

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

Efecto de la proteína E4Orf1 de adenovirus 36 en la glucólisis y
adipogénesis en células infectadas.

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M.C VERÓNICA MERCEDES MÁRQUEZ VERGARA

DIRECTOR: DR. RAMÓN A. GONZÁLEZ GARCÍA CONDE

Co-DIRECTORA: DRA. DELIA VANESSA LÓPEZ GUERRERO

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2023

CONTENIDO

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	III
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	VI

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Generalidades.....	1
1.1.1 Etiología del sobrepeso y la obesidad.....	1
1.2 Infecciones virales como posibles factores asociados a obesidad.....	2
1.2.1 Virus que modifican el metabolismo de la glucosa.....	3
1.2.3 Virus que modifican el metabolismo de la Glutamina.....	4
1.2.4 Adenovirus como agente causal de Obesidad.....	5
1.3 Adenovirus.....	6
1.3.1 Clasificación.....	6
1.3.2 Estructura.....	6
1.3.3 Genoma.....	7
1.3.4 Ciclo de replicación.....	8
1.4 Adenovirus 36.....	9
1.4.1 Estudios Epidemiológicos.....	10
1.4.2 Estudios con HAdV-D36 en animales.....	11
1.4.3 Estudios en líneas celulares.....	12
1.4.4 La proteína E4Orf1.....	12
2. Justificación.....	15
3. Hipótesis.....	15
4. Objetivos.....	15
4.1 Objetivo general:.....	15
4.2 Objetivos particulares:.....	15
5. Materiales y Métodos.....	16
5.1 Células y Virus.....	16
5.2 Eficiencia de replicación Viral.....	17
5.3 Extracción y cuantificación de DNA viral.....	17
5.4 Extracción y cuantificación de RNA.....	17
5.5 Diseño de primers para PCR.....	18
5.6 Cuantificación de la expresión de genes virales.....	19

5.7 Cuantificación de la expresión de genes implicados en la adipogénesis y en el metabolismo de glucosa que son blancos de MYC.	20
5.8 Activación de Ras/PI3K/AKT.....	20
5.9 Tinción de lípidos intracelulares.	21
5.10 Efecto de E4Orf1 sobre la expresión de genes celulares por RNA seq.....	21
6. Resultados.	22
6.1 Se requiere el compromiso a adipocito de las células 3T3-L1 para permitir la replicación productiva de adenovirus 36 que lleva a un metabolismo alterado de lípidos y glucosa. (Artículo: Márquez et. al 2022).	22
6.1.1 Las células 3T3-L1 que han iniciado la diferenciación a adipocitos son susceptibles, pero no permisivas a la infección por HAdV-D36.	22
6.1.2 Se requiere el compromiso a adipocito para que las 3T3-L1 permitan la replicación productiva de HAdV-D36.	26
6.1.3 La infección por HAdV-D36 promueve el metabolismo de la glucosa a través de genes blanco de MYC.....	30
6.2 La proteína E4Orf1 no es necesaria para el efecto adipogénico de HAdV-D36. (Artículo en preparación).....	31
6.2.1 La proteína E4Orf1 coopera, pero no es necesaria para el proceso de adipogénesis inducido por HAdV-D36.	32
6.2.2 E4Orf1 altera el patrón de expresión de C/EBP α , C/EBP β y PPAR- γ	34
6.2.3 La proteína E4Orf1 participa en la última fase del ciclo de replicación de HAdV-D36.....	36
6.2.4 La proteína E4Orf1 favorece la activación de la vía de señalización PI3K en células 3T3-L1 infectadas con HAdV-D36.	37
6.2.5 La regulación del metabolismo de la glucosa a través de la expresión de genes blanco de MYC no depende de E4Orf1.....	40
6.3 Análisis del transcriptoma de células 3T3-L1 infectadas con HAdV-D36.	41
7. Discusión.....	53
8. Conclusiones.	59
9. Perspectivas.....	59
10. Referencias.....	60
11. Anexos.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura de Adenovirus. Representación de la partícula viral.....	7
Figura 2. Diagrama de la organización del genoma de adenovirus en unidades transcripcionales.	8
Figura 3. Resumen de los principales sucesos en el ciclo de replicación de adenovirus.	9
Figura 4. Representación esquematizada de la proteína E4Orf1 de Adenovirus 9 (HAdV-D9).....	13
Figura 5. Alineamiento de E4Orf1 de HAdV-D36, HAdV-D9 y HAdV-C5.....	14
Figura 6. Flujo de trabajo de los experimentos.	22
Figura 7. Las células 3T3-L1 a los 12 dpc muestran características de preadipocitos comprometidos con la diferenciación.	24
Figura 8. Las células 3T3-L1 a 12 dpc, pero no a 2 dpc, son permisivas para la replicación de HAdV-D36.	26
Figura 9. La infección por HAdV-D36 aumenta la adipogénesis en las células 3T3-L1.....	27
Figura 10. El efecto de HAdV-D36 sobre la adipogénesis de 3T3-L1 se potencia por los inductores de diferenciación de adipocitos..	28
Figura 11. La replicación productiva de HAdV-D36 ocurre solo en células 3T3-L1 comprometidas a adipocito.	30
Figura 12. La infección de HAdV-D36 de células comprometidas a adipocitos promueve la expresión de genes glucolíticos blanco de MYC.....	31
Figura 13. La proteína E4Orf1 coopera, pero no es necesaria para el proceso de adipogénesis inducido por HAdV-D36.	33
Figura 14. En presencia de MDI, E4Orf1 potencia la acumulación intracelular de lípidos.....	34
Figura 15. E4Orf1 promueve la maduración de los adipocitos.	35
Figura 16. La ausencia de E4Orf1 retrasa el ciclo de replicación de HAdV-D36.	36
Figura 17. La infección con HAdV-D36 no altera los niveles de tAKT.	38
Figura 18. La proteína E4Orf1 aumenta la fosforilación de AKT.	39
Figura 19. La regulación del metabolismo de la glucosa a través de la expresión de genes blanco de MYC no depende de E4Orf1.....	41
Figura 20. Diagrama de flujo para el análisis de RNAseq.....	42
Figura 21. Mapeo de secuencias y porcentaje de alineamiento	43
Figura 22. Análisis funcional de DEG a los 2dpi.	43
Figura 23. Genes expresados diferencialmente en adipocitos 3T3-L1 infectados con HAdV-D36 vs el mutante que no expresa a la E4Orf1 a diferentes tiempos post-infección. A-C.....	44
Figura 24. Análisis funcionales de DEG por clasificación de ontología génica (GO) comparando HAdV-D36 vs HAdV-D36E4Orf1- a diferentes tiempos post-infección.....	45
Figura 25. Análisis funcionales de DEG por clasificación de ontología génica (GO) comparando HAdV-D36 vs HAdV-D36E4Orf1- a diferentes tiempos post-infección. A-B.	47
Figura 26. E4Orf1 promueve la expresión de genes involucrados en la diferenciación de adipocitos.....	48
Figura 27. E4Orf1 promueve la expresión de genes involucrados en el metabolismo celular.	50
Figura 28. E4Orf1 suprime la respuesta antiviral.....	52

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Datos de los metaanálisis y la correlación de la infección de HAdV-D36 con obesidad.	10
Tabla 2. Primers utilizados en RT-qPCR	18
Tabla 3. Número de células 3T3-L1 a los 2 y 12 dpc en MDI.	23
Tabla 4. Número de células 3T3-L1 en diferentes tiempos post-infección infectadas con HAdV-D36 a los 2 y 12 dpc	25

Abreviaturas.

3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 2 (HMGCS2)	Lactato deshidrogenasa A (LDHA)
Ácido graso sintasa (FASN)	Medio de diferenciación (MDI)
Adipogenina (Adig)	Medio mínimo o de mantenimiento (MM)
Adiponectina (Adipoq)	Multiplicidad de infección (MOI)
Adenilato Ciclasa (Atf3)	Oil Red O (ORO)
Adenovirus humano, especie D, tipo 36 (HAdV-D36)	Oligoadenilato Sintetasa (OAS)
Células 3T3-L1 no infectadas (MK)	Organización para la cooperación y el desarrollo económico (OCDE)
Ciclo de Krebs (TCA)	Organización mundial de la salud (OMS)
Citomegalovirus Humano (HCMV)	PPAR- γ (peroxisome proliferator activated receptors)
Citoglobina (CYGB)	Proteína adenoviral E4 open reading frame 1 (E4Orf1)
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)	Preadipocitos de ratón (3T3-L1)
Deoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolasa (dUTPasa)	Proteína de membrana latente 1 (LMP-1)
Dietilpirocarbonato (DEPC)	Proteína terminal (TP)
Desoxirribonucleótidos (dNTPs)	Proteína quimioatrayente de monocitos (MCP1)
Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM)	Porcupine Homolog (PORCN)
Días post confluencia (dpc)	Receptor de insulina 1 y 2 (IRS1/2)
Distemper Canino (CDV)	Resistina (Retn)
Drosophila disc-large 1 (Dlg-1)	Secuencias repetidas invertidas (ITR)
Diacilglicerol O-Aciltransferasa 2 (DGAT2)	Síndrome metabólico (SM)
Virus Epstein-Barr (EBV)	Suero bobino (SB)
Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 1 (IGF1)	Suero fetal (SF)
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	Temperatura ambiente (TA)
Fosfofructocinasa (PFK)	Unidades formadoras de placa por célula (UFP/célula)
Genes Diferencialmente Expresados (DEGs)	Virus de la enfermedad de Borna (BDV)
Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH)	Virus del herpes simple (HSV-1)
Glucocinasa (GCK)	Virus del sarcoma de Kaposi (KSHV)
Hexocinasa (HK)	Virus de la varicela zoster (VZV)
Índice de masa corporal (IMC)	Virus mutante que no expresa la proteína E4Orf1 (HAdV-D36E4Orf1-)
Interleucina (IL)	Virus tipo 7 asociado a Rous (RAV-7)

Resumen

Los adenovirus son agentes infecciosos ubicuos que causan enfermedades respiratorias, gastroenteritis y queratoconjuntivitis. El adenovirus humano, especie D, tipo 36 (HAdV-D36) puede causar obesidad en modelos animales e induce la diferenciación de preadipocitos en cultivo celular, se ha asociado como un cofactor causal de obesidad en humanos. La infección por HAdV-D36 altera la expresión génica y el metabolismo de las células infectadas, resultando en una mayor captación de glucosa por el transportador de glucosa Glut4, la activación de la vía Ras/PI3K y la acumulación de triglicéridos por la regulación positiva de C/EBPs y PPAR γ . Sin embargo, no se ha explorado la reprogramación metabólica de los preadipocitos en el contexto del ciclo de replicación viral, ni si los preadipocitos humanos pueden ser blanco de la infección *in vivo*. Hasta la fecha, la proteína adenoviral E4 open reading frame 1 (E4Orf1) se ha asociado con cada uno de los efectos descritos arriba. Sin embargo, los mecanismos adipogénicos alterados por la proteína E4Orf1 de HAdV-D36 se han evaluado en detalle en células transfectadas, y no se sabe si las mismas actividades pueden verse afectadas en el contexto de la infección viral.

Los fibroblastos murinos 3T3-L1, que se han utilizado ampliamente como modelo de diferenciación de preadipocitos a adipocitos, se utilizaron en estos experimentos. En estas células, la infección por HAdV-D36 promueve la proliferación y la diferenciación hacia adipocito, pero la replicación viral es abortiva.

Por lo tanto, durante el desarrollo del presente proyecto, inicialmente se establecieron las condiciones bajo las cuales las células 3T3-L1 son permisivas a la infección y encontrado que solo estando comprometidas para la diferenciación hacia adipocitos son permisivas y soportan la replicación viral productiva. Bajo estas condiciones, hemos evaluado el papel de la proteína E4Orf1 sobre la adipogénesis y replicación viral en células infectadas con HAdV-D36, comparando el efecto del virus HAdV-D36 Wt con el de un virus recombinante que no expresa la proteína E4Orf1 (HAdV-D36E4Orf1-). Los niveles de mRNAs virales y la replicación del DNA viral se midieron mediante RT-qPCR y qPCR, respectivamente, y la producción de progenie viral se determinó mediante ensayo en placa, en células infectadas con HAdV-D 36 Wt o HAdV-D36E4Orf1-. El efecto lipogénico de la proteína E4Orf1 se evaluó con tinción Oil Red O (ORO); y la expresión de genes que controlan el metabolismo de los lípidos se midió mediante RT-qPCR. Además, se hizo un análisis transcriptómico de células infectadas con HAdV-D36 Wt o HAdV-D36E4Orf1- mediante RNAseq, donde buscamos otras funciones asociadas a E4Orf1, siendo una de estas la activación de genes glucolíticos blancos de MYC que pudieran estar asociados al metabolismo alterado de la célula infectada.

Los resultados muestran que solo las células 3T3-L1 en un estado de compromiso a adipocitos son permisivas para la síntesis de mRNAs virales tempranos y tardíos, así como para la replicación de DNA viral y la producción de progenie, lo que respalda la replicación viral productiva de HAdV-D36. En el contexto de un ciclo productivo viral, HAdV-D36 moduló la expresión de los genes adipogénicos, C/EBP α , C/EBP β

y PPAR γ , así como la acumulación de lípidos intracelulares, y la infección se acompañó de la expresión alterada de genes glucolíticos que son regulados por MYC. Por otro lado, los resultados mostraron que en las células 3T3-L1 que son permisivas a la infección, la proteína E4Orf1 no es necesaria para la producción de mRNAs virales tempranos o tardíos, ni para la replicación del DNA viral o la producción de progenie. Significativamente, nuestros datos indican que en el contexto de la infección viral de células 3T3-L1 en un estado permisivo la proteína E4Orf1 contribuye, pero no es indispensable para inducir la expresión de los genes adipogénicos C/EBP α , C/EBP β o PPAR γ , o la acumulación de lípidos intracelulares. Por otro lado, observamos que E4Orf1 no solo está involucrada en la alteración de genes adipogénicos, sino que al igual que E4Orf1 de HAdV-C5 y HAdV-D9, está involucrada en el metabolismo glucolítico asociado a MYC y en la respuesta antiviral a la infección.

1. Introducción.

1.1 Generalidades.

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial prevenible y es considerada uno de los principales problemas de salud pública. Se caracteriza por el exceso de adiposidad visceral, visible y cuantificable y está asociada con un incremento en el riesgo de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas tales como diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, cardiopatía isquémica, hipertensión, resistencia a la insulina, enfermedad hepática, osteoartritis, dislipidemias[1]

La obesidad ha alcanzado cifras epidémicas a nivel mundial. Se estima que en las últimas tres décadas la prevalencia a nivel mundial se ha casi triplicado. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2016 más de 1,900 millones de adultos sufrían sobrepeso y más de 650 millones eran obesos [1]. A nivel global, la proporción de adultos con un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 25 kg/m² (definido como sobrepeso por la OMS), incrementó entre 1980 y 2016 de 28.8% a 39% en hombres y de 29.8% a 40% en mujeres. Asimismo, la prevalencia de obesidad ha también incrementado sustancialmente en niños y adolescentes, tanto en países desarrollados como en desarrollo. En el 2016 se estimó que aproximadamente 41 millones de niños menores de 5 años tenían sobrepeso u obesidad y se registraron cerca de 340 millones de individuos entre 5 y 19 años con sobrepeso u obesidad. La OCDE (Organización para la cooperación y el desarrollo económico) estima que uno de cada dos adultos y uno de cada seis niños tienen sobrepeso u obesidad y estima que la obesidad seguirá incrementando al menos hasta el 2030 [2]. Más del 50% de los más de 650 millones de individuos obesos en el mundo se agrupan en 10 países, México incluido. En México, el problema es particularmente agudo, ya que se estima que desde 1980 la prevalencia de sobrepeso y obesidad se ha triplicado y el país ocupa el segundo lugar más alto de prevalencia a nivel mundial [3].

1.1.1 Etiología del sobrepeso y la obesidad.

La etiología de la obesidad es una compleja interacción entre factores metabólicos, genéticos, ambientales, sociales y culturales, pero la causa principal de obesidad y sobrepeso es un desequilibrio energético entre la ingesta y gasto de calorías. A nivel mundial, al mismo tiempo que ha aumentado la ingesta de alimentos de alto contenido calórico ricos en grasa y altos en azúcares refinados, ha disminuido la actividad física debido a la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, así como los nuevos modos de transporte y la creciente urbanización [1].

La obesidad es considerada como un estado de inflamación crónica de bajo grado, causado principalmente por la presencia en el torrente sanguíneo de LPS (lipopolisacárido) proveniente de las paredes de las bacterias de la microbiota intestinal, esto debido a que la permeabilidad intestinal se encuentra comprometida, aumentando el paso de estas moléculas las cuales son detectadas principalmente por el sistema inmune innato, el cual es activado y se comienzan a producir diferentes citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) 6, IL-1 β ,

la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP1) y la leptina, se elevan en la sangre periférica, mientras que citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y la hormona adiponectina, se encuentran reducidas [4].

Los intentos por explicar el aumento de la obesidad en la mayoría de los países del mundo aproximadamente al mismo tiempo, han llevado a buscar factores adicionales que puedan ajustarse más adecuadamente a las características de un fenómeno epidemiológico [5]. En estas búsquedas se han explorado una variedad de factores que van desde aumento del consumo de comida rápida, aumento del tiempo frente a la televisión, aumento de anuncios de comida rápida en televisión, calidad y horas de sueño, aumento del uso de medicamentos que causan aumento de peso. Todos estos factores pueden haber cambiado, aunque en muy diferente grado y en diferentes regiones del mundo desde el inicio de la epidemia de obesidad.

Uno de los nuevos factores que se encuentran relacionados en gran medida con la obesidad y resistencia a la insulina es la microbiota intestinal, un complejo ecosistema con interacciones entre microorganismos y células del intestino que influyen de manera importante en el metabolismo. La microbiota intestinal interviene en la obtención de energía de la dieta, la generación de moléculas menos complejas que sean fácilmente absorbibles, la producción de ácidos grasos de cadena corta y la síntesis de vitaminas [6]. Los microorganismos que componen la microbiota intestinal incluyen bacterias, virus, hongos y protozoarios y en algunas etapas de la vida los parásitos [7].

Los principales filos bacterianos que se encuentran en la microbiota intestinal son Firmicutes (60-65%), Bacteroidetes (20-25%), Proteobacteria (5-10%) y Actinobacteria (3%) constituyendo más del 97% de la microbiota intestinal. Mientras que la microbiota intestinal sufre fluctuaciones constantes en la composición en respuesta a los cambios en la dieta o la exposición a los antibióticos. Factores adicionales que modifican al microbioma intestinal incluyen (1) el ejercicio, que se ha asociado con una inflamación sistémica reducida y un cambio en la estructura microbiana intestinal; (2) la pérdida de sueño, que se vinculó con un aumento en el filo bacteriano Firmicutes Firmicutes; y (3) el estrés que aumenta la permeabilidad intestinal y un cambio ascendente en las citoquinas inflamatorias.

Se sabe que la composición de la microbiota intestinal es diferente entre individuos normopeso y con obesidad. La alteración en la microbiota intestinal provoca una alteración en la permeabilidad de la barrera intestinal, lo que facilita la entrada de componentes bacterianos al torrente sanguíneo, provocando un desbalance en la absorción de nutrientes asociado a inflamación de bajo grado y la obesidad [8].

1.2 Infecciones virales como posibles factores asociados a obesidad.

Se ha determinado que la infección con algunos virus en células en cultivo altera el metabolismo celular, optimizando las condiciones celulares para llevar a cabo un ciclo viral eficiente. Las principales rutas del metabolismo celular que se ven alteradas por infecciones virales son la glucólisis, lipogénesis y la glutaminólisis [9-11]. Estas modificaciones en las rutas metabólicas en las células infectadas pueden

aumentar y optimizar fuentes de carbono, la energía disponible para la replicación del virus y la producción de progenie, proporcionar sustratos celulares específicos para la replicación del virus y crear sitios para la replicación viral al tiempo que aumentan la supervivencia de la célula infectada [11]. El metabolismo inducido por la infección viral puede proporcionar un mayor número de nucleótidos libres necesarios para la replicación del genoma viral, así como una mayor producción de aminoácidos para la producción de proteínas virales y en el caso de los virus con envoltura, aumentar el contenido de lípidos intracelulares podría proporcionar material de membrana adicional para la envoltura viral. Además de proporcionar sustratos directos para la producción de progenie, se pueden requerir ajustes en las vías metabólicas para proporcionar ATP para la biosíntesis de macromoléculas virales. Ciertas infecciones virales han sido propuestas como posibles factores asociados a la obesidad ya que algunos virus son capaces de alterar vías metabólicas para modificar el metabolismo de la célula infectada [9, 10].

1.2.1 Virus que modifican el metabolismo de la glucosa.

Se ha demostrado que varios virus inducen la glucólisis para la producción de progenie viral. Por ejemplo, el poliovirus y el virus del herpes simple (HSV-1) dependen de la presencia de glucosa para su replicación ya que cuando se inhibe la glucólisis mediante el uso de 2-DG, se reduce la producción de virus [12-14]. Además, se ha encontrado que los genes virales pueden modificar directamente el metabolismo de la glucosa. En el caso del virus de pseudorrabia, su material genético induce la glucólisis y las proteínas virales se sintetizan incluso en presencia de 2-DG, aunque con una disminución en la producción de virus infecciosos [15]. El citomegalovirus humano (HCMV) también induce la glucólisis durante la infección, aumentando la producción de lactato [16] y la captación de glucosa a través del aumento de la expresión de Glut4 en membrana [17], además de que la expresión de proteínas virales tempranas es necesaria para la inducción de la glucólisis [18]. El virus de la influenza A y el virus de la hepatitis C (VHC) también modifican la glucólisis y aumentan la producción de lactato en las células infectadas [19] [20] [21] que conlleva a un mayor requerimiento de glucosa y un aumento en la producción de lactato en las células infectadas, mediante la proteína NS5A que interactúa con la hexoquinasa (HK) 2 para mejorar su actividad [22]; mientras que el oncogén LMP-1 (proteína de membrana latente 1) del virus de Epstein-Barr (EBV) durante el periodo de latencia promueve la expresión de HK2 lo que lleva al aumento de la glucólisis [23]. El virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) induce la absorción de glucosa a través de la inducción del transportador Glut 3 y aumenta la producción de ácido láctico [24].

Los adenovirus que infectan humanos (HAdV) también inducen la glucólisis. La infección con HAdV-C5 de células epiteliales de mama no tumorigénicas conduce a un mayor consumo de glucosa y producción de ácido láctico [25]. Se ha relacionado al gen adenoviral E4Orf1 como responsable de inducir la glucólisis. Esta proteína coinmunoprecipita con MYC (oncogén que codifica un factor de transcripción, MYC, asociado a metabolismo celular, ciclo celular y muerte) y se ha observado que

promueve la expresión constitutiva de MYC y su interacción con MYC es necesaria para la inducción de la glucólisis [26]. Se ha observado que el HAdV-C5 incrementa el flujo de carbono hacia la síntesis de nucleótidos y que la replicación de su DNA disminuye cuando se inhibe la activación de MYC. Además, la disminución de la expresión de MYC conduce a una reducción en la producción de virus en células con un bajo metabolismo de glucosa [25].

1.2.2 Virus que modifican el metabolismo de los ácidos grasos.

La síntesis de ácidos grasos es esencial para la producción de lípidos en las células y desempeña un papel importante en la formación de membranas y otras necesidades celulares. En las células de mamíferos, la síntesis de ácidos grasos se inicia con la producción de palmitato a partir de acetil-CoA y malonil-CoA, en una reacción catalizada por la ácido graso sintasa (FASN). El HCMV induce el flujo de carbono derivado de la glucosa hacia la síntesis de ácidos grasos, lo cual se evidencia por la marca radioactiva de glucosa en los medios de cultivo de células infectadas. Este flujo de carbono abastece la síntesis de ácidos grasos y el ciclo de Krebs. [27]. Aunque el mecanismo exacto de inducción de la síntesis de ácidos grasos por HCMV no se conoce, se ha demostrado que la inhibición de la proteína SREBP-1 inhibe tanto la síntesis de ácidos grasos inducida por HCMV como la producción de viriones infecciosos. En el caso del virus de la varicela zoster (VZV), se ha demostrado que la síntesis de ácidos grasos es necesaria durante su replicación lítica. La inhibición de la ácido graso sintasa bloquea la producción de VZV sin afectar la síntesis de proteínas virales. Además, en las células infectadas con VZV, la síntesis de ácidos grasos puede ser necesaria para aumentar la expresión de glucoproteínas en los viriones[28]. El virus de la hepatitis C (VHC) también depende de la síntesis de ácidos grasos para su ciclo de replicación [29]. Se ha observado que el VHC induce la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos y activa los factores de transcripción SREBP y FASN, lo que resulta en un aumento en la síntesis de ácidos grasos [30]. El virus del dengue y el poliovirus también requieren la síntesis de ácidos grasos para su replicación. [31-33]. Virus del dengue-1 induce la reubicación de la ácido graso sintasa a nuevas estructuras de membrana que se forman por la proteína viral NS3 [31] , mientras que el poliovirus induce la absorción celular de ácidos grasos extracelulares a través de la proteína viral 2A [34].

En general, la síntesis de ácidos grasos aumentada por parte de los virus puede ayudar en la remodelación de las membranas celulares para crear sitios específicos de replicación viral. Aunque en el caso de los virus de DNA no está claro cómo se relaciona el aumento en la síntesis de ácidos grasos con su ciclo de replicación.

1.2.3 Virus que modifican el metabolismo de la Glutamina.

La glutamina es un aminoácido no esencial que se absorbe del medio extracelular y converge en múltiples vías metabólicas celulares. En la glutaminólisis, la glutamina se metaboliza en glutamato y

luego en alfa-cetoglutarato. El alfa-cetoglutarato puede transportarse a la matriz mitocondrial donde se utiliza como intermediario en el ciclo de Krebs (TCA). En células con un metabolismo alterado, el carbono de la glucosa se desvía del ciclo TCA tanto hacia la producción de ácido láctico como la síntesis de ácidos grasos por lo que se requiere glutamina como intermediario para el TCA. HCMV promueve la absorción de glutamina [16], y la glutamina puede sustituir a la glucosa como fuente de energía. En ausencia de glutamina en los medios, las células infectadas con HCMV tienen niveles disminuidos de ATP y hay una pérdida significativa de producción de virus, también Poliovirus requiere de la glutamina para la replicación eficiente [35].

En el contexto de la obesidad, se ha investigado la posible asociación entre infecciones virales y el desarrollo de esta condición. Las infecciones virales pueden alterar significativamente el metabolismo celular para favorecer su replicación.

1.2.4 Adenovirus como agente causal de Obesidad.

En las últimas décadas se han obtenido una cantidad considerable de datos que sugieren que agentes infecciosos pueden no sólo establecerse más fácilmente en individuos con obesidad, sino que la infección puede ser un agente causal de obesidad. En 1982, Lyons y colaboradores encontraron que el virus del moquillo (Distemper Canino, CDV por sus siglas en inglés) producía obesidad en ratones. El virus tipo 7 asociado a Rous (RAV-7) y el virus de la enfermedad de Borna (BDV) causan obesidad en animales, pero no se han asociado a obesidad en humanos [36]. Sin embargo, la obesidad relacionada con estas infecciones virales se asoció con daño en el hipotálamo y un incremento en colesterol y triglicéridos séricos. En contraste, los adenovirus, patógenos humanos ubicuos, no sólo son causantes de obesidad en animales [37-39], sino que se han relacionado con obesidad en humanos sin que exista daño en el sistema nervioso central.

La infección con HAdV de los tipos HAdV-C5, HAdV-D36 y HAdV-D37 ha mostrado incremento en adiposidad en modelos animales y en modelos celulares. Los tipos HAdV-C5, HAdV-D36 y HAdV-D37 producen adiposidad o incremento de peso en animales, mientras que HAdV-D9, y HAdV-A31 incrementan el almacenamiento de grasa en células en cultivo, pero no se han asociado con obesidad en humanos [40, 41].

HAdV-D36 fue el primer virus humano que se identificó como causante de obesidad en animales [37]. Los pollos, ratones y ratas infectados con HAdV-D36 aumentaron significativamente de peso y tejido adiposo comparados con los controles no infectados [37, 42, 43]. Un estudio longitudinal en monos mostró un aumento del 15 % en el peso corporal y una reducción del 29 % en los niveles de colesterol sérico después de una infección natural con HAdV-D36 y la infección experimental de monos con HAdV-D36 provocó un aumento de casi cuatro veces en el peso corporal en comparación con los controles no infectados y un aumento del 58 % en la grasa corporal en comparación con los controles; el colesterol sérico disminuyó significativamente ($p < 0.006$) en comparación con los controles [44]. HAdV-D36 es el único virus que se ha relacionado con la obesidad y/o alteraciones metabólicas en

humanos seropositivos y ha sido el patógeno más estudiado cuando se trata de factores biológicos que causan la epidemia de obesidad humana. La correlación es más fuerte y consistente en los niños, pero algunos estudios no correlacionan el sobrepeso u obesidad ni en niños ni en adultos [45], como se describe más adelante.

1.3 Adenovirus.

Los adenovirus (Ad) fueron aislados por primera vez en 1953 por dos grupos que estaban buscando agentes etiológicos de infecciones respiratorias agudas.

1.3.1 Clasificación.

En los humanos, las infecciones por Ad son comunes y causan infecciones de vías respiratorias, gastroenteritis o conjuntivitis. La presencia de anticuerpos para adenovirus es común en la población general [46].

Los Ad fueron aislados por primera de adenoides removidos quirúrgicamente. Posteriormente han sido aislados de todo tipo de vertebrados, desde peces hasta mamíferos.

La familia *Adenoviridae* consta de más de 200 tipos diferentes, los cuales se agrupan en 5 géneros. El género *Aviadenovirus* fue aislado de aves; el género *Siadenovirus* ha sido aislado de reptiles y aves. El género *Atadenovirus* se ha aislado de un mayor número de especies, tales como reptiles, aves, mamíferos. Los *Atadenovirus* fueron nombrados así por su alto contenido inusual de A+T en su genoma [47]. El género *Mastadenovirus* incluye a virus que infectan a mamíferos y a todos los Ad que infectan humanos (HAdV). Se han identificado más de 100 genotipos de HAdV, los cuales son clasificados en siete especies (A-G) con base en características de secuencia; capacidad de hemaglutinación; reactividad con anticuerpos neutralizantes; y capacidad oncogénica [48].

En pacientes inmunocompetentes generalmente causan un efecto leve, sin embargo, en recién nacidos y pacientes inmunodeprimidos, incluidos los pacientes con SIDA, pueden causar neumonía fatal fulminante, hepatitis y encefalitis [47].

1.3.2 Estructura.

Los Ad tienen un genoma de DNA lineal de doble cadena, de entre 26 y 45 kb. La partícula mide entre 60-90 nm de diámetro y no tiene envoltura (Figura 1). La cápside es icosaédrica y está constituida por 252 capsómeros formados por 11 proteínas estructurales enumeradas por convención de II-IX, IIIa, IVa2, TP, μ y la proteasa viral p23. La proteína II se organiza en 240 trímeros que forman la estructura más abundante, llamada hexón. La proteína III forma 12 pentones en los vértices y está asociada con trímeros de la glicoproteína IV que se proyectan de los vértices en estructuras llamadas fibras que son responsables de la interacción del virus con el receptor celular. La cara interna de la cápside está asociada a las proteínas estructurales IX, IIIa VI, y VIII estabilizando las interacciones no equivalentes entre trímeros de hexón [47].

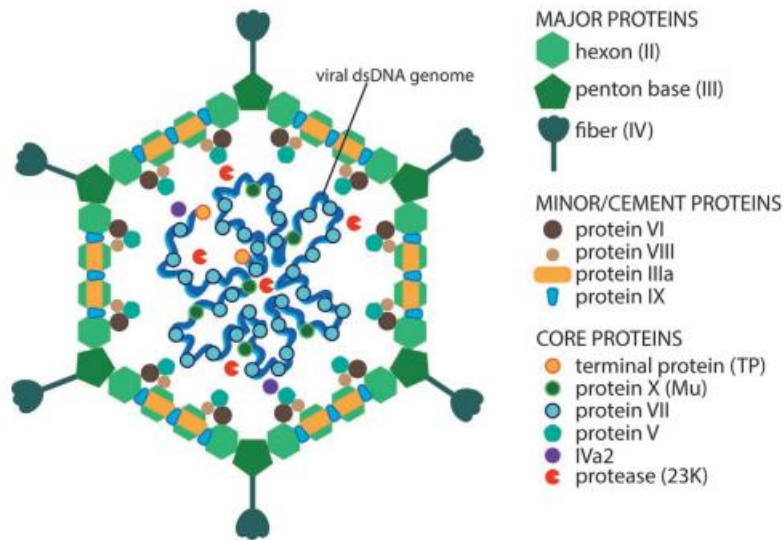


Figura 1. Estructura de Adenovirus. Representación de la partícula viral. Se muestran las once proteínas estructurales del virión, así como las proteínas de la nucleocápside unidas al genoma de dsDNA viral [49].

La nucleocápside está formada por las proteínas V, VII, Mu y TP. Las proteínas V, VII y Mu son ricas en argininas, por lo cual pueden interactuar con las cargas negativas del DNA. El DNA viral se enrolla sobre la proteína VII, la cual es la más abundante de la nucleocápside. Además, dentro de las partículas virales se encuentran aproximadamente diez copias de una proteasa viral (L3 23K) que es esencial para el ciclo de replicación del virus, ya que es necesaria para la maduración de las partículas virales recién ensambladas por el corte proteolítico de los precursores (p) pIIIa, pVI, pVIII, pVII, pMu y pTP y permite la entrada del virus a la célula, favoreciendo el desensamble de las partículas virales y su salida del endosoma [47].

1.3.3 Genoma.

El genoma está organizado en cinco unidades de transcripción temprana (E1A, E1B, E2, E3 y E4), dos unidades tempranas retrasadas (IX y IVa2) y una unidad de transcripción tardía ML (Major late, por sus siglas en inglés) que se procesa por selección diferencial de sitios de poliadenilación (Figura 2). Estos transcritos son procesados por splicing alternativo, lo que genera diversos mRNAs que se agrupan en cinco familias (L1 a L5) todos procesados por splicing alternativo (excepto IX). Todos los mRNAs de estas unidades de transcripción son transcritos por la RNA polimerasa (RNAPol) II celular. Además, existen dos genes virales que son transcritos por la RNAPol III, llamados VA RNA (Virus associated RNA) I y II. El DNA viral tiene una proteína terminal (TP) unida covalentemente en sus extremos 5'. La proteína TP actúa como "primer" para el inicio de la replicación del DNA viral. El genoma viral tiene secuencias repetidas invertidas (ITR) en sus extremos y éstas funcionan como orígenes de replicación [49].

