 2014 de Shang, *et al.*, aquí se contemplan 11 estudios, 7 en adultos y 4 en niños con un tamaño de la muestra de casi 6,000 personas. Encontrándose que el riesgo de padecer obesidad es significativamente mayor en individuos infectados por HAdV-36. En este estudio el tipo de sujeto sí se relacionó con el riesgo de obesidad siendo éste mayor en niños que en adultos. No hubo relación con el país de origen y en los adultos se determinó que el riesgo es mayor a mayor IMC ($IMC \geq 30$) (OR= 1.89 para un $IMC \geq 30$ kg/m² vs. OR= 0.78 para un $IMC < 30$ kg/m²) (11).

El tercer metanálisis es del año 2015 por Xu, *et al.*, donde los estudios contemplados suman 24 aumentando el tamaño de la muestra a 10,191 sujetos y donde el 67% de los estudios fueron publicados de 2012 a 2015. 17 estudios encontraron asociación de infección de HAdV-36 con obesidad humana. Se consideran 3,988 sujetos obesos y 2,991 normopeso, teniendo mayor riesgo de obesidad los seropositivos para HAdV-36. En el análisis por subgrupos se determinó que el riesgo era mayor para adultos que para niños. 16 estudios que contemplaron el parámetro del IMC encontraron que de 5,356 sujetos 1,390 fueron seropositivos para HAdV-36 y 3,866 fueron seronegativos para el virus, concluyendo que la infección se asocia con un riesgo creciente de aumento de peso. En 4 estudios de un total de 570 niños. 182 de ellos fueron seropositivos y 388 seronegativos para HAdV-36 mostrando un puntaje z mayor en los

seropositivos que en los seronegativos aunque no fue estadísticamente significativo (32).

El último metanálisis publicado hasta el momento es del año 2022 por Marjani, *et al.*, donde se enfatiza el hecho de que existe una relación entre adenovirus y obesidad, enfocada a adolescentes. Considerando el análisis en publicaciones de cohortes y casos y controles de los años 2015 a 2020 realizados en personas obesas y controles magros. En este estudio sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles (OR= 1.84; IC 95%, 1.39-2.43), especialmente en menores de 18 años (OR= 2.44; IC 95%, 1.85-3.22). determinando que existe asociación estadísticamente significativa entre adenovirus y obesidad (33).

En México, existen muy pocos estudios reportados sobre la prevalencia de anticuerpos contra HAdV-36. El estudio de 2013 de Parra-Rojas *et al.*, evaluó a 157 niños de 6 a 11 años de edad en escuelas urbanas de la comunidad de Chilpancingo, Gro. 75 fueron normopeso y 82 obesos. En la prueba de anticuerpos séricos por ELISA se encontró una mayor seropositividad en los obesos (73.9%) que en los no obesos (58.6 vs 41.4%, $p= 0.007$), los positivos para HAdV-36 se asociaron con obesidad (OR= 2.66, $p= 0.01$) y HDL < 40 mg/dL (OR= 2.85, $p= 0.03$). No se encontraron diferencias en otros parámetros antropométricos (34).

En un estudio que incluyó a 1,400 adultos hispanos en San Antonio Texas, Estados Unidos, se encontró que la mayoría de los sujetos con sobrepeso (IMC 25–30 kg/m²) y obesidad (IMC > 30 kg/m²) fueron seropositivos para HAdV-36 de

834 mujeres 132 (15.8%) y de 566 varones 72 (12.7%) fueron positivos, los cuales mostraron mayor adiposidad corporal e índices de insulina menores a los seronegativos. Los positivos para HAdV-36 del grupo normopeso ($IMC < 25 \text{ kg/m}^2$) tuvieron mayor control glicémico. Encontrando que existe una asociación de HAdV-36 con un mayor porcentaje de grasa corporal en humanos seropositivos (35).

La evidencia basada en los estudios observacionales no nos permite determinar una relación causa efecto entre la infección por HAdV-36 y la obesidad en humanos ya que no podemos respaldar que la infección haya ocurrido previo al desarrollo de obesidad o que las personas que hayan estado expuestas al virus fueran sujetos con sobrepeso u obesidad desde antes de la infección. Sin embargo, los datos respaldan la evidencia de que HAdV-36 está correlacionado con la obesidad en humanos.

1.4.3 Presencia de DNA de HAdV-36 en tejido adiposo humano.

En particular, la información sobre la presencia del DNA de HAdV-36 en tejido adiposo humano es limitada. En 2012 Goossens, *et al.*, en 31 pacientes holandeses y belgas con obesidad severa, no se detectó DNA adenoviral por PCR en las biopsias de tejido adiposo obtenidas de intervenciones quirúrgicas. La seroprevalencia en 509 muestras de suero fue de 5.5% notando que aumentaba con la edad, no encontrando diferencias significativas entre el IMC de los seropositivos y seronegativos (36).

En las investigaciones realizadas por Ponterio, *et al.*, en el 2015, se estudió el tejido adiposo visceral proveniente de biopsias de 21 pacientes italianos mayores de edad, 8 hombres y 13 mujeres, a los que se les midieron parámetros antropométricos y bioquímicos. Se excluyeron pacientes con enfermedades crónicas y virales. La detección de DNA de HAdV-36 se realizó por PCR punto final y se comprobó por secuenciación. Los pacientes aceptados para el estudio tuvieron un IMC de entre 25 y 54 Kg/m² considerados en las categorías de sobrepeso y obesidad. De las biopsias de tejido adiposo se extrajo el DNA total con la intención de amplificar el gen E4 orf-1. Los autores determinaron que 19% de los pacientes presentó infección por HAdV-36 en el tejido adiposo visceral, aunque no se encontraron diferencias significativas en los niveles de CT, TG y glucosa sérica en ayunas en el suero de estos pacientes (37).

Así mismo, en un estudio realizado en Turquía, Ergin *et al.*, en 2015 utilizaron 49 muestras de tejido adiposo de liposucciones de adultos con un IMC ≥ 30 kg/m². En estas muestras, no se detectó DNA de HAdV-36 por PCR punto final y anidado en ninguna de las muestras. Seis muestras (12.2%) fueron seropositivas para HAdV-36. Tanto el IMC como los niveles leptina fueron mayores en los sujetos con anticuerpos contra HAdV-36. Los niveles de adiponectina en suero fueron menores en el grupo positivo para HAdV-36. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos para CT y TG. Aunque los niveles séricos fueron menores en el grupo seropositivo (38).

1.5 Mecanismos adipogénicos de HAdV-36.

1.5.1 La proteína E4 orf-1 de HAdV-36.

Las infecciones por virus desencadenan cambios metabólicos en las células huésped que respaldan las demandas bioenergéticas y biosintéticas de la replicación viral. Aun cuando no se conocen con certeza los mecanismos por medio de los cuales los adenovirus reprograman el metabolismo celular, algunos autores proponen que la proteína E4 orf-1 de HAdV-36 es necesaria para la regulación positiva inducida por adenovirus para el metabolismo de la glucosa de la célula y suficiente para promover la glucólisis mediante la activación de los protooncogenes Myc. E4 orf-1 se encuentra en el núcleo y mejora la unión de Myc a los genes diana glucolíticos lo que resulta en la expresión de las enzimas glucolíticas. Con lo anterior se promueve una mayor biosíntesis de nucleótidos a partir de intermediarios glucosídicos lo que permite una óptima replicación del virus (39,40).

Hasta la fecha la mayoría de los estudios sobre el efecto adipogénico de HAdV-36 han analizado el papel de la proteína viral E4 orf-1. Esta proteína viral induce un aumento de la expresión y translocación a la membrana de los transportadores de glucosa 1 y 4 (GLUT1 y GLUT4 respectivamente) mejorando la captación de glucosa tanto en tejido adiposo como en músculo esquelético. Por otra parte, E4 orf-1 activa la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) incluso sin la señalización de insulina, puesto que posee un dominio de unión a PDZ (PBM) que le permite interactuar con *Drosophila disc large-1* (DLG1), para translocarse a

la membrana plasmática y activar a RAS culminando en la activación de PI3K y la translocación de GLUT1 y GLUT4 a la membrana (41).

E4 orf-1, también regula el aumento de la expresión de genes propios de la adipogénesis, incluyendo los que codifican para enzimas esenciales del metabolismo lipídico como la lipoproteinlipasa (LPS), proteínas de unión a potenciadores como CCAAT, C/EBP α , C/EBP γ , de importancia en etapas tempranas de diferenciación a adipocitos y otros procesos como proliferación y crecimiento celular (41); además de la expresión del receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR γ) al que se le considera un interruptor maestro del desarrollo de adipocitos. PPAR γ , es un receptor de hormonas nuclear que además de controlar la diferenciación y el desarrollo de adipocitos, es importante en la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina. PPAR γ es un factor de transcripción dependiente de ligando que es el receptor funcional de las tiazolidinedionas antidiabéticas, además controla la expresión de genes implicados en la homeostasis de la glucosa y la expresión de diferentes adipocinas como resistina, adiponectina y leptina (42,43).

La infección con HAdV-36 promueve la diferenciación de células madre a preadipocitos y posteriormente a adipocitos maduros conduciendo por una parte a una hipertrofia (aumento del volumen de lípidos intracelulares) y a una hiperplasia (aumento en el número de células adiposas) del tejido infectado. Esto ocurre básicamente por el incremento en la captación de glucosa por la célula con el subsecuente almacén del exceso de energía en forma de ácidos grasos. En la

figura 4 se esquematizan los mecanismos mediante los cuales se propone que ocurre la adipogénesis mediada por HAdV-36 vía E4 orf-1 (41).

Mecanismos adipogénicos de adenovirus 36

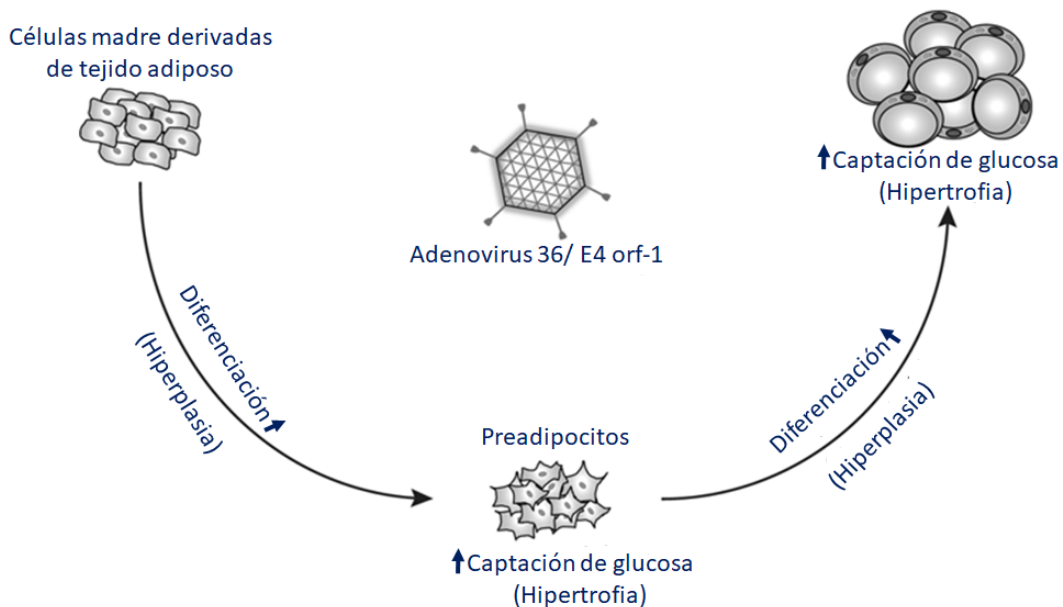


Figura 4. Mecanismos adipogénicos de HAdV-36 sobre células madre. En general, el efecto adipogénico de HAdV-36 consiste en incrementar la captación de glucosa por el preadipocito así como por los adipocitos maduros, induciendo una acumulación de lípidos intracelulares (41).

1.5.2 Estudios *in vitro* de transfección con HAdV-36.

Se han utilizado distintas líneas celulares para determinar el efecto del HAdV-36 para inducir adipogénesis. Los experimentos *in vitro* utilizando células madre humanas hematopoyéticas (hASC) de tejido adiposo primario apoyan la hipótesis de que la infección con HAdV-36 en la línea celular hASC aumenta la adiposidad

(42). En los mecanismos adipogénicos crónicos las células infectadas muestran una menor oxidación de la grasa e incremento en la lipogénesis de novo, así como alteraciones en la sensibilidad a hormonas como la insulina y la leptina. La hormona leptina normalmente proporciona retroalimentación negativa sobre el apetito después de una acumulación de lípidos, pero los adipocitos infectados secretan menos leptina (40).

En estudios en líneas celulares de adipocitos de ratón (3T3-L1), HAdV-36 aumenta la adipogénesis y la diferenciación de los adipocitos *in vitro*. El estudio de Vangipuram, *et al.*, 2007 explica que existe una reducción en la secreción de leptina suprimiendo la expresión del RNA mensajero (mRNA) de la leptina en 52 a 58% de los casos, encontrando hasta un 51% menos de secreción ($p < 0.002$) entre 3 a 5 días posinfección, lo que propicia un aumento de la captación de glucosa por parte de las células grasas en presencia de HAdV-36 incrementando la adipogénesis en líneas de adipocitos 3T3-L1 (44).

Para determinar el efecto adipogénico de HAdV-36 se realizó un estudio en el que se infectaron células musculares con HAdV-36, o con el virus no adipogénico, HAdV-2 y utilizando células no infectadas como control negativo, se encontró que HAdV-36 redujo significativamente la oxidación de ácidos grasos ($p < 0.01$), mientras que la infección con HAdV-2 no mostró cambios en la oxidación de ácidos grasos. El uso de rojo oleoso en las células mostró que había una acumulación sustancial de grasas en las células musculares infectadas con HAdV-36 (35,40,45). De esta forma, se podría explicar el efecto de HAdV-36 sobre el adipocito y como contribuiría al desarrollo de la obesidad (40,42).

1.5.2 Estudios *in vivo* de infección con HAdV-36.

Sumado a lo anterior, se encontró que la infección experimental de ratas con HAdV-36 mejora la sensibilidad a la insulina y promueve la adipogénesis muy similar al efecto de fármacos antidiabéticos como las tiazolidinedionas (46,47) mejorando la hiperglucemia en ratones a pesar de una dieta alta en grasas sin reducir la adiposidad, ya que como se mencionó anteriormente la proteína viral E4 orf-1 regula al alza la expresión de transportadores de glucosa que llevan glucosa dentro de la célula donde posteriormente la sintasa de ácidos grasos convierte el exceso de glucosa en ácidos grasos (40, 51–53).

1.6 Respuesta inmune en obesidad con HAdV-36.

Existe una asociación de la obesidad con la inflamación de bajo grado, esto debido a la activación crónica del sistema inmune innato, que podría culminar en la subsecuente resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e incluso diabetes. Datos recientes indican que en las personas con obesidad existe una mayor infiltración de macrófagos que son una fuente importante de citocinas, donde además los adipocitos hipertrofiados de igual manera pueden producir dichas citocinas proinflamatorias tales como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6), resistina, e inhibidor del activador del plasminógeno-1. Sin embargo, adipocinas como la adiponectina se encuentran poco expresadas en personas con resistencia

a la insulina asociada a obesidad, siendo la adiponectina un inhibidor de la gluconeogénesis hepática que además promueve la oxidación de ácidos grasos por el músculo esquelético y contrarresta los efectos proinflamatorios de TNF en la pared endotelial de la arteria posiblemente previniendo la aterosclerosis (51,52).

La inducción de la producción de citocinas proinflamatorias en células infectadas con HAdV-36 promueve la infiltración de leucocitos incluyendo macrófagos al tejido adiposo, aunque aún no están bien determinadas las vías por las cuales ocurre esto (53). Se ha encontrado que los niveles de la citocina proinflamatoria MCP-1 son más elevados en humanos seropositivos para HAdV-36 con sobrepeso y obesidad que en sujetos HAdV-36 seronegativos, lo que podría explicar en parte la presencia de células blancas en el tejido adiposo (53).

La infección con HAdV-36 podría inducir obesidad a través de la inflamación, y MCP-1 puede ser un regulador clave de la obesidad inducida por HAdV-36 en ratones infectados. En un estudio con ratones de tipo silvestre (WT) y ratones Knock-out (KO) para (MCP-1 $-/-$) HAdV-36 provocó inflamación crónica aumentando los niveles de MCP-1, activando el factor nuclear de transcripción kappa B (NF- κ B), induciendo la infiltración de macrófagos en adipocitos, y alterando el metabolismo lipídico resultando en una mejora del control glicémico dentro del grupo de ratones WT infectados con HAdV-36 de manera intraperitoneal. Mientras que los ratones KO (MCP-1 $-/-$) a pesar de la infección con HAdV-36 se encontraron protegidos de la inflamación y la obesidad inducida por HAdV-36. De este modo la inflamación puede desempeñar un papel en el mantenimiento de la obesidad, sugiriéndose que la inflamación provista por MCP-1

puede contribuir al incremento de la adipogénesis (53–56). Por otro lado, se ha informado de que MCP-1 es responsable de la obesidad, la resistencia a la insulina, esteatosis e infiltración de macrófagos en tejido adiposo en ratones transgénicos y ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasas, donde; la inhibición de MCP-1 mejora la resistencia a la insulina, la esteatosis hepática y de igual forma disminuye la acumulación de macrófagos (54).

Funcionalmente, hay diferentes poblaciones de macrófagos que están asociados con la reparación de tejidos lesionados y la resolución de la inflamación y otros que promueven la inflamación. Esto se debe a que los macrófagos polarizan o cambian su fenotipo dependiendo de los estímulos extracelulares que reciban (56). Los macrófagos se pueden clasificar en dos poblaciones principales que muestran fenotipos distintivos: macrófagos M1 "proinflamatorios" y macrófagos M2 "antiinflamatorios", los cuales en el tejido adiposo se encuentran en proporciones de 10 y 40% respectivamente, donde este ratio se ve aumentado en ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasas (55). Por lo tanto, se ha demostrado que los macrófagos que se acumulan en el tejido adiposo de ratones obesos son aquellos que expresan principalmente genes asociados con M1 o fenotipo de macrófagos "clásicamente activados", mientras que los macrófagos de tejido adiposo de ratones magros expresan genes asociados con un M2 o "alternativamente activados" (57). En ratones infectados con HAdV-36 se observa que después de la primera infección la población de macrófagos M1 aumenta robustamente, aumentando la relación M1/M2 indicando inflamación aguda en respuesta a la infección por HAdV-36. Sin embargo, a las 12 semanas después de

la infección la población de M2 aumentó considerablemente en el tejido adiposo sin verse modificada la cantidad de M1, lo que condujo a una reducción de la relación M1/M2 en los ratones infectados con HAdV-36; contrario a lo observado en ratones control alimentados con una dieta alta en grasas donde se observó una relación mayor entre M1/M2 dentro del tejido adiposo, denotando en estos una inflamación crónica con una población de macrófagos M1 mayor a la de M2. Indicando una respuesta inflamatoria diferente ante la obesidad inducida por HAdV-36 versus dieta alta en grasas (41).

Además, la formación de vasos sanguíneos inducida en la infección por HAdV-36 (angiogénesis) en los adipocitos aumentó la expresión de factores angiogénéticos, angiopoyetina-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) en ratones de tipo salvaje. Esto indicó que la inflamación es necesaria para la angiogénesis inducida por HAdV-36, que contribuye al mantenimiento de la expansión del tejido adiposo. En general, la inflamación inducida por HAdV-36 es beneficiosa para las enfermedades metabólicas (41).

La infección por HAdV-36 induce obesidad al promover la capacidad de expansión del tejido adiposo, la inflamación y la posterior angiogénesis. La obesidad mediada por la infección por HAdV-36 alivia en general la alteración metabólica, debido a que la infección mejora el control glucémico en el tejido adiposo y suprime las enfermedades metabólicas consecuentes a una obesidad causada por sobrenutrición. Además, la infección con HAdV-36 aumenta la actividad de las

mitocondrias en el hígado y, por lo tanto, esto también mejora el control glucémico en los animales infectados por el virus (41).

Por otro lado, se tiene la teoría de que la infección por HAdV-36 puede mejorar la activación de M2 en la etapa tardía de infección por virus afectando las expresiones y/o la actividad de los reguladores epigenéticos implicados en la polarización de los macrófagos (41,58).

1.7 Inflamación de bajo grado.

En sentido general la inflamación es una respuesta del sistema inmunológico cuando éste se enfrenta a estímulos que son censados como noxas o agresiones para el organismo ya sean estos causados por patógenos, células en mal estado, compuestos tóxicos o incluso radiación; de esta forma el sistema inmunitario actúa eliminando dichos estímulos iniciando el proceso de curación. Es por ello, por lo que la inflamación es parte fundamental de la defensa como un mecanismo necesario para contribuir a la restauración de la homeostasis del tejido dañado. Cuando la inflamación ocurre de manera normal, el proceso se conoce como inflamación aguda y se lleva a cabo de forma transitoria; y una vez que la función del tejido logra restablecerse la inflamación ya no es necesaria. Sin embargo, la inflamación aguda no controlada tiene el potencial de volverse inflamación crónica la cual contribuye al desarrollo de enfermedades crónicas inflamatorias (59–61).

Los signos y síntomas que caracterizan la inflamación son dolor, calor, enrojecimiento, hinchazón y la disfunción del tejido, todo esto debido a la respuesta por parte del sistema inmunológico y vascular en el sitio afectado. Durante un proceso inflamatorio ocurren cambios en la permeabilidad vascular, además de la liberación de mediadores inflamatorios que propician el reclutamiento de células blancas y su posterior acumulación en el tejido lesionado. Los procesos de inflamación comparten un mecanismo común que se puede resumir de la siguiente manera: 1) los estímulos nocivos son reconocidos por receptores de patrones moleculares; 2) se induce la expresión de las vías proinflamatorias; 3) los marcadores inflamatorios son liberados al torrente sanguíneo y 4) las células inflamatorias son reclutadas al sitio del daño (61).

Un factor importante en la inflamación asociada a la obesidad es la activación de los receptores de tipo toll (TLR), en particular la de TLR-2 y TLR-4. Los TLR son una familia de receptores que pertenecen al sistema inmune innato, que generalmente son activados por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como el lipopolisacárido (LPS), y que inducen inflamación a través de la vía del NF- κ B. A pesar de que los TLR se expresan de manera ubicua, se ha observado que la expresión de los TLR-4 se encuentra elevada en el tejido muscular y adiposo en condiciones de obesidad, de igual forma mediante la vía NF- κ B la expresión de diversos marcadores proinflamatorios como es el caso de TNF e IL-6 también se encuentra aumentada (62).

1.7.1 TNF.

TNF, es una citocina producida principalmente por macrófagos y linfocitos en respuesta a endotoxemia, inflamación y cáncer. Los adipocitos expresan tanto TNF como sus receptores. En el estado de obesidad la expresión del mRNA de TNF se encuentra aumentada en tejido adiposo, sin embargo; los niveles séricos parecen no afectarse y se ha sugerido que la producción de TNF está restringida a tejido adiposo. *In vitro* en células adiposas TNF induce la expresión de genes como el propio NF- κ B, citocinas como IL-6, factores de crecimiento y moléculas de señalización. Los genes inhibidos incluyen GLUT4, lipasa sensible a hormonas, acetil-CoA sintetasa, adiponectina y PPAR- γ y su exposición prolongada produce una disminución de receptor de insulina (RI), sustrato de receptor de insulina 1 (IRS-1), proteína quinasa B (PKB) y GLUT4 (63).

TNF ejerce su efecto sobre la función celular al unirse a dos receptores específicos de la superficie celular TNF-R55 y TNF-R75, estudios recientes han mostrado que TNF se sobreexpresa en el tejido adiposo durante la obesidad humana y se encontró que las concentraciones solubles de dos receptores de TNF se hallaban elevadas en la obesidad. Durante la pérdida de peso en humanos la concentración sérica de TNF disminuye, al mismo tiempo que ambos receptores aumentan lo que se podría explicar cómo una contrarregulación para evitar una pérdida de peso aún mayor (63).

1.7.2 IL-6.

La IL-6 es una citocina proinflamatoria que también es secretada por sistema inmune, fibroblastos, núcleos hipotalámicos y tejido adiposo, cuya expresión aumenta en tejido adiposo con resistencia a la insulina, IL-6 eleva la concentración de ácidos grasos libres (AGL) e inhibe la señalización de la insulina al unirse a su receptor de la vía de señalización JAK-STAT (JAK/STAT). La obesidad también puede promover diferentes tipos de cáncer como cáncer de hígado y colorrectal que son debidos en parte a la inflamación crónica de bajo grado causada por la obesidad. En particular, el reclutamiento y activación de diversos conjuntos de células inmunes como macrófagos (proinflamatorios M1 y antiinflamatorios M2), células T y células B en donde estas últimas inhiben a las células T reguladoras en el tejido adiposo blanco, hace que aumente aún más la producción de citocinas proinflamatorias como TNF e IL-6 quienes no solo perjudican la acción de la insulina en órganos metabólicos como el tejido adiposo blanco, hígado, músculo, páncreas e incluso sistema nervioso central. Del mismo modo estas citocinas contribuyen favoreciendo la aparición de cáncer (64).

1.7.3 Interferón gamma (INF gamma).

La función antiviral de los macrófagos, los linfocitos T y las células asesinas naturales (NK), se encuentra regulada en gran parte por el INF gamma. En la

inflamación sistémica y la resistencia a la insulina presentes en la obesidad los macrófagos son piezas clave en la mediación de estos procesos y aunque no se conoce del todo el papel del INF gamma en la regulación de la inflamación en la obesidad existen algunos experimentos que sugieren un efecto del INF gamma en la inflamación y el control glicémico durante la enfermedad de obesidad; donde se cree que tiene una participación en los mecanismos sobre la adipogénesis y consecuente angiogénesis, la expresión de citocinas proinflamatorias y el fenotipo que adoptan los macrófagos. En un estudio con ratones KO para INF gamma y ratones control WT, ambos con una dieta normal y una dieta alta en grasas durante 13 semanas, fueron sometidos a pruebas de sensibilidad a la insulina para su posterior sacrificio donde mostraron que los WT con una dieta alta en grasas desarrollaron inflamación sistémica y resistencia a la insulina, además en su tejido adiposo pudo comprobarse la infiltración de células inmunes incluyendo macrófagos, células T y células NK. Mientras que los ratones obesos KO para INF gamma mostraron una ligera mejora en cuanto a la sensibilidad a la insulina, adipocitos de menor tamaño, infiltración de macrófagos con fenotipo M1 y una disminuida secreción de interleucinas proinflamatorias (65).

1.8 Tejido adiposo.

La obesidad induce un aumento del tejido adiposo, el cual hasta hace poco era considerado como una mera reserva de energía. Tradicionalmente se han distinguido dos tipos de tejido adiposo el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo. El tejido adiposo blanco está constituido por un tipo de adipocitos cuyas células poseen una forma redonda generalmente grandes (25-200 μm) caracterizadas por tener una gota lipídica de un solo compartimento o unilocular, la cual está rodeada por una delgada capa de citoplasma, en cuyo espacio se localizan muy pocas mitocondrias y el núcleo con apariencia plana desplazado hacia la periferia celular. Las principales funciones del tejido adiposo blanco son la acumulación de energía en forma de TG, el aislamiento térmico y la secreción de citocinas y adipocinas que regulan diversos procesos biológicos de forma autocrina, paracrina y endocrina. En contraparte, la grasa parda posee adipocitos cuyas células son más pequeñas que las blancas (15-60 μm) y la forma de estos suele ser poligonal, en lugar de una sola gota lipídica se encuentran varias gotas de lípidos en organización multilocular, en su citoplasma existen múltiples mitocondrias y un núcleo con ubicación central. La termogénesis adaptativa mediante la activación de la proteína desacoplante (UCP1) constituye la principal función biológica de la grasa parda, que también puede actuar como depósito de TG y secretar citocinas y adipocinas, aunque en menor medida que el tejido adiposo blanco. Aproximadamente hace una década (en 2010) fue descubierto un tercer y nuevo tipo de células grasas diferentes denominadas adipocitos beige

ubicados dentro del tejido adiposo blanco, aunque su morfología corresponde más bien a la de adipocitos pardos. La adquisición de este fenotipo es similar a los adipocitos pardos (presencia de gotas lipídicas multiloculares y un gran número de mitocondrias) se produce tras la exposición al frío o por estimulación de receptores b-adrenérgicos en un proceso denominado pardeado del tejido adiposo (“*fatbrowning*” en inglés) (66,67).

En el presente estudio, el modelo celular de tejido adiposo con el que se trabajó es el adipocito blanco. El tejido adiposo blanco es cuantitativamente el componente más variable del cuerpo desde un poco porcentaje de peso corporal hasta más del 50% en animales y personas obesas. En mamíferos se encuentra tejido adiposo dentro de la cavidad abdominal, debajo de la piel, dentro de la musculatura (intermuscular) y dentro de los músculos (intramuscular) y en algunos lugares altamente especializados como la cuenca del ojo. Los depósitos de tejido adiposo también se encuentran en aves, reptiles y anfibios. El tejido adiposo blanco es un tejido blando desprovisto de rigidez y bien provisto de capilares y terminaciones nerviosas del sistema nervioso simpático. Las funciones de la grasa blanca pueden resumirse en cuatro principales: la más clásica de todas, actuar como reservorio de energía, formando, almacenando y descomponiendo ácidos grasos en equilibrio con la concentración correspondiente en el torrente sanguíneo. Sintetizar lípidos a partir de excedentes de hidratos de carbono o proteínas. Responder a estímulos hormonales y nerviosos. Secretar sus propias hormonas (leptina, TNF, IL-6, adiponectina, etc.); y recientemente el tejido adiposo blanco está surgiendo como fuente importantísima de células madre adultas (68).

2. JUSTIFICACIÓN:

La obesidad es un problema grave de salud que afecta a todos los estratos sociales tratándose de una situación directamente ligada a la dieta y a la actividad física. Sin embargo, existen otros factores que pueden ser asociados tanto a la etiología como al desarrollo de esta enfermedad. Actualmente hay evidencia de que algunos patógenos, particularmente virus pueden considerarse como adipogénicos, es decir; que son capaces de aumentar el tejido adiposo por lo que hoy en día existe un término llamado infectoobesidad, en donde el HAdV-36 ha sido el virus con mayor prevalencia en los estudios clínicos en pacientes obesos. Por lo anterior, es necesario estudiar la obesidad como una enfermedad multifactorial, en donde cada agente etiológico pueda ser tomado en cuenta para abatir esta epidemia que tiene consecuencias severas para la población mundial. En México, los casos de obesidad cada vez son más preocupantes, ocupando los primeros lugares de obesidad infantil y de SM en el caso de adultos, y se desconoce la asociación de HAdV-36 con esta enfermedad, así como la prevalencia de este virus en la población mexicana.

3. HIPÓTESIS.

La presencia de HAdV-36 se correlaciona con la producción de citocinas proinflamatorias en el tejido adiposo de pacientes con obesidad y sobrepeso.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Establecer la asociación entre la presencia del DNA de HAdV-36 con el IMC de los pacientes y la producción de citocinas proinflamatorias en el tejido adiposo subcutáneo.

4.2 Objetivos específicos.

- 1 Determinar la presencia de DNA de HAdV-36 en tejido graso subcutáneo obtenido de muestras por liposucción.
- 2 Cuantificar la expresión de citocinas proinflamatorias IL-6, TNF e INF gamma en el tejido adiposo subcutáneo.

- 3 Establecer la asociación entre la presencia de DNA de HAdV-36 con el IMC y la producción de citocinas proinflamatorias de los pacientes sometidos a liposucción.

5. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.

5.1 Diseño de estudio.

El presente estudio fue de diseño observacional analítico para evaluar la asociación de la presencia del DNA de HAdV-36 con la respuesta inflamatoria del tejido adiposo subcutáneo y el IMC de las pacientes participantes, tomando como variable independiente la presencia del DNA de HAdV-36 y como variable dependiente la respuesta inflamatoria en el tejido adiposo y el IMC.

5.2 Universo de trabajo y muestra.

El presente protocolo fue en colaboración con el Dr. Ramón A. González García-Conde del Centro de Investigación en Dinámica celular de la UAEM. Y con la clínica de cirugía estética RENOVANCE del Dr. Luis Omar Araujo Montes. Donde se proporcionó la donación de las muestras por parte de pacientes femeninas que se sometieron a cirugía estética de liposucción electiva quedando para este

estudio un muestreo a conveniencia del investigador. Las muestras de tejido graso obtenidas de aspirados fueron colectadas en el periodo de Enero a Agosto de 2019 y almacenadas en RNA later a -70° C hasta su procesamiento. Además de cada paciente se cuenta con muestra de suero sanguíneo y datos de IMC, edad y bioquímicos como glucosa TG y CT.

Los criterios utilizados en la selección de pacientes fueron los siguientes:

Criterios de inclusión:

Pacientes de sexo indistinto mayores de edad, que se sometan voluntariamente al procedimiento de liposucción, clínicamente sanos, sin enfermedades crónicas autoinmunes o virales y capaces de otorgar su consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

Pacientes con algún padecimiento crónico, autoinmune o aquellos de los que no se pueda obtener el consentimiento informado.