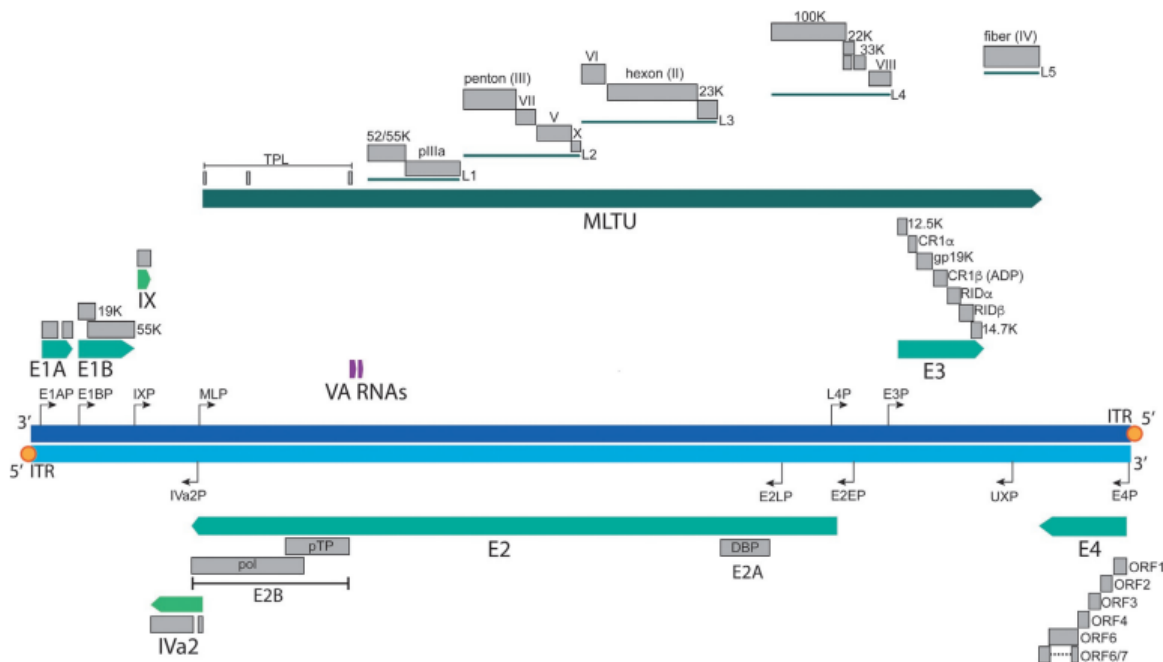


Figura 2. Diagrama de la organización del genoma de adenovirus en unidades transcripcionales. Las barras azules representan el DNA de doble cadena viral. Las unidades transcripcionales están representadas por flechas: la unidad temprana inmediata E1A, las unidades tempranas E1B, E4, E3 y E2; las unidades tempranas retrasadas IX y IVa2; y la unidad transcripcional tardía ML (Formada por 5 familias L1-L5 y la secuencia del líder tripartita, TPL) [50].

1.3.4 Ciclo de replicación.

La mayoría de los estudios sobre la replicación de Ad se han realizado utilizando HAdV-C2 o HAdV-C5 (Mastadenovirus, grupo C) mediante la infección de células tumorales humanas, HeLa (carcinoma cervical humano), A549 (carcinoma de pulmón), Hek-293 (embrionarias de riñón) y de células no transformadas, HFF (prepuccio humano).

Convencionalmente, el ciclo de replicación se divide en 2 fases, las cuales están separadas por el inicio de la replicación del DNA viral. Los eventos tempranos incluyen desde la interacción del virus con su receptor celular hasta la internalización del DNA viral al núcleo y la expresión de todos los genes tempranos. Esta fase tiene como función establecer las condiciones óptimas dentro del ambiente celular para la replicación y la expresión eficiente del genoma viral. Los productos de los genes tempranos inducen a la célula huésped a ingresar a la fase S del ciclo celular, suprimir la respuesta antiviral de la célula huésped y sintetizar productos génicos virales necesarios para la replicación del DNA viral.

Una vez que inicia la replicación del DNA viral, comienza la fase tardía con la expresión de genes tardíos y el posterior ensamblaje de la progenie viral. Los genes virales que codifican para las proteínas IVa2 y IX se expresan en un tiempo intermedio, por lo cual, como se describió antes, se clasifican en una categoría temprana-retrasada [47].

Los eventos tempranos inician cuando la glicoproteína fibra de la superficie del virión interactúa con una proteína celular conocida como receptor de coxsackie y adenovirus (CAR, por sus siglas en inglés). Posteriormente, la interacción del pentón con integrinas $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$ promueve la entrada del virus por endocitosis mediada por clatrina. Esta etapa es regulada por proteínas celulares como PI3K,

p130CAS y la familia de Rho GTPasas que favorecen la reorganización del citoesqueleto de actina necesaria para la endocitosis del virión. Una vez internalizada la partícula viral, dentro del endosoma continúa un desensamble parcial de la cápside debido a que el bajo pH activa a la proteasa viral asociada al virión; la membrana de la vesícula endocítica es desestabilizada, produciéndose así, la liberación de la partícula viral al citoplasma. Se liberan parcialmente las proteínas pentón, IIIa y hexones quedando expuesta la nucleocápside con el DNA viral. La nucleocápside migra al núcleo mediante la interacción con dineínas asociadas a microtúbulos y el genoma viral entra al núcleo a través del complejo del poro nuclear. Una vez en el núcleo, el DNA viral es reconocido por la maquinaria de transcripción celular y se transcriben los genes virales tempranos E1A. Las proteínas codificadas en E1A activan la transcripción de las otras unidades de transcripción tempranas y genes celulares que llevan a la célula a un estado de proliferación. Una vez que se acumulan las proteínas tempranas E1, E4 y en particular las codificadas en la unidad E2, las cuales son directamente responsables de la replicación del genoma viral, inicia la síntesis de DNA viral y la transición a la fase tardía. Los genes tardíos codifican mayoritariamente para proteínas estructurales del virión las cuales ingresan al núcleo en donde se ensambla la progenie viral que es liberada por lisis (Figura 3) [51].

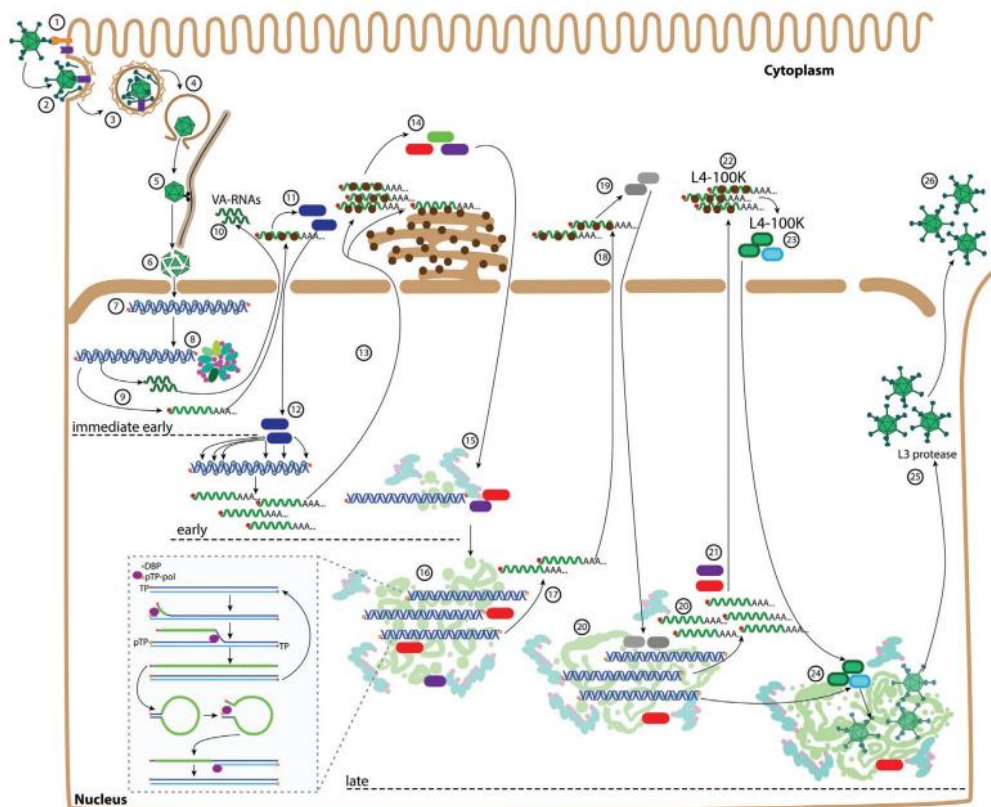


Figura 3. Resumen de los principales sucesos en el ciclo de replicación de adenovirus. Entrada y adhesión (1-6), Expresión genes virales tempranos (7-15), Fase tardía (16), Expresión genes virales tardíos (16-24), liberación y maduración de partículas virales (25 y 26) [49].

1.4 Adenovirus 36.

Adenovirus tipo 36 (HAdV-D36) fue aislado por primera vez en 1978 en Alemania de las heces fecales de una niña con diabetes y con diarrea; se clasificó en el grupo D y está comúnmente asociado

a infecciones respiratorias y conjuntivitis. HAdV-D36 fue el primer adenovirus humano que se demostró que causa obesidad en modelos animales, así como el aumento en la diferenciación de adipocitos. La infección altera la expresión de genes y el metabolismo de las células que resulta en un incremento en el transporte de glucosa a través de GLUT y acumulación celular de triglicéridos. Estudios experimentales en modelos animales han mostrado que HAdV-D36 puede conducir a la progresión de la obesidad al causar hiperplasia e hipertrofia en los adipocitos de ratones, ratas y monos. Además, estudios serológicos y moleculares, tanto en niños como en adultos sugieren que existe asociación entre la presencia de anticuerpos contra HAdV-D36 en suero y obesidad. HAdV-D36 se ha convertido en el adenovirus adipogénico más extensamente estudiado y se ha correlacionado en diferente medida con sobrepeso u obesidad en humanos [36].

1.4.1 Estudios Epidemiológicos.

Reportes de países desarrollados y en vías de desarrollo sugieren que la infección con HAdV-D36 podría estar relacionada con la obesidad en adultos y en niños, ya que en general se observa una alta prevalencia de anticuerpos contra HAdV-D36 en personas obesas. Sin embargo, no todos los estudios realizados en adultos muestran una correlación entre la presencia de anticuerpos contra el virus y obesidad. Estudios realizados en niños muestran una mayor correlación entre la infección con HAdV-D36 y obesidad [52].

Cinco metaanálisis que abarcan estudios hasta el 2020 han proporcionado evidencia de una asociación entre la infección por HAdV-D36 y un mayor riesgo de obesidad. Sin embargo, no todos los estudios han mostrado una correlación directa entre la presencia de anticuerpos contra HAdV-D36 y la obesidad, lo que sugiere que pueden existir otros factores involucrados en esta relación. Además, se ha observado que la infección por HAdV-D36 está más relacionada con la acumulación de grasa subcutánea que con la grasa visceral. En la tabla 1 se resume la información que resulta de estos metaanálisis.

Tabla 1. Datos de los metaanálisis y la correlación de la infección de HAdV-D36 con obesidad.

	Estudios	Muestra	Año	Conclusión
Yamada T, et al.	10 transversales	2,870 donde 409 eran niños obesos y 117 niños no obesos; 1073 adultos obesos y 1271 adultos no obesos.	2012	La infección por HAdV-D36 está asociada con el riesgo de obesidad y aumento de peso, pero no con marcadores metabólicos anormales, sugiriendo que la infección con HAdV-D36 está más asociada con la acumulación de grasa subcutánea que con grasa visceral [52].
Shang Q, et al.	11 caso-control	2,508 sujetos obesos y 3,005 controles	2014	La infección por HAdV-D36 se asocia con un mayor riesgo de desarrollo de la obesidad. El primer informe que revela la relación significativa en niños con un análisis de datos serológicos [53].

Xu MY, et al.	17 análisis de metarregresión y análisis de subgrupos	3,988 casos de obesidad y 2,991 controles.	2015	Hay un mayor número de sujetos obesos que presentan anticuerpos contra HAdV-D36 en comparación con los controles y con un mayor nivel de IMC en 16 de los 17 estudios, sugiriendo una asociación entre la infección con HAdV-D36 y obesidad [45].
Da Silva Fernandes, et al.	37 estudios	10,300 adultos de 18 a 70 años y 4,585 niños y adolescentes de 3 a 18 años	2021	La prevalencia media de HAdV-D36 entre adultos fue del 22.9 %. Entre los niños y adolescentes, la prevalencia promedio de Adv36 fue de 28.9%. Relación positiva entre HAdV-D36 y el aumento de peso, la obesidad y cambios en perfiles metabólicos en 31 de los estudios analizados [54].
Arezoo Marjani, et al.	30 caso-control y de cohorte		2021	La prevalencia global de infección por HAdV-36 en población obesa fue del 32% en casos y del 24% en controles. Se encontró una asociación significativa entre la infección por adenovirus y la obesidad, especialmente en adolescentes [55].

En general, la mayoría de los estudios sugieren una correlación entre la infección por HAdV-D36 y con la obesidad, especialmente en la población infantil. Sin embargo, no se ha establecido un mecanismo preciso que explique esta asociación y se requieren más investigaciones para comprender los efectos del HAdV-D36 en el metabolismo de las células infectadas y su contribución a la obesidad.

1.4.2 Estudios con HAdV-D36 en animales.

Experimentos con animales han demostrado que la infección con HAdV-D36 produce obesidad en gallinas, ratones y primates no humanos. Los animales infectados con HAdV-D36, a pesar de presentar mayor adiposidad, exhiben bajos niveles séricos de colesterol y triglicéridos. En pollos experimentalmente infectados con HAdV-D36 se presenta un fenotipo obesogénico y estos pollos fueron capaces de infectar a pollos no infectados con los que compartían jaula, que posteriormente desarrollaban el fenotipo obesogénico. La infección natural de primates no humanos se ha correlacionado con el aumento de peso [56].

La infección de ratas con HAdV-D36 muestra un aumento en el tejido adiposo, favoreciendo la diferenciación de preadipocitos a adipocitos [57]. HAdV-D36 estimula la expresión de la proteína C/EBP- β (CCAAT/enhancer binding protein), seguida de la expresión de C/EBP- α y PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptors), con la consecuente acumulación de lípidos. Estos experimentos sugieren que la diferenciación de preadipocitos podría ser un mecanismo que subyace el efecto adipogénico de HAdV-D36. Diversos estudios muestran que HAdV-D36 aumenta la captación de glucosa por la célula a través de la activación de Ras/PI3K (las proteínas RAS son pequeñas GTPasas implicadas en la proliferación, diferenciación, apoptosis y senescencia celular. La fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) es una de las principales vías efectoras de RAS, que regula el crecimiento celular, la entrada al ciclo celular, la supervivencia celular, la reorganización del citoesqueleto y el metabolismo), y mejora el control hiperglicémico en ratones a pesar de una dieta alta en grasa, sin reducir la adiposidad. El control hiperglicémico mejora mediante el aumento de la captación de glucosa por el tejido adiposo y músculo esquelético, y por la reducción de la producción de glucosa hepática [58]. Por otra parte, se

ha demostrado que la infección con HAdV-D36 incrementa la expresión de GLUT1 y GLUT4 (proteínas de membrana cuya actividad es transportar la glucosa al interior de la célula) mediada por Ras/PI3K de forma independiente de la activación por insulina. Este efecto de incremento de entrada de glucosa independiente de insulina inducido por HAdV-D36 es además de gran interés para el desarrollo de nuevas drogas para diabetes tipo 2 [59] [60]

Los mecanismos por los que HAdV-D36 promueve la adipogénesis se han asociado hasta ahora a la proteína viral E4Orf1. En ratones que expresan establemente la proteína de HAdV-D36 E4Orf1 mejoró el control glucémico y bajaron los niveles de glucosa en sangre. Se observó mejora en el control glucémico sin estimulación de la vía de señalización de la insulina proximal. La expresión hepática de HAdV-D36 E4Orf1 mejora el control glucémico y promueve el metabolismo de la glucosa a través de la activación de AKT mediante PI3K, aumentando el transportador de glucosa en la membrana plasmática lo que lleva al aumento en el transporte de glucosa.

1.4.3 Estudios en líneas celulares.

Experimentos en cultivo de células han demostrado que la infección por HAdV-D36 promueve la proliferación y diferenciación de preadipocitos de ratón (3T3-L1) [59]. La diferenciación de adipocitos *in vitro* sigue un orden específico. El proceso de diferenciación de los adipocitos comprende la detención de la proliferación, seguido de una fase de expansión clonal, culminando con la expresión de factores de transcripción y diferenciación que inducen un estado adipogénico. Se reducen los niveles de expresión de los genes Pref-1 y Wnt10b, los cuales son inhibidores clave de la cascada adipogénica; posteriormente se incrementa la expresión del receptor PPAR- γ y el enhancer CCAAT (C/EBP), los cuales son promotores de la diferenciación. Finalmente, la acumulación de C/EBP β es crítica para la activación de PPAR- γ y otros genes proadipogénicos. La co-expresión de C/EBP β y C/EBP δ induce la expresión de PPAR- γ , que junto con C/EBP α conduce a la activación de varios genes incluyendo AP2 (factor de transcripción involucrado en la diferenciación y función de los adipocitos) y GAPDH (participa en la regulación del metabolismo de los lípidos y los carbohidratos) [61, 62].

1.4.4 La proteína E4Orf1.

El mecanismo de acción de HAdV-D36 en adipogénesis se ha ligado hasta ahora exclusivamente a la proteína codificada por el marco de lectura 1 del gen temprano 4 (E4Orf1), un polipéptido de 125 aminoácidos [25, 63]. Mutaciones en el gen de la E4Orf1 de HAdV-C5 tienen efectos mínimos sobre la replicación viral y se sabe muy poco sobre las funciones de la proteína en la infección. La secuencia de E4Orf1 de todos los HAdV caracterizados muestra una similitud significativa con enzimas deoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolasas (dUTPasa). Aunque las proteínas E4Orf1 no tienen actividad enzimática conocida se ha propuesto que tienen como ancestro una dUTPasa. La proteína E4Orf1 interacciona con un conjunto de factores celulares a través de un motivo de unión a dominio PDZ

funcional en el Carboxilo terminal. El dominio PDZ interacciona con proteínas implicadas en la transducción de señales como DLG, MUPP1 y MAGI-1 [64].

Recientemente, se ha descubierto que diversas proteínas virales interaccionan con dominios PDZ desestabilizando uniones estrechas entre las células epiteliales y, en consecuencia, probablemente ayudando en la diseminación de la progenie viral.

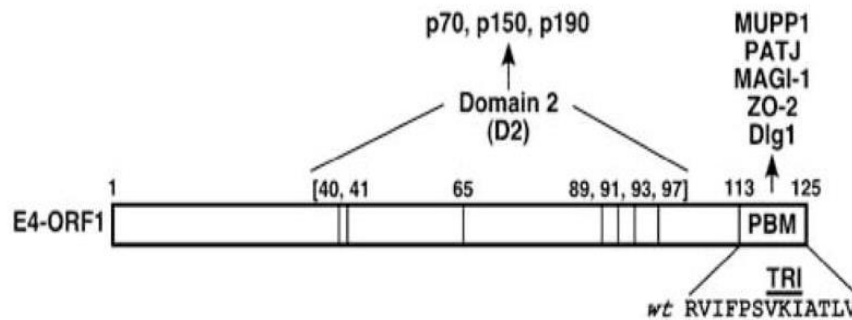


Figura 4. Representación esquematizada de la proteína E4Orf1 de Adenovirus 9 (HAdV-D9). E4Orf1 tiene dos dominios funcionales con los que se asocia a diferentes proteínas celulares, el dominio 2 (D2) y el dominio de unión a PDZ (PBM). El D2 se encuentra en el centro de la proteína y el PBM en el carboxilo-terminal. Se muestran los residuos importantes para la interacción con las proteínas celulares p70, p150 y p190 de D2 (números entre paréntesis) y los residuos PBM. También se indican blancos celulares que se unen a D2 o PBM. El elemento de trimerización de E4Orf1 (TRI) se sobrepone con la secuencia PBM [64].

El incremento en adiposidad asociado a E4Orf1 parece depender de la estimulación de tres vías de señalización celular: E4Orf1 activa la vía de Ras/PI3K e incrementa receptores de glucosa en membrana plasmática [40, 65]; incrementa la expresión de la sintasa de ácidos grasos que aumenta la conversión de glucosa a ácidos grasos; y aumenta la expresión de PPAR- γ resultando en diferenciación de las células en adipocitos. La activación de la vía de Ras/PI3K por E4Orf1 requiere la interacción de la proteína viral con Dlg-1 (*Drosophila disc-large 1*) y, como sucede en HAdV-D9, esta interacción requiere del dominio de unión al PDZ (PBM) de E4Orf1 (Figura 4) [66].

En el caso de HAdV-D9, un virus tumorigénico en un modelo de rata, se ha asociado a E4Orf1 con la regulación positiva del metabolismo de la glucosa y se ha sugerido que E4Orf1 es suficiente para promover la glucólisis por la activación de MYC. E4Orf1 se une a MYC y conduce a un aumento de la transcripción de los genes blanco de MYC que resulta en la expresión elevada de enzimas glucolíticas [25].

Como se muestra en la Figura 4, dos dominios son responsables de las actividades de E4Orf1, el dominio 2 (D2), definido por 7 residuos de aminoácidos (GVDLFHF) ubicados en el centro de la proteína, y el dominio de unión a PDZ (PBM), situado en el extremo carboxilo terminal (RVIFPSVKIATLV). La activación de PI3K depende de los dominios D2 y PBM, mientras que la activación de MYC parece depender solo del dominio D2 [25]. Mientras que el dominio D2 media la unión a factores celulares no identificados y también a MYC, el dominio PBM interacciona con un grupo de proteínas con dominios PDZ celulares para ejercer dos funciones distintas: (i) la interrupción de las uniones estrechas y la pérdida de la polaridad celular apicobasal, ya que como monómero E4Orf1

secuestra a las proteínas PDZ, MUPP1, PATJ, MAGI-1, y ZO-2 en el citoplasma y (ii) la activación de PI3K inducida por el homotrímero de E4Orf1 en un complejo de E4Orf1:PI3K que se asocia a la membrana plasmática. La E4Orf1 de HAdV-C5 también interacciona con MYC mediante D2 y el dominio de interacción a PDZ (PBM) de E4Orf1 también activa a PI3K y a AKT, pero mutaciones que eliminan el dominio PBM no interfieren con el incremento en el consumo de glucosa, por lo que E4Orf1 podría aumentar el metabolismo de glucosa por un mecanismo independiente de PI3K que dependa de MYC, lo que se sugiere que E4Orf1 puede mejorar el metabolismo glucolítico de una manera PI3K-independiente [65]. Sin embargo, no se ha determinado si HAdV-D36 podría tener un efecto similar sobre la activación de MYC en la regulación del metabolismo de glucosa. La activación de la vía de Ras/Mek/Erk está conservada en todos los adenovirus humanos, pero sólo los subtipos HAdV-C5, HAdV-D36 y HAdV-D37 producen adiposidad. Es por lo tanto esencial determinar el papel que juegan las vías de Ras y MYC en la infección con HAdV-D36, y el papel de E4Orf1 en estos procesos en el contexto de la célula infectada. En comparación con otros HAdV del grupo D la proteína E4Orf1 de HAdV-D36 y HAdV-D9 (ambos del grupo D) se encuentra altamente conservada. Estas dos proteínas tienen el 92% de similitud. En contraste, la comparación de la secuencia de E4Orf1 de HAdV-D36 y HAdV-C5 muestra que las proteínas están menos conservadas ya que tienen el 72% de similitud (Figura 5).

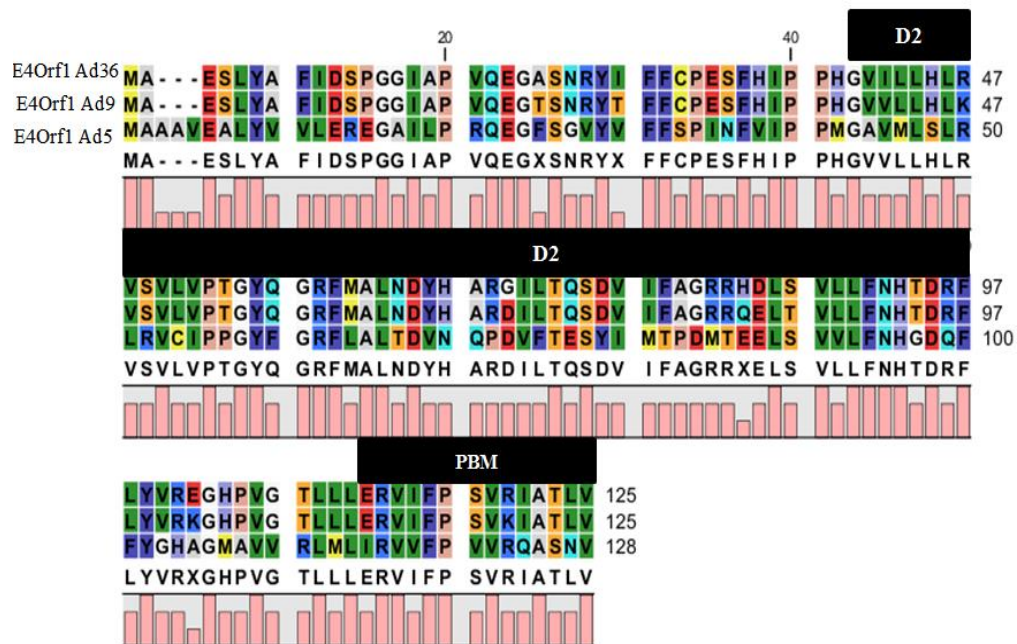


Figura 5. Alineamiento de E4Orf1 de HAdV-D36, HAdV-D9 y HAdV-C5. Se puede observar el alto grado de conservación y las diferencias en aminoácidos en el dominio 2 (D2), el dominio de unión a PDZ (PBM) y fuera de estos. Alineamiento hecho con el programa CLC 6.06.

Se ha demostrado que E4Orf1 de HAdV-C5 se une a MYC en el núcleo, en donde activa genes glucolíticos. En un estudio en células MCF10A que expresan E4Orf1 se observó un aumento de expresión de genes glucolíticos blanco de MYC. En este se utilizó glucosa marcada con carbono-14 y se observó que éste se integraba en la síntesis de *novo* de nucleótidos, por lo que se concluyó que E4Orf1

promueve un cambio en la glucólisis anaerobia que convierte la glucosa en nucleótidos para la replicación viral.

E4Orf1 de HAdV-D36 y HAdV-C5 tienen 29 residuos diferentes en el dominio D2 y solo 6 en el PBM, por lo que la capacidad de activar tanto la vía de señalización de Ras/PI3K como la de MYC pudiera estar conservada entre estas proteínas.

2. Justificación.

En conjunto, la evidencia sugiere que la infección con HAdV-D36 podría ser un agente causal de obesidad en humanos y que el efecto adipogénico es debido a la proteína E4Orf1. Sin embargo, no se ha estudiado el efecto de la E4Orf1 sobre adipogénesis en el contexto de la infección con HAdV-D36.

Las actividades asociadas a la proteína E4Orf1 de HAdV-D36 se han demostrado exclusivamente en células transfectadas y en los estudios en donde se evalúa su efecto *in vitro*, se suplementa el medio con factores de diferenciación de adipocitos. En el presente trabajo, se realizaron experimentos con el HAdV-D36 silvestre y con un recombinante que no expresa la proteína E4Orf1 con la finalidad de entender el papel de esta proteína sobre el ciclo de replicación viral y sobre la regulación del metabolismo de la célula infectada.

Entender con detalle el efecto de la infección con HAdV-D36 sobre el metabolismo de glucosa y adipogénesis permitirá aportar información para establecer un nuevo marco para tratamientos caso-específicos de obesidad y el diseño de nuevos agentes terapéuticos antidiabéticos.

3. Hipótesis.

La alteración del metabolismo de glucosa y lípidos inducida por E4Orf1 de HAdV-D36 en células humanas infectadas, depende de la regulación de las vías de Ras/PI3K y MYC.

4. Objetivos.

4.1 Objetivo general: Determinar los mecanismos moleculares que son alterados por E4Orf1 de HAdV-D36 en células infectadas.

4.2 Objetivos particulares:

- Determinar el efecto de E4Orf1 sobre el ciclo de replicación de HAdV-D36:
 - La eficiencia de síntesis de DNA viral durante el ciclo de replicación.
 - La eficiencia de producción de progenie de HAdV-D36.
 - La eficiencia de la expresión de genes virales durante la infección.
- Determinar el efecto de E4Orf1 sobre la diferenciación, proliferación y adipogénesis en células

infectadas con HAdV-D36.

- Evaluar el efecto de E4Orf1 sobre la expresión de genes celulares implicados en el metabolismo de lípidos y glucosa.

5. Materiales y Métodos.

5.1 Células y Virus.

Células A549: Las células A549 (células humanas de carcinoma pulmonar) se utilizaron para la amplificación de los adenovirus y para determinar la producción de progenie viral. Las A549 se crecieron como cultivos en monocapa en medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) suplementado con 5% de suero bobino (SB) + 5% de suero fetal (SF) (v/v). Se incubaron a 37° C, 5% CO₂.

Células 3T3-L1: Las células 3T3-L1 (preadipocitos murinos) se utilizaron como modelo de preadipocitos. Las células 3T3-L1 se crecieron como cultivos en monocapa en medio DMEM 1.5 g/L bicarbonato + 10% SB; 10 µl de piruvato. Se incubaron a 37° C, 5% CO₂ como medio mínimo o de mantenimiento (MM) y DMEM 1.5 g/L bicarbonato+ 10% SB; 1% de piruvato + 10mg/mL de insulina + 0.5mM de dimetil-etil-xantina + 25mg/mL de dexamentasona en medios complementario o de diferenciación (MDI) cambiándoles el medio de cultivo cada 2 días.

Amplificación de virus: En todos los experimentos se utilizaron adenovirus serotipo 36 Wt (HAdV-D36) y el mutante HAdV-D36E4Orf1- que no expresa la E4Orf1 ya que se insertaron codones de paro inmediatamente rio abajo del codón de inicio, por lo que es nulo para la expresión de la proteína. Ambos virus fueron amplificados en células A549 utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 unidades formadoras de placa por célula (UFP/célula). Se infectaron 10 cajas de 100 mm por virus (8.8x10⁶ células/caja de 100 mm) y a los 7 dpi (días post infección) las células se cosecharon con gendarme, se centrifugaron a 400 g durante 5 min a 4°C y el pellet se resuspendió en 1 ml de solución IV USB (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 0.1% w/v dextrosa). Después se lisaron las células para liberar las partículas virales mediante congelación y descongelación, 5 min en nitrógeno líquido y 5 min a 37°C (3 veces); posteriormente se centrifugó a 20,000 g durante 5 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo; los virus se titularon por ensayo en placa en células A549. La adsorción de los virus se realizó durante 1.5 h, a 37°C, durante la cual se movieron las células cada 15 min para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Posteriormente se retiró el inóculo y se adicionó DMEM/5% de SB + 5% de SF, manteniendo las células a 37°C dependiendo del tiempo post-infección requerido.

5.2 Eficiencia de replicación Viral.

El efecto de la ausencia de la E4Orf1 sobre la replicación del virus se determinó mediante la cuantificación de la eficiencia de producción de progenie viral comparando a HAdV-D36 Wt y el mutante HAdV-D36E4Orf1-, por ensayos en placa. Para titular la progenie viral producida en células 3T3-L1, se crecieron células A549 en cajas de 12 pozos con DMEM/5% de SB + 5% de SF. Cuando llegaron al 90% de confluencia las células A549 se infectaron con la progenie, del virus Wt o el mutante de E4Orf1, producida en células 3T3-L1 cosechadas a los 2d, 6d, 12d y 18d post-infección; así como con la progenie obtenida de sobrenadantes de los 2d, 4d, 6d, 8d, 10d, 12d, 14d, 16d y 18d post-infección (dpi). Posteriormente se retiró el inóculo y se mantuvieron las células en DMEM agar (DMEM con agar al 1% suplementado con 7.5% de NaHCO₃, 10 mg/ml gentamicina, 1 M MgCl₂, y 2% SF). Para cuantificar la progenie viral se utilizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻³. Cuando se observó la formación de placas (7 días después de iniciado el ensayo) se adicionó al medio rojo neutro a una concentración de 1% para contar las placas formadas. Después de 4 horas de haber adicionado el rojo neutro se contaron las placas en cada una de las diluciones para calcular el título de los virus. Para calcular el título viral se tomó el promedio de diluciones con <50 placas utilizando la siguiente formula:

$$\text{Título viral (UFP/ml)} = (\# \text{ placas formadas}) \times (10 \times 1/\text{factor de dilución}).$$

5.3 Extracción y cuantificación de DNA viral.

Para determinar el efecto la proteína E4Orf1 sobre la acumulación de DNA viral, las células infectadas se cosecharon a diferentes tiempos post infección y el DNA viral se cuantificó por qPCR utilizando primers específicos para HAdV-D36. Se crecieron células 3T3-L1 en cajas de 100 mm y después de 12 días de haber llegado a confluencia se infectaron como se describe anteriormente. Las células se colectaron a 3 hpi, 2 dpi, 6 dpi, 12 dpi y 18 dpi con 500 µl de tripsina, se centrifugaron por 5 minutos a 400 g a 4°C y el pellet se resuspendió en 5 ml de PBS, del cual se tomó 1 ml para extraer DNA. Se centrifugó a 400 g a 4°C y el pellet se resuspendió en 100 µl de una solución con 1 mg/ml de Proteinasa K (Promega) y 1:200 de Tween20 (Promega) y se incubó por 1 h a 55°C. Después de la incubación se inactivó la Proteinasa K durante 10 min a 95°C. Se centrifugó por 2 min a 22,000 g y se colectó el sobrenadante. El DNA se precipitó con 1/10 de Acetato de Sodio 3M y un volumen de isopropanol a 4°C toda la noche. Después de precipitar, se centrifugó a 22,000 g durante 10 min a 4°C. El pellet obtenido se lavó con 1 ml de Etanol al 70%, centrifugando por 5 min a 22,000 g 4°C. El DNA se resuspendió en 10 µl de Tris 10 mM pH 7.4 y se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.4 Extracción y cuantificación de RNA.