Se obtuvieron para este trabajo un total de 21 muestras de pacientes femeninas con un rango de edad de 25 a 41 años y un IMC de 19.4 a 28.4 kg/m². Durante una entrevista se llevó a cabo la toma de datos personales de las pacientes y en el proceso se les informó sobre el protocolo, para posteriormente obtener su consentimiento informado por escrito. También fueron tomadas medidas antropométricas de las pacientes tales como su peso y estatura para poder

calcular su IMC. Su peso fue medido en kilogramos en una báscula omron portátil y su estatura se midió con un estadiómetro en centímetros.

El personal médico de la clínica tomó muestras de sangre de las pacientes antes de ingresar a cirugía para la evaluación de los parámetros bioquímicos como CT, glucosa en ayunas y TG. Las mediciones bioquímicas se llevaron a cabo en colaboración con el laboratorio clínico de diagnóstico clínico y molecular (DICLIM).

En este proyecto el manejo de datos personales está restringido únicamente al personal de la clínica, las muestras de tejido se manejan con códigos por lo que se garantiza el anonimato de las pacientes. Sin embargo, en cualquier momento se puede solicitar consultar el historial clínico de estas pacientes.

5.3 Instrumento de investigación.

Para la realización de este proyecto se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final para la detección del DNA de HAdV-36 en las muestras de tejido graso humano. La obtención de mRNA se obtuvo mediante la técnica de Trizol (Tri) Reagent Zymo Research y la cuantificación de la concentración del estado estable del mRNA de las citocinas proinflamatorias se llevó a cabo mediante densitometría en el programa de procesamiento de imágenes digital ImageJ. Los detalles del manejo de muestras se muestran en la figura 5.

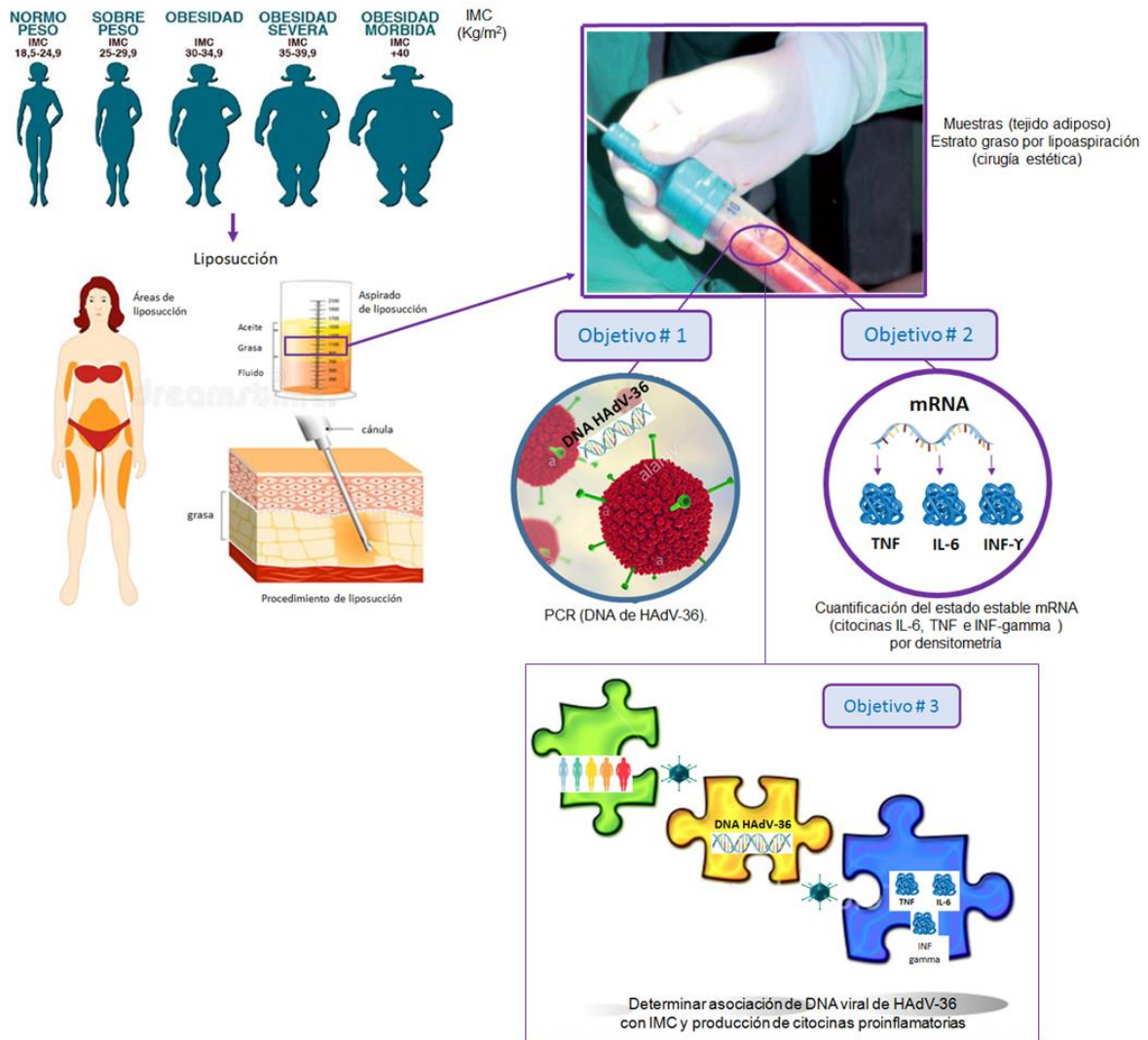


Figura 5. Estrategia experimental. Para el estudio, se reclutaron pacientes adultas con IMC de 19 a 35 Kg/m², las cuales se sometieron a liposucción, de este procedimiento se obtuvo tejido graso subcutáneo. Posteriormente se hizo una extracción de DNA y de mRNA para la determinación de la presencia de DNA de HAdV-36 y de citocinas proinflamatorias (TNF, IL-6 e INF gamma).

5.4 Desarrollo del proyecto.

5.4.1 Determinación de la presencia del DNA de HAdV-36 en tejido adiposo humano por PCR.

Extracción de DNA.

Después de descongelar las muestras de las liposucciones de tejido graso subcutáneo que fueron guardadas a -70°C en un ultracongelador se tomaron disecciones de 0.5-0.6 g del tejido dentro de una campana de flujo laminar, después el tejido se homogeneizó con 1 mL de buffer fosfato salino (PBS) pH 7.2.

A 1 mL de tejido homogeneizado se añadieron 100 μL de una solución de proteinasa K a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ más Tween 20 al 0.005%. El tejido se incubó por 1 h a 55°C para permitir la actividad de la proteinasa K. Después de la incubación la proteinasa K se inactivó durante 10 minutos a 95°C . La mezcla se centrifugó por 2 minutos a 14000 g y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo.

El DNA obtenido se precipitó con un volumen de isopropanol y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M dejándolo a 4°C durante toda la noche. Después de precipitar, se centrifugó a 14000 g durante 10 minutos a 4°C . Se recuperó el pellet y se dejó secar sobre una toalla de papel.

El pellet obtenido se lavó con 1 mL de Etanol al 70%, y se centrifugó por 5 minutos a 14000 g 4°C . Al término nuevamente se recuperó el pellet y el DNA se

resuspendió en 10 μL de Tris HCl 10 mM pH 7.4. Concluida la extracción de DNA, las muestras fueron almacenadas a -20°C para su uso posterior.

Para el análisis de pureza y cuantificación de DNA obtenido durante las extracciones, se hicieron alícuotas con 1 μL de muestra obtenida de DNA en 100 μL de agua deionizada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se midió la absorbancia a 260, 280 y 230 nm en un espectrofotómetro UV/VIS BioDrop DUO, colocando 3 μL de muestra en la celda de lectura vigilando que el cociente A_{260}/A_{280} fuera cercano a 2.0 para asegurar que no exista contaminación por proteínas. Y que el cociente A_{260}/A_{230} fuera cercano a 1.8 que indicara que no exista contaminación por compuestos fenólicos. Para la muestra blanco se utilizaron 3 μL de agua DEPC. La cuantificación se realizó calculando ($A_{260}\text{ nm} \times$ dilución del DNA = DNA ng/ μL).

Para comprobar que la extracción de DNA fue exitosa se realizó un PCR punto final utilizando oligonucleótidos para amplificar un gen celular de expresión constitutiva como es el caso del gen U1, para posteriormente determinar la presencia de DNA de HAdV-36 con oligonucleótidos específicos para amplificar una región variable del gen que codifica la proteína del hexón de HAdV-36. (ver tabla 1). El producto del PCR fue analizado en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, en los que se detectó una banda de 184 pb correspondiente al producto de amplificación específico para el DNA de HAdV-36 y una banda de 116 pb para el gen U1. Los reactivos para la reacción de PCR se detallan en la tabla 2.

Oligonucleótidos para la reacción de PCR punto final				
Oligonucleótido	Secuencia 5'.....3'		Tm °C	PM (amplicón)
U1 (gen celular)	Forward ACCTGGCAGGGGAGATACCAT	Reverse TTCCACATTCTCCGCATGG	62	116 pb
Adenovirus 36 (gen de la proteína del hexón)	Forward: CCGTGTGGTTAAAGAGCAGC	Reverse: TTCCACATTCTCCGCATGG	64	184 pb
β-actina (Gen celular) (cDNA)	Forward: GCTCCGGCATGTGCAA	Reverse: ACTACCTCATGAAGATCCT	55	541 pb
IL-6	Forward: AACCTGAACCTTCCAAAGATGG	Reverse: TCTGGCTTGTTCTCACTACT	55	159 pb
TNF	Forward: CTGTAGCCCATGTTGTAGCAAAC	Reverse: ATGAGGTACAGGCCCTCTGAT	60	139 pb
INF gamma	Forward: GCAGAGCCAAATTGTCTCC	Reverse: GGACATTCAAGTCAGTTACC	63	182 pb

Tabla 1. Oligonucleótidos para PCR punto final. Empleados para la amplificación de DNA genómico, viral y para citocinas proinflamatorias.

Reactivos para la reacción de PCR con U1 Thermo Scientific™	
Reactivo:	Cantidad en µL
DNA (100-200 ng)	1.5
MgCl ₂ (25mM)	4.5
(NH ₄)SO ₄ (10x)	1.5
KCl (10X)	1.5
Fw (10 µM)	0.5
Rv (10 µM)	0.5
Dntps (2 mM)	2.0
Taq polimerasa (5 U/µL)	0.625
H ₂ O (cbp 30µl)	

Tabla 2. Reactivos de PCR para amplificar U1.

Las muestras fueron corridas en PCR punto final empleando las siguientes condiciones: Para HAdV-36: 3 min 95°C; 1 min 95°C; 1 min 64°C; 30 min 72°C; 3

min 72°C. Por 40 ciclos. Para u1: 3 min 95°C; 1 min 95°C; 1 min 62°C; 30 min 72°C; 3 min 72°C; 10 min 72°C. Por 35 ciclos.

Los productos de la amplificación fueron analizados en un gel de agarosa al 2%, realizando el siguiente protocolo:

Para el gel de agarosa al 2%, se pesaron 2 g de agarosa en 100 mL de buffer TAE (Tris 40 mM, ácido acético 19 Mm, EDTA 1 mM) a pH 7.5. A la mezcla se agregaron 10 µL de bromuro de etidio. La preparación se calentó en microondas hasta obtener una mezcla homogénea y transparente. Una vez que la agarosa se enfrió un poco, se vertió en un molde para electroforesis con un peine para marcar los pocillos. Cuando la mezcla gelificó se retiró el peine del gel y éste se colocó en una cámara para electroforesis la cual se llenó con TAE hasta cubrir el gel.

Sobre una tira de papel parafilm Bemis se mezclaron 10 µL de cada muestra de PCR con 5 µL de buffer de carga Xilencianol 6X Thermo Scientific™, y se cargaron en los pocillos. En el primer pocillo de la placa de gel se colocaron 3 µL de marcador de peso molecular Low Range Thermo Scientific™. El gel se corrió a 80 V durante 25 minutos y después a 90 V durante 95 minutos. Transcurrido ese tiempo el resultado fue fotodocumentado bajo la luz ultravioleta de un transiluminador.

5.4.2 Extracción de RNA total obtenido de tejido graso subcutáneo.

La extracción de RNA se realizó mediante la técnica de trizol Tri Reagent Zymo Research. Para la extracción de RNA, se deben ocupar micropipetas y materiales exclusivos para este uso, horneado previamente al menos 12 horas a 80° C.

De las muestras homogeneizadas con buffer PBS (descrito en el apartado de extracción de DNA) se tomaron 500 µl del tejido a los que se agregaron 500 µL de Tri Reagent Zymo Research y se mezclaron en vortex por 30 segundos. Se añadieron 200 µL de cloroformo y se mezcló en vortex por aproximadamente 60 segundos. Se dejó reposar 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 g por 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante (fase acuosa) y la muestra se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL con una micropipeta puesta a 200 µL cuidando de no arrastrar la interfase (ya que ésta contiene DNA).

Al sobrenadante recolectado, se adicionaron 500 µL de isopropanol y se mezcló muy bien en vortex por 15 segundos. Se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se centrifugaron a 12,000 g por 15 minutos a 4°C. Se decantó con mucho cuidado el isopropanol y se agregaron 1000 µL de etanol al 75%, para lavar el pellet. Se centrifugó a 12,000 g por 5 minutos a 4°C, y se decantó con mucho cuidado para retirar el etanol. El pellet se dejó secar hasta que no quede nada de líquido en el tubo. El pellet obtenido se resuspendió en 25 µL de agua DEPC libre de endonucleasas y ribonucleasas. Las muestras se almacenaron a -70° C, hasta su posterior análisis.

Para comprobar la integridad del RNA extraído, las muestras de RNA total se hicieron pasar por un gel de agarosa al 1% y fueron teñidas con bromuro de etidio para detectar las bandas 28S y 18S de RNA ribosomal en proporción 2:1. El RNA total obtenido fue cuantificado utilizando el Nanodrop, el RNA total extraído fue diluido en agua DEPC 1:100 y cuantificado en un espectrofotómetro UV/VIS BioDrop DUO, utilizando 2 μ L de muestra. Siguiendo las especificaciones detalladas en el apartado de extracción de DNA de este escrito. La cuantificación se realizó calculando ($A_{260\text{ nm}} \times \text{dilución del RNA} = \text{RNA ng}/\mu\text{L}$).

5.4.3 Síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA) de los mRNA por reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR).

A partir del RNA total extraído de los tejidos se sintetizó un cDNA de los mRNA celulares utilizando las indicaciones del kit First-Strand de Thermo.

Síntesis de cDNA:

Posterior a confirmar la presencia de RNA mediante espectrofotometría en las extracciones hechas se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción para la síntesis de cDNA, utilizando entre 500 ng a 2 μ g de muestra de RNA, empleando el kit RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 U/ μ L); mismo que se ocupó realizando una modificación al protocolo desarrollada en el laboratorio del Dr. Ramón González. Para la reacción de síntesis se agregó oligo dT (oligonucleótido sintético de polideoxitimidina) (50 μ M) y se preparó la mezcla de reacción, lo cual fue añadido al RNA. El RNA + el oligo dT se incubó durante 5 minutos en baño

maría a 65°C para permitir que las hebras de RNA pierdan su estructura original, se vuelvan lineares y se favorezca su alineamiento o hibridación con el primer del oligo dT. Finalmente se dejó incubar con el resto de los reactivos en baño maría durante 60 minutos a 42°C y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

5.4.4 Amplificación del gen de β -actina en cDNA obtenido a partir de RNA total de tejido graso.

Para comprobar que los DNA complementarios fueron sintetizados con éxito, se preparó una reacción para PCR punto final utilizando oligonucleótidos específicos para el gen de β -actina (gen celular constitutivo), con una banda esperada de 541 pb (ver tabla 1). Para 20 μ L de reacción por cada muestra se emplearon los reactivos de la tabla 3.

Reactivos para la reacción de PCR con β -actina Thermo Scientific™	
Reactivo:	Cantidad en μ L
FW (10 μ M)	1
RV (10 μ M)	1
DNTPs (2 mM)	2
Buff. (NH ₄) ₂ SO ₄ (10X)	2
Taq polimerasa (5 U/ μ L)	0.5
MgCl (25 mM)	1.5
cDNA (muestra)	1
H ₂ O cbp 20 μ L	

Tabla 3. Reactivos de PCR para amplificar β -actina.

Condiciones del PCR: 120 seg 92°C; 45 seg 92°C; 45 seg 55°C; 45 seg 72°C; 60 seg 72°C; 10 min 72°C. Por 35 ciclos.