Se crecieron células 3T3-L1 en cajas de 100 mm y 12 días después de haber llegado a confluencia se infectaron como se describe anteriormente. Las células se colectaron a 3 hpi, 2 dpi, 6 dpi, 12 dpi y 18 dpi con 500 µl de tripsina, se centrifugaron por 5 minutos a 400 g a 4°C y el pellet se resuspendió en 5

ml de PBS, del cual se tomó 1.5 ml para extraer RNA. Se centrifugó a 400 g a 4°C y el pellet se resuspendió en 500 µl de TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadió 200 µl de cloroformo por cada ml de TRIzol. Se incubó por 3 minutos a TA y se centrifugó a 16,000 g a 4°C por 15 min. En este punto se separaron tres fases y se recuperó la fase superior que corresponde a la fase acuosa con RNA. La fase acuosa se transfirió a otro tubo, cuidando de no llevarse la interfase, esta fase se precipitó con 500 µl de isopropanol por cada ml de TRIzol. Las muestras se incubaron 30 min a 4°C y después se centrifugó por 15 min a 22,000 g. El pellet se lavó con 1 ml de etanol al 70% por cada ml de TRIzol inicial. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 22,000 g durante 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el pellet de RNA se dejó secar durante 5 min. Finalmente, se resuspendió en 50 µl de agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) y las muestras se guardaron a -70°C. El RNA de cada muestra se cuantificó utilizando NanoDrop.

5.5 Diseño de primers para PCR.

Para el diseño y evaluación de primers se utilizaron los programas CLC Sequence Viewer (CLC Bio), PrimerPlex (Premier Biosoft) y Primer-Blast de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los pares de primers se diseñaron para generar productos de entre 70 y 250 pares de bases (pb) aproximadamente. Se seleccionaron los primers que no generaran productos secundarios inespecíficos. Las secuencias de cada par de primers se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Primers utilizados en RT-qPCR

Nombre	Secuencia 5'-3'	Producto (pb)
E1A	Fw. CGGCGACCTGGCTGTGATTATG	253
	Rv. TTCAGGTATGGGAGGCAGAGTGG	
L3 Hexón	Fw ATCGCAGTCGCAAATGGCCA	149
	Rv CCCAGGCTGAAGTACGTGTC	
IVa2	Fw. TGGAGACGCGAGGGCGAAG	112
	Rv. ACGTCACCGAGCTCTGGGAC	
HAdV-D36 DNA	Fw. CCGTGTGGTTAAAGAGCAGC	184
	Rv. TTCCACATTCCTCCGCATGG	
HK2	Fw. CGGCCGTGCTACAATAGG	80
	Rv. CTCGGGATCATGTGAGGG	
PFK	Fw GGCGGAGATCACATCAGG	82
	Rv GTAATCCCACGCTTACCAG	
GAPDH	Fw. CCCACCACACTGAATCTCCC	88
	Rv. TACATGACAAGGTGCGGCTC	
LDHA	Fw. ACGTCAGCATAGCTGTTCCACT	83
	Rv. TGAGATCCGGAATCGGCGG	
PPAR-γ	Fw GCCTGCGAAAGCCTTTTGGTG	151
	Rv GGCTTCACATTCAGCAAACCTGG	

C/EBP- α	Fw AGGAACACGAAGCACGATCAG	141
	Rv CGCACATTCACATTGCACAA	
C/EBP- β	Fw CGGACTGCAAGCGGAAGGAGGA	150
	Rv GGCTGGACGACGAGGATGTGGA	

5.6 Cuantificación de la expresión de genes virales.

Para evaluar el efecto de E4Orf1 sobre la expresión de genes virales E1A, IVa2 y Hexón. Se midieron cada uno de estos mRNA en células infectadas con el virus Wt o mutante de E4Orf1 por RT-qPCR. El gen de actina fue utilizado para normalizar. Se crecieron células 3T3-L1 en cajas de 100 mm y se infectaron con el virus HAdV-D36 Wt o HAdV-D36E4Orf1- como se describe anteriormente y se extrajo RNA total.

RT: Con los RNA obtenidos de las células infectadas se hicieron reacciones de RT utilizando 100 ng de RNA total; 10 pmol de cada uno de los primers descritos en la Tabla 2; 2 μ l de Buffer de reacción 5X (Fermentas); 10 unidades (U) de inhibidor de RNasa RiboLock (Fermentas); 2 μ l de una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) (Fermentas) que contiene 10 mM de cada dNTP y 50 U de transcriptasa reversa RevertAid (Fermentas). La reacción se mezcló, posteriormente se incubó a 42°C por 60 minutos, la enzima RT se inactivó a 70°C por 10 minutos. Una vez realizada la RT se prosiguió a la qPCR para cada uno de los genes virales y celulares de interés.

qPCR: Para el análisis cuantitativo de los mRNA, se utilizó el sistema de detección SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), usando los primers que se muestran en la tabla 2 como genes de interés (GOI), así como U1 como gen de referencia, partiendo de los cDNA obtenidos de la RT. Este kit utiliza el siguiente programa de ciclado: 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de: 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Para la amplificación de los GOI, se utilizaron 50 ng del templado (cDNA), 1X del Master Mix del kit (SYBR® Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase UP, dNTPs, referencia pasiva (ROX). Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo StepOne (Applied Biosystems). Para cada par de primers se hicieron controles de muestra sin templado (NTC) para verificar si existía amplificación por formación de estructuras secundarias entre los primers. Además, se hicieron curvas con diluciones 1:10 partiendo de 100 ng totales de RNA de las muestras para verificar que la eficiencia de amplificación de todos los pares de primers utilizados fuera similar. Las muestras se analizaron por el método comparativo $\Delta\Delta$ Ct en el cual se seleccionó como genes de referencia (ref) a actina para calcular el Δ Ct de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\Delta\text{Ct muestra} = \text{Ct GOI} - \text{Ct referencia}$$

Como calibrador se seleccionó el gen de interés (en cada caso) a 3 hpi para calcular el $\Delta\Delta$ Ct de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct muestra} - \Delta\text{Ct calibrador}$$

Se obtuvo el cambio de expresión (Fold-change) de cada muestra, en relación con el calibrador, de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Fold-change} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

Los resultados (fold-change) y la desviación estándar se graficaron utilizando el programa Graph Prism.

Para el análisis cuantitativo del DNA viral, se utilizó el mismo sistema de detección SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), usando los primers específicos para DNA de HAdV-D36, siguiendo el protocolo antes descrito.

5.7 Cuantificación de la expresión de genes implicados en la adipogénesis y en el metabolismo de glucosa que son blancos de MYC.

Para evaluar el efecto de E4Orf1 sobre la expresión de genes clave en la cascada de regulación adipogénica, se midieron los mRNAs de marcadores adipogénicos, PPAR γ , C/EBP- α y C/EBP- β . Por otro lado, para los mRNAs celulares claves del metabolismo de glucosa que son blancos de MYC evaluamos los siguientes mensajeros: Hexocinasa 2 (HK2); Fosfofructocinasa (PFK); Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH); Lactato deshidrogenasa A (LDHA).

Se midieron cada uno de estos mRNA en células infectadas con el virus Wt o mutante por RT-qPCR. El gen celular de U1 fue utilizado para normalizar. Se crecieron células 3T3-L1 en cajas de 100 mm y se infectaron con el virus HAdV-D36 Wt o HAdV-D36E4Orf1- y posteriormente se siguió el protocolo de exacción de RNA total, seguido por RT-qPCR como se describió previamente.

5.8 Activación de Ras/PI3K/AKT.

La activación de las vías de Ras/PI3K/AKT se evaluaron por determinación directa de la fosforilación de las subunidades de AKT que se midieron por western blots. Se crecieron células 3T3-L1 en cajas de 100 mm y después de 12 días de haber llegado a confluencia se infectaron como se describe anteriormente. Las células se colectaron a 3 hpi, 2 dpi, 6 dpi, 12 dpi y 18 dpi con 500 μ l de tripsina al 0.05%, se centrifugaron por 5 minutos a 400 g a 4°C y el pellet se resuspendió en 5 ml de PBS, del cual se tomó 1.5 ml para obtener proteína total. Se centrifugó a 400 g a 4°C y el pellet se resuspendió en buffer RIPA (NaCl 159 mM, Tris HCl 25 mM, SDS 0.5%, deoxicolato de sodio 0.5% EDTA pH 8.5 mM y NP40 1%) para liberar las proteínas. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se mezcló con buffer laemmli. Las proteínas obtenidas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las proteínas en los geles se tiñeron con azul de Coomassie. Paralelamente las proteínas se transfirieron a membranas de PDVF, que se trató previamente antes con metanol durante 5 minutos, por electrotransferencia húmeda, por 1.5 h, a 400 mA. Las membranas de PDVF se bloquearon con TBS (NaCl 150 mM, Tris 20 mM; pH 7.6), 3% leche descremada/ 0.5% Tween 20, a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora y posteriormente se

incubó 2 horas a TA con el anticuerpo primario anti-tAKT 1:1000 (cell signaling technology) y anti-pAKT 1:2000 (Prontech) diluidos en TBS, 0.3% leche descremada/ 0.05% Tween 20. Después de 3 lavados con TBS, la membrana se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o conejo acoplado a peroxidasa a una dilución 1:10,000 (Jackson ImmunoResearch). La señal se reveló con un sustrato quimioluminiscente (ECL), como lo describe el fabricante (Invitrogen) y la membrana se reveló utilizando el equipo LI-COR C-Digit. Se utilizó anti-tubulina 1:2,000 (Abcam) como control de carga.

5.9 Tinción de lípidos intracelulares.

Para determinar el efecto de la proteína E4Orf1 en la acumulación de lípidos intracelulares se crecieron células 3T3-L1 en cajas de 35 mm y después de 12 días de haber llegado a confluencia se infectaron como se describe anteriormente. Las células se fijaron durante 10 min con formalina al 10%; posteriormente se lavaron con agua MiliQ esteril y se tiñeron con Oil Red O (Sigma) a las 3 hpi, y a los 2, 6, 12 y 18 dpi (una tinción distinta por tiempo y por medio de cultivo). Las células teñidas se trataron con isopropanol al 100% para eluir la tinción y se midió la absorbancia a 510 nm siendo la densidad óptica proporcional a la acumulación de lípidos intracelulares.

5.10 Efecto de E4Orf1 sobre la expresión de genes celulares por RNA seq.

Se crecieron células 3T3-L1 en cajas de 100 mm y 12 días después de haber llegado a confluencia se infectaron con HAdV-D36 Wt o HAdV-D36E4Orf1- como se describe anteriormente. Las células se colectaron a 3 hpi, 2, 6, 12 y 18 dpi y el RNA total de células infectadas o no infectadas se extrajo con Trizol. La calidad del RNA se evaluó mediante un Bioanizador con nanochip de RNA (Agilent Technologies). La verificación de calidad de las bibliotecas (tamaño y calidad) se visualizó en un BioAnalyzer High Sensitivity DNA Chip (High Sensitivity DNA K.it de Agilent Technologies). Las bibliotecas de cDNA se secuenciaron en el sistema Illumina HiSeq 2500. Las lecturas sin procesar se asignaron al genoma de referencia de ratón con el alineador STAR RNA-seq (v.2.7.8), las lecturas no asignadas se excluyeron del archivo BAM de salida, los niveles de abundancia de transcritos se cuantificaron utilizando Feature Counts (v.2.0 .1) con la versión de anotación GENCODE M25 y realizamos el análisis EdgeR para la identificación de genes expresados diferencialmente (DEGS) con FDR <0.01 y fold-change > 2. Las listas completas de DEG están disponibles en la Tabla complementaria. Los archivos BAM de cada muestra se usaron para calcular la correlación de Pearson y PCA (v.3.5.1). Los niveles de abundancia para los DEG se transformaron en Z-score y se usaron para crear mapas de calor con gplots usando R. El análisis de ontología genética se realizó con Metascape (<https://metascape.org>) y los genes específicos de cada término GO se tomaron de Mouse Genome Informatics (<https://metascape.org>) [://www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)). Para obtener genes compartidos y

específicos de listas de DEG de todos los conjuntos de datos, utilizamos Intervene (v.0.6.1).

En la siguiente figura, se esquematiza de forma general el flujo del trabajo experimental que se realizó en este proyecto.

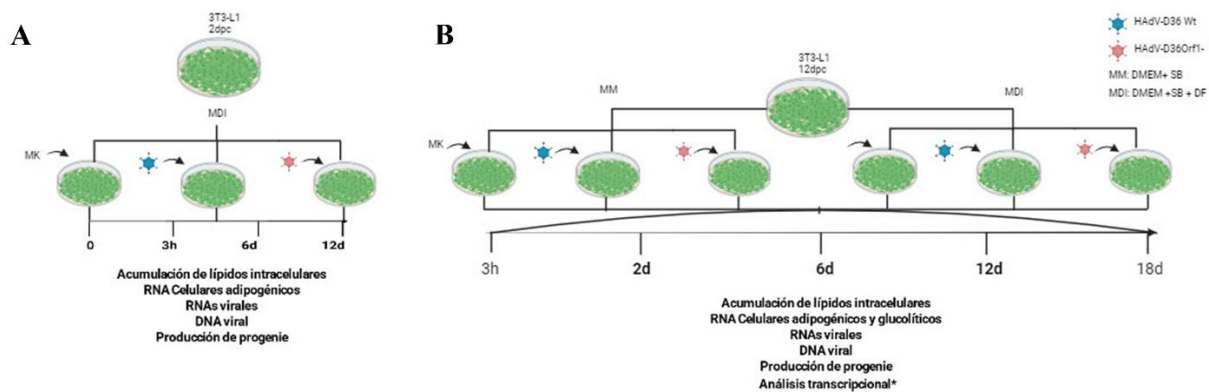


Figura 6. Flujo de trabajo de los experimentos. Las células 3T3-L1 se infectaron con HAdV-D36 o se infectaron con HAdV-D36E4Orf1- y se comparó con células no infectadas a los 2 (A) o 12 (B) días después de la confluencia (2 dpc o 12 dpc, respectivamente), en ausencia o presencia de factores de diferenciación (MM o MDI, respectivamente). Las células se recolectaron en los puntos de tiempo indicados cuando se realizaron mediciones de mRNA viral y celular, DNA viral, producción de progenie viral y lípidos intracelulares como se describe en materiales y métodos.

6. Resultados.

6.1 Se requiere el compromiso a adipocito de las células 3T3-L1 para permitir la replicación productiva de adenovirus 36 que lleva a un metabolismo alterado de lípidos y glucosa. (Artículo: Márquez et. al 2022).

Las células 3T3-L1 se han utilizado ampliamente como modelo para el estudio de la diferenciación de adipocitos. Cuando estas células alcanzan la confluencia, se detiene su crecimiento e inicia su diferenciación a adipocitos [67]. Las células 3T3-L1 tienen una morfología de tipo fibroblasto cuando no están diferenciadas y su diferenciación a adipocito puede inducirse por contacto célula-célula o usando factores de diferenciación (Metil-etil-xantina, insulina y dexametasona: MDI) [68]. En ambos escenarios, durante las etapas iniciales del proceso de diferenciación, se observa un aumento en la expresión de C/EBP β y C/EBP α , lo cual lleva a la expresión de PPAR γ y a la acumulación de lípidos estimulada por la adiponectina y la FAS. Todo esto contribuye a la formación de adipocitos maduros en etapas posteriores [69, 70].

Aunque la infección por HAdV-D36 de 3T3-L1 promueve la proliferación y diferenciación celular [60, 71], el ciclo de replicación viral es abortivo [72]. Por lo tanto, los efectos de la replicación de HAdV-D36 en la diferenciación de adipocitos y el metabolismo de los lípidos aún no se han dilucidado por completo. En este apartado determinamos bajo qué condiciones las células son permisivas para la replicación de HAdV-D36 y evaluamos el efecto adipogénico en el contexto de la replicación viral.

6.1.1 Las células 3T3-L1 que han iniciado la diferenciación a adipocitos son susceptibles, pero no permisivas a la infección por HAdV-D36.

Con el fin de determinar si la fase de diferenciación celular influye en la permisividad de las células 3T3-L1 a la replicación de HAdV-D36 y analizar el impacto de la replicación viral en la adipogénesis, decidimos comparar los efectos de la infección por HAdV-D36 en células 3T3-L1 a los 2 y 12 días después del inicio de la diferenciación en presencia de MDI. Inicialmente, medimos los niveles de expresión de mRNA de C/EPB β , C/EPB α , PPAR γ y la acumulación de lípidos, comparando células 3T3-L1 no infectadas en medio suplementado con MDI a los 2 y 12 días después de que las células llegaran a confluencia (dpc). Las células se cosecharon a las 3 horas, 6 días y 12 días después de la adición de MDI (Figura 7), como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Utilizamos RT-qPCR con primers específicos para secuencias de mRNAs procesados, y utilizamos el reactivo ORO para medir la acumulación de lípidos. Como era de esperar, el número de células aumentó aproximadamente diez veces entre los 2 dpc y 12 dpc en presencia de MDI. Sin embargo, cuando las células a los 2 dpc fueron estimuladas con MDI, solo aumentaron aproximadamente dos veces cada 6 días, y el aumento en células a 12 dpc entre los días 2 y 6 fue de solo aproximadamente un 30% cuando se agregó MDI (Figura 7D). También se observó, como era de esperar, que tanto el porcentaje de células (Figura 7E) como la acumulación total de lípidos por célula (Figura 7F) fueron significativamente mayores en las células suplementadas con MDI a los 12 dpc. Se ha demostrado que los niveles de C/EPB β y C/EBP δ aumentan temporalmente durante las etapas iniciales de la diferenciación y disminuyen en etapas posteriores, cuando se acumulan C/EPB α y, en consecuencia, PPAR γ lo que conduce a la síntesis y almacenamiento de ácidos grasos [73]. En nuestros experimentos encontramos diferencias significativas en los patrones de expresión de los genes C/EPB y PPAR γ entre las células a los 2 dpc y 12 dpc (Figura 7A,7B). Las células a 12 dpc mostraron niveles de mRNAs de C/EPB β , C/EPB α y PPAR γ de 2 a 4 veces más altos y un patrón de expresión que corresponde a células comprometidas a la diferenciación a adipocitos. En este patrón de expresión, se observó un aumento temporal de C/EPB β y C/EPB α seguido de niveles más altos de PPAR γ .

Tabla 3. Número de células 3T3-L1 a los 2 y 12 dpc en MDI.

Tiempo	Número de Células	
	2dpc	12dpc
3h	1.36 X 10 ⁶	1.82 X 10 ⁷
6d	2.35 X 10 ⁶	2.36 X 10 ⁷
12d	4.02 X 10 ⁶	2.30 X 10 ⁷

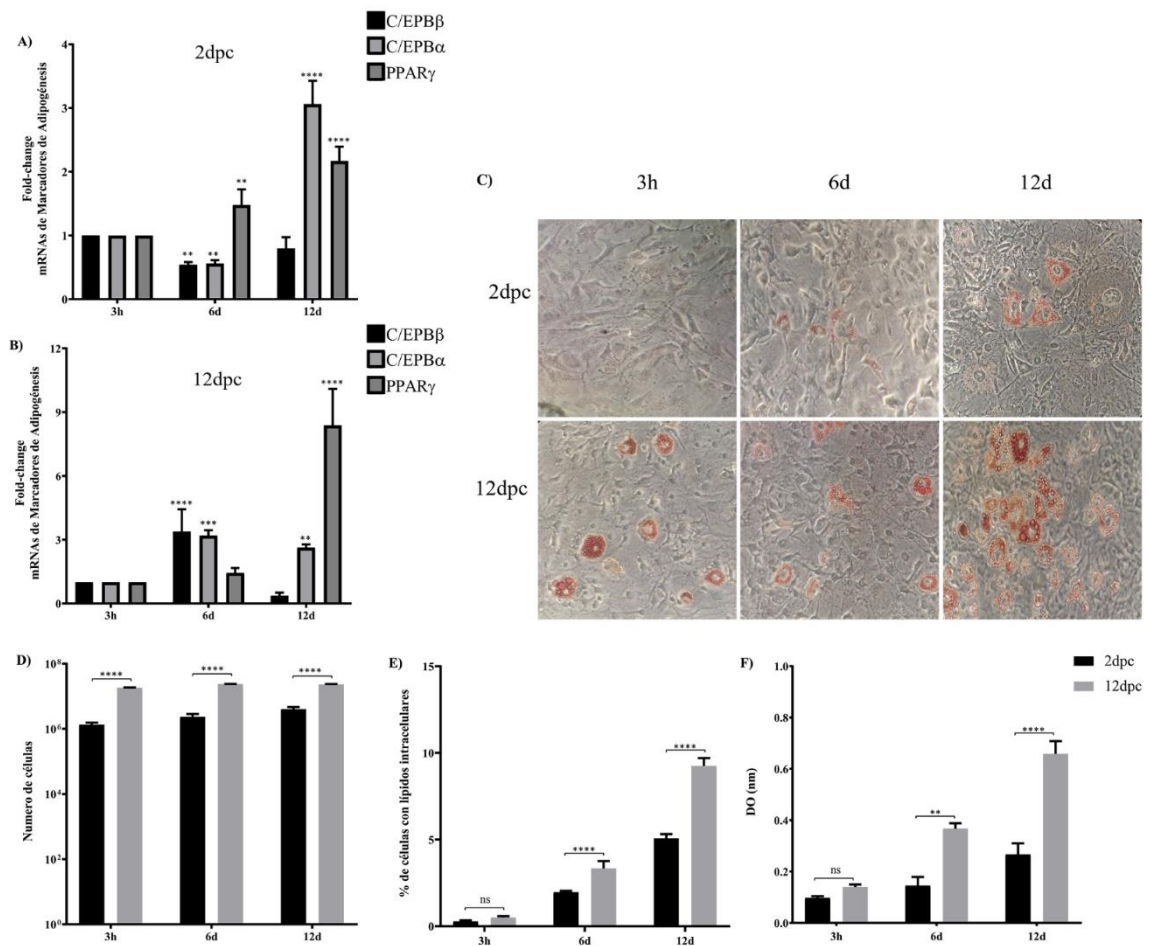


Figura 7. Las células 3T3-L1 a los 12 dpc muestran características de preadipocitos comprometidos con la diferenciación. La diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 se indujo por contacto célula-célula y la adición de MDI. Se aisló RNA de células 3T3-L1 a 2 dpc (A) o 12 dpc (B), y se analizaron los niveles de expresión de C/EBPβ, C/EBPα y PPARγ mediante RT-qPCR. La acumulación de lípidos intracelulares se observó mediante tinción con ORO y microscopía de campo claro (C). El número de células se midió utilizando una cámara de Neubauer (D). Los cambios en el porcentaje de células con acumulación de lípidos se contaron mediante tinción con ORO y microscopía de campo claro (E), y la cantidad relativa de acumulación de lípidos se determinó por elución de la tinción ORO, medida a una densidad óptica (DO) de 510 nm (F). Todos los valores representan la media de dos experimentos independientes, medidos en duplicados técnicos. Las diferencias significativas de cada punto de tiempo en relación con 3 h (A, B) y entre cada grupo de tiempo (D-F) se indican mediante ** $p < 0,005$. *** $p < 0,0005$. **** $p < 0,00001$. ns, no significativo.

Utilizando el mismo diseño experimental, procedimos a evaluar las condiciones bajo las cuales las células 3T3-L1 son susceptibles a la infección con HAdV-D36. Las células 3T3-L1, suplementadas con MDI a los 2 dpc y 12 dpc, fueron infectadas con una MOI de 5 UFP/célula. Se aisló DNA y RNA para determinar los niveles de expresión de los genes virales tempranos y tardíos, así como la replicación del DNA viral y la producción de progenie a diferentes tiempos después de la infección (3 horas, 6 días y 12 días). Se seleccionaron el gen viral temprano E1A, y el gen viral tardío hexón, ya que la expresión de E1A es necesaria para inducir la expresión de todos los genes virales, mientras que la expresión de hexón ocurre después del inicio de la replicación del DNA viral [47].

Se observaron niveles muy bajos y transitorios de mRNA viral en células infectadas a los 2 dpc, y no se detectó replicación de DNA viral, ni producción de progenie viral, lo cual coincide con resultados previos (datos no mostrados) [72]. En cambio, se observó un aumento en los niveles mRNA de E1A y hexón cuando las células fueron infectadas a los 12 dpc. Algo que resulta interesante, es que los niveles

de mRNA de E1A y hexón, así como el DNA viral, alcanzaron su punto máximo a los 6 días post-infección, y aunque la producción de progenie viral continuó acumulándose hasta los 12 días post-infección, no aumentó significativamente después de los 6 días (Figura 8A-8D). Estos resultados indican que las células 3T3-L1 tratadas con MDI a 2 dpc son susceptibles a la infección, pero solo las células tratadas con MDI durante 12 días (es decir que están comprometidas a la diferenciación a adipocito) son permisivas para la replicación viral productiva. También se observaron diferencias significativas en los patrones de expresión de los genes C/EBP β , C/EBP α y PPAR γ entre las células infectadas a los 2 dpc y 12 dpc (Figura 8E, 8F). Se detectaron niveles elevados de C/EBP β a los 12 días post-infección en las células infectadas a los 2 dpc, pero no se observó un aumento en los niveles de PPAR γ . En contraste, se observaron niveles más altos de PPAR γ en las células infectadas a los 12 dpc a los 6 días post-infección, pero la acumulación de C/EBP α fue mayor hasta los 12 días post-infección, lo cual difiere del patrón de expresión en las células no infectadas (comparar Figura 7A, 7B con Figura 8E, 8F), por lo que parece que el efecto de HAdV-D36 podría ser en la activación de C/EBP α . Tanto el porcentaje de células que acumularon lípidos intracelulares, como la cantidad total de lípidos aumentaron considerablemente en las células infectadas a los 12 dpc, mientras que el aumento de lípidos en las células infectadas a los 2 dpc fue similar al observado en las células no infectadas (comparar Figura 7C-7F con Figura 8G-8J). Como se mencionó previamente, después de inducir la diferenciación, los preadipocitos experimentan una fase de mitosis post-confluencia con al menos una ronda de replicación de DNA y división celular, seguida de la salida del ciclo celular y nulo crecimiento [74, 75]. En las células infectadas, el número de células a los 2 dpc se duplicó para los 6 dpi y continuaron proliferando. Por el contrario, las células a los 12 dpc solo tuvieron un aumento del 20% sin un aumento adicional a los 12 dpi (Figura 8H y Tabla 4).

Tabla 4. Número de células 3T3-L1 en diferentes tiempos post-infección infectadas con HAdV-D36 a los 2 y 12 dpc

Tiempo post infección	Número de células	
	2dpc	12dpc
3h	1.86 X 10 ⁶	1.42 X 10 ⁷
6d	3.52 X 10 ⁶	1.70 X 10 ⁷
12d	4.00 X 10 ⁶	1.73 X 10 ⁷

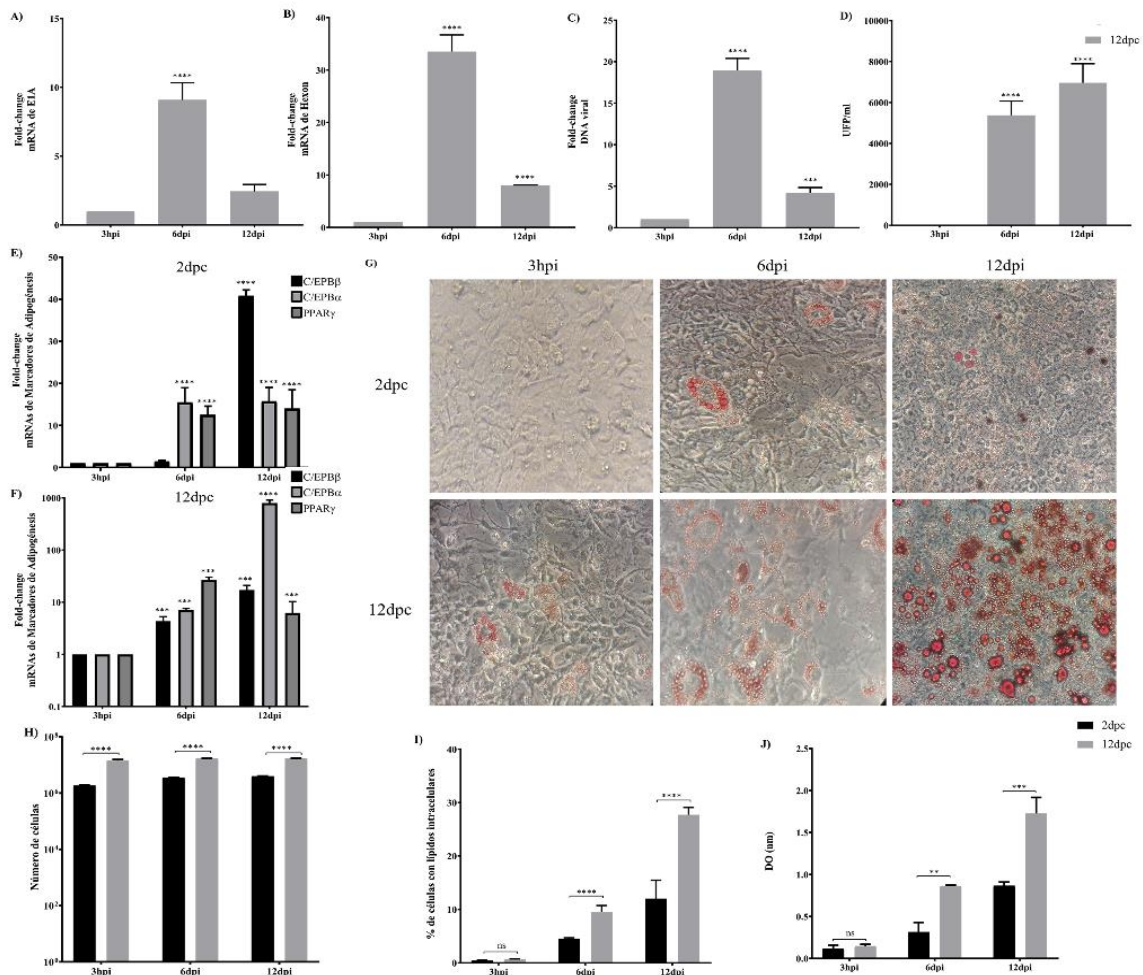


Figura 8. Las células 3T3-L1 a 12 dpc, pero no a 2 dpc, son permisivas para la replicación de HAdV-D36. Se infectaron células 3T3-L1, a los 2 dpc o 12 dpc, con HAdV-D36 en presencia de MDI. Los niveles de expresión de mRNA viral de E1A (A) y Hexón (B) se midieron mediante RT-qPCR. El DNA se aisló y analizó mediante qPCR (C) y la producción de progenie viral se determinó mediante ensayo en placa (D). Los niveles de expresión de C/EBPβ, C/EBPα y PPARγ se midieron mediante RT-qPCR (E, F). La acumulación de lípidos intracelulares se observó mediante tinción con ORO y microscopía de campo claro (G). El número de células se determinó utilizando una cámara de Neubauer (H) y el cambio en el porcentaje de células con acumulación de lípidos en presencia de MDI se determinó usando la tinción con ORO y microscopía de campo claro (I), la acumulación de lípidos se determinó por elución de la tinción del colorante ORO, medido a una densidad óptica (DO) de 510 nm (J). Los valores representan la media de dos experimentos independientes, medidos en duplicados técnicos. Los datos se expresan como la media y las barras de error representan las desviaciones estándar. Diferencias significativas de cada punto de tiempo relativo a 3h (A–F) y entre 2 y 12 dpc en cada punto de tiempo (H–J) se indican con ** $p < 0,005$. *** $p < 0,0005$. **** $p < 0,00001$. Ns: no significativo. hpi: horas postinfección. dpi: días postinfección.

6.1.2 Se requiere el compromiso a adipocito para que las 3T3-L1 permitan la replicación productiva de HAdV-D36.

Los resultados previos indican la importancia del compromiso a la diferenciación de los adipocitos en la replicación viral productiva de HAdV-D36, y sugieren que el impacto de la infección por HAdV-D36 en la adipogénesis puede ser más significativo cuando las células están comprometidas a adipocito. Por lo tanto, decidimos comparar los niveles de mRNA de C/EBPβ, C/EBPα y PPARγ, así como los niveles de lípidos, en células 3T3-L1 no infectadas (MK) y células 3T3-L1 infectadas con HAdV-D36 a los 12 dpc (comprometidas a diferenciación), tanto en ausencia (Figura 9) como en presencia de MDI (Figura 10). Las células se cosecharon en diferentes tiempos después de la infección: 3 h, 2 d, 6 d, 12 d y 18 d para las células MK y 3 hpi, 2 dpi, 6 dpi, 12 dpi y 18 dpi para las células infectadas. A diferencia de los experimentos anteriores, los puntos de tiempo de 2 y 18 días se incluyeron en estos experimentos

para obtener una mejor comprensión del efecto inicial del MDI, así mismo, se decidió evaluar el efecto de HAdV-D36 en ausencia de MDI, ya que los factores de diferenciación podrían estar favoreciendo el efecto que la infección. Los resultados mostraron patrones complejos en los niveles de mRNAs de C/EBP β , C/EBP α y PPAR γ entre todas las condiciones evaluadas, principalmente en las células infectadas en presencia de MDI, donde se observaron incrementos de 10 a 500 veces en los niveles de los marcadores de adipogénesis (Figura 9A, 9B vs Figura 10A, 10B). En ausencia de MDI, las células MK presentaron un aumento máximo en los niveles de mRNA de C/EBP β y C/EBP α a los 12 días, mientras que los niveles de mRNA de PPAR γ mostraron un ligero aumento a los 6 días, manteniéndose relativamente estables hasta los 18 días. Además, solo alrededor del 10% de las células mostraron acumulación de lípidos a los 18 días (Figura 9C, 9E). Por otro lado, la infección con HAdV-D36 indujo aumentos de aproximadamente 2 y 5 veces en los niveles de mRNA de C/EBP β y C/EBP α , respectivamente, a los 2 días post-infección (Figura 9B). Los niveles de mRNA de PPAR γ aumentaron aproximadamente 2 veces a los 12 días y 30 veces a los 18 días, y alrededor del 40% de las células mostraron acumulación de lípidos en estos tiempos (Figura 9E, 9F).