Posterior a la reacción de PCR, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2% preparado con 1 g de agarosa disuelta en 100 mL de TAE y 10 μ L de una solución de bromuro de etidio. La agarosa se dejó gelificar como se explica anteriormente en la sección de electroforesis en gel y se agregaron para cada pocillo 5 μ L de buffer de carga Xilencianol (Buffer de carga 6X DNA Loading Dye 1mL # 60611, Lote 00619174) más 5 μ L de muestra. Colocando en el primer carril el marcador de peso molecular (gene Ruler 1Kb DNA Ladder 0.5 μ g/ μ L, 50 μ g # SM0311, Lote 00246188). El gel se corrió a 90 V durante 45 minutos y el resultado fue fotodocumentado bajo la luz ultravioleta de un transiluminador.

5.4.5 PCR punto final para cDNA de citocinas IL-6, TNF e INF gamma.

Para analizar la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF e INF gamma se realizó un PCR punto final utilizando oligos específicos para cada caso (ver tabla 1). El producto del PCR fue analizado en geles de agarosa al 2% y teñidos bromuro de etidio a una concentración de 2 mg/mL, determinado la presencia del amplicón para IL-6, TNF e INF gamma cuando se amplificó una banda de 159, 139 y 182 pb respectivamente. Los reactivos para la reacción de PCR se detallan en la tabla 4.

Reactivos para la reacción de PCR con INF gamma Thermo Scientific™		Reactivos para la reacción de PCR con TNF Thermo Scientific™		Reactivos para la reacción de PCR con IL-6 Thermo Scientific™	
Reactivo:	Cantidad en μL	Reactivo:	Cantidad en μL	Reactivo:	Cantidad en μL
FW (10 μM)	0.5	FW (5 μM)	0.5	FW (10 μM)	0.5
RV (10 μM)	0.5	RV (5 μM)	0.5	RV (10 μM)	0.5
DNTPs (2 mM)	2.5	DNTPs (2 mM)	2	DNTPs (2 mM)	2
Buff. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10X)	2.5	Buff. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10X)	2	Buff. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10X)	2
Taq polimerasa (5 U/ μL)	0.5	Taq polimerasa (5 U/ μL)	0.5	Taq polimerasa (5 U/ μL)	0.5
MgCl (25 mM)	2.5	MgCl (25 mM)	1.5	MgCl (25 mM)	1.5
cDNA (muestra)	1	cDNA (muestra)	1	cDNA (muestra)	1
H2O cbp 20 μL		H2O cbp 20 μL		H2O cbp 20 μL	

Tabla 4. Reactivos de PCR punto final para citocinas.

Condiciones del PCR: 120 seg 92°C; 45 seg 92°C; 45 seg 55°C; 45 seg 72°C; 60 seg 72°C. Por 35 ciclos. Con diferente Tm en grados centígrados: (IL-6-55, TNF-60 e INF gamma-63).

Posterior a la reacción por PCR, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2% preparado con 2 g de agarosa disuelta en 100 mL de TAE 1X y 10 μL de una solución de bromuro de etidio a una concentración de 2 mg/mL. En cada pocillo se cargaron 5 μL de buffer de carga Xilencianol (Buffer de carga 6X DNA Loading Dye 1mL # 60611, Lote 00619174) más 5 μL de muestra. Colocando en el primer carril el marcador de peso molecular (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Lote 00566248). El gel se corrió a 90 V durante 45 minutos y el resultado fue fotodocumentado bajo la luz ultravioleta de un transiluminador.

5.4.6 Análisis de imágenes con el software ImageJ.

Para la cuantificación de las muestras de acuerdo a la intensidad de la fluorescencia de las bandas de DNA de los genes que codifican para las diferentes citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF e INF gamma), se utilizó el software del programa ImageJ, mediante el cual se realiza un análisis por densitometría (área multiplicada por la intensidad de cada pixel) lo que es directamente proporcional a la abundancia de DNA presente en cada fragmento de interés, lo cual se normaliza con la intensidad de las bandas del gen de β -actina. Para ello se emplean las imágenes obtenidas en el transiluminador de los geles de agarosa al 2%.

5.4.7 Diseño de análisis estadístico.

Los resultados de este proyecto se analizaron con GraphPad Software Inc, asumiendo un nivel de significancia de $p < 0.05$. Inicialmente se realizó un análisis descriptivo de las variables cuantitativas predictoras presentadas como media y desviación estándar (DE). Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre las variables categóricas. La comparación de diferencias entre grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica Kolmogorov-Smirnov. Se empleó una prueba t de Student no pareada para comparar las medias del grupo positivo y negativo para DNA de HAdV-36 para determinar diferencias en la expresión de citocinas entre grupos. Por último, se llevaron a cabo correlaciones

no paramétricas para definir si existe correlación entre las variables cuantitativas, mediante la prueba del coeficiente de correlación *rho* de Spearman.

6. RESULTADOS.

Durante los últimos 20 años desde inicios de la década de los 90's se ha reportado que el adenovirus humano HAdV-36 ha demostrado ser adipogénico en modelos animales experimentales aumentando la acumulación lipídica en el tejido adiposo al mismo tiempo que disminuye las concentraciones séricas de glucosa, CT, y TG. La seroprevalencia para HAdV-36 también ha sido reportada en muchos países del mundo y se ha asociado con un incremento en el IMC de las personas, riesgo de obesidad y sobrepeso. En humanos la seropositividad para HAdV-36 no siempre se asocia con marcadores bioquímicos saludables y la búsqueda de DNA de HAdV-36 dentro del tejido adiposo se ha reportado en pocos estudios. Es por ello que en este proyecto se decidió determinar la presencia del DNA de HAdV-36 y su correlación con las citocinas proinflamatorias presentes en el tejido adiposo humano de pacientes que fueran elegibles de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión mencionados en el apartado 5.2 universo de trabajo y muestra de este escrito, y que además otorgaran su consentimiento informado por escrito dentro de la clínica de cirugía estética RENOVANCE de la ciudad de Cuernavaca, Morelos. Se tomó un total de 21 pacientes femeninas las cuales fueron clasificadas con un número de muestra y una clave, además se obtuvieron sus

datos de edad, IMC y parámetros bioquímicos (CT, TG y glucosa en ayunas). Los datos se reportan en la tabla 5.

Características del grupo de estudio						
Número de muestra:	Clave de la paciente:	EDAD años	TG mg/dL	glucosa mg/dL	colesterol mg/dL	IMC Kg/m ²
1	AVV	37	153	97,89	210,8	25.2
2	DRA	29	44.8	98.5	236.0	26.0
3	MAS	31	129,76	93,3	257,8	26.1
4	ARN	31	53,09	82,6	164,9	24.7
5	MAMA	29	139.3	110.5	192.0	22.53
6	DFS	37	76.02	181.1	339.1	28.8
7	MDLAS	37	129.3	77.06	187.0	28.35
8	MBM	39	351.0	151.0	181.1	27.1
9	GGR	39	112,84	151.4	181,1	28.4
10	MFSM	25	134,25	91.5	159,9	19.4
11	TIEC	41	131.7	89.9	245.1	25.8
12	CEPG	35	134,23	106,6	198,9	25.5
13	CECR	37	113.9	115.3	212.0	25.12
14	AEG	32	227,7	103,6	166,8	24.8
15	RSGB	28	113.9	106.6	480.0	23.36
16	EERO	32	99.1	87.0	176.1	21.9
17	WBA	40	56.4	120.1	141.1	26.2
18	RMG	28	84.9	102.0	187.1	23.4
19	PAJ	28	572	158.1	297.0	24.5
20	APF	41	70.41	98.0	265.0	24.7
21	MJCL	37	113	97.8	294	25.5

Tabla 5. Características generales del grupo de estudio de acuerdo con número y clave de muestra asignados. Triglicéridos (TG), índice de masa corporal (IMC).

6.1 Características del grupo de estudio.

En la tabla 6 se muestran las variables predictoras de estudio de las 21 pacientes como media, mediana y desviación estándar. También se observan los valores mínimos y máximos de cada la variable.

Variables predictoras del grupo de estudio

Variable	Promedio \pm DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Edad (años)	33.9 \pm 4.9	37	25	41
IMC (kg/m ²)	25.1 \pm 2.2	25.2	19.4	28.4
Glucosa (mg/dL)	110.5 \pm 27.2	102	77.06	181.1
TG (mg/dL)	144.7 \pm 118.1	113.9	44.8	227.7
CT (mg/dL)	227.7 \pm 77.6	198.9	141	480

Tabla 6. Variables predictoras del grupo de estudio. Correspondientes a las 21 pacientes femeninas de las que se obtuvo muestra de tejido adiposo. Las variables continuas edad, índice de masa corporal (IMC), glucosa, triglicéridos (TG) y colesterol total (CT) se presentan como media y desviación estándar.

En la tabla 7 se muestran las variables cuantitativas descritas por categorías con el número de pacientes que corresponde a cada una de ellas.

Categorización de las variables continuas

Variable	Valor normal	Valor alto	Valor bajo
IMC (kg/m ²)	(n=9) 18.5-24.9	(n=12) 25.0-29.9	-- inferior a 18.5
Glucosa (mg/dL)	(n=10) inferior a 100	(n=11) 100 a 126	--
TG (mg/dL)	(n=17) < 150 hasta 199	(n=4) (200 a 499)	--
CT (mg/dL)	(n=11) 125 a 200	(n=10) >200	--

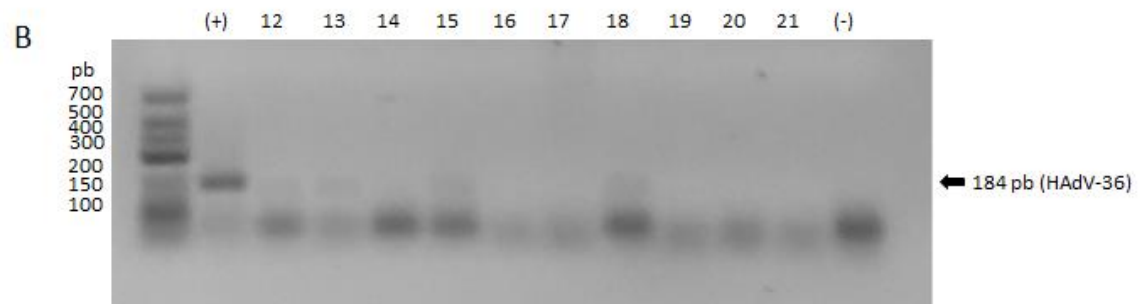
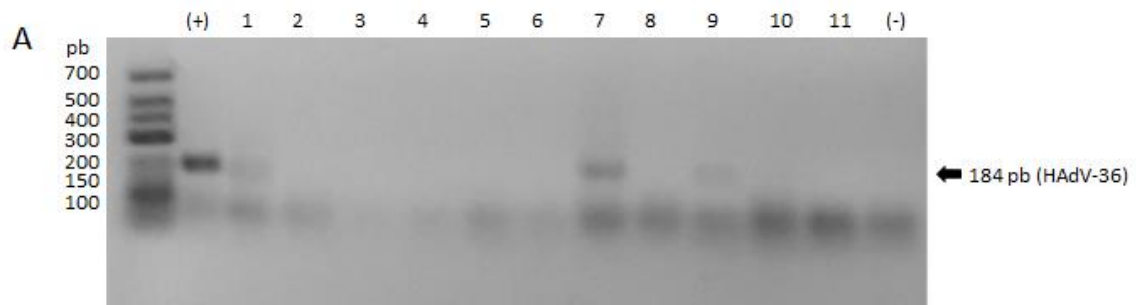
Tabla 7. Categorización de las variables continuas. El número de individuos presentes en cada categoría se encuentra entre parentesis. Debajo de cada número de pacientes se presenta el rango de valores límite para cada categoría con unidades arbitrarias. Índice de masa corporal (IMC), glucosa, triglicéridos (TG) y colesterol total (CT) se presentan como media y desviación estándar.

6.2 Detección de DNA de HAdV-36.

La detección de DNA de HAdV-36 se realizó por PCR punto final a partir de muestras de tejido graso de mujeres sometidas a cirugía estética.

Los productos de la PCR fueron identificados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Antes de determinar la presencia de DNA de HAdV-36, las muestras de las extracciones de DNA genómico se probaron para observar si amplificaban un gen celular (U1), y se llevaron a cabo de forma simultánea reacciones para controles positivo y negativo. En la figura 6 (A y B) se muestran

un total de 7 resultados positivos después de la amplificación de una región variable de la proteína del hexón específicamente de HAdV-36, y en (C y D) se muestran la amplificaciones del gen U1 en todas las muestras utilizadas de tejido adiposo humano.



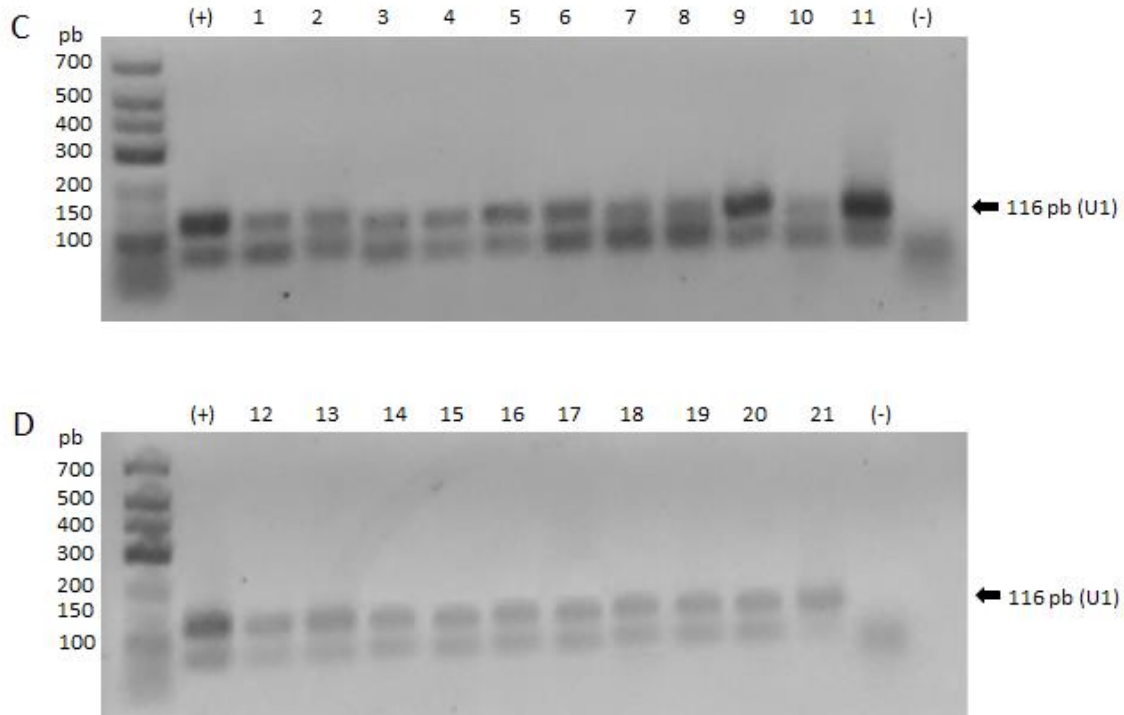


Figura 6. Amplificación de los genes de HAdV-36 y U1 en DNA genómico de tejido graso humano. (A y B) líneas 1 a 11 y 12 a 21 productos de PCR que corresponden a muestras de pacientes; (+) control positivo de DNA de células A549 de epitelio pulmonar infectadas con el virus HAdV-36; (-) control negativo; (pb) pares de bases del marcador de peso molecular (Gene Ruler Low Range DNA ladder de 25 a 700 pb) Thermo Scientific™. Las bandas que corresponden a 184 pb pertenece a una región variable de la proteína del hexón específicamente de HAdV-36, indicando muestra positiva para presencia de DNA de HAdV-36, se observó amplificación para las muestras 1, 7, 9, 12, 13, 15 y 18. (C y D) las líneas 1 a 11 y 12 a 21 corresponden a muestras de pacientes; (+) control positivo de DNA genómico obtenido de células mononucleares de sangre periférica (PBMC); (-) control negativo; (pb) pares de bases del marcador de peso molecular (Gene Ruler Low Range DNA Ladder de 25 a 700 pb) Thermo Scientific™. Las bandas que corresponden a 116 pb pertenecen al gen de la proteína U1, indicando muestra positiva para gen celular. Se observó amplificación en todas las muestras.

De 21 pacientes analizadas 12 de ellas se clasificaron con sobrepeso (IMC entre 25.0-29.9 Kg/m²) y 9 se clasificaron como normopeso (IMC entre 18.5-24.9

Kg/m²), ver tabla 7. Se observó presencia de DNA de HAdV-36 en 41.6% de las 12 pacientes con sobrepeso y en 20% de las 9 pacientes con normopeso (Figura 6). La asociación entre variables mostró que los odds ratio (OR) calculados mediante la prueba exacta de Fisher determinaron que la presencia de DNA de HAdV-36 se comporta como factor de riesgo para padecer sobrepeso (IMC entre 25.0 y 29.9 kg/m²) OR= 2.5. Mientras que la presencia de DNA de HAdV-36 se comporta como factor protector para tener parámetros bioquímicos saludables en sangre como son CT, TG y glucosa (OR= 0.7, 0.6 y 0.4 respectivamente) ver tabla 8.