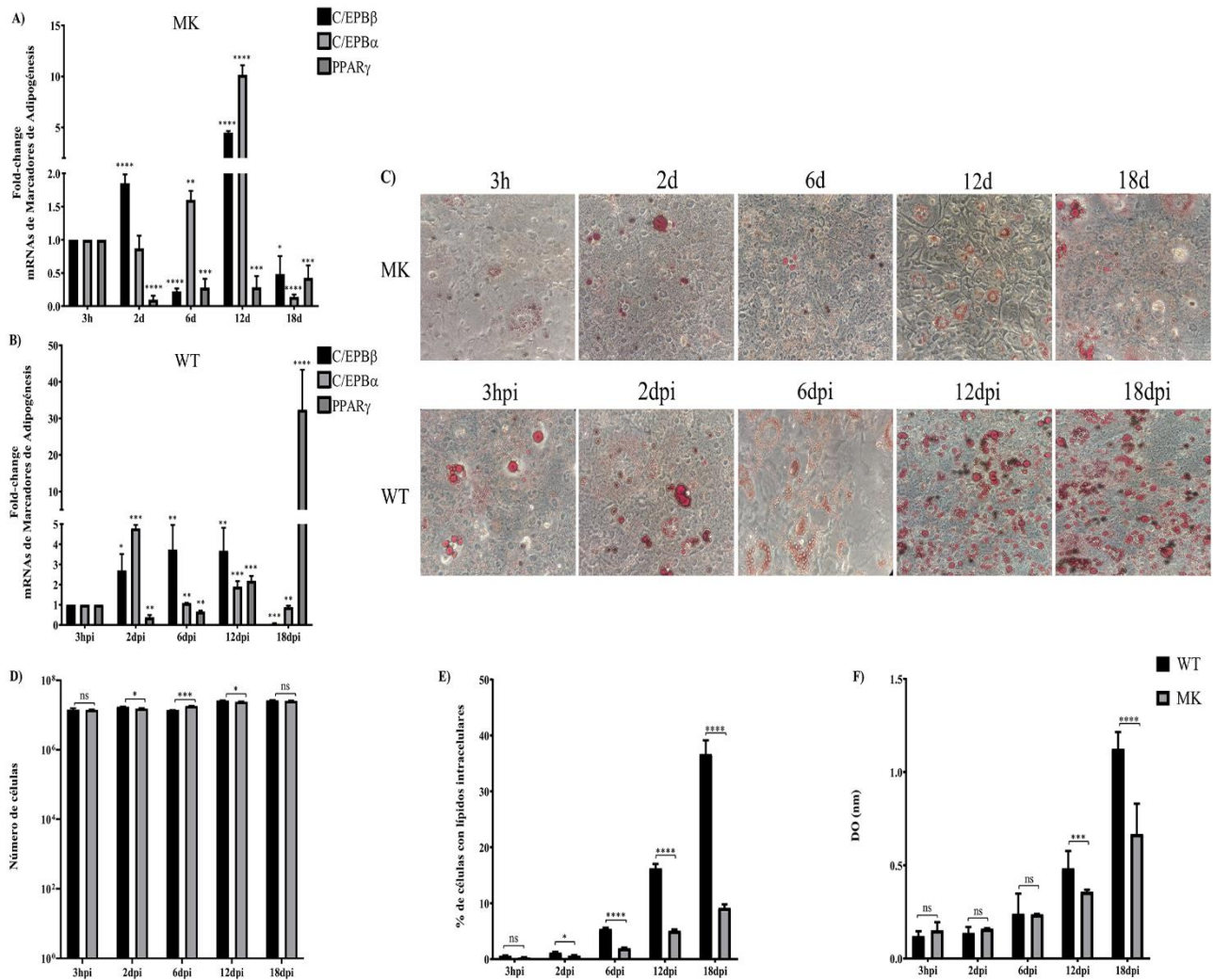


Figura 9. La infección por HAdV-D36 aumenta la adipogénesis en las células 3T3-L1. Las células 3T3-L1 a los 12 dpc se infectaron con HAdV-D36 sin inductores de diferenciación de adipocitos (MM) y los niveles de expresión de C/EBP β , C/EBP α y PPAR γ se analizaron mediante RT-qPCR (A, B). La acumulación de lípidos intracelulares se observó mediante tinción con ORO y microscopía de campo claro (C) y el número de células se determinó utilizando una cámara de Neubauer (D). El porcentaje de

células con acumulación de lípidos intracelulares se contó usando tinción ORO y microscopía de campo claro (E) y la acumulación de lípidos se determinaron por elución de la tinción ORO, medido por densidad óptica (DO) a 510 nm (F). Los datos se expresan como la media y las barras de error representan las desviaciones estándar del duplicado de 2 experimentos independientes. Las diferencias significativas de cada punto de tiempo en relación con 3h (A, B) y entre células Mock e infectadas con HAdV-D36 en cada punto de tiempo (DF) se indican mediante * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$. *** $p < 0,0005$. **** $p < 0,00001$. ns, no significativo.

Como se esperaba, cuando se aplicó MDI a células no infectadas, se observó un aumento significativo en los niveles de C/EBP β y C/EBP α , así como un aumento de aproximadamente 7 veces en los niveles de mRNA de PPAR γ a los 12 días (Figura 10A), y alrededor del 20% de las células mostraron acumulación de lípidos (Figura 10C, 10E). Sin embargo, se observó un aumento mucho más pronunciado en los niveles de mRNA de C/EBP β , C/EBP α y PPAR γ en las células infectadas con HAdV-D36 (Figura 10B) donde casi el 80% de las células acumuló lípidos intracelulares (Figura 10E) y lípidos totales hasta dos veces más altos (Figura 10F), confirmando que el efecto adipogénico más marcado se indujo en presencia de MDI, en las células infectadas a los 12 días, lo que corresponde a un estado de compromiso de diferenciación a adipocito.

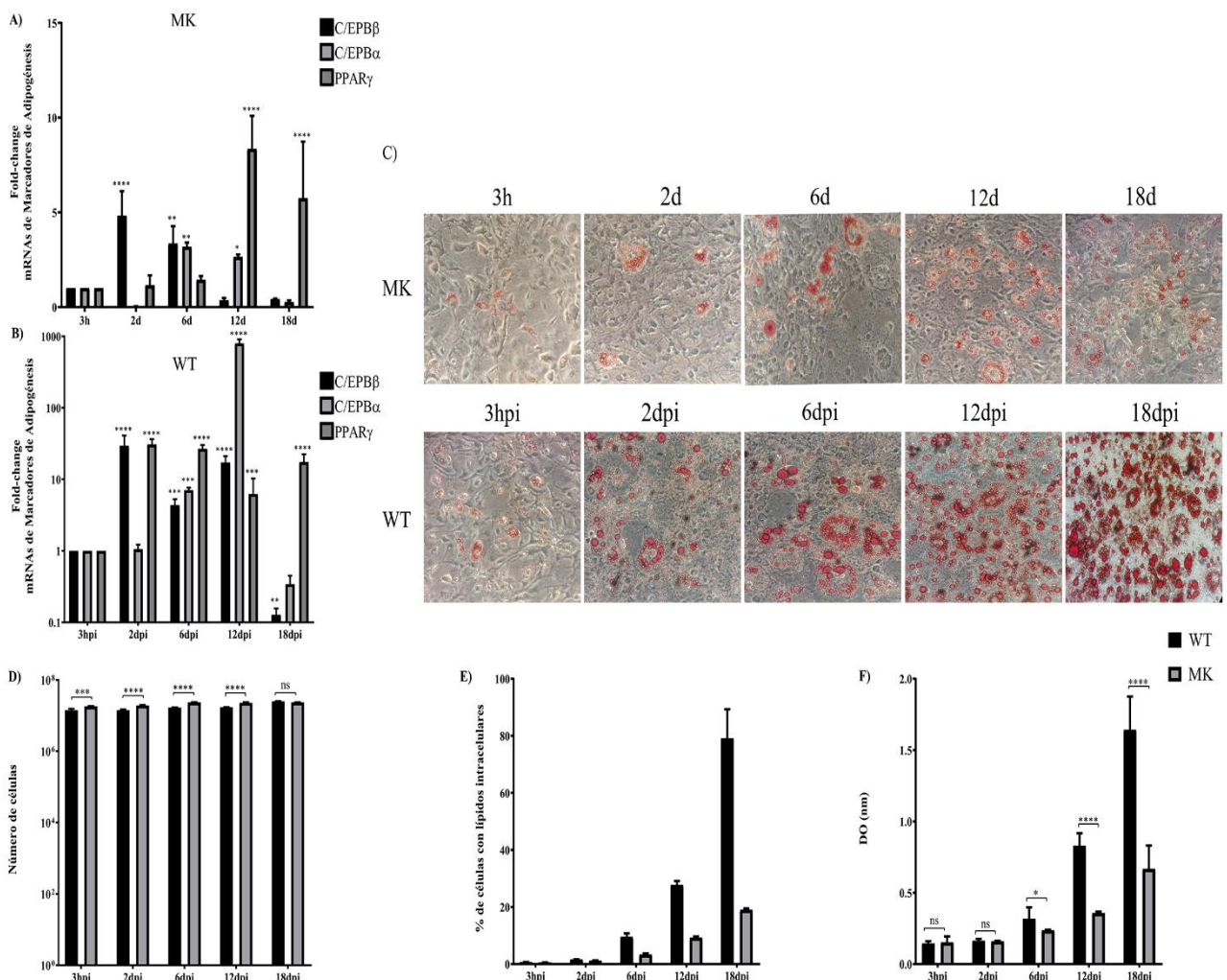


Figura 10. El efecto de HAdV-D36 sobre la adipogénesis de 3T3-L1 se potencia por los inductores de diferenciación de adipocitos. Para evaluar el efecto de la infección sobre células 3T3-L1 a los 12 dpc cultivadas en MDI, se infectaron células 3T3-L1 a 12 dpc con HAdV-D36 en presencia de inductores de diferenciación de adipocitos (MDI) y se analizaron los niveles de expresión de C/EBP β , C/EBP α y PPAR γ mediante RT-qPCR (A, B). La acumulación de lípidos intracelulares se observó mediante tinción con ORO y microscopía de campo claro (C). El número de células se midió utilizando una cámara de Neubauer (D). El porcentaje de células con lípidos intracelulares en presencia de MDI se determinó mediante tinción ORO y microscopía de campo claro (E) y la acumulación de lípidos se determinó por elución de la tinción con ORO, medida por densidad óptica (DO) a 510 nm (F).

nm (F). Los valores representan la media de dos experimentos independientes, medidos en duplicados técnicos. Los datos se expresan como la media y las barras de error representan las desviaciones estándar. Las diferencias significativas de cada punto de tiempo en relación con 3h (A, B) y entre células infectadas con Mock y HAdV-D36 en cada punto de tiempo (DF) se indican mediante * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$. *** $p < 0,0005$. **** $p < 0,00001$. ns, no significativo.

De acuerdo con los resultados descritos en la Figura 8 y como lo demuestran resultados previos [72], se observaron niveles apenas detectables y transitorios de mRNA de E1A y hexón, y no se detectó replicación de DNA viral, ni producción de progenie en las células 3T3-L1 infectadas a los 2 dpc en presencia de MDI. Con el fin de evaluar el impacto de la fase de diferenciación de los adipocitos en la replicación productiva de HAdV-D36, llevamos a cabo mediciones de mRNA virales, temprano (E1A), intermedio (IVa2) y tardío (hexón), replicación de DNA viral y producción de progenie viral en células 3T3-L1 infectadas a los 12 dpc (en un estado de compromiso a adipocito), con o sin MDI. Se incluyó el mRNA de IVa2 en estos experimentos debido a que la proteína IVa2 es necesaria para la transición de la fase temprana a la tardía de la replicación de adenovirus, así como para la activación de los genes virales tardíos, los cuales dependen de una replicación activa del DNA viral durante la replicación productiva del virus. Siguiendo la misma estrategia experimental, se cosecharon células infectadas con HAdV-D36 a una MOI = 5 UFP/célula a las 3 horas y a los 2, 6, 12 y 18 dpi (Figura 11). En ausencia de MDI (Figura 11A-11D, barras negras), la acumulación de mRNA de E1A fue muy baja y transitoria, seguida de un aumento en la expresión de IVa2, que alcanzó el nivel máximo a los 6 dpi y luego fue seguido por la acumulación de mRNA de hexón, que alcanzó el nivel máximo a los 12 dpi. Se observaron niveles más bajos de mRNA y DNA viral comparados con los niveles detectados en presencia de MDI, sin embargo, estos niveles fueron suficientes para respaldar la producción de progenie viral, la cual se detectó inicialmente a los 6 dpi y alcanzó el punto máximo a los 12 dpi (Figura 11E, barras negras). En presencia de MDI (Figura 11A-11D, barras grises) se observaron niveles de mRNA virales de 2 a 5 veces más altos, alcanzando el nivel máximo a los 6 dpi, y mostrando un patrón de acumulación similar al DNA viral (Figura 11D, barras grises). Sin embargo, este aumento en la acumulación de mRNA virales no se vio reflejado en la producción de progenie (Figura 11E, barras grises), la cual fue detectable hasta 6 dpi. Estos resultados confirman que la expresión de genes virales y la replicación del DNA alcanzan su punto máximo cuando se alcanzan niveles más altos de RNA de C/EBP α y PPAR γ (Figura 10B), y que las células 3T3-L1 comprometidas a adipocitos apoyan la replicación viral productiva de HAdV-D36, con un mayor efecto en el aumento de la adipogénesis.

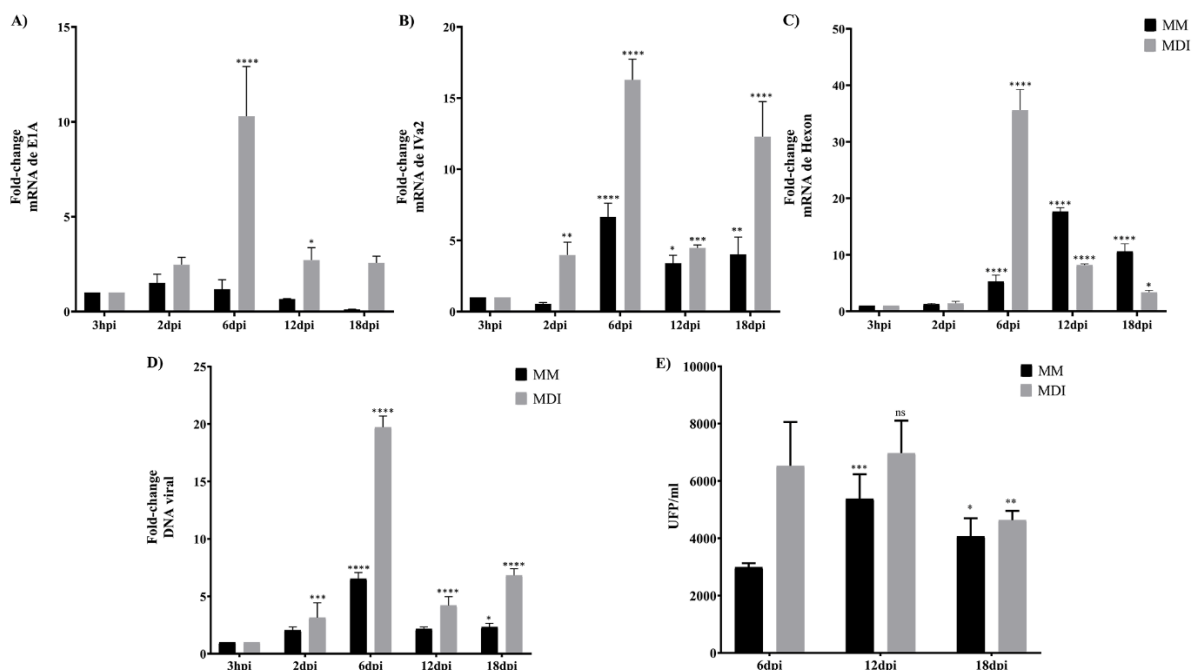


Figura 11. La replicación productiva de HAdV-D36 ocurre solo en células 3T3-L1 comprometidas a adipocito. Las células 3T3 con o sin inductores de diferenciación de adipocitos (MDI o MM) se infectaron 12 dpc y el RNA y el DNA se purificaron como se describe en materiales y métodos. Los niveles de expresión de E1A (A), IVa2 (B) y Hexón (C) se midieron mediante RT-qPCR y el DNA mediante qPCR (D). La producción de progenie viral se determinó por ensayo en placa (E). Los valores representan la media de dos experimentos independientes, medidos en duplicados técnicos y los datos se expresan como la media y las barras de error representan las desviaciones estándar. Las diferencias significativas de cada punto de tiempo en relación con 3h (A-D) y con relación a 6 dpi (E) se indican mediante * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$. *** $p < 0,0005$. **** $p < 0,00001$. ns, no significativo.

6.1.3 La infección por HAdV-D36 promueve el metabolismo de la glucosa a través de genes blanco de MYC.

Los cambios metabólicos inducidos por HAdV que contribuyen al efecto adipogénico de la infección están asociados con una mayor activación transcripcional de los genes glucolíticos regulados por MYC [25, 76, 77]. Por lo tanto, decidimos determinar si la activación de los genes diana de MYC involucrados en el metabolismo de la glucosa requiere condiciones favorables en las células infectadas que permitan una replicación viral eficiente. Para ello, medimos los niveles de mRNA de los genes blanco de MYC, hexocinasa (Hk), fosfofructocinasa (PFk), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y lactato deshidrogenasa (LDHA), en células 3T3-L1 MK e infectadas con HAdV-D36 a los 12 dpc, en presencia (MDI) o ausencia (MM) de inductores de diferenciación de adipocitos. Utilizamos los mismos tiempos post-infección que en los experimentos anteriores. En células MK, en ausencia de MDI, se observaron variaciones relativamente pequeñas en los niveles de mRNA durante 30 días de cultivo celular (12 dpc + 18 días), excepto por un aumento inesperado de 6 veces en el nivel de mRNA de Hk-2 en el día 12 (Figura 12A). Por otro lado, la presencia de MDI en las células MK indujo un aumento progresivo y rápido de 5 a 50 veces en los niveles de mRNA (Figura 12C), como era de esperarse para respaldar las demandas energéticas y biosintéticas de la diferenciación de adipocitos y la acumulación de lípidos (Figura 7). Los factores de diferenciación de adipocitos mostraron un efecto claro en el aumento de Hk-2 y LDHA a los 6 días, y los cuatro mRNA aumentaron al menos 10 veces a

los 18 días. Sin embargo, el efecto de la infección en los niveles de mRNA de los genes glucolíticos fue aún mayor que el efecto propio del MDI (Figura 12D). A los 2 dpi, se observaron niveles aproximadamente 10 veces más altos de Hk-2 y Pfk-2, y los cuatro mRNA aumentaron entre 15 y 150 veces a los 6 dpi. Los niveles de Hk-2, Pfk, GAPDH y LDHA aumentaron entre 50 y 100 veces, alcanzando niveles máximos que coincidieron con la expresión de genes virales y la replicación del DNA (Figuras 11A-D), así como con los niveles más altos de C/EBP α y PPAR γ (Figura 10B). Estos resultados sugieren que el compromiso de los adipocitos, que es necesario para respaldar la replicación productiva de HAdV-D36 está correlacionado con la activación dependiente de MYC del metabolismo de la glucosa.

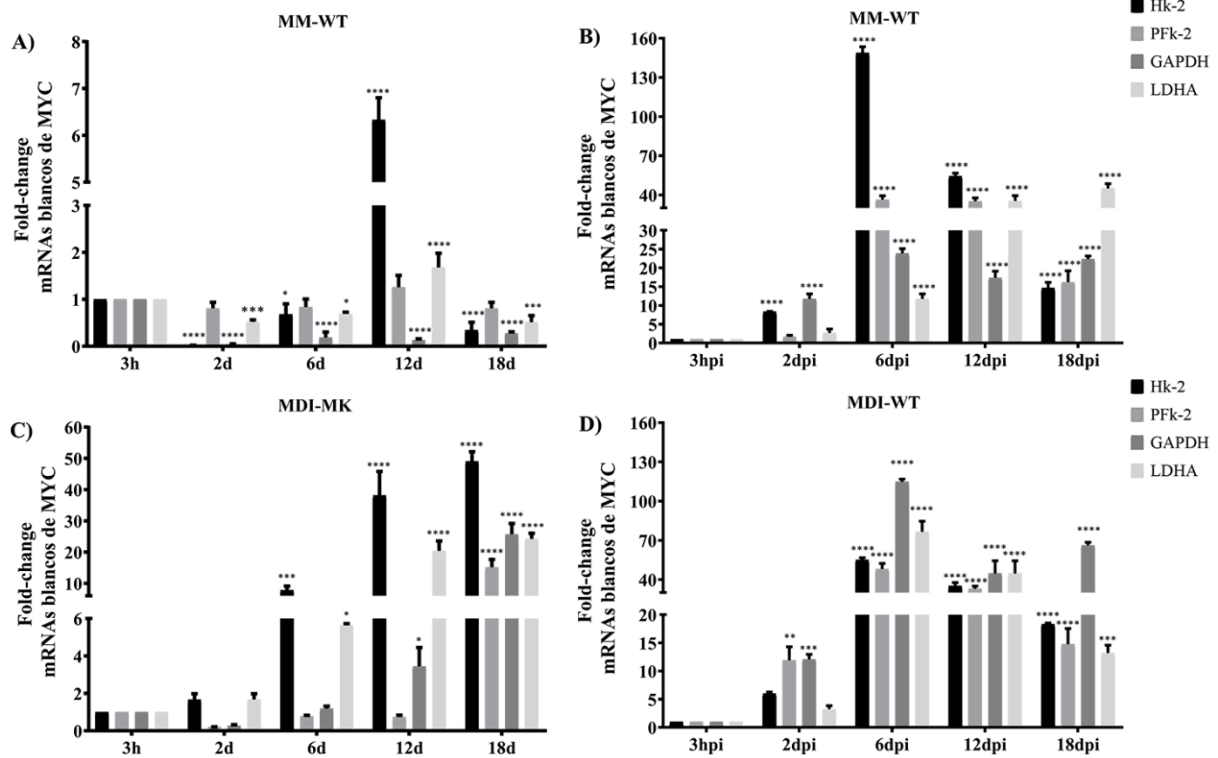


Figura 12 La infección de HAdV-D36 de células comprometidas a adipocitos promueve la expresión de genes glucolíticos blanco de MYC. Para determinar el efecto de la infección en los genes blanco de MYC, las células 3T3-L1 a 12 dpc se infectaron con HAdV-D36 (B, D) sin inductores de diferenciación de adipocitos (MM) (A, B) o con (MDI) (C, D) y los niveles de expresión de hexocinasa (Hk), fosfofructocinasa (Pfk), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y lactato deshidrogenasa (LDHA) se midieron mediante RT-qPCR y se compararon con células no infectadas (A, C). Todos los valores representan la media de dos experimentos independientes, medidos en duplicados técnicos. Los datos se expresan como la media y las barras de error representan las desviaciones estándar. Las diferencias significativas de cada punto de tiempo en relación con 3 h se indican mediante * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$. *** $p < 0,0005$. **** $p < 0,00001$. ns, no significativo.

6.2 La proteína E4Orf1 no es necesaria para el efecto adipogénico de HAdV-D36.

(Artículo en preparación)

Como se mencionó anteriormente, hasta la fecha, la alteración del metabolismo celular causada por HAdV-D36 se ha asociado exclusivamente a la proteína E4Orf1. Sin embargo, es importante destacar que estos hallazgos se basan en estudios realizados en células que fueron transfectadas o en cultivos celulares a los que se les añaden factores de diferenciación de adipocitos. Esto plantea preguntas sobre si los efectos observados se deben a una sobreexpresión artificial de la proteína y si los resultados obtenidos con estas metodologías reflejan fielmente lo que ocurre durante una infección viral natural.

Por lo tanto, es crucial investigar cómo actúa la proteína E4Orf1 durante la infección viral productivo y si los efectos sobre el metabolismo celular son similares o divergentes en comparación con los observados en estudios de sobreexpresión de la proteína. Comprender el impacto de la proteína E4Orf1 durante la infección viral es esencial para obtener una visión completa de los mecanismos subyacentes a la alteración del metabolismo celular inducida por HAdV-D36.

Adicionalmente, existen múltiples evidencias que muestran que al menos la proteína E1A del virus induce la alteración del metabolismo celular [78, 79].

En este estudio, se realizaron experimentos con un virus que no expresa la proteína E4Orf1 con la finalidad de comprender su papel en el ciclo de replicación viral y la regulación del metabolismo de la célula infectada.

6.2.1 La proteína E4Orf1 coopera, pero no es necesaria para el proceso de adipogénesis inducido por HAdV-D36.

Con el fin de determinar el efecto de la proteína E4Orf1 sobre la adipogénesis en células 3T3-L1 que son permisivas a la replicación viral decidimos evaluar

los efectos de la infección por HAdV-D36 con los generados por virus mutante que no expresa la proteína E4Orf1 (HAdV-D36E4Orf1-), siendo estos los primeros estudios en los que se evalúa el efecto de E4Orf1 en el contexto de la infección.

Siguiendo la estrategia experimental anterior, inicialmente, medimos la acumulación de lípidos intracelulares en células 3T3-L1 infectadas con HAdV-D36 Wt o con el virus HAdV-D36E4Orf1- en células 3T3-L1 infectadas tanto en MM (Figura 13) como en MDI (Figura 14). Las células fueron infectadas a los 12 dpc y se recolectaron en diferentes tiempos después de la infección: 3 horas, 2 días, 6 días, 12 días y 18 días. Utilizando el colorante ORO, las células se tiñeron y se observaron al microscopio. Los resultados revelaron un aumento en la acumulación de lípidos en células infectadas con ambos virus en comparación con células no infectadas, tanto en condiciones de MM (Figura 13) como en MDI (Figura 14). Sin embargo, se observó un porcentaje mayor de células con lípidos intracelulares en las células infectadas con el virus HAdV-D36 Wt en comparación con el virus mutante HAdV-D36E4Orf1-.

En las células 3T3-L1 no infectadas cultivadas en MM (Figura 13), se observó que aproximadamente el 10% de las células perdían su morfología de fibroblasto y presentaban un aumento de lípidos a medida que avanzaba el tiempo de cultivo (Figura 13A, primera columna). En contraste, las células infectadas con el virus HAdV-D36 Wt (Figura 13A, segunda columna) mostraron un aumento significativo en la presencia de células teñidas a partir del segundo día después de la infección (2 dpi). A los 18 dpi, aproximadamente el 40% de las células tenían lípidos intracelulares, lo cual representa aproximadamente 4 veces más en comparación con las células Mk (Figura 13B) y el doble en

comparación con el virus HAdV-D36E4Orf1- (Figura 12C). Al comparar el número de células con lípidos entre el virus HAdV-D36E4Orf1- y las células Mk, se observó que, a partir de 6 dpi, el número de células con lípidos se duplicó y la cantidad total de lípidos aumentó el 50%. Estos hallazgos indican que, en condiciones de MM (en ausencia de suplementos de diferenciación), la proteína E4Orf1 favorece la acumulación de lípidos intracelulares, pero no es necesaria para el efecto adipogénico de HAdV-D36, lo que sugiere que otro(s) producto(s) viral(es) está(n) involucrado(s) en el efecto adipogénico del virus.

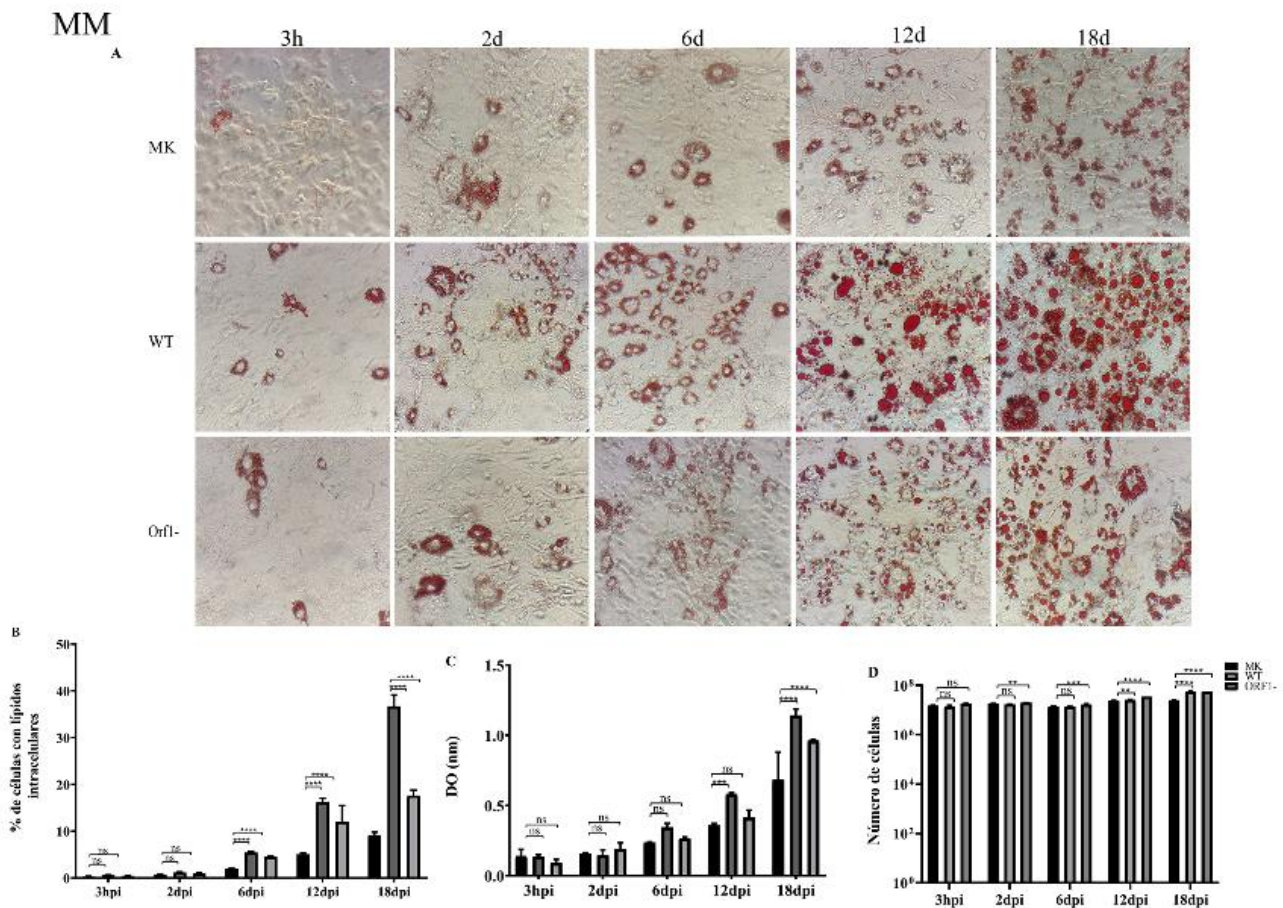


Figura 13. La proteína E4Orf1 coopera, pero no es necesaria para el proceso de adipogénesis inducido por HAdV-D36. Las células comprometidas 3T3-L1 se infectaron con HAdV-D36 y el efecto sobre la acumulación intracelular de lípidos se comparó con las células comprometidas 3T3-L1 infectadas con HAdV-D36E4Orf1- en mínimos medios. La acumulación de lípidos intracelulares se observó mediante tinción con ORO y microscopía de campo claro (A). Los cambios en el porcentaje de células con acumulación de lípidos se calcularon utilizando tinción ORO y microscopía de campo claro (B) y mediante la elución de la tinción ORO, se determinó la cantidad relativa de acumulación de lípidos medidas a 510 nm de densidad óptica (DO) (C). El número de células se determinó utilizando una cámara de Neubauer (D). Todos los valores representan lo medido en duplicados técnicos. Los datos se expresan como la media y las barras de error representan las desviaciones estándar de la media de dos experimentos independientes y las diferencias significativas de cada punto de tiempo relativo a 3h se indican mediante ** $p < 0,005$. *** $p < 0,0005$. **** $p < 0,00001$. ns, no significativo.

Como era de esperarse, en los experimentos en presencia de MDI (Fig. 14), se observó un aumento significativo en la acumulación de lípidos intracelulares en las células no infectadas (Figura 14A, primera fila), ya que se encontró un aumento de hasta un 20% en la cantidad de lípidos a los 18 d. Sin embargo, se observó un incremento mucho más pronunciado en la acumulación de lípidos en las células infectadas con el virus HAdV-D36 (Figura 14A, segunda fila), donde más del 80% de las células presentaron lípidos intracelulares (Figura 14B) y la cantidad total de lípidos fue casi 3 veces mayor

(Figura 14C). Las células infectadas con el virus HAdV-D36E4Orf1- mostraron aproximadamente un 50% más de lípidos intracelulares en comparación con las células Mk y un 50% menos en comparación con el virus Wt (Figura 14E).

MDI

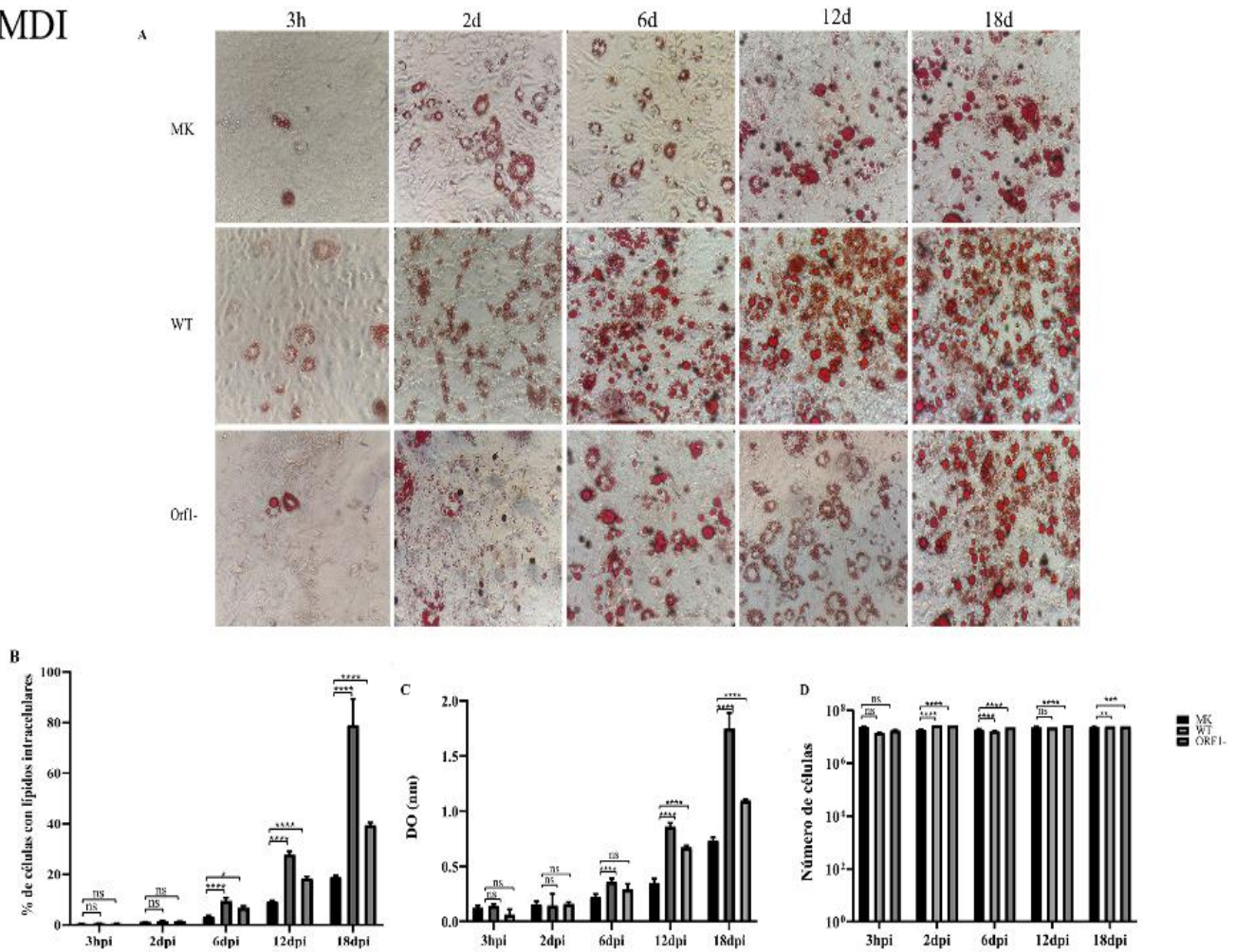


Figura 14. En presencia de MDI, E4Orf1 potencia la acumulación intracelular de lípidos. Las células 3T3-L1 comprometidas a adipocito se infectaron con HAdV-D36 y el efecto sobre la acumulación intracelular de lípidos se comparó con las células infectadas con HAdV-D36E4Orf1- en MM. La acumulación de lípidos intracelulares se observó mediante tinción con ORO y microscopía de campo claro (A). Los cambios en el porcentaje de células con acumulación de lípidos se calcularon utilizando tinción ORO y microscopía de campo claro (B) y mediante la elución de la tinción ORO se determinó la cantidad relativa de acumulación de lípidos medida por densidad óptica (DO) a 510 nm (C). El número de células se determinó utilizando una cámara de Neubauer (D). Todos los valores representan la media de dos duplicados técnicos. Los datos se expresan como la media y las barras de error representan las desviaciones estándar de la media de dos experimentos independientes y las diferencias significativas de cada punto de tiempo relativo a 3 h se indican mediante **p < 0,005. *** p < 0,0005. **** p < 0,00001. ns, no significativo.

6.2.2 E4Orf1 altera el patrón de expresión de C/EBP α , C/EBP β y PPAR- γ .

En conjunto, los resultados descritos anteriormente sugieren que la proteína E4Orf1 no es necesaria para inducir la acumulación de lípidos. Sin embargo, aún se desconoce el papel específico que podría desempeñar la proteína E4Orf1 en la adipogénesis en el contexto de un ciclo de replicación productivo. Por lo tanto, para determinar el efecto de E4Orf1 sobre la adipogénesis, medimos los niveles de expresión de C/EBP β , C/EBP α y PPAR γ en células 3T3-L1 infectadas con HAdV-D36 Wt o HAdV-D36E4Orf1- en presencia o ausencia de MDI (Figura 15). Siguiendo la misma estrategia experimental,

las células se cosecharon en diferentes tiempos post-infección: 3 h, 2 d, 6 d, 12 d y 18 d para las células MK y 3 hpi, 2 dpi, 6 dpi, 12 dpi y 18 dpi para células infectadas. Al igual que los datos obtenidos en las Figuras 9 y 10, los patrones de expresión de C/EBP β , C/EBP α y PPAR γ fueron muy complejos en cada una de las condiciones evaluadas. En ausencia de MDI (Figura 15 A-C) la infección con HAdV-D36 Wt indujo un aumento significativo a partir de los 2 dpi en los niveles de mRNAs de C/EBP β y C/EBP α , de aproximadamente 2 y 10 veces, respectivamente (Figura 15A). Además, los niveles de PPAR γ aumentaron aproximadamente 40 veces a los 6 dpi y se mantuvieron altos, indicando un estado de adipocito maduro. Por otro lado, en ausencia de la proteína E4Orf1, se observó un nivel hasta 10 veces menor en la expresión de C/EBP α y PPAR γ en comparación con el virus WT (Figura 15B). Sin embargo, al comparar la expresión de C/EBP β , C/EBP α y PPAR γ entre HAdV-D36E4Orf1- y células MK (Figura 15C), se encontró un aumento de casi 10 veces en los niveles de C/EBP β y PPAR γ a los 6 dpi.

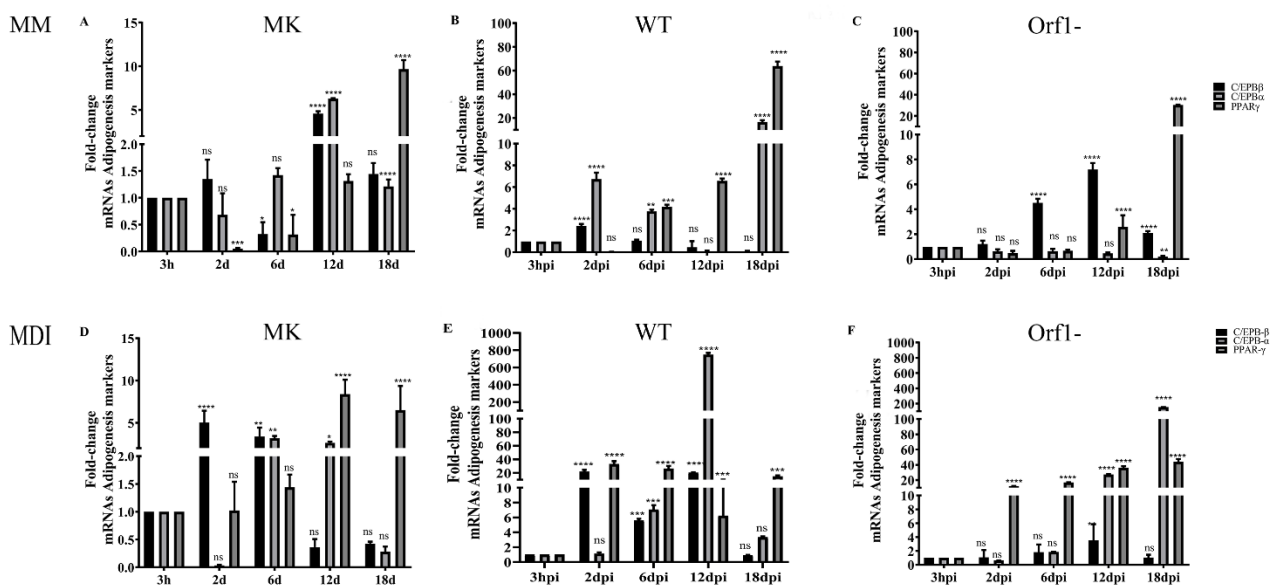


Figura 15. E4Orf1 promueve la maduración de los adipocitos. Se infectaron células 3T3-L1 con HAdV-D36 Wt o HAdV-D36E4Orf1- en presencia (D-F) o ausencia (A-C) de inductores de diferenciación de adipocitos y los niveles de C/EBP β , C/EBP α y PPAR γ se midieron usando RT-qPCR y la expresión de estos genes se comparó con células no infectadas (A y D). Los datos se expresan como la media y las barras de error representan las desviaciones estándar de la media de dos experimentos independientes y todos los valores representan la media de dos duplicados técnicos. Las diferencias significativas de cada punto de tiempo en relación con 3h se indican mediante * $p < 0,005$. ** $p < 0,0005$. **** $p < 0,00001$. ns: no significativo. MM: medio de mantenimiento. MDI: Medio de diferenciación.

En presencia de MDI, se observó un incremento significativo en los niveles de mRNA de C/EBP β , C/EBP α y PPAR γ en las células infectadas con HAdV-D36 en comparación con las células infectadas con HAdV-D36E4Orf1- y Mk (Figura 15D, 15E y 15F, respectivamente). Al igual que los resultados mostrados antes (Figura 10B), se observó un aumento en el patrón de expresión desde los 2 dpi principalmente en C/EBP α y PPAR γ . En contraste, la infección viral en ausencia de la proteína E4Orf1 indujo menores niveles de expresión tanto de C/EBP β y C/EBP α , así como de PPAR γ (Figura 15F). En conjunto, los resultados sugieren que la proteína E4Orf1 no es indispensable para inducir la adipogénesis.

6.2.3 La proteína E4Orf1 participa en la última fase del ciclo de replicación de HAdV-D36.

De acuerdo con los resultados descritos en la Figura 11, determinamos que las células 3T3-L1 comprometidas a la diferenciación son permisivas a la infección y a un ciclo de replicación productivo de HAdV-D36, por lo que nos propusimos evaluar el impacto de la E4Orf1 en el ciclo de replicación viral. Para ello, se siguió la misma estrategia experimental y se midieron los mRNA virales, temprano (E1A), intermedio (IVa2) y tardío (Hexón), la replicación de DNA viral y la producción de progenie viral en células 3T3-L1 infectadas en un estado de compromiso a adipocito, con o sin MDI (Figura 16).

En las células infectadas con HAdV-D36 Wt en ausencia de MDI, se observaron niveles bajos de mRNA y DNA virales (Figura 16, barras negras). Cuando las células se infectaron con HAdV-D36E4Orf1-, los niveles de los genes virales fueron aún más bajos, excepto para los niveles de Hexón a los 18 dpi (Figura 16C). Por otro lado, en presencia de MDI, se observaron niveles más altos de los mRNA evaluados en células infectadas con HAdV-D36 Wt, excepto para Hexón 18 dpi. Los niveles de mRNA viral son menores en HAdV-D36E4Orf1-, pero son suficientes para detectar síntesis de DNA viral (Figura 16D). Sin embargo, la síntesis de DNA viral aumenta hasta tres veces en presencia de la proteína E4Orf1. La producción de progenie viral de HAdV-D36 Wt, que se detectó inicialmente a los 6 dpi y alcanzó su punto máximo a los 12 dpi (Figura 16E), fue hasta un 50% mayor en comparación con el virus HAdV-D36E4Orf1- en MM y hasta 2 veces mayor cuando se añadió MDI. Sin embargo, para los 18 dpi, la producción de progenie fue similar.

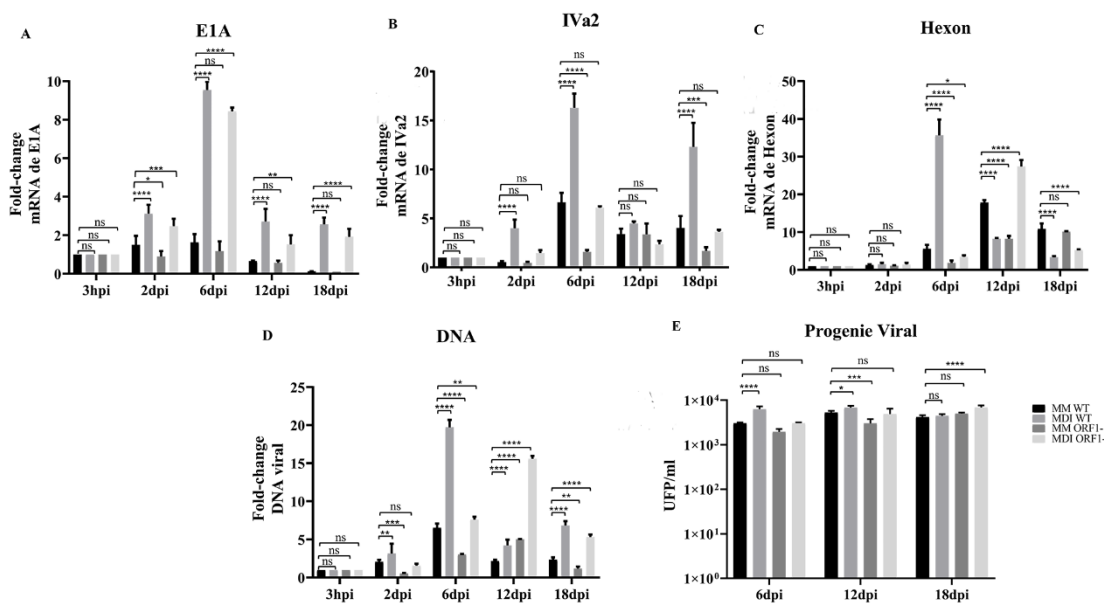


Figura 16. La ausencia de E4Orf1 retrasa el ciclo de replicación de HAdV-D36. Se infectaron células 3T3-L1 en compromiso a diferenciación con HAdV-D36 o HAdV-D36E4Orf1- en presencia (MDI) o ausencia (MM) de inductores de diferenciación de adipocitos y se aisló RNA y DNA. Los niveles de E1A (A), IVa2 (B) y Hexón (C) se midieron por RT-qPCR y el DNA por qPCR (D). La producción de progenie viral se determinó mediante ensayo de placas (E). Los primers se diseñaron para hibridarse en las uniones exón-exón para medir el mRNA maduro y las uniones intrón-exón para medir el DNA. Los datos se expresan como la media y las barras de error representan las desviaciones estándar de la media de dos experimentos independientes y todos los valores representan los medidos en duplicados técnicos. Las diferencias significativas de cada punto de tiempo en relación con 3h se indican mediante * $p < 0,005$. *** $p < 0,0005$. **** $p < 0,00001$. ns, no significativo.

En ausencia de E4Orf1, la síntesis de mRNA y DNA virales se retrasó, y la producción de progenie

viral fue menor que en el Wt a los 6 dpi, pero aumentó a los 12 dpi y fue mayor que en el Wt a los 18 dpi. Estos hallazgos sugieren que la diferenciación retrasada de los adipocitos cuando E4Orf1 está ausente favorece la producción de progenie viral. En resumen, estos resultados confirman que la expresión de genes virales y la replicación de DNA viral alcanzan su punto máximo cuando se alcanzan niveles más altos de mRNA de C/EBP α y PPAR γ (Figura 15). La disminución en la activación de estos genes adipogénicos relacionada con E4Orf1 parece comprometer y retrasar la expresión de genes virales hasta que los niveles de C/EBP α y PPAR γ alcanzan valores más altos respaldando así la replicación viral productiva de HAdV-D36 y ejerciendo un mayor efecto en el aumento de la adipogénesis.

6.2.4 La proteína E4Orf1 favorece la activación de la vía de señalización PI3K en células 3T3-L1 infectadas con HAdV-D36.

Como se ha descrito en secciones anteriores, los mecanismos subyacentes a la alteración metabólica y al efecto adipogénico HAdV-D36 se han asociado exclusivamente a la proteína E4Orf1. E4Orf1 interacciona con un conjunto de factores celulares a través de un motivo de unión a dominio PDZ en su extremo Carboxilo terminal [80]. Se sabe que el incremento en adiposidad asociado a E4Orf1 parece depender de la vía de señalización de Ras/PI3K que incrementa receptores de glucosa en membrana plasmática [40]; aumentando la internalización de glucosa a la célula y el posterior aumento de PPAR- γ , que resulta en la diferenciación de las células a adipocitos, pero como se ha señalado, una limitante de estos resultados es que todos se han demostrado fuera del contexto de la infección.

Los resultados descritos en secciones anteriores demostraron que las células 3T3-L1 comprometidas a adipocito son permisivas ya que son capaces de soportar el ciclo de replicación productivo de HAdV-D36. Por lo tanto, decidimos utilizar esas condiciones para evaluar el efecto de la proteína E4Orf1 de HAdV-D36 sobre la vía de PI3K en el contexto de la infección. Se utilizaron lisados de células infectadas con HAdV-D36 Wt o con HAdV-D36E4Orf1- a diferentes tiempos post-infección y se analizaron por Western blot con anticuerpos dirigidos contra AKT total (tAKT), la cual es la segunda proteína de la cascada de PI3K, y AKT fosforilada (pAKT), que es la forma activa de AKT y es la encargada de la señalización de la vía de PI3K.

Cuando las células se crecieron en MM (Figura 17A), se observaron niveles similares de la proteína total (tAKT) en las células infectadas tanto con HAdV-D36 como con HAdV-D36E4Orf1-, en todos los tiempos post-infección. De manera similar, en las células infectadas en presencia de MDI (Figura 17B), se observaron ligeras diferencias en los niveles de tAKT tanto con HAdV-D36 como con HAdV-D36E4Orf1-.

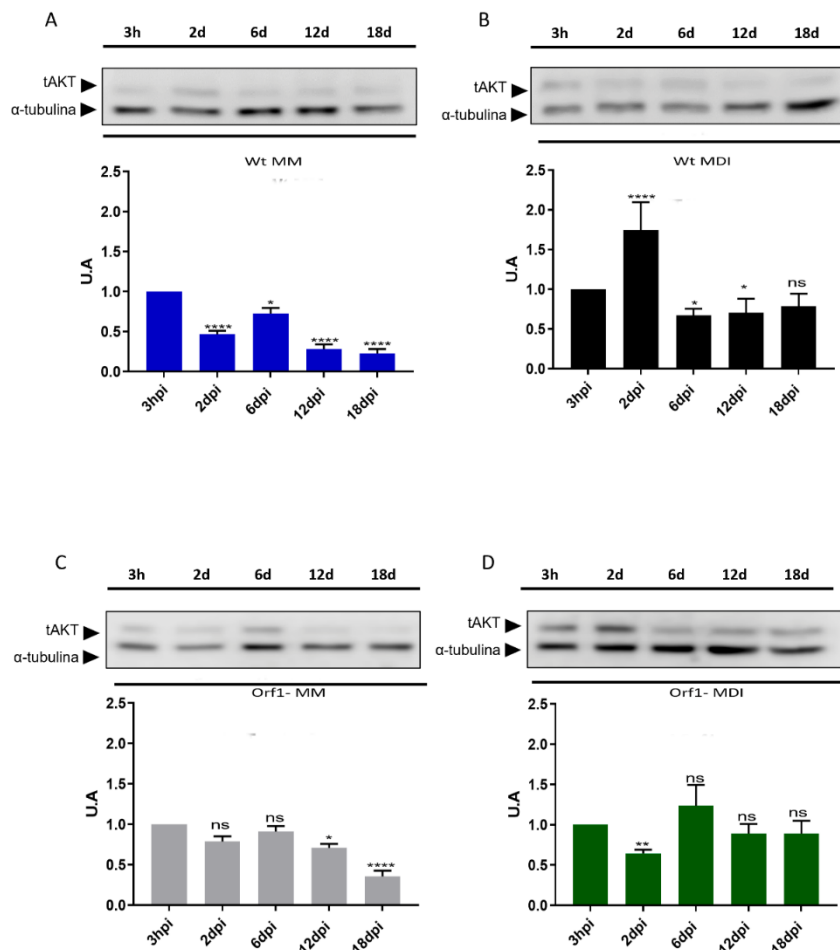


Figura 17. La infección con HAdV-D36 no altera los niveles de tAKT. En el panel A se muestran los niveles cuantificados de tAKT en células 3T3-L1 infectadas con HAdV-D36 en medio MM. En el panel B, se muestran los valores de tAKT en células infectadas con HAdV-D36 Wt en MDI. En el panel C, se muestran los niveles de tAKT en células infectadas con el virus HAdV-D36E4Orf1- en MM y en el panel D, se muestran los niveles de tAKT en células infectadas con el virus HAdV-D36E4Orf1 MDI. Los datos se expresan como la media y las barras de error representan las desviaciones estándar de la media de tres experimentos independientes y todos los valores representan los medidos en duplicados técnicos. Los valores obtenidos se analizaron por densitometría (ImageJ) y se graficaron utilizando el programa Graph Prism. ($P=0.0001$). Los datos fueron normalizados utilizando α -tubulina. Las diferencias significativas de cada punto de tiempo en relación con 3h se indican mediante ** $p < 0,005$. *** $p < 0,0005$. **** $p < 0,00001$. ns, no significativo. U.A: unidades arbitrarias.

En conclusión, los resultados indican que los niveles de tAKT se mantienen estables en células cultivadas en MM y en células infectadas tanto con HAdV-D36 como con HAdV-D36E4Orf1-. Esto sugiere que ni la infección, ni la presencia de E4Orf1 tienen algún efecto sobre la regulación de los niveles de tAK ya que el efecto que se observa parece ser una sumatoria de efectos entre la infección y el MDI.

Posteriormente, se evaluó la fosforilación de AKT (pAKT) y se observó un aumento continuo en la señal de pAKT desde los 2 hasta los 12 dpi, pero a los 18 dpi se registró una disminución del 50% en células infectadas con HAdV-D36 Wt en condiciones de MM (Figura 18A). En células infectadas con HAdV-D36 Wt en presencia de MDI, se observó un aumento del 50% en pAKT a los 2 dpi, manteniéndose hasta los 12 dpi. De manera similar a lo observado en MM, los niveles de pAKT disminuyeron a los 18 dpi.

Al comparar el efecto de la proteína E4Orf1 en células cultivadas en MM (Figura 18C), se

observaron cambios significativos en los niveles de pAKT. Estos datos sugieren que la proteína E4Orf1 podría potenciar la fosforilación de AKT, ya que se observa fosforilación en la proteína, pero esta se mantiene constante durante todos los tiempos de infección evaluados. Además, se encontró que la adición de factores de diferenciación podría reemplazar el efecto de E4Orf1, ya que al medir la fosforilación de AKT en células cultivadas en MDI e infectadas con el virus que no expresa E4Orf1 (Figura 18D), se observó un aumento de la fosforilación a los 2 dpi, seguido de una disminución del 15% a los 6 dpi y una disminución continua del 30% a los 12 dpi. Curiosamente, a diferencia de lo observado anteriormente, se observó un aumento en la fosforilación de AKT a los 18 dpi.

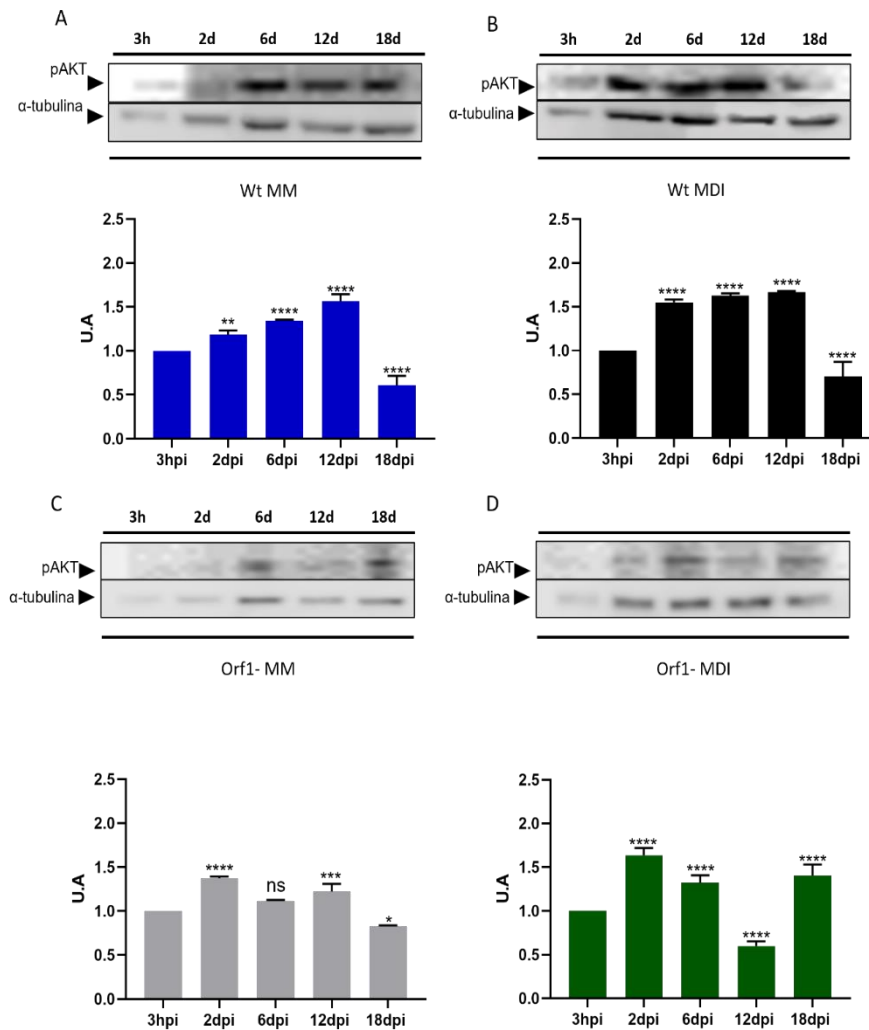


Figura 18. La proteína E4Orf1 aumenta la fosforilación de AKT. En el panel A se muestran los niveles cuantificados de pAKT en células 3T3-L1 infectadas con HAdV-D36 en medio MM. En el panel B, se muestran los valores de pAKT en células infectadas con HAdV-D36 Wt en MDI. En el panel C, se muestran los niveles de pAKT en células infectadas con el virus HAdV-D36E4Orf1- en MM y en el panel D, se muestran los niveles de pAKT en células infectadas con el virus HAdV-D36E4Orf1 MDI. Los datos se expresan como la media y las barras de error representan las desviaciones estándar de la media de tres experimentos independientes y todos los valores representan los medidos en duplicados técnicos. Los valores obtenidos se analizaron por densitometría (ImageJ) y se graficaron utilizando el programa Graph Prism. (P= 0.0001). Los datos fueron normalizados utilizando α -tubulina. Las diferencias significativas de cada punto de tiempo en relación con 3h se indican mediante **p < 0,005. *** p < 0,0005. **** p < 0,00001. ns, no significativo. U.A: unidades arbitrarias.

En conclusión, estos resultados sugieren que la infección con HAdV-D36 favorece la fosforilación de AKT, incluso en ausencia de la proteína E4Orf1. Esto podría explicarse porque la proteína E4Orf1

está involucrada en la señalización de PI3K, y el medio suplementado con factores de diferenciación contiene insulina, la cual también activa la vía de PI3K. Por lo tanto, los factores de diferenciación podrían estar compensando la actividad de E4Orf1 en la fosforilación de AKT. Sin embargo, se requieren más estudios para comprender la interacción entre E4Orf1, los factores de diferenciación y la fosforilación de AKT durante la infección productiva de HAdV-D36.

6.2.5 La regulación del metabolismo de la glucosa a través de la expresión de genes blanco de MYC no depende de E4Orf1.

Estudios recientes han demostrado que la proteína E4Orf1 de HAdV-D9 y HAdV-C5 activa el metabolismo de la glucosa mediante la activación de MYC, independientemente de la regulación de Ras/PI3K. Esta activación se produce a través de la interacción del dominio central de la proteína denominado D2 con MYC [25, 26]. Si bien la secuencia de E4Orf1 muestra una alta similitud entre HAdV-D36 y HAdV-D9 (96,8% de similitud de aminoácidos), su similitud es menor entre HAdV-D36 y HAdV-C5 (64,4% de similitud de aminoácidos) (Figura 19A) y considerando nuestros resultados previos que respaldan la correlación entre la replicación productiva de HAdV-D36 y la activación dependiente de MYC en el metabolismo de la glucosa (Figura 12), nos propusimos determinar si la activación de los genes blanco de MYC en el metabolismo de la glucosa depende de la proteína E4Orf1 en HAdV-D36. Para ello, se midieron los niveles de mRNA de Hk, Pfk, GAPDH y LDHA en células 3T3-L1 infectadas con HAdV-D36 y se compararon con los niveles obtenidos en células infectadas con HAdV-D36E4Orf1-, en ausencia (MM) o presencia (MDI) de inductores de diferenciación de adipocitos, en los mismos puntos de tiempo que los experimentos anteriores.

Se observó un aumento significativo en los niveles de mRNA de los genes glucolíticos (Hk-2, Pfk, GAPDH y LDHA) en células infectadas con HAdV-D36, especialmente a los 2 y 6 dpi (Figura 19B). Los valores de GAPDH y LDHA se mantuvieron elevados en el día 12 y 18 dpi, lo que podría indicar un mayor metabolismo de lactato, en concordancia con estudios previos sobre la E4Orf1 de HAdV-C5 [25]. Además, en presencia de MDI, la infección con HAdV-D36 mostró un efecto más pronunciado, con un aumento general de 10 a 100 veces en los niveles de Hk-2, Pfk, GAPDH y LDHA. Sin embargo, al comparar con células infectadas con HAdV-D36E4Orf1- (Figura 19C), se observó que solo hubo un aumento en la expresión de Hk-2 a los 2 dpi, lo que sugiere que otros productos génicos de HAdV-D36 podrían compensar la ausencia de E4Orf1. Al comparar con células MK (Figura 19D), se observaron niveles más altos en todos los genes evaluados a 2 y 6 dpi, excepto para Pfk-2, que no mostró un aumento significativo en ningún punto evaluado. Estos resultados sugieren que la E4Orf1

podría estar involucrada principalmente en la activación de Pfk-2 en el metabolismo de la glucosa.

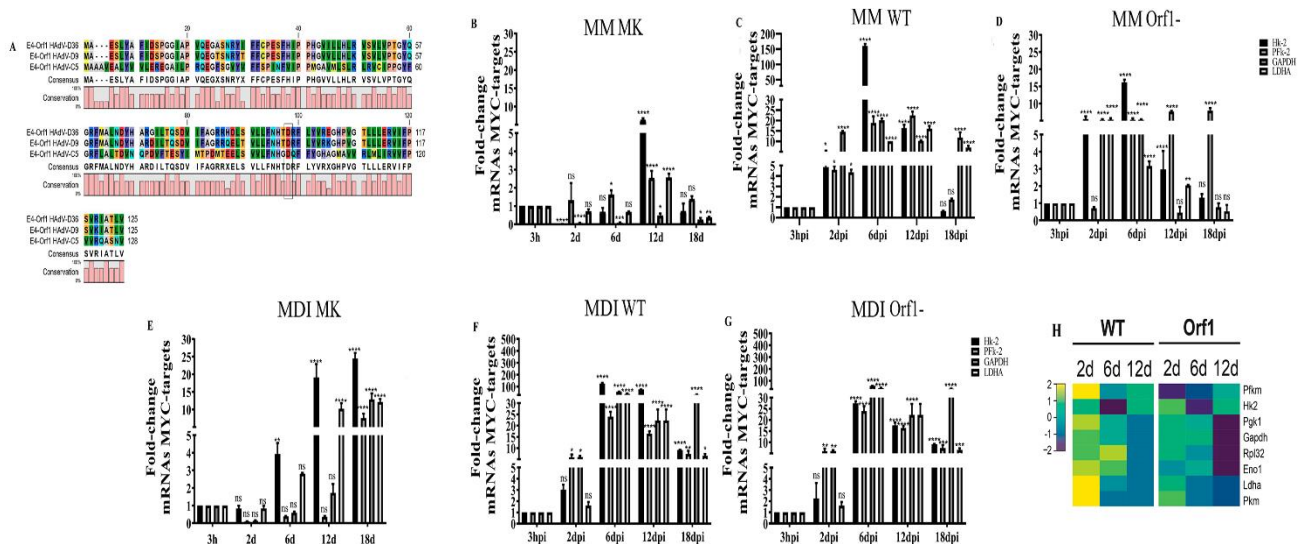


Figura 19. La regulación del metabolismo de la glucosa a través de la expresión de genes blanco de MYC no depende de E4Orf1. Para determinar el efecto de la infección en los genes blanco de MYC, las células 3T3-L1 a 12 dpc se infectaron con HAdV-D36 (C y E) o HAdV-D36E4Orf1- (G y D), sin inductores de diferenciación de adipocitos (MM) (B-D) o con (MDI) (E-G) y se comparó con células no infectadas (B y E). El RNA se aisló en los puntos de tiempo indicados y los niveles de expresión de hexokinasa (Hk), fosfofructoquinasa (Pfk), la gluceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la lactato deshidrogenasa (LDHA) fueron medidas por RT-qPCR. Todos los valores representan la media de dos experimentos independientes, medidos en duplicados técnicos. Los datos se expresan como la media y las barras de error representan desviaciones estándar. Las diferencias significativas de cada punto de tiempo en relación con 3h se indican con * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$. *** $p < 0,0005$. **** $p < 0,00001$. ns, no significativo. MM: Medio de mantenimiento. MDI: Medio de diferenciación.

Adicionalmente, en células infectadas con HAdV-D36 en presencia de MDI, se observó un aumento significativo de hasta 100 veces en Pfk-2 y GAPDH a los 2 dpi, y estos dos genes se mantuvieron elevados hasta el día 12. A los 6 días, Hk-2 y GAPDH también mostraron un aumento de hasta 10 veces, mientras que LDHA no presentó cambios significativos. Sin embargo, para los 18 dpi, todos los genes evaluados disminuyeron su expresión (Figura 19E). La comparación entre HAdV-D36 Wt y HAdV-D36E4Orf1- en la expresión de Hk-2, Pfk, GAPDH y LDHA (Figura 19F) mostró que Pfk fue el gen más afectado por la ausencia de E4Orf1 en los primeros tiempos de infección, aunque este efecto pareció disminuir a partir de los 6 dpi. Algo similar ocurrió con Hk-2, GAPDH y LDHA a los 6 dpi, donde la presencia de E4Orf1 parecía ser necesaria para una expresión eficiente de estos genes. Sin embargo, a los 18 dpi, solo se observó un efecto significativo de E4Orf1 en la síntesis de GAPDH. Estos datos confirman, como se esperaba por el efecto previamente reportado de la proteína E1A sobre el metabolismo celular, que la E4Orf1 no es la única responsable del metabolismo glucolítico y que otros genes adenovirales están involucrados en la activación de MYC y el metabolismo de la glucosa.

6.3 Análisis del transcriptoma de células 3T3-L1 infectadas con HAdV-D36.

Los experimentos descritos en las secciones anteriores mostraron que, aunque las células 3T3-L1 son susceptibles a la infección con HAdV-D36, solo las células que alcanzan un estado de compromiso de diferenciación a adipocito son permisivas. Por otra parte, aunque la infección en las células no

diferenciadas (en las que no hay una replicación productiva del virus) tiene un efecto adipogénico, este efecto se ve aumentado por la infección cuando las células están diferenciadas. Los datos muestran además que, aunque la proteína E4Orf1 contribuye al efecto adipogénico de la infección, su expresión no es indispensable ni para la diferenciación, reprogramación metabólica o adipogénesis, ni para la replicación del virus.