Frecuencia de pacientes con valores elevados en los parámetros clínicos (casos) y pacientes con valores normales de parámetros clínicos (controles) y su asociación con la presencia de DNA de HAdV-36.

Variable	Presencia/ausencia (DNA HAdV-36)	Casos n (%)	Controles n (%)	OR	I.C. (95%)	p valor
IMC (kg/m ²)	DNA HAdV-36 (-)	7 (33.33)	7 (33.33)	1 ^a	0.43336-15.24	0.6
	DNA HAdV-36 (+)	5 (23.8)	2 (9.5)	2.5		
Glucosa (mg/dL)	DNA HAdV-36 (-)	4 (19.04)	10 (47.61)	1 ^a	0.02969-4.274	0.6
	DNA HAdV-36 (+)	2 (4.7)	5 (28.5)	0.4		
TG (mg/dL)	DNA HAdV-36 (-)	3 (14.28)	11 (52.3)	1 ^a	0.04097-5.054	0.9
	DNA HAdV-36 (+)	1 (4.7)	6 (28.5)	0.6		
CT (mg/dL)	DNA HAdV-36 (-)	7 (33.33)	7 (33.33)	1 ^a	0.1470-4.262	0.9
	DNA HAdV-36 (+)	3 (14.28)	4 (19.04)	0.7		

Tabla 8. Frecuencias de las pacientes (n=21) y el OR para cada parámetro clínico y su asociación con la presencia de DNA de HAdV-36. Índice de masa corporal (IMC); casos: IMC ≥ 25 kg/m², controles: IMC ≤ 25 Kg/m². Glucosa en ayunas; casos: glucosa ≥ 120 mg/dL, controles: glucosa ≤

120 mg/dL. Triglicéridos (TG); casos: $TG \geq 150$ mg/dL, controles: $TG \leq 150$ mg/dL. Colesterol total (CT); casos: $CT \geq 200$ mg/dL, controles $CT \leq 200$ mg/dL. ^avalor de referencia; odds ratio (OR); intervalo de confianza (IC); miligramos por decilitro de sangre (mg/dL). Prueba estadística aplicada: exacta de Fisher.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pacientes positivas y negativas para DNA de HAdV-36 mediante la prueba estadística no paramétrica Kolmogorov-Smirnov. Lo cual indica que se tuvo un grupo de pacientes heterogéneo en cuanto a sus características clínicas como son: edad, IMC, CT, TG y glucosa en ayunas (Figura 7). Sin embargo, se observa que, dentro del grupo de pacientes positivas para HAdV-36 más de la mayoría de ellas tenía sobrepeso, a diferencia del grupo de pacientes negativas para DNA de HAdV-36, donde predominó un IMC de normopeso. En las pacientes positivas para DNA de HAdV-36 los niveles séricos de CT, TG y glucosa en ayunas, se observan con tendencia hacia valores dentro de lo normal según lo establecido por las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) (Figura 7); la NOM-015-SSA2-2010 (69) establece que los valores de glucosa en ayunas no deben exceder los 100 mg/dL; y la mayoría de pacientes positivas se encuentran en valores muy cercanos a 100 mg/dL; sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos $p > 0.05$ (Figura 7, tabla 9). En cuanto a TG y CT según la NOM-037-SSA2-2012 (70) los resultados muestran que hubo menos pacientes con TG y CT elevado en el grupo de HAdV-36 positivas con respecto al grupo HAdV-36 negativas; aunque tampoco hubo diferencias significativas entre grupos $p > 0.05$ (Figura 7, tabla 10). En la tabla 9, se aprecia que en el caso de CT las pacientes número 1 y 13 positivas

para DNA de HAdV-36 sobrepasan por poco el límite establecido por la NOM-037-SSA2-2012, (70) a excepción de la paciente número 15, la cual sobrepasa por más del doble el límite que marca la norma con un valor de 480 mg/dL en sangre para esta última paciente.

**Diferencias entre las características clínicas de las pacientes
DNA de HAdV-36 positivas y DNA de HAdV-36 negativas**

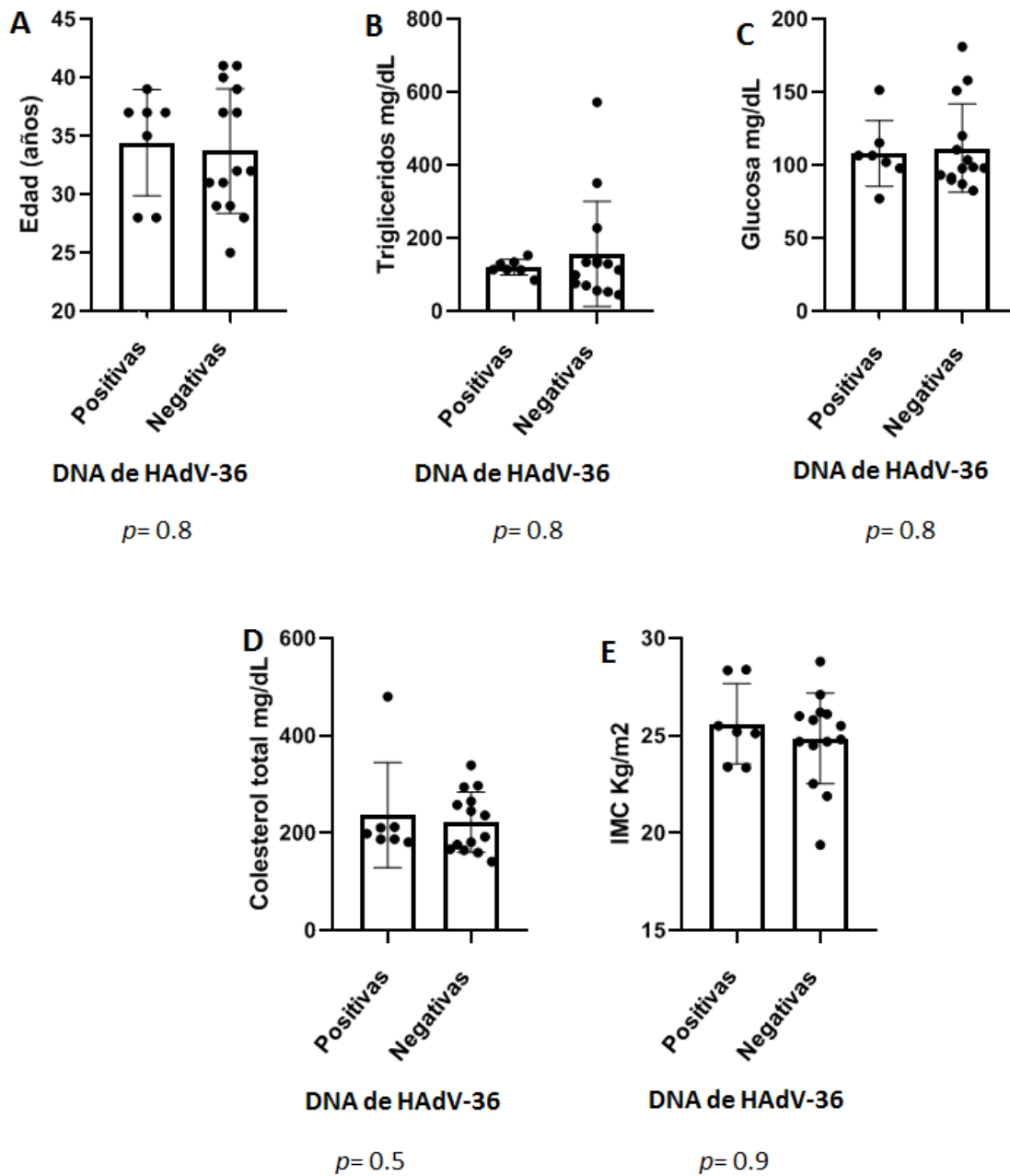


Figura 7. Características clínicas de las pacientes DNA de HAdV-36 positivas y DNA de HAdV-36 negativas. Diferencias de la distribución de frecuencias observadas entre los parámetros bioquímicos determinados en las pacientes y su asociación con la presencia de DNA de HAdV-36 mediante la prueba estadística no paramétrica Kolmogorov-Smirnov. A) diferencia de frecuencias

para la edad entre pacientes DNA de HAdV-36 positivas vs DNA de HAdV-36 negativas. B) diferencia de frecuencias para triglicéridos entre pacientes DNA de HAdV-36 positivas vs DNA de HAdV-36 negativas. C) diferencia de frecuencias para glucosa en ayunas entre pacientes DNA de HAdV-36 positivas vs DNA de HAdV-36 negativas. D) diferencia de frecuencias para el colesterol total entre pacientes DNA de HAdV-36 positivas vs DNA de HAdV-36 negativas. E) diferencia de frecuencias para el índice de masa corporal (IMC) entre pacientes DNA de HAdV-36 positivas vs DNA de HAdV-36 negativas.

Características clínicas y parámetros bioquímicos de las pacientes DNA de HAdV-36 positivas							
Número de muestra	1	7	9	12	13	15	18
Edad (años)	37	37	39	35	37	28	28
IMC (Kg/m ²)	25.2	28.33	28.4	25.5	25.1	23.3	23.4
Glucosa (mg/dL)	97.9	77.06	151.4	106.6	115.3	106.6	102.0
TG (mg/dL)	153	129.3	112.84	134.23	113.9	113.9	84.9
CT (mg/dL)	210.8	187.0	181.1	198.9	212.0	480.0	187.0

Tabla 9. Características clínicas y parámetros bioquímicos en las pacientes positivas para el DNA de HAdV-36.

En la tabla 10 se observan los promedios de la edad, el IMC y los parámetros bioquímicos tanto de las pacientes DNA de HAdV-36 positivas como aquellas que fueron DNA de HAdV-36 negativas. Se puede apreciar que la edad muestra un promedio similar entre ambos grupos. El promedio del IMC de las pacientes positivas es más alto que el de las pacientes negativas encontrándose que las pacientes positivas pertenecen a la categoría de sobrepeso (IMC entre 25.0 y 29.9

kg/m²), mientras que aquellas que fueron DNA de HAdV-36 negativas en promedio pertenecen a la categoría de normopeso (IMC entre 18.5-24.9Kg/m²). Respecto a los parámetros bioquímicos TG y glucosa las pacientes positivas muestran promedios menores dentro de los límites establecidos por las normas mexicanas; contrario a los promedios de las pacientes negativas cuyos valores sobrepasan lo determinado por dichas normas, a pesar de no ser estadísticamente significativo ($p > 0.05$). En cuanto a CT el grupo positivo mostró una tendencia a ser más elevado (sin diferencia estadísticamente significativa). Sin embargo, recordemos que uno de los valores de las pacientes positivas (n_o. 15) se encuentra muy por encima de lo establecido por la NOM-037-SSA2-2012 (70). En ambos grupos se aprecia que los niveles de CT se encuentran por encima de los límites para este parámetro.

Comparación entre las características clínicas y los parámetros bioquímicos de las pacientes DNA de HAdV-36 positivas y DNA de HAdV-36 negativas

Parámetro	DNA de HAdV-36 (+) Promedio ± DE	DNA de HAdV-36 (-) Promedio ± DE	p valor
Edad (años)	34.4 ± 4.5	33.7 ± 5.3	0.8
IMC (Kg/m ²)	25.6 ± 2.0	24.8 ± 2.3	0.9
Glucosa (mg/dL)	108.1 ± 22.4	111.6 ± 30.2	0.8
TG (mg/dL)	120.2 ± 21.3	157.0 ± 144.0	0.8
CT (mg/dL)	236.7 ± 107.9	222.5 ± 61.8	0.5

Tabla 10. Comparación entre las características clínicas y los parámetros bioquímicos de las pacientes DNA de HAdV-36 positivas y DNA de HAdV-36 negativas. Promedio y DE. La

comparación de diferencias de rangos entre grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica Kolmogorov-Smirnov.

6.3 Citocinas IL-6, TNF e INF gamma

6.3.1 Amplificación de β -actina.

A partir de las extracciones de RNA total del tejido graso subcutáneo de las 21 muestras de liposucción, se realizó la síntesis del cDNA para cada una de ellas. La presencia del cDNA se comprobó realizando un PCR punto final empleando oligonucleótidos para β -actina. Posteriormente, el bandeo de los amplicones se observó en un gel de agarosa al 2% (Figura 8).

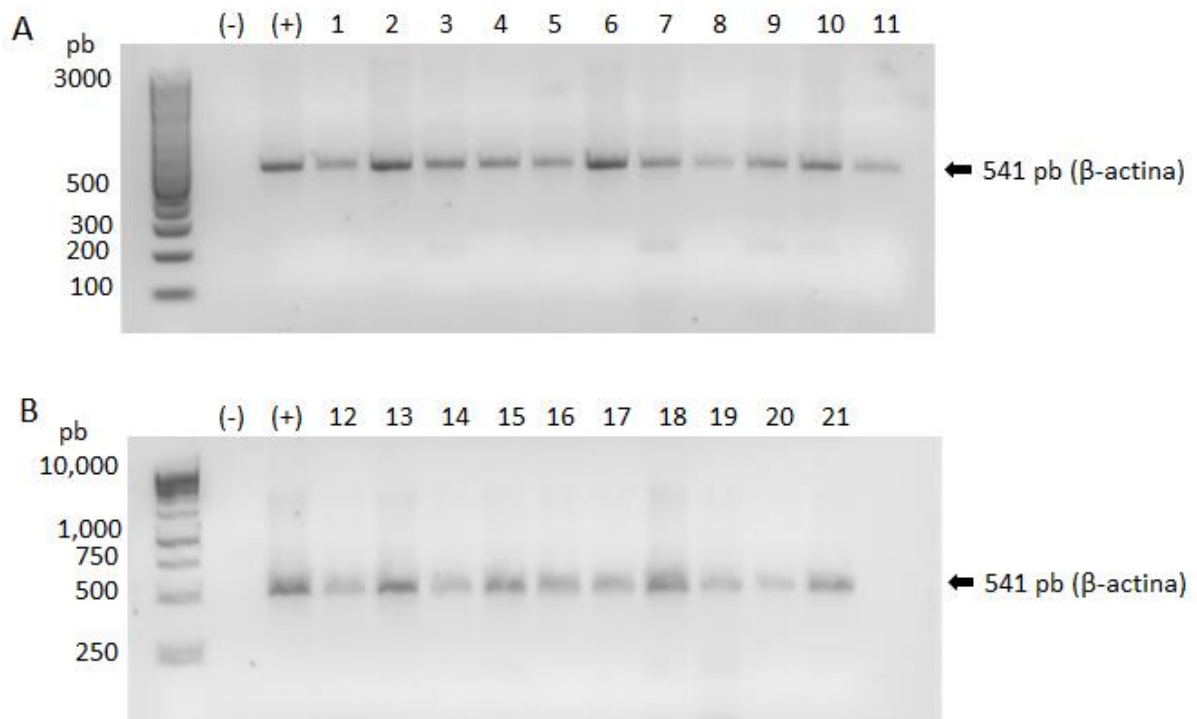


Figura 8. Amplificación del gen β -actina humana a partir de muestras de RNA total de tejido adiposo. (A) (pb) pares de bases del marcador de peso molecular (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder de 100 a 3,000 pb) Thermo Scientific™, (+) control positivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), estimuladas con LPS; carriles 1 a 11 muestras de cDNA mostrando productos de PCR para β -actina, con una banda amplificada para cDNA de 541 pb. (B) (pb) pares de bases del marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb DNA ladder de 250 a 10,000 pb) Thermo Scientific™, (+) control positivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), estimuladas con LPS; carriles 12 a 21 muestras de cDNA mostrando productos de PCR para β -actina, con una banda amplificada para cDNA de 541 pb.

6.3.2 Amplificación de citocinas IL-6, TNF e INF gamma.

A partir de los cDNA sintetizados con las muestras de RNA obtenidas del tejido adiposo subcutáneo de las 21 pacientes se realizó la amplificación de los genes para citocinas proinflamatorias IL-6, TNF e INF gamma, mediante PCR punto final con oligos específicos en cada caso.

Únicamente se observó amplificación en todas las muestras para la citocina IL-6 con la aparente presencia de una variante al gen (Figura 9), la amplificación de esta citocina en cierta medida es de esperarse puesto que se trata de una citocina que se expresa tanto en la fase aguda como en la fase crónica de los padecimientos además se ha descrito que las variantes participan en el desarrollo o agravamiento de algunas enfermedades. No hubo amplificación de los genes de las citocinas TNF e INF gamma, ver (Figura 10).

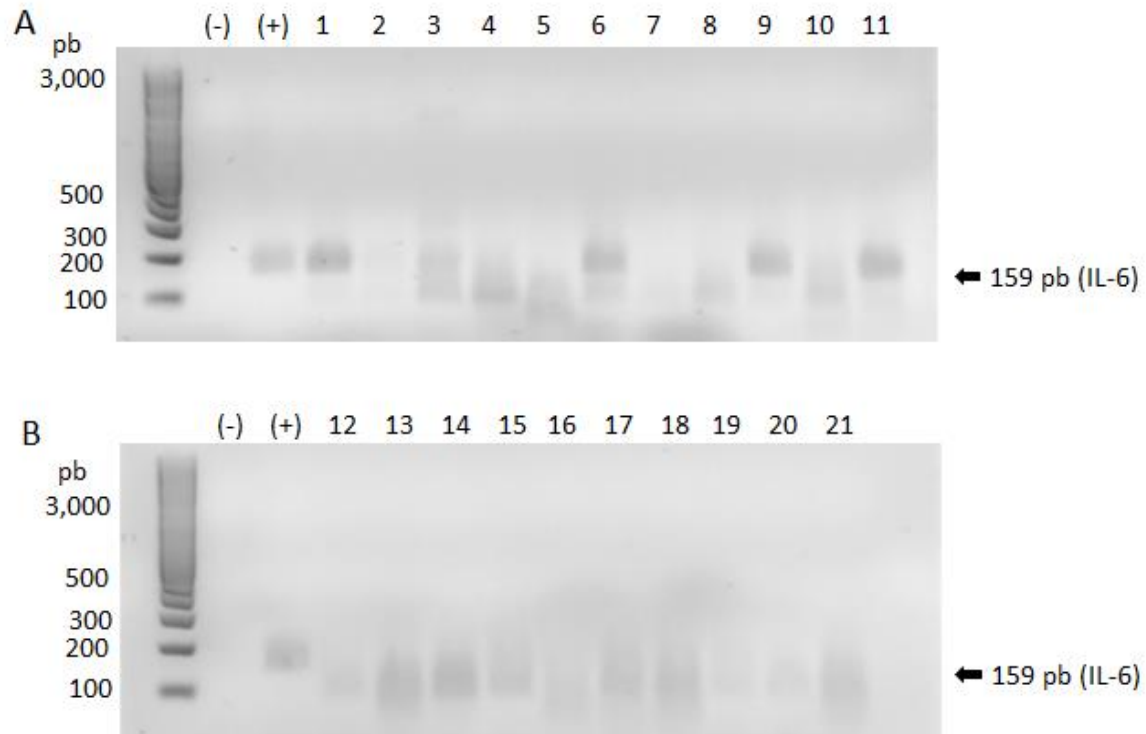


Figura 9. Amplificación del gen IL-6 humana en muestras de RNA total de tejido adiposo. (A) (pb) pares de bases del marcador de peso molecular (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder de 100 a 3,000 pb) Thermo Scientific™, (+) control positivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), estimuladas con LPS; carriles 1 a 11 muestras de cDNA mostrando productos de PCR para IL-6, con una banda amplificada para cDNA de 159 pb. (B) (pb) pares de bases del marcador de peso molecular (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder de 100 a 3,000 pb) Thermo Scientific™, (+) control positivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), estimuladas con LPS; carriles 12 a 21 muestras de cDNA mostrando productos de PCR para IL-6, con una banda amplificada para cDNA de 159 pb.

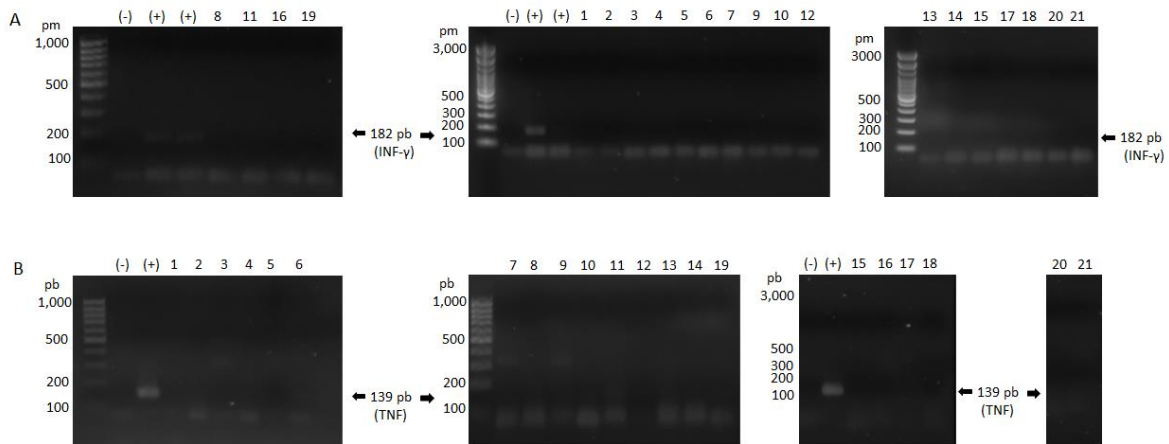


Figura 10. Amplificación de los genes TNF e INF gamma humanos en muestras de RNA total de tejido adiposo. (A) (pb) pares de bases del marcador de peso molecular (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder de 100 a 1,000 pb) Thermo Scientific™ y (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder de 100 a 3,000 pb) Thermo Scientific™, (+) control positivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), estimuladas con LPS, con una banda amplificada para cDNA de 182 pb.; carriles con números 1 a 21 muestras de cDNA sin productos de PCR para INF gamma. (B) (pb) pares de bases del marcador de peso molecular (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder de 100 a 1,000 pb) Thermo Scientific™ y (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder de 100 a 3,000 pb) Thermo Scientific™), (+) control positivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), estimuladas con LPS, con una banda amplificada para cDNA de 139 pb; carriles con números 1 a 21 muestras de cDNA sin productos de PCR para TNF.

6.4 Expresión de citocinas IL-6, TNF e INF gamma.

Anteriormente el tejido adiposo era considerado solo como un reservorio energético del exceso de calorías en forma de TG que en momentos de escasez podía movilizar esa energía en forma de ácidos grasos libres para cubrir las necesidades del organismo. Así mismo se pensaba que dichos ácidos grasos eran

los únicos causantes de la resistencia a la insulina o DM tipo II. Sin embargo, hoy se sabe que el tejido adiposo es capaz de expresar diferentes citocinas en respuesta a diversos estímulos como son algunos PAMPs incluyendo entre otros el LPS, y que también la propia expansión del tejido puede desencadenar la expresión de citocinas tanto por el adipocito como por células inmunes especialmente macrófagos residentes del tejido adiposo. Es sabido que en el estado de obesidad la expresión de citocinas se ve aumentada, y en presencia de patógenos esta condición podría verse agravada. La expresión de citocinas proinflamatorias dentro del tejido adiposo humano no ha sido medida como tal y no se cuenta con valores de referencia que indiquen que cantidad de citocinas es la adecuada para cada IMC por ejemplo. En este estudio, se pretendía medir la expresión de los mRNA de las citocinas proinflamatorias en el tejido adiposo de las 21 muestras de pacientes, mediante PCR tiempo real (qPCR), lo cual fue descartado debido a que no se observó amplificación en dos de las citocinas probadas (TNF e INF gamma) y solo hubo amplificación para el gen del IL-6 ver figura 11.

Expresión de citocinas en el tejido adiposo de las pacientes n=21

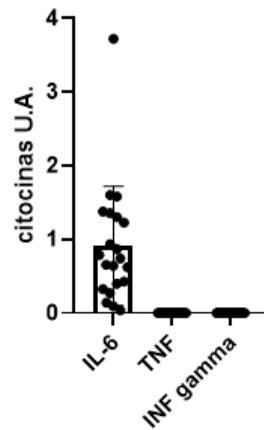


Figura 11. Expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF e INF gamma por parte del tejido adiposo de las pacientes (n= 21). Prueba utilizada: promedio y desviación estándar.

En la figura 12 se observan las diferencias en la expresión de la citocina IL-6 entre grupos, aquellas DNA de HAdV-36 positivas comparadas con las DNA de HAdV-36 negativas; donde el grupo de positivas muestra una ligera tendencia a producir mayor cantidad de IL-6 que el grupo de las negativas. Aunque no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre grupos ($p > 0.05$).

**Expresión de IL-6 en el tejido adiposo de pacientes
DNA de HAdV-36 positivas y DNA de HAdV-36 negativas**

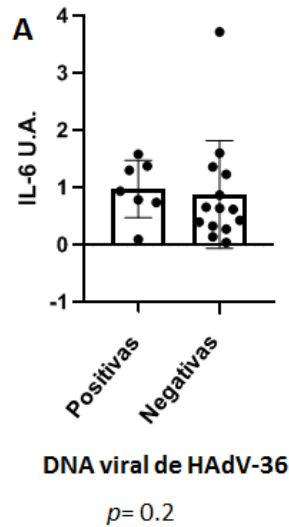


Figura 12. Comparación de la expresión de IL-6 en las pacientes DNA de HAdV-36 positivas contra DNA de HAdV-36 negativas, mediante la prueba estadística t de Student no pareada.

En la tabla 11 se observan los resultados para las correlaciones encontradas entre la citocina IL-6 y las diferentes variables predictoras del grupo de estudio DNA de HAdV-36 tanto positivo como negativo. En el grupo DNA de HAdV-36 positivo el coeficiente de correlación *rho* de Spearman muestra una correlación negativa pero débil y sin significancia estadística ($p > 0.05$) entre IL-6 con la edad y el IMC, lo que significa que a mayor edad y a mayor IMC se espera menor expresión de la citocina proinflamatoria IL-6 en presencia del DNA de HAdV-36. Mientras que en la población que no presente el DNA de HAdV-36 se espera lo que en teoría ya se conoce que es que a mayor edad y a mayor IMC la expresión de IL-6 aumente en las personas. La correlación entre IL-6 y los parámetros bioquímicos de glucosa, TG y CT mostraron que en el grupo DNA de HAdV-36 positivo se encontró una

correlación positiva, lo que significa que, a mayor concentración de glucosa, TG y CT habría una mayor expresión de IL-6 en los individuos de este estudio siendo el parámetro con mayor importancia el de CT, el cual presentó una correlación positiva alta con significancia estadística ($p < 0.05$). Resultados similares se encontraron en el grupo DNA de HAdV-36 negativo excepto para los TG donde se dio una correlación negativa baja. En ningún caso se encontró significancia estadística. Es importante mencionar que al tener un grupo de estudio pequeño ($n = 21$) es difícil saber si el análisis estadístico es concluyente debido a que se necesitaría un número mayor de pacientes para poder tener la certeza de que estos resultados tendrían un comportamiento homogéneo en la población.

Interpretación del coeficiente de correlación de Spearman para pacientes DNA de HAdV-36 positivas				Interpretación del coeficiente de correlación de Spearman para pacientes DNA de HAdV-36 negativas			
	Valor de ρ	Significado	p valor		Valor de ρ	Significado	p valor
IL-6 (U.A.) vs edad (años)	-0.15	Correlación negativa muy baja	0.7	IL-6 (U.A.) vs edad (años)	0.51	Correlación positiva moderada	0.06
IL-6 (U.A.) vs IMC (Kg/m ²)	-0.57	Correlación negativa moderada	0.2	IL-6 (U.A.) vs IMC (Kg/m ²)	0.27	Correlación positiva baja	0.3
IL-6 (U.A.) vs glucosa (mg/dL)	0.09	Correlación positiva muy baja	0.8	IL-6 (U.A.) vs glucosa (mg/dL)	0.13	Correlación positiva muy baja	0.6
IL-6 (U.A.) vs TG (mg/dL)	0.41	Correlación positiva moderada	0.3	IL-6 (U.A.) vs TG (mg/dL)	-0.20	Correlación negativa baja	0.4
IL-6 (U.A.) vs CT (mg/dL)	0.82	Correlación positiva alta	0.03	IL-6 (U.A.) vs CT (mg/dL)	0.27	Correlación positiva baja	0.3

Tabla 11. Correlación entre IL-6 y las variables predictoras del grupo DNA de HAdV-36 positivo (izquierda) y el grupo DNA de HAdV-36 negativo (derecha), mediante la prueba estadística no paramétrica del coeficiente de correlación ρ de Spearman. Interleucina 6 (IL-6), índice de masa

corporal (IMC) en kilogramos por metro cuadrado (Kg/m²), glucosa en ayunas, triglicéridos (TG) y colesterol total (CT) en miligramos por decilitro de sangre (mg/dL).

7. DISCUSIÓN.

Durante el desarrollo del presente proyecto, se trabajó con muestras de pacientes femeninas mayores de edad con diferentes IMC y con consentimiento informado firmado sometidas a liposucción y lipectomía por elección en la clínica RENOVANCE de la ciudad de Cuernavaca, Morelos. Dichas muestras fueron obtenidas en condiciones de esterilidad por parte del personal médico de la clínica. Cabe mencionar que todas las muestras son obtenidas de los desechos de las cirugías y no se requiere de ningún procedimiento extra. Por lo cual, a partir de estas muestras fue posible realizar el análisis tanto de la presencia de DNA de HAdV-36 como la presencia de mRNA para citocinas proinflamatorias IL-6, TNF e INF gamma.

En los últimos años, se han realizado diversos estudios en donde se observa una alta prevalencia de anticuerpos neutralizantes para HAdV-36 detectados por ensayos de neutralización o inmunoensayos en pacientes con obesidad con sobrepeso y normopeso. El primer reporte de búsqueda de anticuerpos neutralizantes contra HAdV-36 en humanos ocurrió en Estados Unidos mostrando una prevalencia significativamente mayor de anticuerpos contra HAdV-36 en personas obesas con un 30% sobre un 11% en personas no obesas de un total de

502 participantes; lo que ha llevado a asociar la presencia de anticuerpos contra HAdV-36 con la obesidad y el aumento del IMC de los individuos seropositivos respecto de sus controles magros (11,29,31,32).

Sin embargo, la detección del DNA de HAdV-36 directamente en el tejido adiposo de humanos es considerada una pieza clave para determinar la evidencia de la asociación de la infección por HAdV-36 con el aumento de peso en humanos (37). El primer reporte de detección de DNA de HAdV-36 fue en 2010 en una muestra de tejido adiposo subcutáneo de un paciente con un IMC= 34 Kg/m² con depósitos masivos de grasa en tórax y abdomen, y con parámetros bioquímicos normales (71).

En nuestro estudio reportamos los resultados sobre la detección de DNA de HAdV-36 en tejido adiposo humano de pacientes mexicanas de lo cual existe muy poca información ya que las bajas concentraciones víricas limitan su hallazgo además de que el acceso a las muestras de tejido graso humano suele ser complicado.

Durante el desarrollo del presente estudio se logró coleccionar un total de 26 muestras de tejido graso, sin embargo, trabajamos solo con 21 de ellas, de las cuales se contaban con los datos antropométricos completos, encontrando la presencia de DNA de HAdV-36 en 33% de un total de 21 muestras, algo sorprendente, puesto que en nuestro estudio no se reclutaron muestras de pacientes con obesidad (IMC ≥ 30.0 Kg/m²). Dentro de las muestras solo contamos con tejido adiposo de pacientes con normopeso y con sobrepeso. Sin embargo, se encontró DNA de HAdV-36 en ambos grupos donde 5 muestras fueron positivas

para sobrepeso (IMC 25-28 Kg/m²) y 2 para normopeso (IMC 22 y 23 Kg/m²); tal como lo reportado por Ponteiro, *et al.*, 2015 (37) donde se determinó presencia de DNA de HAdV-36 en 19% de un total de 21 muestras de tejido adiposo visceral de las cuales dos correspondían a obesidad (IMC 44 y 41 Kg/m²) y dos a sobrepeso (IMC 26 y 28 Kg/m²). El hallazgo de la presencia de DNA de HAdV-36 en nuestras muestras, mostró una tendencia de positividad en las pacientes con sobrepeso, lo cual resulta como lo esperado, aunque no se pudo establecer una asociación entre la presencia de DNA de HAdV-36 y el IMC de cada paciente debido a la limitada cantidad de muestras. En un estudio reciente realizado en México por Barrera-Alcocer, *et al.*, 2021 (72) la detección del DNA de HAdV-36 fue positiva para 31% de 52 muestras (7 normopeso, 4 sobrepeso y 5 de obesidad) en el tejido adiposo. Barrera-Alcocer y colaboradores no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de características clínicas y metabólicas de los pacientes. De igual manera que en nuestro estudio donde la diferencia de medias no fue estadísticamente significativa para los parámetros clínicos y metabólicos medidos entre las pacientes positivas para DNA de HAdV-36 vs las pacientes negativas. Lo anterior, también ha sido reportado en diversos estudios epidemiológicos donde no ha habido diferencias significativas en relación con el CT ($p= 0.83$), TG ($p= 0.64$), HDL ($p= 0.69$), glucosa en sangre ($p= 0.08$), circunferencias de la cintura ($p= 0.09$) y presión arterial sistólica ($p= 0.25$) y la seropositividad para HAdV-36 (31). Solamente en Estados Unidos la seropositividad de HAdV-36 ha sido asociada con niveles de lípidos (CT y TG) paradójicamente saludables en personas obesas (IMC de ≥ 30 kg/m²), frente a sus contrapartes seronegativas $p= 0.003$ en el estudio de Atkinson, *et al.*, 2005 (29).