Por otra parte, la E4Orf1 sí tiene un claro efecto adipogénico ya que además de cooperar en la reprogramación de la expresión de CEBPs y PPAR γ , y en la alteración del metabolismo celular a través de la activación de las vías de PI3K y AKT, tiene también un claro efecto sobre la activación de MYC. Adicionalmente, en ausencia de E4Orf1 disminuye la expresión de genes virales y la replicación del genoma viral, aunque no se impacta la producción de progenie. En conjunto, estos resultados sugieren por una parte que la E4Orf1 podría afectar la expresión de otros genes celulares y, por otra parte, que otros genes virales como E1A y E1B inducen cambios en la expresión de genes celulares que incluyen no solo las vías de PI3K, AKT, MYC o CEBPs y PPAR γ .

Por lo anterior, se decidió analizar el transcriptoma de las células 3T3-L1 que se encuentran en un estado permisivo a la replicación de HAdV-D36 (12 dpc), y se compararon células no infectadas (a los 2 y 18 dpc) con células infectadas con el HAdV-D36 Wt y el mutante que no expresa la E4Orf1 (a los 2, 6 y 12 dpi). Se extrajo el RNA total y se secuenció con la tecnología Illumina como se describe en materiales y métodos. Inicialmente, para analizar la calidad de las secuencias, se utilizó la herramienta FASTQC. En todas las muestras se observó calidad suficiente para el análisis de RNAseq.

Posteriormente se analizaron los archivos FASTA. Para este análisis se siguieron los pasos que se esquematizan en el siguiente diagrama.

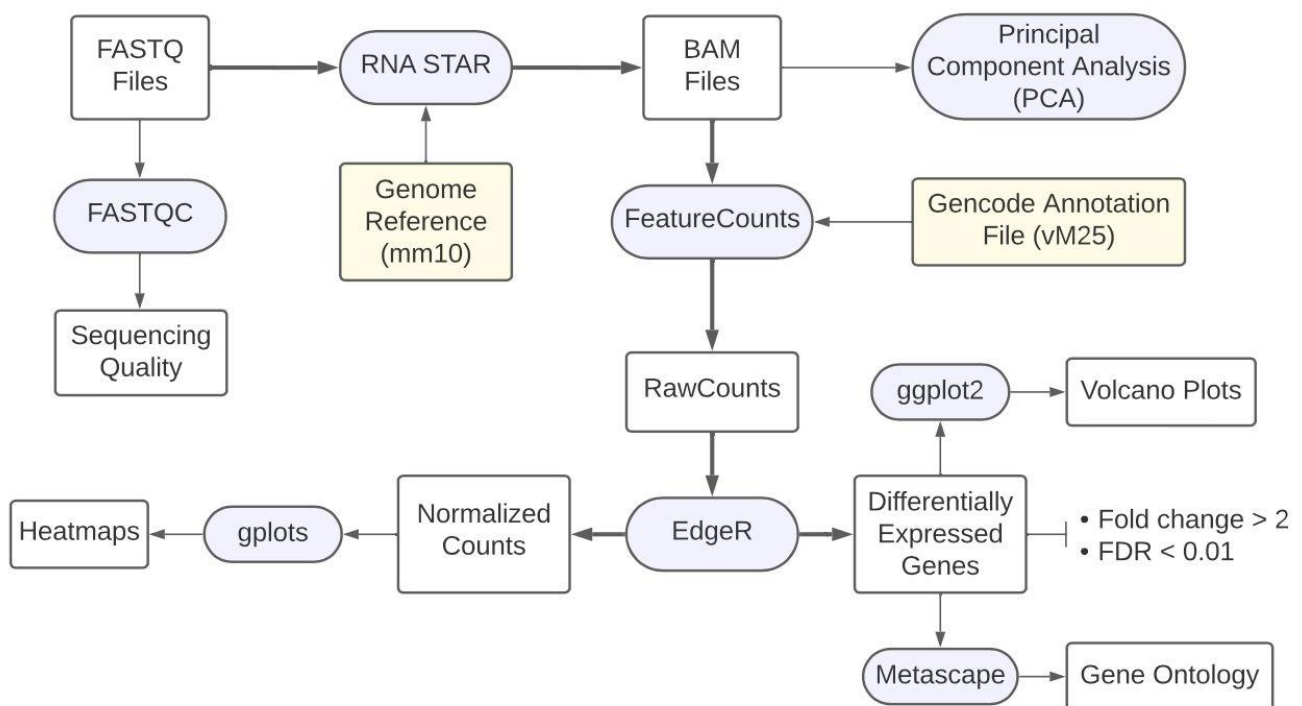


Figura 20. Diagrama de flujo para el análisis de RNAseq.

Los comandos que se utilizaron para el análisis fueron desarrollados por el Biol. Ángel Josué Cerecedo-Castillo. Instituto de Fisiología Celular, UNAM y se muestran en el Anexo 2. Se alinearon los archivos FASTA con el genoma de ratón (ya que las células 3T3-L1 usadas en estos experimentos son fibroblastos murinos) y con el genoma de HAdV-D36 utilizando la herramienta de bowtie2. Los resultados del mapeo de lecturas sobre el genoma de ratón se muestran en la Figura 21, en donde se puede observar que en todas las muestras secuenciadas se mapearon al menos un 70% de las lecturas.

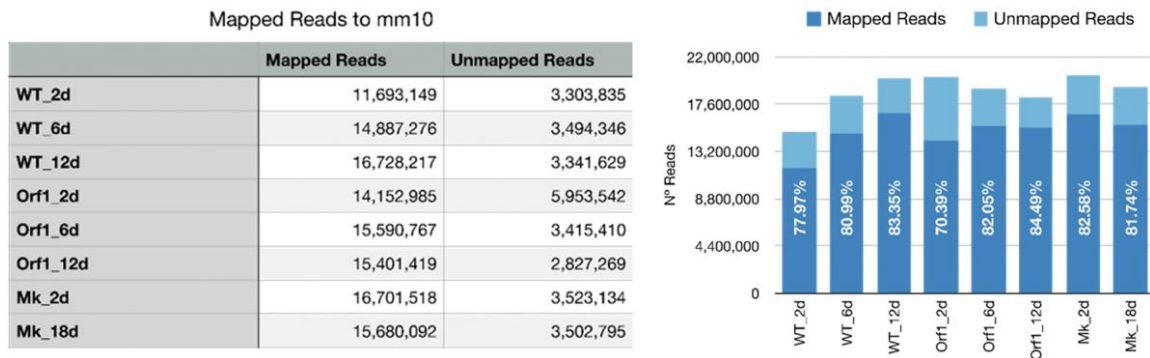


Figura 21. Mapeo de secuencias y porcentaje de alineamiento

Una vez que se obtuvieron los alineamientos en los respectivos genomas, se procedió a cuantificar los genes en cada una de las lecturas utilizando la herramienta Feature Counts.

Con los datos generados por Feature Counts se hicieron análisis comparativos utilizando la herramienta EdgeR para normalizar y calcular las dispersiones de datos de expresión génica.

Inicialmente se analizaron los genes que son alterados únicamente por la infección comparando a las células Mk 2d con las células infectadas, ya sea con HAdV-D36 o con HAdV-D36E4Orf1- a 2dpi (Figura 22).

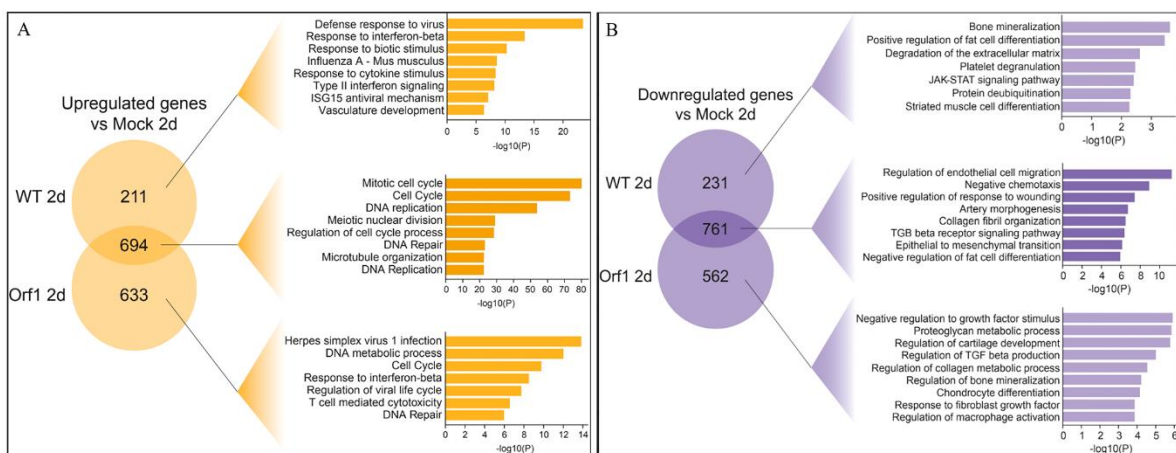


Figura 22. Análisis funcional de DEG a los 2dpi. Diagramas de Venn de genes positiva o negativamente regulados, representando el número de DEG que son únicos o compartidos en cada grupo evaluado y la agrupación de los DEG significativamente enriquecidos. **A;** Genes cuya expresión aumenta en las células infectadas. **B;** Genes cuya expresión disminuye en las células infectadas.

Como se esperaba, al igual que otros análisis previamente reportados del efecto de la infección

con HAdV-C2 y HAdV-C5 [81, 82], la infección, tanto con HAdV-D36 como el HAdV-D36E4Orf1- mostraron un efecto en la expresión de más de 1,000 genes celulares. Un análisis detallado reveló que la mayoría de los genes cuya expresión se ve alterada durante la infección son comunes entre HAdV-D36 y HAdV-D36E4Orf1- (694 genes comunes aumentaron su expresión y 761 disminuyeron). Además, es interesante notar que en las células infectadas con el mutante de E4Orf1, el número de genes únicos con alteración de expresión con respecto a Mk es mayor en comparación con HAdV-D36 (633 vs 211 genes aumentaron y 562 vs 231 genes disminuyeron su expresión). Entre los grupos de genes destacados, se observa que la activación de la respuesta antiviral se ve aumentada solo en el virus HAdV-D36, mientras que en los genes comunes se destacan actividades esperadas en la infección por adenovirus, como la activación del ciclo celular, replicación y reparación del DNA (Figura 22A). Por otro lado, se observa una disminución en la expresión de genes asociados a la transición epitelio-mesénquima y la regulación negativa de la diferenciación de células grasas (Figura 22B).

Posteriormente, comparamos los genes diferencialmente expresados entre HAdV-D36 y HAdV-D36E4Orf1- en diferentes tiempos post-infección.

En la Figura 23 se muestran gráficas de volcán en las que se compararon los genes alterados por el HAdV-D36 contra el mutante que no expresa a la E4Orf1 a los tres tiempos post-infección (2, 6 y 12 dpi). Los resultados muestran que a los 2 dpi (Figura 23A) se encontró la mayor diferencia en los genes expresados. Para los 6 dpi (Figura 23B) disminuye el número de genes que están regulados negativa o positivamente y para los 12 dpi, menos de 50 genes mostraron regulación positiva o negativa.

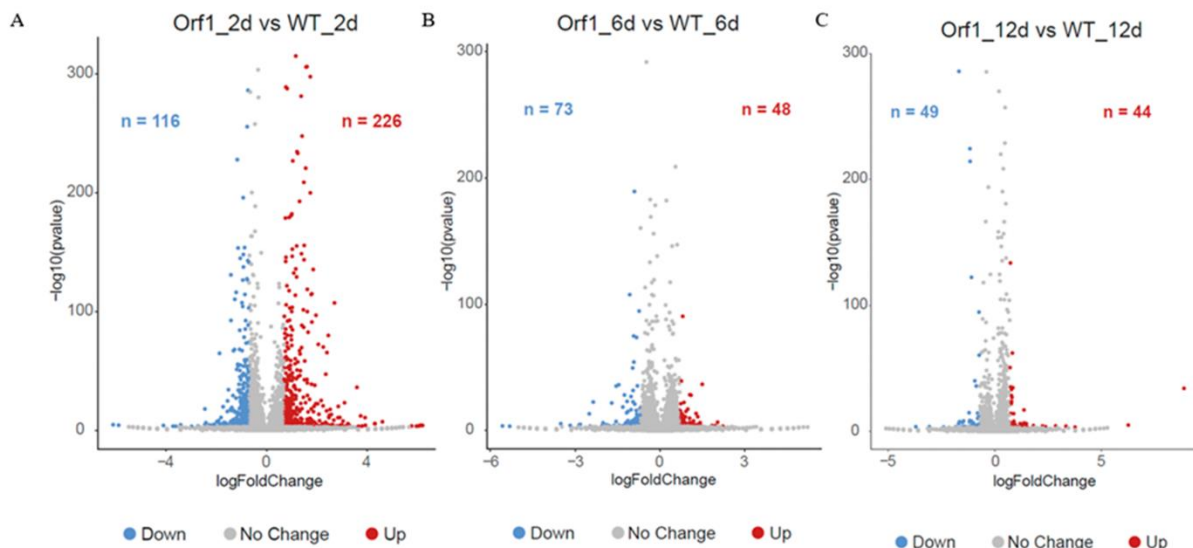


Figura 23. Genes expresados diferencialmente en adipocitos 3T3-L1 infectados con HAdV-D36 vs el mutante que no expresa a la E4Orf1 a diferentes tiempos post-infección. A–C. Gráficas de volcán para las muestras con diferencias de expresión de mRNA. El registro (Fold-change) se representa como abscisa y el registro 10 (valor P corregido) se representa como ordenada. Las distribuciones representativas de genes cuya expresión aumenta o disminuye entre cada dos etapas se muestran en los volcanes. Los genes cuya expresión aumenta se indican en rojo y en azul se indican los genes cuya expresión disminuye.

Para comprender mejor las funciones o actividades asociadas a los genes que están expresados diferencialmente, se utilizó un análisis de ontología génica (GO) (Figura 24). Este análisis reveló patrones distintos en la presencia o ausencia de la proteína E4Orf1 en diferentes tiempos post-infección.

A los 2 dpi (Figura 24A), se observó una disminución en mRNA de la respuesta inflamatoria, la vía de señalización de JAK-STAT y la adhesión focal en ausencia de E4Orf1, mientras que se favoreció la respuesta al interferón tipo I y la señalización por TNF, entre otros.

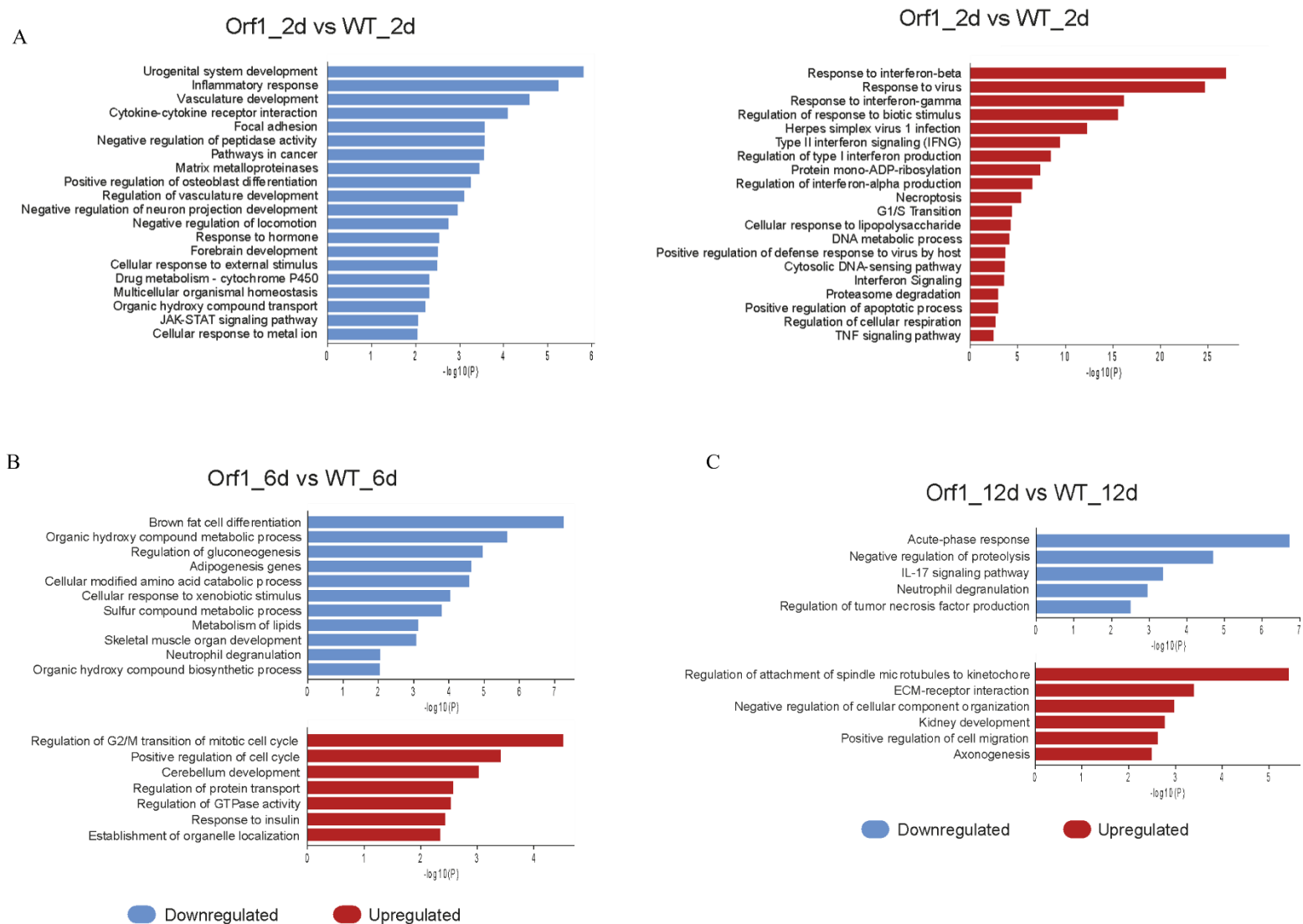


Figura 24. Análisis funcionales de DEG por clasificación de ontología genica (GO) comparando HAdV-D36 vs HAdV-D36E4Orf1- a diferentes tiempos post-infección. La comparación muestra los principales términos GO significativamente enriquecidos. Se representan gráficamente el número de genes enriquecidos como abscisas y los términos GO como ordenadas.

A los 6 dpi (Figura 24B), se encontró que la presencia de E4Orf1 está relacionada con la diferenciación de adipocitos, la adipogénesis y el metabolismo general de lípidos. En ausencia de E4Orf1, se observó una disminución de los mRNA implicados en estos procesos celulares y una regulación positiva de la regulación del ciclo celular y la actividad de GTPasa. A los 12 dpi (Figura 24C), no se observaron genes relacionados con el metabolismo de lípidos, pero se encontró una regulación negativa en la respuesta a la fase aguda y la regulación del factor de necrosis tumoral en ausencia de E4Orf1. Estos hallazgos sugieren que E4Orf1 puede tener un impacto en la respuesta inflamatoria, la diferenciación de adipocitos y otros procesos celulares relevantes como la regulación del ciclo celular, dependiendo del punto de tiempo analizado.

Se llevó a cabo un análisis de los Genes Diferencialmente Expresados (DEGs). A los 2 dpi, se identificaron 226 genes cuya expresión aumentó en ausencia de E4Orf1 (Figura 25A). se observa que la presencia de la proteína E4Orf1 tiene un impacto significativo en la regulación de la expresión génica en el contexto del HAdV-D36E4Orf1-. Solo dos genes se mantienen expresados a los 6 días postinfección (dpi), lo que sugiere que la mayoría de los genes que estaban inicialmente regulados a los 2 dpi han experimentado cambios en su expresión en presencia de E4Orf1. Además, se notó una tendencia interesante en los patrones de regulación negativa. De los 47 genes que estaban regulados negativamente en ausencia de E4Orf1, solo uno permanece regulado negativamente a los 12 dpi. Esto indica que la presencia de E4Orf1 puede tener un efecto estabilizador en la expresión génica a lo largo del tiempo, previniendo la regulación negativa persistente de la mayoría de los genes. Al considerar los patrones temporales de regulación negativa, se encontró que, a los 12 dpi, se identifican 43 genes que están regulados negativamente, de los cuales 38 son exclusivos de este período de tiempo. Esto sugiere que hay una modulación continua y específica de la regulación génica en presencia de E4Orf1 a lo largo de la infección. Al comparar los genes regulados negativamente en ausencia de la proteína E4Orf1, se observó una compleja interacción temporal. Por ejemplo, de los 116 genes regulados negativamente a los 2 dpi, solo uno se comparte con los 73 genes regulados al alza a los 6 dpi. Estos patrones cambiantes sugieren que la presencia o ausencia de E4Orf1 no solo influye en la expresión génica de manera directa, sino que también puede tener efectos secundarios en la regulación de otros genes a lo largo de diferentes momentos de la infección. En resumen, los resultados indican que la proteína E4Orf1 tiene un papel clave en la regulación dinámica de la expresión génica durante la infección por HAdV-D36E4Orf1-. Sus efectos pueden ser complejos y variados, afectando tanto la regulación negativa como positiva de genes específicos en diferentes momentos post-infección

Realizamos un análisis adicional comparando los genes que solo se regulan positivamente en el virus silvestre y el mutante para E4Orf1 (Figura 25C) y los resultados revelaron una vez más su asociación con la diferenciación de células grasas y adipogénesis. También se observaron mecanismos de regulación positiva en la activación de macrófagos y la vía de señalización de IL-17. Para el virus mutante, la ausencia de E4Orf1 favoreció la respuesta a interferón tipo I y II, así como la respuesta general a virus y la vía de detección de DNA citosólico, así como los checkpoints del ciclo celular.

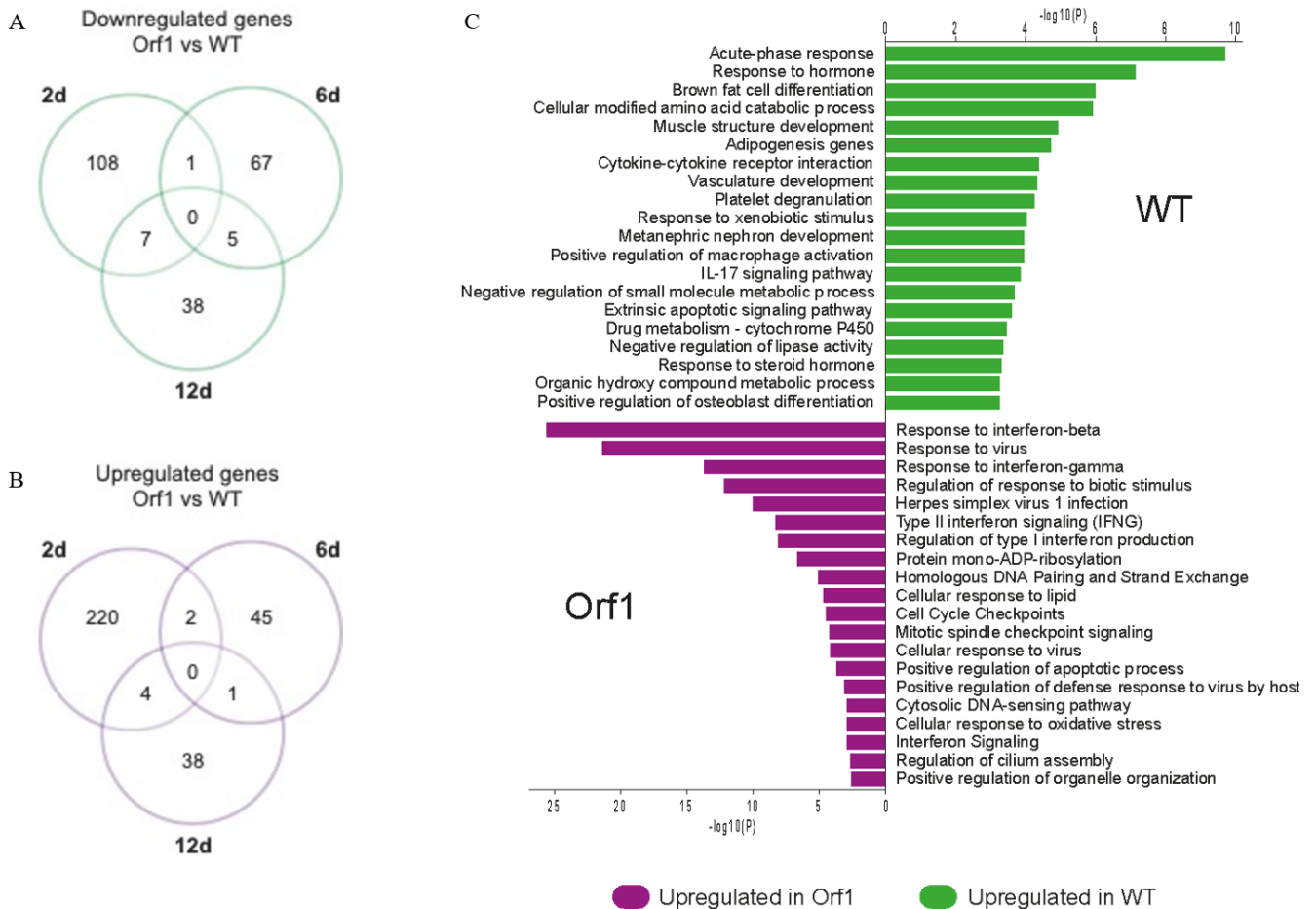


Figura 25. Análisis funcionales de DEG por clasificación de ontología génica (GO) comparando HAdV-D36 vs HAdV-D36E4Orf1- a diferentes tiempos post-infección. A-B. Diagramas de Venn. Representando el número de DEG que son únicos o compartidos en cada tiempo post-infección evaluado. **C.** Se muestran los GO de genes cuya expresión aumenta en el virus Wt vs aquellos que aumentan en ausencia de E4Orf1.

Para representar la expresión diferencial de genes entre HAdV-D36 y HAdV-D36E4Orf1-, se realizaron mapas de calor de algunas de las categorías de interés. Tales como; diferenciación de células grasas marrones y diferenciación de células grasas (Figura 26); metabolismo de glucosa y metabolismo de lípidos (Figura 27).

Entre los genes relacionados con la diferenciación de células grasas marrones destaca el gen *Lrg1* que, en células infectadas con HAdV-D36 aumentó su expresión a los 2 dpi y después disminuyó, mientras que con el mutante de E4Orf1 su expresión se encontró disminuida en todos los tiempos evaluados. *Lrg1* suprime la señalización de insulina al disminuir la expresión del Sustrato del receptor de insulina 1 y 2 (*IRS1/2*) [83]. Por otra parte, en nuestros experimentos la expresión de la adiponectina aumentó entre los 6 dpi y a los 12 dpi en HAdV-D36, lo que sería indicativo del proceso de maduración de los adipocitos [84].

Se sabe que cuando se sobre expresa *SH2B2* en adipocitos 3T3-L1, aumenta la activación inducida por insulina/IGF de la vía *IRS1/PI3K/AKT* [85]. Los efectos distales de la insulina y el IGF-1, el transporte de glucosa, la captación de aminoácidos, la síntesis de glucógeno y la lipogénesis se ven potenciados por la sobreexpresión de *SH2B2* en los preadipocitos 3T3-L1 [86]. En nuestros datos, observamos que en células infectadas con HAdV-D36, la expresión de *SH2B2* aumentó a los 6 dpi,

mientras que en ausencia de E4Orf1 no se observó un aumento en su expresión en ningún tiempo evaluado.

FABP4 está involucrada en el transporte y el metabolismo de ácidos grasos en la célula, lo que es esencial para el almacenamiento de lípidos en forma de gotas lipídicas en el citoplasma del adipocito y aumenta a medida que las células se comprometen con la diferenciación a adipocitos. La regulación de la expresión de FABP4 está mediada por factores de transcripción adipogénicos como C/EBP α y PPAR γ , que se activan durante la diferenciación de adipocitos [87]. En nuestros datos observamos que la expresión de este gen aumentó progresivamente en células infectadas con HAdV-D36, mientras que en ausencia de E4Orf1 disminuyó en los primeros tiempos post-infección y solo aumentó para los 12 dpi.

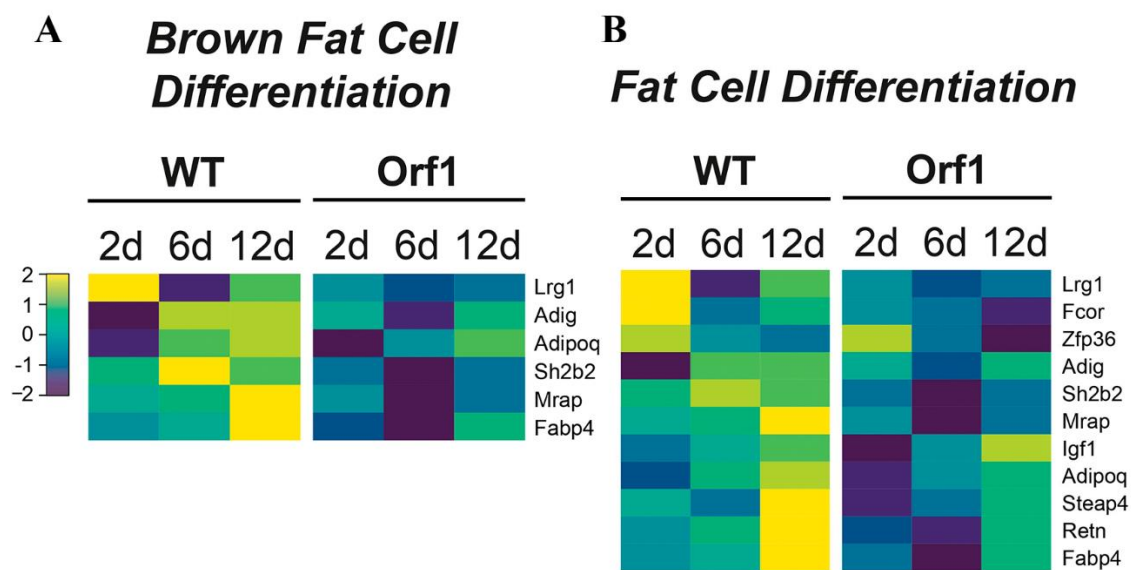


Figura 26. E4Orf1 promueve la expresión de genes involucrados en la diferenciación de adipocitos. La anotación de color del mapa de calor se muestra en la escala de color superior izquierda. Los genes regulados positiva o negativamente están representados por barras amarillas y azules, respectivamente.

Adicionalmente, la expresión de Fcor aumentó solo a los 2 dpi en células infectadas con HAdV-D36 (Figura 26B), y disminuyó en los tiempos posteriores. En contraste, en células infectadas con HAdV-D36E4Orf1 la expresión de Fcor disminuyó. Fcor inhibe la actividad de FOXO, por lo que también está involucrado en el proceso de adipogénesis.

Observamos que, a los 12 dpi en células infectadas con HAdV-D36, aumentó la expresión de genes que son marcadores de adipocito maduro, como Adipogenina (Adig), una proteína enriquecida en adipocitos cuya expresión se induce durante la adipogénesis; AdipoQ cuya expresión aumenta durante la diferenciación de los adipocitos en las células 3T3-L1, tiene propiedades antiinflamatorias y reguladoras del metabolismo de la glucosa y los lípidos y está identificada como un evento tardío en la adipogénesis; MRAP, una proteína específica de grasa y altamente enriquecida en adipocitos diferenciados [88]. Resistina (Retn), una adipocina secretada por los adipocitos que puede influir en la sensibilidad a la insulina y en la diferenciación de los adipocitos [89]. El Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 1

(IGF1), participa en la regulación de la diferenciación de adipocitos y la acumulación de lípidos en las células adiposas, y puede actuar junto con otros factores de crecimiento y hormonas para estimular la adipogénesis y el crecimiento de los adipocitos.[90]. Estos marcadores de adipocito maduro, que se encontraron aumentados en las células infectadas con HAdV-D36, aumentaron solo ligeramente hasta los 12 dpi en las células infectadas con el mutante HAdV-D36E4Orf1-, lo que sugiere que la E4Orf1 es importante para promover la adipogénesis.

En cuanto al metabolismo de lípidos (Figura 27A), diversos genes son activados por factores de transcripción clave involucrados en la diferenciación de los adipocitos, como PPAR γ , C/EBP α , y SREBP-1c; por ejemplo, 3-Hidroxi-3-Metilglutaril-CoA Sintasa 2 (HMGCS2) y Citoglobina (CYGB) que promueven la síntesis de lípidos o inhiben su catabolismo (ANGPTL4). [87, 91]. Además, algunos estudios han identificado vías de señalización, como la vía de Wnt, que también pueden estar involucradas en la regulación la adipogénesis [92]. La vía de Wnt parece desempeñar un papel dual en la adipogénesis, ya que puede promover o inhibir la diferenciación de los adipocitos dependiendo del contexto celular. Entre los genes adipogénicos que aumentaron su expresión en la infección con HAdV-D36 están, Porcupine Homolog (PORCN) que está implicada en la diferenciación celular y el desarrollo del tejido adiposo. La regulación de PORCN durante la adipogénesis sugiere que la vía de señalización de Wnt puede estar involucrada en la diferenciación y función de los adipocitos y Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 4 (WNT4) que están involucradas en la regulación de la diferenciación celular y el desarrollo tisular [93].