Si bien se pudo detectar el DNA de HAdV-36 en muestras de pacientes mexicanas, cabe mencionar que esto no ha ocurrido en otros estudios que de igual manera han analizado muestras de tejido adiposo, tal es el caso de lo reportado por Goossens, *et al.*, 2011 (36) y Ergin, *et al.*, 2015 (38), donde ninguno reportó presencia de DNA de HAdV-36 en ninguna de las muestras obtenidas de tejido adiposo humano. Gossens, trabajó con 31 muestras de biopsia quirúrgica de pacientes con obesidad mórbida, mientras que Ergin, analizó 49 adultos con un IMC > 30 kg/m² en muestras de liposucción (72). Lo anterior podría deberse a la baja prevalencia de HAdV-36 en otros países, debido a los diferentes estilos de vida e higiene. En nuestro caso, encontramos un 33% de positividad en pacientes tanto con sobrepeso como normopeso, lo que nos sugiere que HAdV-36 tiene una mayor prevalencia en la población mexicana, sin embargo, desconocemos cual será la prevalencia en grupos con obesidad y con obesidad mórbida, por lo que se requieren estudios con una muestra mayor de pacientes, que permita establecer los grupos de riesgo para HAdV-36.

Otra condición que puede influir en la determinación de DNA de HAdV-36 entre las distintas poblaciones estudiadas podría ser el tipo de oligos empleados en cada análisis ya que la especificidad de cada oligo determinará la porción de material genético que sea reconocido, la cantidad de tejido analizada, la zona de donde fue retirada esa porción de tejido, pues posiblemente exista una diferenciación anatómica en donde se encuentra mayor cantidad de DNA (72).

Como lo habíamos mencionado antes, la obesidad es un problema que crece rápidamente a nivel mundial trayendo consigo un sin número de consecuencias a la salud de las personas que la padecen. Se sabe que la obesidad es debida a un aumento de la masa del tejido adiposo y que ello está íntimamente ligado a un estado de inflamación de bajo grado, situación que compromete a los tejidos ya que conduce a un aumento en la producción de mediadores proinflamatorios estimulados por señales tanto externas como internas dentro de un ambiente celular, es decir, el sistema inmune se encuentra activado por las diferentes señales de peligro de las células de manera constante, por lo que no es capaz de responder ante los retos antigénicos patogénicos de una manera adecuada, lo que genera complicaciones que pueden llegar a ser graves e incluso fatales. El tejido adiposo está compuesto por una variedad de células que van desde fibroblastos, preadipocitos, adipocitos maduros y diversas células inmunes especialmente macrófagos. Es conocido, que estos últimos tienen una contribución muy importante en el proceso inflamatorio y en la producción de citocinas proinflamatorias con las cuales logran mantener una estrecha relación altamente coordinada con las células adiposas para el mantenimiento del estado de obesidad. El tejido adiposo inflamado que ha sido invadido por macrófagos produce IL-6 y TNF contribuyendo así a procesos como la resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares, además de que el aumento de la masa grasa puede provocar hipoxia estimulando la invasión por células T y macrófagos y aunque no se conoce con certeza el desencadenante de la inflamación no es posible descartar que esto sea debido a una infección (73). Dilucidar el vínculo entre la obesidad y la inflamación es de gran importancia dentro del campo de la

biología para lograr un mejor entendimiento de la etiología y el tratamiento de la enfermedad.

En la actualidad se sabe que, existen algunos tipos de virus capaces de inducir adipogénesis, aunque la obesidad crónica inducida por virus aún no está del todo clara, lo que se sabe es que la inflamación induce un estado de obesidad y que la infección por virus como HAdV-36 aumenta la expresión de marcadores inflamatorios como IL-6, lo cual ha sido demostrado *in vitro* en adipocitos contribuyendo a un estado de inflamación crónico de bajo grado (54). Lo cual coincide con lo encontrado en nuestro estudio donde se observó que a pesar de no ser significativo la expresión de IL-6 aumento en el grupo de pacientes DNA de HAdV-36 positivas en comparación con el grupo de pacientes DNA de HAdV-36 negativas; y que aun cuando la correlación de IL-6 con el IMC y la edad de las pacientes fue negativa, no tuvo significancia estadística, y lo que esto sugiere es que, a mayor edad e IMC puede ser probable que la presencia vírica se vea disminuida o resuelta por el propio organismo. Además, es importante mencionar que el aumento de citocinas en la obesidad no siempre es consistente puesto que en ocasiones se ha observado que los adipocitos humanos cultivados *in vitro* e infectados con HAdV-36 pueden producir cantidades similares de IL-6 y TNF que los adipocitos en medio de cultivo no infectados. Sin embargo, en estos casos la producción de IL-6 puede verse aumentada en cocultivos con adipocitos humanos no infectados y macrófagos presentes en el medio debido a la interacción célula-célula, dependiendo del número de células inmunes presentes (73). En nuestro estudio se desconoce si dentro del tejido adiposo de las pacientes exista

presencia de células inmunes, siendo lo más probable, puesto que se trata de aspirados y no de biopsias. Sin embargo, dado que no se detectó amplificación de TNF e INF gamma suponemos que no debe haber una activación fuerte de los linfocitos dentro de este tejido y posiblemente la diferencia que se observa en la expresión de IL-6 pueda ser debida a la presencia del DNA de HAdV-36 o a la expresión de IL-6 por parte de macrófagos, células que pueden estar presentes en este tejido, o bien por parte de los mismos adipocitos como consecuencia del procedimiento quirúrgico.

En el estudio realizado por Na, *et al.*, 2012, empleando ratones WT y KO (MCP-1 -/-) infectados con HAdV-36, se encontró que en las almohadillas de grasa de los WT 1 día después de la infección con HAdV-36, estos tenían niveles de mRNA de citocinas MCP-1 y TNF 3 y 2 veces más altos respectivamente, en comparación con los controles con una infección simulada. Y a los 90 días de infección con HAdV-36 los ratones WT mostraron niveles de MCP-1 2 veces más y 6 veces más de TNF que en los ratones con infección simulada. Mientras que, los ratones KO siempre mostraron niveles de mRNA de MCP-1 y TNF menores en comparación con sus contrapartes infectadas de manera simulada. Además, se mencionó que los ratones del grupo WT infectado tuvieron valores bioquímicos más bajos a diferencia de los KO quienes presentaron los niveles bioquímicos más altos de todos los grupos. Asumiendo así que MCP-1 regula el metabolismo de lípidos a través de la inflamación (54). En nuestro estudio los promedios de los niveles de los parámetros bioquímicos en el grupo DNA de HAdV-36 positivo fueron menores y mostraron mayor expresión de la citocina IL-6, lo que concuerda con el trabajo *in*

vivo realizado por Na, donde pareciera que la inflamación correlaciona de manera positiva con los niveles de los parámetros bioquímicos, y que, a mayores niveles de glucosa, TG y CT se requiere de mayor expresión de citocinas proinflamatorias para mantener un estado saludable, tal como se observó en el presente trabajo aunque sin significancia estadística. Ya que como se pudo observar en el grupo DNA de HAdV-36 negativo los niveles de expresión de IL-6 fueron menores y los promedios de los niveles de bioquímicos se encontraron elevados.

En humanos, los estudios que han analizado la seropositividad de HAdV-36 y su relación con las algunas citocinas proinflamatorias en suero han revelado que los resultados no han sido concluyentes ya que en algunas ocasiones las citocinas se encuentran elevadas en los grupos seropositivos especialmente aquellos con un IMC elevado ($IMC > 25 \text{ Kg/m}^2$). Sin embargo, también puede ocurrir que se reporte lo contrario, por lo que no se ha llegado a un consenso.

En el estudio de Karamese, *et al.*, 2015 en Turquía con adultos e infantes obesos, observaron que no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IL-6 y TNF entre el grupo que fue seropositivo para HAdV-36 comparado con el grupo seronegativo para HAdV-36 ya fuese en niños o adultos. Sin embargo, se puede mencionar que todos los grupos (adultos e infantes obesos) presentaron niveles elevados de estas citocinas con respecto a su valor considerado como normal en suero. En este estudio tampoco se encontraron diferencias significativas entre CT, TG y LDL entre los grupos de obesos y no obesos HAdV-36 positivos o negativos; además en ambos grupos los niveles lipídicos eran normales ($< 200 \text{ mg/dL}$) (74). En los resultados de nuestro estudio tampoco se encontraron

diferencias estadísticamente significativas tanto en la expresión de citocinas como en los niveles de bioquímicos. Sin embargo, si se observó una tendencia a que la expresión de citocinas fuera mayor en el grupo DNA de HAdV-36 positivo en comparación con el grupo DNA de HAdV-36 negativo y también se observó que los niveles de bioquímicos en promedio fueron menores para las pacientes DNA de HAdV-36 positivas que para las pacientes DNA de HAdV-36 negativas. Además, los resultados de ambos estudios no pueden ser del todo comparables ya que se debe tener en cuenta que las citocinas pueden estar presentes en suero por diversas razones como son infecciones estacionales, algunas alergias, u otras variables confusoras que no son tomadas en cuenta y las citocinas presentes en tejido adiposo están denotando aspectos particulares de este tejido.

En el trabajo realizado por Karamese, solo se encontraron diferencias en los niveles de leptina en suero los cuales fueron menores en niños y adultos obesos seropositivos para HAdV-36 (74). Este último resultado concuerda con lo encontrado por Sapunar, *et al.*, 2019, en una población chilena, donde los niveles de leptina fueron más bajos en los obesos HAdV-36 seropositivos encontrando una asociación entre los niveles de leptina y la presencia de anticuerpos anti HAdV-36 ($p= 0.014$), esta asociación no se encontró en los sujetos delgados HAdV-36 positivos; aunque el grupo de obesos en general presentó niveles de leptina por encima de los valores normales en sangre. Los seropositivos delgados se relacionaron con niveles de CT, TG y VLDL más bajos comparados con sus contrapartes obesos seropositivos (75), no así en nuestro estudio donde las pacientes DNA de HAdV-36 negativas mostraron un IMC predominante de

normopeso ($IMC < 25 \text{ Kg/m}^2$) pero con promedios de niveles elevados de parámetros bioquímicos.

Los estudios de Karamese y Sapunar, no concuerdan con lo reportado por Ergin, *et al.*, 2015 donde en una población turca los niveles de leptina se encontraron aumentados en suero, en las personas obesas que fueron seropositivas para HAdV-36 con niveles de adiponectina más bajos que sus contrapartes seronegativas normopeso ($p < 0.05$), aunque los niveles de estas adipocinas se encontraban dentro del rango normal en sangre en ambos grupos (38); este resultado es una evidencia más de que las citocinas y adipocinas tienden a elevarse en las personas seropositivas para HAdV-36.

El trabajo de Kocazeybek, *et al.*, 2017 también de Turquía, pero analizando únicamente infantes de 7 a 17 años de edad, reveló que en aquellos pacientes seropositivos obesos los niveles de leptina e IL-6 se encontraban elevados mostrando niveles bajos de adiponectina. Sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos para parámetros bioquímicos como son CT, LDL, y TG, ($p = 0.05$) al igual que lo encontrado en nuestro estudio y lo reportado por Karamese. El análisis multivariado realizado por Kocazeybek, determinó a HAdV-36 como un factor de riesgo para el desarrollo de la obesidad ($p = 0.02$, $OR = 8.855$) (76). Coincidente con lo encontrado en nuestro estudio donde las pacientes DNA de HAdV-36 positivas mostraron niveles de IL-6 superiores a los de las pacientes DNA de HAdV-36 negativas, aunque sin significancia estadística ($p > 0.05$) y pese a que fue medida en diferente tejido, de igual forma que en el trabajo de Kocazeybek la presencia del DNA de HAdV-36 en el tejido adiposo en nuestros

resultados también se comporta como un factor de riesgo para padecer sobrepeso (OR= 2.5) aunque no fue estadísticamente significativo ($p= 0.6$).

8. CONCLUSIÓN.

Se encontraron 7 pacientes positivas para el DNA del virus HAdV-36 dentro de tejido adiposo representando un 33% de un total de 21 pacientes femeninas. La presencia de DNA de HAdV-36 es un factor de riesgo para padecer sobrepeso (OR> 1) y un factor protector para tener parámetros bioquímicos normales (OR< 1). La presencia del DNA de HAdV-36 se encontró más representada en las pacientes con sobrepeso que en las pacientes normopeso.

No se observaron diferencias significativas para los niveles de glucosa en ayunas, CT y TG entre los grupos de pacientes DNA de HAdV-36 positivas y negativas. Y tampoco se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de DNA de HAdV-36 con parámetros bioquímicos anormales o IMC ($p> 0.05$).

La expresión de la citocina IL-6 mostró una tendencia a ser mayor en las pacientes DNA de HAdV-36 positivas que en aquellas DNA de HAdV-36 negativas, aunque sin significancia estadística ($p> 0.05$). La correlación para las pacientes DNA de HAdV-36 positivas entre IL-6 y el IMC y la edad de las pacientes fue negativa, aunque débil y sin significancia estadística ($p> 0.05$), mientras que la correlación

entre IL-6 y los parámetros bioquímicos glucosa, TG y CT fue positiva con significancia estadística para IL-6 vs CT ($p= 0.03$).

9. PERSPECTIVAS.

Determinar la presencia de DNA de HAdV-36, en diferentes grupos de células y tejidos; en grasas de origen visceral, en grupos de personas con diferentes grados de obesidad y diferentes edades. Comprobar la presencia de diferentes citocinas o quimiocinas no estudiadas en el presente proyecto. Determinar la presencia de anticuerpos anti HAdV-36 en suero al igual que los niveles séricos de adipocinas o citocinas. Realizar cortes histológicos de tejidos para analizar diferencias entre receptores para insulina, PPAR γ , citocinas entre otros. Y notar diferencias estructurales en los tejidos con presencia de DNA de HAdV-36 vs sin DNA de HAdV-36.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. WHO. WHO | Overweight and obesity. WHO. 2018. [consulta: 30 ago 2019].
2. Bray GA, Bellanger T. Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine*. 2006;29(1):109–17.
3. Petrova D, Salamanca-Fernández E, Rodríguez Barranco M, Navarro Pérez P, Jiménez Moleón JJ, Sánchez MJ. Obesity as a risk factor in COVID-19: Possible mechanisms and implications. *Aten Primaria*. 2020;52(7):496–500.
4. McAllister EJ, Dhurandhar N V., Keith SW, Aronne LJ, Barger J, Baskin M, et al. Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009;49(10):868–913.
5. Lazcano-Ponce E. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19 en México, indicador de inequidad en salud y de incremento progresivo de exposiciones no saludables. *Salud Pública de México*. *Salud Pública de México*; 2020;62(6, Nov-Dic):611–3.
6. Almanza-Pérez JC, Blancas-Flores G, García-Macedo R, Alarcón-Aguilar FJ, Cruz M. Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 TT - Leptin and its association with obesity and type 2 diabetes. *Gac Med Mex*. 2008;144(6):535–42.
7. Dhurandhar NV, Kulkarni PR, Ajinkya SM, Sherikar AA, Atkinson RL. Association of adenovirus infection with human obesity. *Obes Res*.

1997;5(5):464–9.

8. Vasilakopoulou A, Le Roux CW. Could a virus contribute to weight gain? *Int J Obes (Lond)*. 2007;31(9):1350–6.
9. Pasarica M, Dhurandhar N V. Infectobesity: Obesity of Infectious Origin. *Adv Food Nutr Res*. 2007;52:61–102.
10. Wigand R, Gelderblom H, Wadell G. New human adenovirus (candidate adenovirus 36), a novel member of subgroup D. *Arch Virol*. 1980;64(3):225–33.
11. Shang Q, Wang H, Song Y, Wei L, Lavebratt C, Zhang F, et al. Serological data analyses show that adenovirus 36 infection is associated with obesity: A meta-analysis involving 5739 subjects: Ad36 Associated with Obesity by Meta-Analysis. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22(3):895–900.
12. Voss JD, Dhurandhar NV. Viral Infections and Obesity. *Curr Obes Rep*. 2017;6(1):28–37.
13. Bernaola G, Luque W. Fisiopatología de las Infecciones por Adenovirus. *Pediatrica*. 2002;4(2):41-47.
14. Mennechet FJD, Paris O, Ouoba AR, Salazar Arenas S, Sirima SB, Takoudjou Dzomo GR, et al. A review of 65 years of human adenovirus seroprevalence. *Expert Rev Vaccines*. 2019;18(6):597–613.
15. Water Recreation and disease – Plausibility of Associated Infections: Acute effects, sequelae and mortality. *Int J Health Care Qual Assur*. 2006;19(2).