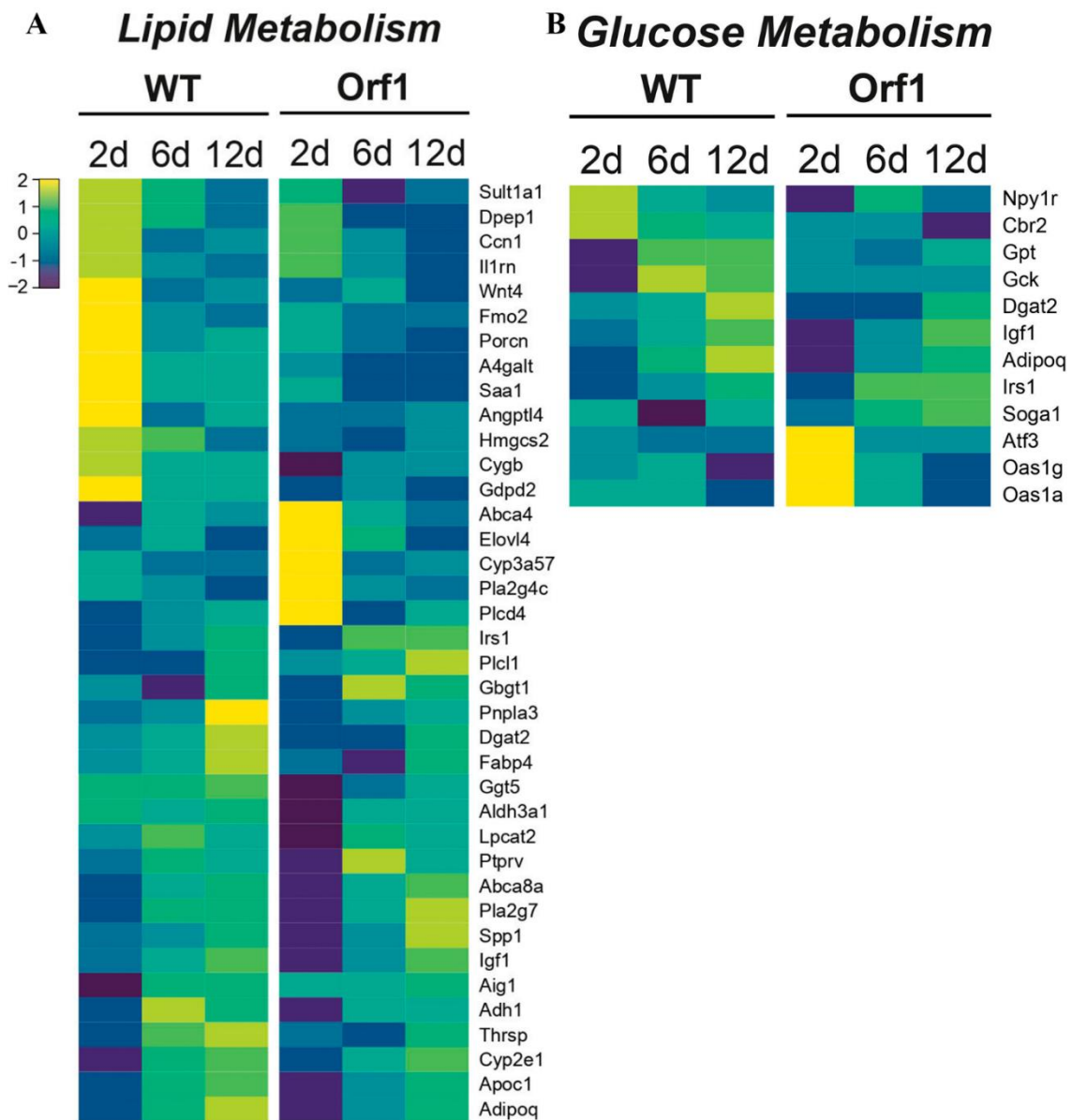


Figura 27. E4Orf1 promueve la expresión de genes involucrados en el metabolismo celular. La anotación de color del mapa de calor se muestra en la escala de color superior izquierda. Los genes regulados positiva o negativamente están representados por barras amarillas y azules, respectivamente.

El metabolismo de glucosa también se altera por la infección con HAdV-D36 (Figura 27B), observamos que la glucoquinasa (GCK) que es la enzima que cataliza la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato, lo que es el primer paso en el metabolismo de la glucosa en muchas células está regulada durante la adipogénesis y está asociada con la captación y metabolismo de glucosa en los adipocitos y observamos que aumenta su expresión en células infectadas con HAdVD-36 desde los 6dpi y en HAdV-D36E4Orf1- no aumenta su expresión. La Diacylglycerol O-Acyltransferase 2 (DGAT2) es una enzima involucrada en la síntesis de triglicéridos y es regulada por PPAR γ [94] aumenta para los 12dpi, tanto en HAdV-D36 Wt, pero en niveles más bajos en HAdV-D36E4Orf1-.

Los genes Oas1a y Oas1g son miembros de la familia de enzimas OAS (Oligoadenilato Sintetasas) que participan en la respuesta antiviral mediada por interferón tipo I [95]. Estas enzimas están involucradas en la detección y respuesta a los virus al catalizar la síntesis de oligonucleótidos de

adenilato (2-5A) a partir de ATP, lo que a su vez activa la ribonucleasa L para degradar el RNA viral y así limitar la replicación viral. En el contexto de la adipogénesis, Oas1a y Oas1g pueden estar regulados por la presencia de interferones y citoquinas inflamatorias, que son liberadas en respuesta a la infección viral o la inflamación. Oas1a, Oas1g y Atf3 aumentaron a los 2 dpi en ausencia de la E4Orf1, por lo que la E4Orf1 podría no solo estar involucrada en alteración del metabolismo celular, sino también en la defensa antiviral; ya que el Factor de Transcripción 3 Activado por la Actividad de Adenilato Ciclasa (Atf3) es un factor de transcripción que puede ser regulado en respuesta a diversos estímulos, incluidos los factores de crecimiento, las citoquinas y el estrés celular. Atf3 puede interactuar con factores de transcripción clave en la vía de señalización de la insulina, como el factor de transcripción FoxO1 y el receptor de insulina, para modular la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa, se sabe que su sobre expresión genera resistencia a la insulina [96].

Se decidió entonces evaluar la expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta antiviral entre HAdV-D36 y HAdV-D36E4Orf1-. Para ello, se realizaron mapas de calor con genes de la respuesta a virus (Figura 28A), respuesta a interferón beta (Figura 28B) y respuesta a interferón gamma (Figura 28C).

La mayoría de los genes que aumentaron su expresión en ausencia de E4Orf1 están principalmente involucrados en la respuesta antiviral mediada por el interferón tipo I, parte importante de la respuesta inmune innata contra las infecciones virales. Algunos de los genes encontrados también están relacionados con la respuesta inflamatoria y la activación de vías de señalización.

La Interleucina 33 (IL-33 y la lipocalina 2 (Lcn2) son las únicas que están mayormente expresadas cuando se encuentra la E4Orf1. La IL-33 es una citocina proinflamatoria. En relación con la adipogénesis y el metabolismo de la glucosa, se ha demostrado que IL33 puede influir en el desarrollo y la función de los adipocitos y puede estar implicada en la regulación del tejido adiposo y el metabolismo energético [97]. Estudios han sugerido que IL-33 contribuye a la obesidad y la resistencia a la insulina ya que la expresión de IL-33 en el tejido adiposo puede aumentar en la obesidad y se ha relacionado con la activación de células inmunitarias proinflamatorias en el tejido adiposo, lo que puede llevar a la inflamación crónica y la disfunción metabólica. También se ha observado que IL-33 puede promover la diferenciación de células madre mesenquimales en adipocitos y puede aumentar la síntesis y liberación de adipocinas proinflamatorias, como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Por otro lado, Lcn2 es una proteína transportadora de lípidos y actúa como una proteína de unión de hierro y se ha asociado con la obesidad y la resistencia a la insulina. Se ha observado que los niveles de Lcn2 están aumentados en el tejido adiposo de individuos obesos y se correlacionan positivamente con la resistencia a la insulina [98]. Además, Lcn2 puede inducir la expresión de citocinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-6, y puede estar involucrada en la regulación del equilibrio entre la inflamación y la homeostasis metabólica en el tejido adiposo.

En general, la E4Orf1 parece tener un papel complejo en la modulación de la respuesta inmune.

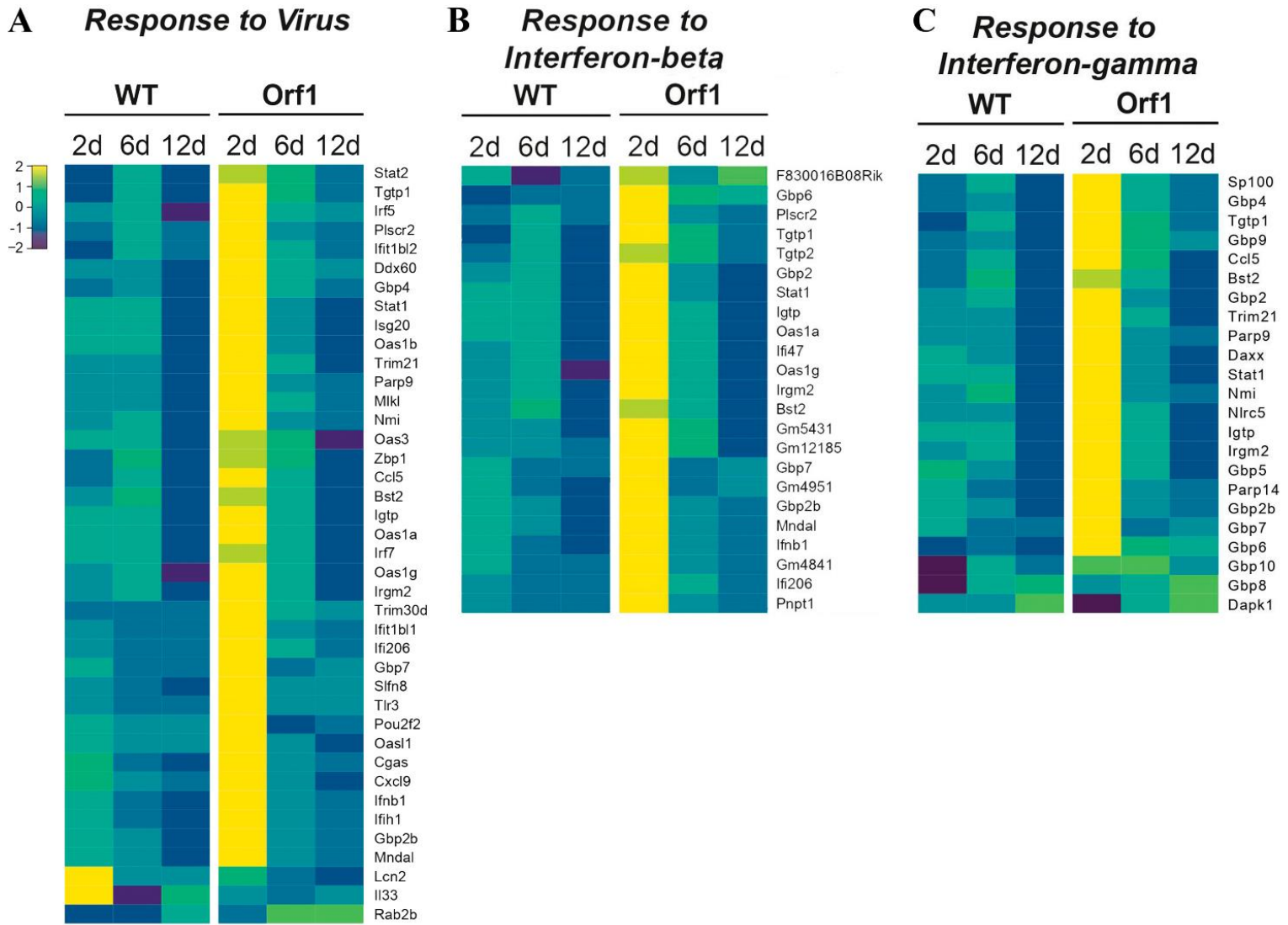


Figura 28. E4Orf1 suprime la respuesta antiviral. La anotación de color del mapa de calor se muestra en la escala de color superior izquierda. Los genes regulados positiva o negativamente están representados por barras amarillas y azules, respectivamente.

7. Discusión.

En los últimos años se ha acumulado evidencia sólida sobre el impacto de adenovirus humano tipo D36 (HAdV-D36) en la adipogénesis en diversos modelos celulares, como preadipocitos murinos 3T3-L1 [99] y células madre/estromales derivadas del tejido adiposo humano [100], además de en modelos animales [37, 42, 44, 56]. Sin embargo, hasta la fecha muy pocos estudios han investigado el efecto de la infección en la fase de diferenciación celular en la que las células son permisivas a la replicación productiva de HAdV-D36. En este estudio se abordó el impacto de la replicación productiva del virus en el metabolismo celular, proporcionando información nueva y valiosa para comprender la relación entre la infección por HAdV-D36 y el desarrollo de la obesidad.

Los resultados obtenidos en este estudio revelan que, durante la fase inicial de la diferenciación de adipocitos, las células 3T3-L1 son susceptibles a la infección con HAdV-D36. Sin embargo, la expresión de genes virales tempranos, como E1A, requeridos para la replicación del DNA viral y la expresión de genes virales tardíos, tal como Hexón, es deficiente, como resultado que el DNA viral no se replique y el ciclo viral no progrese (Figura 8). De acuerdo con publicaciones anteriores, la expresión baja y transitoria de los genes virales tempranos [47, 72, 101, 102] podrían ser suficientes para inducir el aumento en la acumulación de lípidos que observamos en los preadipocitos infectados (Figura 8); sin embargo, la acumulación de lípidos fue comparable con células no infectadas que se crecen en MDI (Figura 7), lo que sugiere que la expresión sostenida de genes virales, que conduce a la replicación viral, es necesaria para el efecto adipogénico de la infección.

Asimismo, se logró determinar que a los 12 dpc, las células 3T3-L1 presentan un patrón de expresión de C/EBP β , C/EBP α y PPAR γ característico de adipocitos comprometidos (Figura 7), siendo hasta 3 veces mayores los niveles de mRNAs de estas proteínas, comparadas con células a los 2 dpc; además, las células a 12 dpc mostraron una acumulación de lípidos intracelulares y un porcentaje mayor de células que presentaron lípidos en el citoplasma. Debido a que las células 3T3-L1 en estado de preadipocitos (2 dpc) no son permisivas a la infección con HAdV-D36, nos preguntamos si en un estado de compromiso a adipocito las células serían permisivas a la infección culminando en la producción de progenie viral. Observamos que la acumulación de DNA viral aumentó solo en células comprometidas (12 dpc) y no en células en estado de preadipocitos (Figura 8). También observamos que, solo en células en compromiso a adipocito, se expresaron los mRNAs virales y se produjo progenie viral. La infección por HAdV-D36 de adipocitos comprometidos resultó en una mayor expresión de marcadores adipogénicos y niveles de lípidos (Figura 9-10), aun en células en medio MM. Estos datos sugieren que, en células comprometidas a diferenciarse en adipocito, la infección con HAdV-D36 es suficiente para impulsar la expresión de los mRNAs de las proteínas C/EBP β , C/EBP α y PPAR γ que se refleja en mayor acumulación de lípidos intracelulares.

Aunque se produjeron niveles de 3 a 10 veces más altos de mRNA y DNA viral en células infectadas a los 12 dpc en presencia de DMI, la fase de diferenciación de las células 3T3-L1 fue

suficiente para respaldar niveles comparables de progenie viral en ausencia de inductores de diferenciación (MM) (Figura 11). Estos datos sugieren que, una vez comprometidas a adipocito, las células 3T3-L1 permiten la replicación viral productiva y muestran la alteración en el metabolismo de los lípidos, aun en ausencia de factores de diferenciación, lo que indica que en células comprometidas a adipocito la infección con HAdV-D36 es suficiente para que la replicación productiva del virus se vea acompañada con un claro efecto adipogénico [103].

Las actividades de varios productos génicos de HAdV que reprograman cada paso de la expresión génica celular, desde la remodelación y transcripción de la cromatina, hasta el procesamiento postranscripcional, la exportación de RNA y la traducción de mRNA, se han estudiado ampliamente [49, 104-116], pero no se ha estudiado con detalle su papel en el efecto adipogénico de HAdV. Hasta la fecha, la única proteína de HAdV que se ha relacionado directamente con las alteraciones metabólicas asociadas a obesidad que resultan de la infección por HAdV es la proteína E4Orf1, que como se describió en la introducción interacciona con un grupo de proteínas celulares a través de un motivo de dominio de unión a PDZ, lo que resulta en la activación de PI3K y AKT [66, 80], sin embargo, es bien sabido que la infección por HAdV aumenta la captación de glucosa y la fermentación a lactato a través de E1A [117]. En el caso de HAdV-D36, E4Orf1 muestra efectos adipogénicos que dependen de una mayor expresión de los receptores de glucosa y la captación de glucosa [61, 101, 102, 118]; aumento de la sintasa de ácidos grasos y conversión de glucosa en ácidos grasos [58, 99]; y la activación de C/EBP's y PPAR- γ que dan como resultado la diferenciación de los adipocitos [42, 60, 119-121] y la proteína E4Orf1 es suficiente para inducir los efectos adipogénicos cuando se expresa en células transfectadas o a través de vectores lentivirales [71, 122, 123], pero su efecto adipogénico en el contexto de la replicación viral productiva no se había determinado. Nuestros resultados evidencian que, en el contexto de una infección productiva, la proteína E4Orf1 no es indispensable, sino que desempeña una función cooperativa en el proceso de adipogénesis (Figura 15). Esto se destaca dado que, en ausencia de E4Orf1, se observa una alteración en la expresión de los genes C/EBP's y PPAR γ , incluso en células cultivadas en MM.

Observamos un impacto particularmente relevante de E4Orf1 en la expresión de C/EBP α , siendo más pronunciado a los 18 dpi, ya que su ausencia ocasiona una disminución drástica de casi 100 veces en la expresión de este gen adipogénico. Llama la atención que en condiciones de cultivo que favorece la diferenciación (MDI), la presencia de E4Orf1 resulta en un aumento de más de 50 veces en la acumulación de C/EBP β a 2 dpi. Esto sugiere que E4Orf1 es crucial para dar inicio al proceso de adipogénesis. Con el avance del tiempo post infección, la falta de E4Orf1 parece afectar principalmente la síntesis de C/EBP α . Entre los días 6 y 12 dpi, se observa una reducción en su síntesis de 5 a 30 veces en ausencia de E4Orf1. Este patrón sugiere que existe una deficiencia en la regulación positiva de la adipogénesis ocasionada por la infección, considerando que C/EBP α desempeña un papel fundamental

como factor de transcripción en la activación de diversos genes relacionados con la adipogénesis. Entre estos genes se incluyen la proteína transportadora de ácidos grasos (FABP4) y la proteína desacopladora 1 (UCP1), que participan en el metabolismo de grasas y la regulación del gasto energético. C/EBP α también interactúa con otros factores de transcripción clave en la adipogénesis, como PPAR γ y C/EBP β , en una colaboración sinérgica que orquesta la expresión de genes en el proceso de diferenciación de las células adiposas [124, 125]. En conjunto, la regulación de la adipogénesis por C/EBP α es un proceso complejo que involucra la activación de cascadas de señalización, la interacción con otros factores de transcripción y la modulación de la expresión de genes adipogénicos clave. Dado el papel central de C/EBP α en la diferenciación y maduración de los adipocitos, la detección de niveles más bajos de este factor en ausencia de E4Orf1 sugiere que esta proteína favorece el proceso de maduración de los adipocitos al contribuir a la regulación positiva de genes clave en este proceso. Una implicación interesante de estos resultados es que la E4Orf1 no es la única proteína viral responsable del efecto adipogénico, ya que en células infectadas con el virus que no expresa la E4Orf1, se detectaron niveles aumentados, no solo de la expresión de C/EBP's y PPAR- γ , sino también en la acumulación de lípidos intracelulares en comparación con células no infectadas (Mk) (Figuras 13-15).

Está bien establecido que los HAdV alteran el metabolismo de la célula infectada a través de una variedad de mecanismos que incluyen el metabolismo de glucosa, glutamina y lípidos para satisfacer las demandas bioenergéticas y biosintéticas de la síntesis de macromoléculas virales y la producción de progenie [25, 63, 77, 79]. La replicación productiva de HAdV en células permisivas sigue un programa de expresión de genes virales complejo que induce cambios en la expresión de genes celulares, las vías de señalización y el metabolismo. En nuestros experimentos, la expresión de los genes de HAdV-D36, la replicación del DNA y la producción de progenie alcanzaron niveles máximos entre 6 y 12 dpi y disminuyeron para los 18 dpi (Figura 16), lo que sugiere que a medida que los adipocitos maduran se vuelven menos permisivos. La proteína E4Orf1 parece ser necesaria para la expresión eficiente de genes virales y la replicación de DNA viral, pero sorpresivamente, esto no impactó en la producción de progenie (Figura 16). Nuestros resultados muestran que el efecto principal se observa en la acumulación de Hexón y DNA viral, por lo que la ausencia de E4Orf1 podría estar implicada en la transición a la fase tardía.

Se sabe que la proteína viral E1A también puede alterar el metabolismo de la célula infectada [78, 126]. E1A es esencial para el ciclo de replicación de HAdV. E1A sirve para condicionar el entorno celular en un estado favorable para la infección por HAdV al interactuar con muchas proteínas reguladoras celulares. Lo más probable es que el efecto metabólico de E1A dependa predominantemente de las interacciones de la proteína con el retinoblastoma (pRB), que da como resultado la activación de los factores de transcripción E2F de fase S, y con las lisina acetilasas p300/CBP [127, 128], lo que lleva a la progresión del ciclo celular y a un estado proliferativo sostenido [47]. En combinación, la interacción entre E1A representa más de 4000 asociaciones únicas, que comprenden una parte significativa de todo

el proteoma humano [78, 128, 129]. E1A interacciona con los complejos que contienen MYC y puede resultar en la regulación de los genes blanco de MYC que afectan el metabolismo energético a través de la activación de genes involucrados en la glucólisis, el metabolismo de la glutamina y la biogénesis mitocondrial [40, 130-133], por lo que E1A podría también tener un papel clave en el proceso de diferenciación celular.

La proteína E4Orf1 producida por HAdV-D9 y HAdV-C5 se une a MYC, lo que conduce a un aumento en la transcripción de genes diana de MYC y una mayor expresión de enzimas glucolíticas, lo que a su vez mejora la replicación viral al promover una mayor biosíntesis de nucleótidos a partir de intermediarios de glucosa y permite una replicación óptima de adenovirus en células epiteliales de pulmón primario [25, 26, 63]. Nuestros resultados muestran que la infección por HAdV-D36 también da como resultado un aumento en los niveles de mRNAs de genes glucolíticos que son blanco de MYC, con un claro efecto sobre la expresión de Hk-2 y Pfk (Figura 12), de acuerdo con hallazgos anteriores [25, 26, 63]. Sin embargo, como se esperaba, observamos que E4Orf1 no es la única proteína viral responsable de alterar el metabolismo glucolítico inducido por MYC, ya que aun en ausencia de la proteína, la infección induce un aumento en la expresión de estos genes (Figura 19). Como se describió previamente, este efecto, aunque no se había estudiado en HAdV-D36, se ha estudiado con detalle para HAdV-C5 y depende de la proteína E1A, por lo que la E4Orf1 solo potencia el efecto glucolítico observado.

E4Orf1 de HAdV-C5, al formar un trímero con E4Orf6 y MYC, promueve la expresión de las enzimas glucolíticas HK-2 y Pfk para inducir la glucólisis independiente de PI3K [63]. Este mecanismo, a su vez, proporciona intermediarios que entran en la vía de las pentosas fosfato para, en última instancia, proporcionar nucleótidos para la replicación del DNA viral. Nuestros resultados indican que el efecto de E4Orf1 de HAdV-D36 está principalmente en Hk-2 a los 6dpi en MM; y Pfk-2 a los 2dpi, GAPDH y LDHA a los 6dpi en MDI (Figura 19), lo que coincide con el aumento en la expresión de genes virales y el inicio en la acumulación de lípidos, por lo que la deficiencia en estas enzimas podría estar correlacionada con una baja síntesis de DNA viral y mensajeros tardíos.

Los mecanismos subyacentes al efecto adipogénico, así como al metabolismo alterado por HAdV-D36 se asocia a la proteína E4Orf1, que interactúa con un conjunto de factores celulares a través de un motivo de unión a dominio PDZ funcional en el extremo carboxilo terminal lo que conlleva a la activación de la vía de señalización de PI3K [80]. La ruta de señalización de PI3K/AKT es un complejo mecanismo de transducción de señales donde la PI3K y la proteína cinasa B (AKT) juegan un papel importante para la captación de glucosa y crecimiento celular. Se sabe que el incremento en adiposidad asociado a E4Orf1 parece depender de la vía de señalización de Ras/PI3K al incrementar receptores de glucosa en membrana plasmática [134]; incrementando la internalización de glucosa a la célula y el posterior aumento de PPAR- γ resultando en diferenciación de las células en adipocitos. En el contexto de la infección, observamos que hay un ligero aumento en la acumulación de la proteína AKT, y que la

ausencia de E4Orf1 no parece estar involucrada en la acumulación de AKT (Figura 17). En la fosforilación de la serina/treonina cinasa AKT (pAKT), el cual es un punto central en la vía de señalización de PI3K [135], observamos una variabilidad en la fosforilación de AKT inducida por la infección con HAdV-D36 (Figura 18). Los niveles de pAKT disminuyeron cuando se infectan con HAdV-D36 en MM, sin embargo, cuando las células se crecen en MDI los niveles de pAKT se mantienen durante la infección con un pico máximo a los 2 dpi que posteriormente disminuye (12dpi), lo que coincide con la disminución en la producción de progenie viral.

Al igual que la interacción con MYC, la señalización de Ras/PI3K es una vía de señalización celular importante involucrada en el control del crecimiento, supervivencia y proliferación celular. Los adenovirus pueden activar esta vía de diversas formas y no solo de forma dependiente de E4Orf1. Las proteínas E1A y E1B juegan un papel crucial en la manipulación del ambiente celular para favorecer la replicación viral. En el caso de la proteína E1A ésta puede activar la vía de Ras/PI3K al interactuar con proteínas celulares, como la proteína retinoblastoma (pRb), lo que podría también tener un papel importante en la regulación de PI3K y cooperar con E4Orf1 para promover el metabolismo celular.

Se sabe que las proteínas E1A y E4Orf1 de HAdV-C5 y HAdV-D9 alteran el metabolismo celular por múltiples mecanismos, incluida la vía de Myc. Los resultados mostraron que en células infectadas con HAdV-D36 Myc es activado y en ausencia de E4Orf1 no se observaron diferencias significativas en su activación en comparación con Wt. Estos experimentos no nos permiten determinar si la E4Orf1 activa a Myc, ya que el efecto podría verse enmascarado por la activación a través de E1A. La interacción entre E1A y MYC puede resultar en la regulación de genes blanco de MYC que afectan el metabolismo energético a través de la activación de genes involucrados en la glucólisis, el metabolismo de la glutamina y la biogénesis mitocondrial, por lo que también podría estar involucrada en el metabolismo celular. Este efecto parece ser aditivo con la activación de la vía de señalización de PI3K por E4Orf1, lo que promueve la captación de glucosa y el crecimiento celular. En este punto será interesante investigar si, al igual que la E4Orf1 de HAdV-C5 y HAdV-D9, la proteína de HAdV-D36 puede interactuar con Myc e inducir la activación de sus genes blanco. En cualquier caso, los datos muestran que la infección con HAdV-D36 induce la activación de PI3K y de Myc.

La transcriptómica de células 3T3-L1 ha ampliado nuestra comprensión de las actividades asociadas con la infección de HAdV-D36 y E4Orf1 en el metabolismo celular. Confirmamos que E4Orf1 promueve la diferenciación de células adiposas, especialmente a los 6 dpi (Figura 24B). Genes como Adipoq, Fabp4, Pnpla3, Gck, Gpt, Cbr2, Gm5431, Gm4841, Cyp2e1, Aldh3a1 y Hmgcs2 son regulados por factores de transcripción como PPAR γ y C/EBP. Esta regulación también se observa en la infección por HAdV-D36, y la regulación positiva de estos genes favorece la transcripción de Fabp4 y Igf1, los cuales están relacionados con el metabolismo y la función de adipocitos.

Con relación a E4Orf1, sus actividades se concentran en gran medida en la respuesta de la célula huésped a la infección, con un énfasis particular en la modulación de genes relacionados con la respuesta

a interferones beta y gamma, como se aprecia en la Figura 28. La inhibición de la producción de IFN-I por parte de E4Orf1 podría constituir una estrategia viral para evadir la respuesta inmunológica del huésped, facilitando así su reproducción y propagación en el organismo infectado. Por consiguiente, entender los mecanismos mediante los cuales E4Orf1 inhibe IFN-I resulta fundamental para dilucidar cómo HAdV-D36 influye en el desarrollo de la obesidad.

La infección por adenovirus también se ha vinculado a la inducción de una respuesta inflamatoria en el tejido adiposo. Durante la infección, se liberan citocinas proinflamatorias, como la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estas citocinas podrían contribuir a la inflamación crónica de bajo grado característica de la obesidad [134]. Genes como *Il1rn*, *Ccl5*, *Saa1* y *Angptl4*, que tienen relación con la respuesta inflamatoria, son regulados en respuesta a la infección por adenovirus, sugiriendo que E4Orf1 de HAdV-D36 podría estar implicada en el mantenimiento de la inflamación de bajo grado observada en la obesidad. [136].

Aunque la correlación de HAdV-D36 con la obesidad en humanos ha sido reportada en muchos estudios [45, 52-55], quedan varias preguntas, incluyendo si los sujetos obesos son más susceptibles a la infección que los sujetos no obesos o si la infección causa o aumenta la obesidad [137, 138].

Nuestros hallazgos revelan que el estado de diferenciación de los adipocitos 3T3-L1 determina si las células son permisivas para la replicación viral, y que los mayores efectos sobre los genes glucolíticos diana de MYC, la expresión de C/EBP β , C/EBP α , PPAR γ y la acumulación de lípidos ocurren en los adipocitos que permiten la replicación viral productiva y que, en estas condiciones, la proteína E4Orf1 no es la única responsable del efecto adipogénico asociado a HAdV-D36 y que la glucólisis dependiente de PI3K y el aumento en la glucólisis dependiente de MYC no necesariamente son mutuamente excluyentes. En cambio, ambos podrían trabajar en conjunto para reestablecer el metabolismo celular, lo que tendría un efecto aditivo en la proliferación celular o la replicación del virus. Estos hallazgos justifican estudios más detallados sobre el impacto de la replicación de HAdV-D36 en la adipogénesis, tanto en el adipocito modelo 3T3-L1 como en preadipocitos humanos.

La comprensión del papel de HAdV-D36 en la obesidad humana demanda investigaciones adicionales. Es esencial comprender si la infección por este virus contribuye al desarrollo de la obesidad en individuos susceptibles.

8. Conclusiones.

- Durante la fase inicial de la diferenciación de adipocitos, las células 3T3-L1 son susceptibles a la infección por HAdV-D36, pero no permisivas, ya que la expresión de genes virales tempranos es muy baja, no hay replicación del genoma viral, ni producción de progenie.
- Las células comprometidas a diferenciación a adipocito son permisivas a la replicación viral productiva que resulta en una mayor expresión de marcadores adipogénicos y acumulación de lípidos.
- La proteína viral E4Orf1 juega un papel importante en la adipogénesis inducida por HAdV-D36 y colabora con la expresión de C/EBP α y PPAR γ , factores clave en la diferenciación de adipocitos, pero la expresión de estos marcadores adipogénicos no es exclusivo de E4Orf1.
- La proteína E4Orf1 potencia el proceso de replicación de HAdV-D36, pero no es necesaria para el ciclo de replicación de HAdV-D36.
- La activación de la vía de señalización de PI3K se favorece en células 3T3-L1 infectadas con HAdV-D36 aún en ausencia de la proteína E4Orf1.
- La infección con HAdV-D36 promueve el metabolismo de la glucosa a través de genes blanco de MYC.
- La regulación del metabolismo de la glucosa a través de la expresión de genes blanco de MYC no depende de E4Orf1.

9. Perspectivas

- Determinar el efecto de E1A de HAdV-D36 sobre el metabolismo de la célula infectada.
- Determinar el mecanismo molecular de MYC sobre el ciclo viral de HAdV-D36.
- Determinar la interacción entre E1A y E4Orf1 de HAdV-D36 con MYC.
- Determinar el efecto de HAdV-D36 sobre la respuesta a antiviral.
- Determinar el efecto del estado inflamatorio sobre la replicación de HAdV-D36.
- Determinar la interacción de E4Orf1 con factores celulares implicados en la respuesta inmunológica y la inflamación que pudieran favorecer la replicación viral y potenciar el efecto adipogénico.
- Determinar el efecto la activación de la vía de Ras/PI3K por E1A y su impacto en el metabolismo de la célula infectada
- Realizar análisis funcionales de genes blanco que estén involucrados tanto en el metabolismo celular como en la respuesta antiviral.