16. Binder AM, Biggs HM, Haynes AK, Chommanard C, Lu X, Erdman DD, et al. Human Adenovirus surveillance — United States, 2003-2016. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2017;66(39):1039–42.
17. Knipe DM, Howley P. *Fields virology*. Sixth edition. *Fields Virology: 6th ed.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2013.
18. Ponterio E, Gnessi L. Adenovirus 36 and obesity: An overview. *Viruses.* 2015;7(7):3719–40.
19. Avendaño C LF. INFECCION RESPIRATORIA POR ADENOVIRUS EN PEDIATRIA: DE AYER A HOY. *Neumol Pediatr.* 2019;14(1):12–8.
20. Mejía López H, López-Martínez I. Adenovirus aislados de pacientes mexicanos con infección respiratoria aguda. *Rev Biomédica.* 2007;18(3):7.
21. Van Ginneken V, Sitnyakowsky L, Jeffery JE. "Infectobesity: viral infections (especially with human adenovirus-36: Ad-36) may be a cause of obesity. *Med Hypotheses.* 2009;72(4):383–8.
22. Almgren M, Atkinson RL, Hilding A, He J, Brismar K, Schalling M, et al. Human adenovirus-36 is uncommon in type 2 diabetes and is associated with increased insulin sensitivity in adults in Sweden. *Ann Med.* 2014;46(7):539–46.
23. Dhurandhar N V, Kulkarni P, Ajinkya SM, Sherikar A. Effect of adenovirus infection on adiposity in chicken. *Vet Microbiol.* 1992;31(2–3):101–7.
24. Dhurandhar N V, Israel BA, Kolesar JM, Mayhew G, Cook ME, Atkinson RL.

- Transmissibility of adenovirus-induced adiposity in a chicken model. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(7):990–6.
25. Dhurandhar N V., Israel BA, Kolesar JM, Mayhew GF, Cook ME, Atkinson RL. Increased adiposity in animals due to a human virus. *Int J Obes (Lond).* 2000;24(8):989–96.
 26. Whigham LD, Israel BA, Atkinson RL. Adipogenic potential of multiple human adenoviruses in vivo and in vitro in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290(1):R190-4.
 27. Dhurandhar N V, Whigham LD, Abbott DH, Schultz-Darken NJ, Israel BA, Bradley SM, et al. Human adenovirus Ad-36 promotes weight gain in male rhesus and marmoset monkeys. *J Nutr.* 2002;132(10):3155–60.
 28. Pasarica M, Shin AC, Yu M, Yang HMO, Rathod M, Catherine Jen KL, et al. Human adenovirus 36 induces adiposity, increases insulin sensitivity, and alters hypothalamic monoamines in rats. *Obesity.* 2006;14(11):1905–13.
 29. Atkinson RL, Dhurandhar N V, Allison DB, Bowen RL, Israel BA, Albu JB, et al. Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *Int J Obes.* 2005;29(3):281–6.
 30. Atkinson RL. Viruses as an etiology of obesity. *Mayo Clinic Proceedings.* 2007;82(10):1192–8.
 31. Yamada T, Hara K, Kadowaki T. Association of adenovirus 36 infection with obesity and metabolic markers in humans: a meta-analysis of observational

studies. PLoS ONE. 2012;7(7):e42031.

32. Xu MY, Cao B, Wang DF, Guo JH, Chen KL, Shi M, et al. Human Adenovirus 36 infection increased the risk of obesity: A meta-Analysis update. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(51):e2357.
33. Marjani A, Khatami A, Saadati H, Asghari M, Razizadeh MH, Abbasi A, et al. Association of adenovirus 36 infection and obesity; An updated meta-analysis of community-based studies. *Rev Med Virol*. 2022;32(1).
34. Parra-Rojas I, Del Moral-Hernández O, Salgado-Bernabé AB, Guzmán-Guzmán IP, Salgado-Goytia L, Muñoz-Valle JF. Adenovirus-36 seropositivity and its relation with obesity and metabolic profile in children. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:463194.
35. Lin WY, Dubuisson O, Rubicz R, Liu N, Allison DB, Curran JE, et al. Long-term changes in adiposity and glycemic control are associated with past adenovirus infection. *Diabetes Care*. 2013;36(3):701–7.
36. Goossens VJ, DeJager SA, Grauls GE, Gielen M, Vlietinck RF, Derom CA, et al. Lack of evidence for the role of human adenovirus-36 in obesity in a European Cohort. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(1):220–1.
37. Ponterio E, Cangemi R, Mariani S, Casella G, De Cesare A, Trovato FM, et al. Adenovirus 36 DNA in human adipose tissue. *Int J Obes. (Lond)*. 2015;39(12):1761–4.
38. Ergin S, Altan E, Pilanci O, Sirekbasan S, Cortuk O, Cizmecigil U, et al. The

role of adenovirus 36 as a risk factor in obesity: The first clinical study made in the fatty tissues of adults in Turkey. *Microb Pathog.* 2015;80:57–62.

39. Thai M, Graham NA, Braas D, Nehil M, Komisopoulou E, Kurdistani SK, et al. Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell anabolic glucose metabolism and virus replication. *Cell Metab.* 2014;19(4):694–701.
40. Vangipuram SD, Yu M, Tian J, Stanhope KL, Pasarica M, Havel PJ, et al. Adipogenic human adenovirus-36 reduces leptin expression and secretion and increases glucose uptake by fat cells. *Int J Obes.* 2007;31(1):87–96.
41. Kim J, Na H, Kim JA, Nam JH. What we know and what we need to know about adenovirus 36-induced obesity. *Int J Obes (Lond).* 2020;44(6):1197–209.
42. Pasarica M, Mashtalir N, McAllister EJ, Kilroy GE, Koska J, Permana P, et al. Adipogenic human adenovirus Ad-36 induces commitment, differentiation, and lipid accumulation in human adipose-derived stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(4):969–78.
43. Floyd ZE, Stephens JM. Controlling a master switch of adipocyte development and insulin sensitivity: Covalent modifications of PPAR γ . *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(7):1090–5.
44. Vangipuram SD, Sheele J, Atkinson RL, Holland TC, Dhurandhar N V. A human adenovirus enhances preadipocyte differentiation. *Obes Res.* 2004;12(5):770–7.

45. Wang ZQ, Yu Y, Zhang XH, Floyd EZ, Cefalu WT. Human adenovirus 36 decreases fatty acid oxidation and increases de novo lipogenesis in primary cultured human skeletal muscle cells by promoting Cidec/FSP27 expression. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34(9):1355–64.
46. Rogers PM, Fusinski KA, Rathod MA, Loiler SA, Pasarica M, Shaw MK, et al. Human adenovirus Ad-36 induces adipogenesis via its E4 orf-1 gene. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(3):397–406.
47. Rathod MA, Rogers PM, Vangipuram SD, McAllister EJ, Dhurandhar N V. Adipogenic cascade can be induced without adipogenic media by a human adenovirus. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(4):657–64.
48. Dhurandhar EJ, Dubuisson O, Mashtalir N, Krishnapuram R, Hegde V, Dhurandhar N V. E4orf1: A novel ligand that improves glucose disposal in cell culture. *PLoS One*. 2011;6(8):e23394.
49. Dubuisson O, Dhurandhar EJ, Krishnapuram R, Kirk-Ballard H, Gupta AK, Hegde V, et al. PPAR γ -independent increase in glucose uptake and adiponectin abundance in fat cells. *Endocrinology*. 2011;152(10):3648–60.
50. Dhurandhar N V. Insulin sparing action of Adenovirus 36 and its E4orf1 protein. *J Diabetes Complications [Internet]*. 2013;27(2):191–9.
51. Bastard J-P, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*. 2006;17(1):4–12.

52. Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gómez JM, Gutiérrez C, et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res.* 2004;12(6):962–71.
53. Moseti D, Regassa A, Kim W-K. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1):124.
54. Na H-N, Nam J-H. Adenovirus 36 as an obesity agent maintains the obesity state by increasing MCP-1 and inducing inflammation. *J Infect Dis.* 2012;205(6):914–22.
55. Castoldi A, D Naffah de Souza C, Câmara NOS, Moraes-Vieira PM. The macrophage switch in obesity development. *Front Immunol.* 2015;6:637.
56. Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K, Kammoun HL. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? *Front Immunol.* 2014;5:470.
57. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K-I, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1494–505.
58. Ishii M, Wen H, Corsa CAS, Liu T, Coelho AL, Allen RM, et al. Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. *Blood.* 2009;114(15):3244–54.
59. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.*

2018;9(6):7204–18.

60. Libby P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. *Nutr Rev.* 2007;65(12):140–6.
61. Hall JE. Guyton y Hall Tratado de Fisiología Médica 13a Edición. Tratado de Fisiología Médica. 2016.
62. Gutiérrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA. Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina: Una actualización. *Gac Med Mex.* 2017;153(2):214-228.
63. Zahorska-Markiewicz B, Anowska J, Olszanecka-Glinianowicz M, Zurawski A. Serum concentrations of TNF- α and soluble TNF- α receptors in obesity. *Int J Obes (Lond).* 2000;24(11):1392–5.
64. Kern L, Mittenbühler MJ, Vesting AJ, Ostermann AL, Wunderlich CM, Wunderlich FT. Obesity-induced TNF α and IL-6 signaling: The missing link between obesity and inflammation- driven liver and colorectal cancers. *Cancers (Basel).* 2018;11(1):24.
65. O'Rourke RW, White AE, Metcalf MD, Winters BR, Diggs BS, Zhu X, et al. Systemic inflammation and insulin sensitivity in obese IFN- γ knockout mice. *Metabolism.* 2012;61(8):1152–61.
66. Ezquerro S, Frühbeck G, Rodríguez A. El tejido adiposo, protagonista en las alteraciones metabólicas de la obesidad | Revista de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular | SEEBM. *Bioquímica la Obes.* 2016;

67. Carvajal Carvajal C. Tejido Adiposo, obesidad e insulino resistencia. *Medicina Legal de Costa Rica*. 2015;32:138-44.
68. Pérez Miguelsanz MJ, Cabrera Parra W, Varela Moreiras G, Garaulet M. Distribución regional de la grasa corporal: Uso de técnicas de imagen como herramienta de diagnóstico nutricional. *Nutrición Hospitalaria*. 2010;25:207-23.
69. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. *Diario Oficial de la Federación* 2010;1(1):1–40. [consulta: 30 Ago 2021].
70. Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012. Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. *Diario Oficial de la Federación* 2012;1–38. [consulta: 17 Ago 2021].
71. Salehian B, Forman SJ, Kandeel FR, Bruner DE, He J, Atkinson RL. Adenovirus 36 DNA in adipose tissue of patient with unusual visceral obesity. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(5):850–2.
72. Barrera-Alcocer J, García-Benavides L, Muñoz-Valle JF, de la Cruz-Mosso U, González RA, Luquín S, et al. Presence of adenovirus-36 dna in adipose tissue of women: Relationship with adipocyte morphology and the expression of C/EBP β and HIF-1 α . *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021;14:477–86.
73. Bouwman JJM, Diepersloot RJA, Visseren FLJ. Intracellular infections enhance interleukin-6 and plasminogen activator inhibitor 1 production by

cocultivated human adipocytes and THP-1 monocytes. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(8):1222–7.

74. Karamese M, Altoparlak U, Turgut A, Aydogdu S, Karamese SA. The relationship between adenovirus-36 seropositivity, obesity and metabolic profile in Turkish children and adults. *Epidemiol Infect.* 2015;143(16):3550–6.
75. Sapunar J, Fonseca L, Molina V, Ortiz E, Barra MI, Reimer C, et al. Adenovirus 36 seropositivity is related to obesity risk, glycemic control, and leptin levels in Chilean subjects. *Int J Obes.* 2020;44(1):159–66.
76. Kocazeybek B, Dinc HO, Ergin S, Saribas S, Ozcabi BT, Cizmecigil U, et al. Evaluation of Adenovirus-36 (Ad-36) antibody seropositivity and adipokine levels in obese children. *Microb Pathog.* 2017;108:27–31.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
NUTRICIÓN


PRESENTE

Toda vez que el trabajo de tesis realizado por la Bióloga Maria de la Luz Karina Reyes Olivas, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición con número de matrícula 10033875, y que lleva por título "Asociación de adenovirus 36 con la inflamación de bajo grado en tejido adiposo humano" ha sido revisada a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente.

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva a prestar a la presente.

Atentamente



Dra. Ollin Cejeste Martínez Ramírez

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 15 días del mes de Febrero de 2022.



Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE

Toda vez que el trabajo de tesis realizado por la Bióloga María de la Luz Karina Reyes Olivas, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición con número de matrícula 10033875, y que lleva por título "Asociación de adenovirus 36 con la inflamación de bajo grado en tejido adiposo humano" ha sido revisada a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente.

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva a prestar a la presente.

Atentamente

Dr. Carlos Sandoval Jaime

Investigador Instituto de Biotecnología

UNAM

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 22 días del mes de Febrero de 2022.



AV. UNIVERSIDAD 2001, COL. CHAMILPA
C.P. 62210 CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO
TELS. (5255) 5622 7600 - (777) 329 1600
www.ibt.unam.mx



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE

Toda vez que el trabajo de tesis realizado por la Bióloga Maria de la Luz Karina Reyes Olivas, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición con número de matrícula 10033875, y que lleva por título "Asociación de adenovirus 36 con la inflamación de bajo grado en tejido adiposo humano" ha sido revisada a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva a prestar a la presente.

Atentamente

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 11 días del mes de Febrero de 2022.



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAE M del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha: 2022-02-26 18:46:28 | Firmante
 B50c0GqEqQ7m1KCBAmbo01i1SXEvUx6JG9TEYASRgNpapeUoDWZuAn9Ok3QWmcaPHZJjU9VImZ8oPDZEe8Z42i+YqJqJCPWL+bLMVveUwh3up1wSfLMWkaf2g6hooH2
 GN2qjMdoXVZBwgrmzyI+976VxXfgcY7NzaurX08ye8wPxFm/dp4FKoLIAM178ud9GnFysE6JIDjMAPP1dZdo75fukGooOididgKuOKwe/S6VeRdkadBakV7h19EkOwWEst
 H1nBmAyKSPHYLjMBjsoE0AWy80q4Amx1iG7JvhuIm64E42mpTGUWxmRN5xU2JF2hxkoQ==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

Cp7VZBR58

<https://efirma.uaem.mx/noRepublo/eDIYGaNz0fYqelx6YgxQaPWJE2ZHNFW9>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Centro de
Investigación en
Dinámica Celular

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

PRESENTE

Toda vez que el trabajo de tesis realizado por la Bióloga María de la Luz Karina Reyes Olivas, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición con número de matrícula 10033875, y que lleva por título "Asociación de adenovirus 36 con la inflamación de bajo grado en tejido adiposo humano" ha sido revisada a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente.

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva a prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dr. Ramón Antonio González García Conde

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 11 días del mes de febrero de 2022.



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha: 2022-02-12 12:10:46 | Firmante
 G1G EPQ mA3ovTF8A/jurCY53H5WYK0R0gNVEIX2xVZ QtoFkG /lwR0y0/3Uun4A40F5RgeV2Nstf3PPurTxl0T0stM0wTQ15eJTe9UYF57Dw8Wx+W4Zl0wQ8oK5QLE0B0j 2/b
 QhRHUvZ3XHdkP55lqwhAZ1+JUG nm85w1b029cz1UgPTZJhVJmeWpBM wrtpWUeVfwymMjwV70E5/W3U6n+J5J0dBCBuczW5M4CahVFulo0 nEe30hF0X6R+ YgDH
 No/4GG 2xyXXCY818U amon3L0CR9PxXNZJnE8Yer0 aB+gG K0Wlp0 mbR0up3uP78eSk19KwQ==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[K.ev67pj.5g](#)

<https://efirma.usem.mx/hoRepuolo/R3U7LY0d1s8JK70z2gaelmTznkZ10wt>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN


COMISIÓN ACADÉMICA DE LA
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE

Toda vez que el trabajo de tesis realizado por la Bióloga **Maria de la Luz Karina Reyes Olivas**, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición con número de matrícula 10033875, y que lleva por título ***“Asociación de adenovirus 36 con la inflamación de bajo grado en tejido adiposo humano”*** ha sido revisada a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva a prestar a la presente.

Atentamente


DRA. MARIA ARACELI ORTIZ RODRIGUEZ
Profesora Investigadora de Tiempo Completo
Facultad de Nutrición
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 17 días del mes de Febrero de 2022.