10. Referencias.

1. OMS. *Obesity and overweight*. 2021; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
2. OECD, *OECD Health Statistics 2017*. 2017.
3. ENSANUT, *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016*. 2016.
4. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 772-83.
5. Blaut, M. and T. Clavel, *Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease*. *J Nutr*, 2007. **137**(3 Suppl 2): p. 751S-5S.
6. Kobyliak, N., et al., *Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view*. *Nutr Metab (Lond)*, 2016. **13**: p. 14.
7. Rajilić-Stojanović, M. and W.M. de Vos, *The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota*. *FEMS Microbiol Rev*, 2014. **38**(5): p. 996-1047.
8. Velagapudi, V.R., et al., *The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice*. *J Lipid Res*, 2010. **51**(5): p. 1101-12.
9. Dhurandhar, N.V., *Infectobesity: obesity of infectious origin*. *J Nutr*, 2001. **131**(10): p. 2794S-2797S.
10. van Ginneken, V., L. Sitnyakowsky, and J.E. Jeffery, *"Infectobesity: viral infections (especially with human adenovirus-36: Ad-36) may be a cause of obesity*. *Med Hypotheses*, 2009. **72**(4): p. 383-8.
11. Sanchez, E.L. and M. Lagunoff, *Viral activation of cellular metabolism*. *Virology*, 2015. **479-480**: p. 609-18.
12. Courtney, R.J., S.M. Steiner, and M. Benyesh-Melnick, *Effects of 2-deoxy-D-glucose on herpes simplex virus replication*. *Virology*, 1973. **52**(2): p. 447-55.
13. Lewis, V.J., Jr. and L.V. Scott, *Nutritional requirements for the production of herpes simplex virus. I. Influence of glucose and glutamine of herpes simplex virus production by HeLa cells*. *J Bacteriol*, 1962. **83**(3): p. 475-82.
14. Eagle, H. and K. Habel, *The nutritional requirements for the propagation of poliomyelitis virus by the HeLa cell*. *J Exp Med*, 1956. **104**(2): p. 271-87.
15. Ludwig, H. and R. Rott, *Effect of 2-deoxy-D-glucose on herpesvirus-induced inhibition of cellular DNA synthesis*. *J Virol*, 1975. **16**(2): p. 217-21.
16. Munger, J., et al., *Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy*. *Nat Biotechnol*, 2008. **26**(10): p. 1179-86.
17. Yu, Y., A.J. Clippinger, and J.C. Alwine, *Viral effects on metabolism: changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection*. *Trends Microbiol*, 2011. **19**(7): p. 360-7.
18. Yu, Y., T.G. Maguire, and J.C. Alwine, *Human cytomegalovirus activates glucose transporter 4 expression to increase glucose uptake during infection*. *J Virol*, 2011. **85**(4): p. 1573-80.
19. Klemperer, H., *Glucose breakdown in chick embryo cells infected with influenza virus*. *Virology*, 1961. **13**: p. 68-77.
20. Ritter, J.B., et al., *Metabolic effects of influenza virus infection in cultured animal cells: Intra- and extracellular metabolite profiling*. *BMC Syst Biol*, 2010. **4**: p. 61.
21. Ripoli, M., et al., *Hepatitis C virus-linked mitochondrial dysfunction promotes hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated glycolytic adaptation*. *J Virol*, 2010. **84**(1): p. 647-60.
22. Ramiere, C., et al., *Activity of hexokinase is increased by its interaction with hepatitis C virus protein NS5A*. *J Virol*, 2014. **88**(6): p. 3246-54.
23. Xiao, L., et al., *Targeting Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1-mediated glycolysis sensitizes nasopharyngeal carcinoma to radiation therapy*. *Oncogene*, 2014. **33**(37): p. 4568-78.
24. Delgado, T., et al., *Global metabolic profiling of infection by an oncogenic virus: KSHV induces and requires lipogenesis for survival of latent infection*. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(8): p. e1002866.
25. Thai, M., et al., *Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell anabolic glucose metabolism and virus replication*. *Cell Metab*, 2014. **19**(4): p. 694-701.
26. Kong, K., et al., *Adenovirus E4-ORF1 Dysregulates Epidermal Growth Factor and Insulin/Insulin-Like Growth Factor Receptors To Mediate Constitutive Myc Expression*. *J Virol*, 2015. **89**(21): p. 10774-85.
27. Munger, J., et al., *Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection*. *PLoS Pathog*, 2006. **2**(12): p. e132.
28. Namazue, J., et al., *Evidence for attachment of fatty acid to varicella-zoster virus glycoproteins and effect of cerulenin on the maturation of varicella-zoster virus glycoproteins*. *Intervirology*, 1989. **30**(5): p. 268-

29. Schaefer, E.A. and R.T. Chung, *HCV and host lipids: an intimate connection*. *Semin Liver Dis*, 2013. **33**(4): p. 358-68.
30. Diamond, D.L., et al., *Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(1): p. e1000719.
31. Heaton, N.S., et al., *Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(40): p. 17345-50.
32. Mosser, A.G., L.A. Caligiuri, and I. Tamm, *Incorporation of lipid precursors into cytoplasmic membranes of poliovirus-infected HeLa cells*. *Virology*, 1972. **47**(1): p. 39-47.
33. Guinea, R. and L. Carrasco, *Phospholipid biosynthesis and poliovirus genome replication, two coupled phenomena*. *Embo j*, 1990. **9**(6): p. 2011-6.
34. Nchoutmboube, J.A., et al., *Increased long chain acyl-Coa synthetase activity and fatty acid import is linked to membrane synthesis for development of picornavirus replication organelles*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(6): p. e1003401.
35. Babiss, L.E., H.S. Ginsberg, and J.E. Darnell, Jr., *Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport*. *Mol Cell Biol*, 1985. **5**(10): p. 2552-8.
36. Atkinson, R.L., *Viruses as an etiology of obesity*. *Mayo Clin Proc*, 2007. **82**(10): p. 1192-8.
37. Dhurandhar, N.V., et al., *Increased adiposity in animals due to a human virus*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000. **24**(8): p. 989-96.
38. Whigham, L.D., B.A. Israel, and R.L. Atkinson, *Adipogenic potential of multiple human adenoviruses in vivo and in vitro in animals*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. **290**(1): p. R190-4.
39. Whigham, L.D., B.A. Israel, and R.L. Atkinson, *Adipogenic potential of multiple human adenoviruses in vivo and in vitro in animals*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. **290**(1): p. R190-R194.
40. Voss, J.D., R.L. Atkinson, and N.V. Dhurandhar, *Role of adenoviruses in obesity*. *Rev Med Virol*, 2015. **25**(6): p. 379-87.
41. Bil-Lula, I., et al., *Adenovirus type 9 enhances differentiation and decreases cytokine release from preadipocytes*. *J Med Virol*, 2015. **87**(2): p. 230-9.
42. Pasarica, M., et al., *Human adenovirus 36 induces adiposity, increases insulin sensitivity, and alters hypothalamic monoamines in rats*. *Obesity (Silver Spring)*, 2006. **14**(11): p. 1905-13.
43. Krishnapuram, R., et al., *Template to improve glycemic control without reducing adiposity or dietary fat*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. **300**(5): p. E779-89.
44. Dhurandhar, N.V., et al., *Human adenovirus Ad-36 promotes weight gain in male rhesus and marmoset monkeys*. *J Nutr*, 2002. **132**(10): p. 3155-60.
45. Xu, M.Y., et al., *Human Adenovirus 36 Infection Increased the Risk of Obesity: A Meta-Analysis Update*. *Medicine (Baltimore)*, 2015. **94**(51): p. e2357.
46. Lynch, J.P., 3rd and A.E. Kajon, *Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention*. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016. **37**(4): p. 586-602.
47. Berk, A.J., *Adenoviridae. Fields Virology cap 55 6ta. ed. Lippincott Pag 1704-1730*. 2013.
48. Robinson, C.M., et al., *Molecular evolution of human adenoviruses*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 1812.
49. Hidalgo P, a.G.R., *Adenoviruses. , in Encyclopedia of Infection and Immunity. , O.E.L.A.r. reserved, Editor. 2022. p. pp. 59-66*.
50. Hidalgo Paloma, a.G.R.A., *Adenoviruses., in Encyclopedia of Infection and Immunity. , O.E.L.A.r. reserved, Editor. 2022. p. pp. 59-66*.
51. Berk, A.J., *Fields virology. Adenoviridae cap 55. 6 th ed, ed. 825740706. Vol. 2. 2013, Philadelphia Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins*.
52. Yamada, T., K. Hara, and T. Kadowaki, *Association of adenovirus 36 infection with obesity and metabolic markers in humans: a meta-analysis of observational studies*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e42031.
53. Shang, Q., et al., *Serological data analyses show that adenovirus 36 infection is associated with obesity: a meta-analysis involving 5739 subjects*. *Obesity (Silver Spring)*, 2014. **22**(3): p. 895-900.
54. da Silva Fernandes, J., et al., *Adenovirus 36 prevalence and association with human obesity: a systematic review*. *Int J Obes (Lond)*, 2021. **45**(6): p. 1342-1356.
55. Marjani, A., et al., *Association of adenovirus 36 infection and obesity; An updated meta-analysis of community-based studies*. *Rev Med Virol*, 2022. **32**(1): p. e2255.
56. Dhurandhar, N.V., et al., *Transmissibility of adenovirus-induced adiposity in a chicken model*. *Int J Obes*

- Relat Metab Disord, 2001. **25**(7): p. 990-6.
57. Vangipuram, S.D., et al., *Adipogenic human adenovirus-36 reduces leptin expression and secretion and increases glucose uptake by fat cells*. International Journal of Obesity, 2007. **31**(1): p. 87-96.
 58. Kusminski, C.M., et al., *E4orf1 induction in adipose tissue promotes insulin-independent signaling in the adipocyte*. Mol Metab, 2015. **4**(10): p. 653-64.
 59. Dhurandhar, E.J., et al., *E4orf1 improves lipid and glucose metabolism in hepatocytes: a template to improve steatosis & hyperglycemia*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47813.
 60. Vangipuram, S.D., et al., *A human adenovirus enhances preadipocyte differentiation*. Obes Res, 2004. **12**(5): p. 770-7.
 61. Wang, Z.Q., et al., *Human adenovirus type 36 enhances glucose uptake in diabetic and nondiabetic human skeletal muscle cells independent of insulin signaling*. Diabetes, 2008. **57**(7): p. 1805-13.
 62. Ponterio, E. and L. Gnessi, *Adenovirus 36 and Obesity: An Overview*. Viruses, 2015. **7**(7): p. 3719-40.
 63. Thai, M., et al., *MYC-induced reprogramming of glutamine catabolism supports optimal virus replication*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8873.
 64. Javier, R.T., *Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses*. Oncogene, 2008. **27**(55): p. 7031-46.
 65. Frese, K.K., et al., *Selective PDZ protein-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by the adenovirus E4-ORF1 oncoprotein*. Oncogene, 2003. **22**(5): p. 710-721.
 66. Javier, R.T. and A.P. Rice, *Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses*. J Virol, 2011. **85**(22): p. 11544-56.
 67. Scott, R.E. and D.L. Florine, *Cell cycle models for the aberrant coupling of growth arrest and differentiation in hyperplasia, metaplasia, and neoplasia*. Am J Pathol, 1982. **107**(3): p. 342-8.
 68. Yeh, W.C., et al., *Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins*. Genes Dev, 1995. **9**(2): p. 168-81.
 69. Gregoire, F.M., C.M. Smas, and H.S. Sul, *Understanding adipocyte differentiation*. Physiol Rev, 1998. **78**(3): p. 783-809.
 70. Moseti, D., A. Regassa, and W.K. Kim, *Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(1).
 71. Dubuisson, O., et al., *PPARgamma-independent increase in glucose uptake and adiponectin abundance in fat cells*. Endocrinology, 2011. **152**(10): p. 3648-60.
 72. Rathod, M., et al., *Viral mRNA expression but not DNA replication is required for lipogenic effect of human adenovirus Ad-36 in preadipocytes*. Int J Obes (Lond), 2007. **31**(1): p. 78-86.
 73. MacDougald, O.A. and M.D. Lane, *Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 345-73.
 74. Scott, R.E., et al., *Coupling of proadipocyte growth arrest and differentiation. II. A cell cycle model for the physiological control of cell proliferation*. J Cell Biol, 1982. **94**(2): p. 400-5.
 75. Wille, J.J., Jr. and R.E. Scott, *Topography of the predifferentiation G0 growth arrest state relative to other growth arrest states in the G1 phase of the cell cycle*. J Cell Physiol, 1982. **112**(1): p. 115-22.
 76. Prusinkiewicz, M.A., et al., *Differential Effects of Human Adenovirus E1A Protein Isoforms on Aerobic Glycolysis in A549 Human Lung Epithelial Cells*. 2020. **12**(6): p. 610.
 77. Prusinkiewicz, M.A., et al., *Differential Effects of Human Adenovirus E1A Protein Isoforms on Aerobic Glycolysis in A549 Human Lung Epithelial Cells*. Viruses, 2020. **12**(6): p. 610.
 78. King, C.R., et al., *Hacking the Cell: Network Intrusion and Exploitation by Adenovirus E1A*. mBio, 2018. **9**(3).
 79. Prusinkiewicz, M.A. and J.S. Mymryk, *Metabolic Reprogramming of the Host Cell by Human Adenovirus Infection*. Viruses, 2019. **11**(2).
 80. Frese, K.K., et al., *Selective PDZ protein-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by the adenovirus E4-ORF1 oncoprotein*. Oncogene, 2003. **22**(5): p. 710-21.
 81. Strath, J., et al., *Identification of genes differentially expressed as result of adenovirus type 5- and adenovirus type 12-transformation*. BMC Genomics, 2009. **10**(1): p. 67.
 82. Zhao, H., et al., *The transcriptome of the adenovirus infected cell*. Virology, 2012. **424**(2): p. 115-28.
 83. He, S., et al., *LRG1 is an adipokine that mediates obesity-induced hepatosteatosis and insulin resistance*. J Clin Invest, 2021. **131**(24).
 84. Musovic, S., et al., *Resistin is co-secreted with adiponectin in white mouse adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2021. **534**: p. 707-713.
 85. Yoshiga, D., et al., *Adaptor protein SH2-B linking receptor-tyrosine kinase and Akt promotes adipocyte*

- differentiation by regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma messenger ribonucleic acid levels.* Mol Endocrinol, 2007. **21**(5): p. 1120-31.
86. Zhang, M., Y. Deng, and H. Riedel, *PSM/SH2B1 splice variants: critical role in src catalytic activation and the resulting STAT3s-mediated mitogenic response.* J Cell Biochem, 2008. **104**(1): p. 105-18.
87. Doğan, A., et al., *Cytoglobin: a potential marker for adipogenic differentiation in preadipocytes in vitro.* Cytotechnology, 2017. **69**(1): p. 157-165.
88. Xu, A., et al., *Identification of novel putative membrane proteins selectively expressed during adipose conversion of 3T3-L1 cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(4): p. 1161-7.
89. Berger, E. and A. Geloën, *FABP4 Controls Fat Mass Expandability (Adipocyte Size and Number) through Inhibition of CD36/SR-B2 Signalling.* Int J Mol Sci, 2023. **24**(2).
90. Wabitsch, M., et al., *The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation.* Metabolism, 1995. **44**(10 Suppl 4): p. 45-9.
91. Dutton, S. and P. Trayhurn, *Regulation of angiopoietin-like protein 4/fasting-induced adipose factor (Angptl4/FIAF) expression in mouse white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes.* Br J Nutr, 2008. **100**(1): p. 18-26.
92. Zhang, Q., et al., *Roles and action mechanisms of WNT4 in cell differentiation and human diseases: a review.* Cell Death Discov, 2021. **7**(1): p. 287.
93. Rao, D.M., et al., *Wnt family member 4 (WNT4) and WNT3A activate cell-autonomous Wnt signaling independent of porcupine O-acyltransferase or Wnt secretion.* J Biol Chem, 2019. **294**(52): p. 19950-19966.
94. Payne, V.A., et al., *Sequential regulation of diacylglycerol acyltransferase 2 expression by CAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) and C/EBPalpha during adipogenesis.* J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 21005-14.
95. Szatmari, I., et al., *PPARGgamma regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism.* Blood, 2007. **110**(9): p. 3271-80.
96. Ku, H.C. and C.F. Cheng, *Master Regulator Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Metabolic Homeostasis and Cancer.* Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 556.
97. Pereira, M.J., et al., *Interleukin-33 inhibits glucose uptake in human adipocytes and its expression in adipose tissue is elevated in insulin resistance and type 2 diabetes.* Cytokine, 2023. **161**: p. 156080.
98. Deis, J.A., et al., *Adipose Lipocalin 2 overexpression protects against age-related decline in thermogenic function of adipose tissue and metabolic deterioration.* Mol Metab, 2019. **24**: p. 18-29.
99. Vangipuram, S.D., et al., *Adipogenic human adenovirus-36 reduces leptin expression and secretion and increases glucose uptake by fat cells.* Int J Obes (Lond), 2007. **31**(1): p. 87-96.
100. Pasarica, M., et al., *Adipogenic human adenovirus Ad-36 induces commitment, differentiation, and lipid accumulation in human adipose-derived stem cells.* Stem Cells, 2008. **26**(4): p. 969-78.
101. Krishnapuram, R., et al., *Infectivity period of mice inoculated with human adenoviruses.* Lab Anim, 2011. **45**(2): p. 103-8.
102. Mostofinejad, Z., et al., *Antidiabetic E4orf1 protein prevents hepatic steatosis and reduces markers of aging-related cellular damage in high fat fed older mice.* BMJ Open Diab Res Care, 2021. **9**(1): p. e002096.
103. Márquez, V., et al., *Adipocyte commitment of 3T3-L1 cells is required to support human adenovirus 36 productive replication concurrent with altered lipid and glucose metabolism.* 2022. **12**.
104. Babich, A. and J.R. Nevins, *The stability of early adenovirus mRNA is controlled by the viral 72 kd DNA-binding protein.* Cell, 1981. **26**(3, Part 1): p. 371-379.
105. Pilder, S., et al., *The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs.* Mol Cell Biol, 1986. **6**(2): p. 470-6.
106. Hardy, S., D.A. Engel, and T. Shenk, *An adenovirus early region 4 gene product is required for induction of the infection-specific form of cellular E2F activity.* Genes Dev, 1989. **3**(7): p. 1062-74.
107. Engel, D.A., S. Hardy, and T. Shenk, *cAMP acts in synergy with E1A protein to activate transcription of the adenovirus early genes E4 and E1A.* Genes Dev, 1988. **2**(12a): p. 1517-28.
108. Huang, M.M. and P. Hearing, *The adenovirus early region 4 open reading frame 6/7 protein regulates the DNA binding activity of the cellular transcription factor, E2F, through a direct complex.* Genes Dev, 1989. **3**(11): p. 1699-710.
109. Chang, L.S. and T. Shenk, *The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters.* J Virol, 1990. **64**(5): p. 2103-9.
110. Hayes, B.W., et al., *The adenovirus L4 100-kilodalton protein is necessary for efficient translation of viral*

- late mRNA species*. J Virol, 1990. **64**(6): p. 2732-42.
111. Mathews, M.B., *Control of translation in adenovirus-infected cells*. Enzyme, 1990. **44**(1-4): p. 250-64.
 112. Nordqvist, K. and G. Akusjärvi, *Adenovirus early region 4 stimulates mRNA accumulation via 5' introns*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(24): p. 9543-7.
 113. Bridge, E., C. Hemström, and U. Pettersson, *Differential regulation of adenovirus late transcriptional units by the products of early region*. Virology, 1991. **183**(1): p. 260-6.
 114. Cuesta, R., Q. Xi, and R.J. Schneider, *Preferential translation of adenovirus mRNAs in infected cells*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2001. **66**: p. 259-67.
 115. Hidalgo, P., et al., *E1B-55K Is a Phosphorylation-Dependent Transcriptional and Posttranscriptional Regulator of Viral Gene Expression in Human Adenovirus C5 Infection*. Journal of Virology, 2022. **96**(5): p. e02062-21.
 116. Hidalgo, P., et al., *Morphological, Biochemical, and Functional Study of Viral Replication Compartments Isolated from Adenovirus-Infected Cells*. Journal of Virology, 2016. **90**(7): p. 3411-3427.
 117. Madhu, B., et al., *Metabolomic changes during cellular transformation monitored by metabolite-metabolite correlation analysis and correlated with gene expression*. Metabolomics, 2015. **11**(6): p. 1848-1863.
 118. Rogers, P.M., et al., *Human adenovirus Ad-36 induces adipogenesis via its E4 orf-1 gene*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(3): p. 397-406.
 119. Farmer, S.R., *Regulation of PPAR γ activity during adipogenesis*. International Journal of Obesity, 2005. **29**(1): p. S13-S16.
 120. Jiao, Y., et al., *Regulation of PPAR γ and CIDEA expression by adenovirus 36 in adipocyte differentiation*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2017. **428**(1): p. 1-8.
 121. Afruza, R., et al., *E4orf1, an Adeno-viral protein, attenuates renal lipid accumulation in high fat fed mice: A novel approach to reduce a key risk factor for chronic kidney disease*. Heliyon, 2020. **6**(10): p. e05261.
 122. Rogers, P.M., et al., *Metabolically favorable remodeling of human adipose tissue by human adenovirus type 36*. Diabetes, 2008. **57**(9): p. 2321-31.
 123. Dhurandhar, E.J., et al., *E4orf1: a novel ligand that improves glucose disposal in cell culture*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23394.
 124. Rosen, E.D., et al., *C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 22-6.
 125. Linhart, H.G., et al., *C/EBP α is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12532-7.
 126. Tessier, T.M., et al., *Almost famous: Human adenoviruses (and what they have taught us about cancer)*. Tumour Virus Research, 2021. **12**: p. 200225.
 127. Ferrari, R., et al., *Adenovirus small E1A employs the lysine acetylases p300/CBP and tumor suppressor Rb to repress select host genes and promote productive virus infection*. Cell Host Microbe, 2014. **16**(5): p. 663-76.
 128. Ferrari, R., et al., *Epigenetic reprogramming by adenovirus e1a*. Science, 2008. **321**(5892): p. 1086-8.
 129. Berk, A.J., et al., *Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs*. Cell, 1979. **17**(4): p. 935-44.
 130. Shim, H., et al., *c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(13): p. 6658-63.
 131. Osthus, R.C., et al., *Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21797-800.
 132. Li, F., et al., *Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(14): p. 6225-34.
 133. Gao, P., et al., *c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 762-5.
 134. Voss JD, A.R., Dhurandhar NV., *Role of adenoviruses in obesity*. Rev Med Viro, 2015: p. 379-387.
 135. Manning, B.D. and A. Toker, *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network*. Cell, 2017. **169**(3): p. 381-405.
 136. Sohn, S.Y. and P. Hearing, *Adenoviral strategies to overcome innate cellular responses to infection*. FEBS Lett, 2019. **593**(24): p. 3484-3495.
 137. Goossens, V.J., et al., *Lack of evidence for the role of human adenovirus-36 in obesity in a European cohort*. Obesity (Silver Spring), 2011. **19**(1): p. 220-1.
 138. Goossens, V.J. and C.A. Bruggeman, *Response to 'human adenovirus-36 and childhood obesity'*. Pediatr Obes, 2012. **7**(2): p. e19-20.

11. Anexos



the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

OPEN ACCESS

EDITED BY

Bibo Zhu,
University of Virginia, United States

REVIEWED BY

Usama Ashraf,
Stanford University, United States
Hao Zhang,
Sun Yat-sen University, China

*CORRESPONDENCE

Ramón A. González
rgonzalez@uaem.mx

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Virus and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

RECEIVED 10 August 2022

ACCEPTED 05 September 2022

PUBLISHED 27 September 2022

CITATION

Márquez V, Ballesteros G, Dobner T
and González RA (2022) Adipocyte
commitment of 3T3-L1 cells is
required to support human
adenovirus 36 productive replication
concurrent with altered lipid and
glucose metabolism.
Front. Cell. Infect. Microbiol.
12:1016200.
doi: 10.3389/fcimb.2022.1016200

COPYRIGHT

© 2022 Márquez, Ballesteros, Dobner
and González. This is an open-access
article distributed under the terms of

Adipocyte commitment of 3T3-L1 cells is required to support human adenovirus 36 productive replication concurrent with altered lipid and glucose metabolism

cell culture. HAdV-D36 infection alters gene expression and the metabolism of the infected cells resulting in increased glucose internalization and triglyceride accumulation. Although HAdV-D36 prevalence correlates with obesity in humans, whether human preadipocytes may be targeted *in vivo* has not been determined and metabolic reprogramming of preadipocytes has not been explored in the context of the viral replication cycle. HAdV-D36

infection of the mouse fibroblasts, 3T3-L1 cells, which can differentiate into adipocytes, promotes proliferation and differentiation, but replication of the virus in these cells is abortive as indicated by short-lived transient expression of viral mRNA and a progressive loss of viral DNA. Therefore, we have evaluated whether a productive viral replication cycle can be established in the 3T3-L1 preadipocyte model under conditions that drive the cell differentiation process. For this purpose, viral mRNA levels and viral DNA replication were measured by RT-qPCR and qPCR, respectively, and viral progeny production was determined by plaque assay. The lipogenic effect of infection was evaluated with Oil Red O (ORO) staining, and expression of genes that control lipid and glucose metabolism was measured by RT-qPCR. In the context of a viral productive cycle, HAdV-D36 modulated the expression of the adipogenic genes, C/EBPa, C/EBPb and PPAR γ , as well as intracellular lipid accumulation,

Verónica
Márquez¹, Grisel
Ballesteros¹,
Thomas
Dobner² and
Ramón A.
González^{1*}

¹Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico, ²Department of Viral Transformation, Leibniz Institute of Virology, Hamburg, Germany

Human adenovirus 36 (HAdV-D36) can cause obesity in animal models, induces an adipogenic effect and increased adipocyte differentiation in

and the infection was accompanied by altered expression of glycolytic genes. The results show that only adipocyte-committed 3T3-L1 cells are permissive for the expression of early and late viral mRNAs, as well as viral DNA replication and progeny production, supporting productive HAdV-D36 viral replication, indicating that a greater effect on adipogenesis occurs in adipocytes that support productive viral replication.

KEYWORDS

human adenovirus 36, obesity, adipocyte commitment, permissive replication, lipid and glucose metabolism

Introduction

Obesity, defined as a metabolic disorder caused by excessive caloric intake, is considered a major nutritional burden in both high-income and low-income countries (Romieu et al., 2017), and has become one of the most serious health problems globally. Obesity is a multifactorial disease caused by the interaction of genetic, epigenetic, metabolic, lifestyle, immunologic and environmental factors, and is currently considered a pandemic phenomenon (Chooi et al., 2019; Jaacks et al., 2019). Attempts to explain the increase in obesity in most countries of the world during the last four decades have led to the search for additional factors that may be more adequately adjusted to the characteristics of an epidemiological phenomenon (Dhurandhar, 2001; Blaut and Clavel, 2007; Mitra and Clarke, 2010). The accumulated evidence has shown that some virus infections induce metabolic alterations and have adipogenic effects in different animal species (Dhurandhar et al., 2000; Whigham et al., 2006; Pasarica and Dhurandhar, 2007; Munger et al., 2008; Voss et al., 2015); however, many questions still remain about the role of infectious agents and their contribution to obesity in humans and the current obesity pandemic.

The prevalence of Human Adenovirus 36 (HAdV-D36) has been correlated with obesity in humans (Yamada et al., 2012; Shang et al., 2014; Xu et al., 2015). Moreover, virus infection can cause obesity in animal models (Dhurandhar et al., 2001; Dhurandhar et al., 2002; Atkinson, 2007) and alter lipid metabolism in cellular models (Vangipuram et al., 2004; Pasarica et al., 2008). In animal models HAdV-D36 infection increases adiposity, decreases cholesterol and serum triglycerides, alters the expression of adipogenic genes, increases glucose metabolism and promotes preadipocyte to adipocyte differentiation, as well as cellular proliferation without cell lysis (Pasarica et al., 2008). In cellular models HAdV-D36 infection of rodent preadipocytes increases differentiation and lipid accumulation (Vangipuram et al.,

2004), and enhances differentiation of human adipose-derived stem cells (Pasarica et al., 2008). However, detailed studies of the effect of productive virus replication in adipocytes that are permissive to infection is still lacking. Therefore, studies are needed to determine the specific effects of HAdV-D36 infection and replication on adipocytes at different stages of adipocyte differentiation.

The molecular events associated with adipocyte differentiation have been studied in detail in the mouse preadipocytes, 3T3-L1 cells, because these cells can be induced to differentiate in response to dimethyl-ethyl-xanthine (MIX), dexamethasone (DEX), and insulin (MacDougald and Lane, 1995; Yeh et al., 1995), an adipogenic cocktail commonly abbreviated MDI. The adipogenic program follows two sequential phases: the first includes events that favor the commitment of cells to preadipocytes, while the second involves mechanisms that allow mature adipocyte formation (Hershey and Merrick, 2000). Studies of the coordinated activation of Cytosine-Cytosine-Adenosine-Adenosine-Thymidine/Enhancer-binding proteins (C/EBPs) and peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) have shown that the induction of C/EBP β increases expression of C/EBP α , which in turn activates the expression of adipocyte genes and thus stimulates the differentiation process (Tanaka et al., 1997; Gregoire et al., 1998; Salma et al., 2004). PPAR γ and C/EBP α are two key regulators of adipogenesis that are necessary for adipocyte differentiation both in cell culture and in animal models, and act in a reciprocal positive feedback loop (Wu et al., 1999; Linhart et al., 2001; Rosen et al., 2002; Farmer, 2005). HAdV-D36 infection increases the expression of C/EBP β downstream genes, C/EBP α and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH), suggesting that a direct target of HAdV-D36 in the adipocyte differentiation program may be C/EBP β (Pasarica et al., 2008; Na et al., 2012). C/EBP β results in activation of C/EBP α and PPAR γ at an early stage, which in turn increase adiponectin and fatty acid synthase (FAS) levels for mature adipocyte formation.

Although HAdV-D36 infection of 3T3-L1 promotes cell proliferation and differentiation (Vangipuram et al., 2004; Dubuisson et al., 2011), the viral replication cycle is abortive and cellular metabolism is altered without ensuing cell lysis or cytopathic effect (Rathod et al., 2007). Hence, the effects of HAdV-D36 replication in adipocyte differentiation and lipid metabolism have not yet been fully elucidated. Therefore, to determine under what conditions the cells are permissive for HAdV-D36 replication and to evaluate the adipogenic effect in the context of viral replication, we measured viral early and late mRNA expression, DNA replication and progeny production, as well as genes that are key regulators of the adipogenic cascade, *C/EBPα*, *C/EBPβ* and *PPARγ*, and *MYC* glycolytic target genes, in 3T3-L1 cells infected with HAdV-D36 at different stages of differentiation (Figure 1). The results show that the infection with HAdV-D36 increased the expression of adipogenic genes *C/EBPα*, *C/EBPβ* and *PPARγ*, as well as intracellular lipid accumulation, regardless of the differentiation stage. However, only 3T3-L1 cells that have engaged the differentiation process were permissive for HAdV-D36 replication allowing the expression of early and late viral mRNAs, as well as viral DNA replication and viral progeny production, concurrent with greater metabolic alterations and amplified adipogenic effects.

medium (MM) consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 1.5 g/l NaHCO₃, supplemented with 10% (vol/vol) bovine serum (BS), 0.1% sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 37°C in 5% CO₂. For the differentiation medium (MDI), 0.5 mM dimethyl-ethyl-xanthine, 25 mg/ml dexamethasone, 10 mg/ml insulin were added. The culture medium was replaced with fresh medium every 2 days. Human lung carcinoma A549 cells were maintained in monolayer cultures in DMEM supplemented with 10% (vol/vol) BS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37°C in 5% CO₂. Human Adenovirus 36 wild type (HAdV-D36) was propagated in A549 cells and virus titers were determined using plaque assays. Briefly, A549 cells were grown in 12-well plates with DMEM/5% BS + 5% Fetal Bovine Serum (FBS). When the cells reached 90% confluence, they were infected and overlaid with agarose (DMEM 2X supplemented with 7.5% NaHCO₃, 10 mg/ml gentamicin, 1 M MgCl₂, 2% FBS and 1% agarose). Serial dilutions were used to determine viral titers. When plaque formation was observed (14 days post-infection), 125 µl of neutral red (1% in MilliQ water) was added to the medium and after 4 hours plaques were counted at each of the dilutions to calculate virus titer. The 3T3-L1 cells were infected with HAdV-D36 at a MOI of 5 PFU/cell in all experiments.

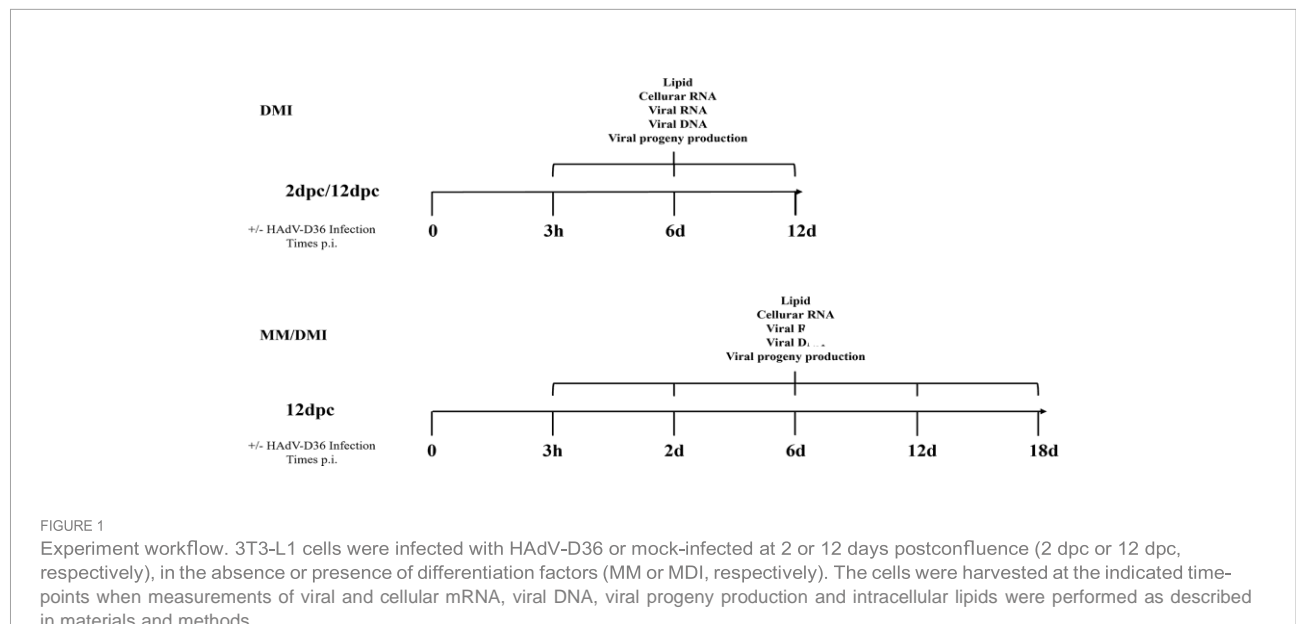
Materials and methods

Cells and viruses

Mouse 3T3-L1 cells were used as a model of preadipocytes. The cells were maintained in monolayer cultures in minimum

Quantitative PCR and RT-PCR

DNA or RNA was isolated from total lysates of mock-infected (MK) or HAdV-D36-infected cells. 3T3-L1 cells were grown to confluence and 12 days after confluence, were



infected with HAdV-D36 at a MOI of 5 PFU/cell. For viral DNA, the cells were collected at 3 hpi, 2 dpi, 6 dpi, 12 dpi and 18 dpi and centrifuged for 5 minutes at 400 g at 4°C; the cell pellet was resuspended in 1 mg/ml Proteinase K (Promega) and 1:200 Tween20 (Promega) and incubated for 1 h at 55°C. After incubation, Proteinase K was inactivated for 10 min at 95°C. The solution was centrifuged for 2 min at 10,000 g and the supernatant was collected. The DNA was precipitated with 1/10 volume of 3M Sodium Acetate and 1 volume of isopropanol at 4°C overnight. The DNA was resuspended in 10 ml of 10 mM Tris pH 7.4 and stored at -20°C until use. For RNA, the cells were collected at 3 hpi, 2 dpi, 6 dpi, 12 dpi and 18 dpi and centrifuged for 5 minutes at 400 g at 4°C; the cell pellet was extracted using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The RNA from each sample was quantified using NanoDrop. To analyze RNA, equal volumes (approximately 100 ng) of RNA were reverse transcribed using Revert-Aid reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific) in 20 µl reaction volumes. Viral or cellular genes were quantified using the Power SYBR green PCR master mix kit according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The StepOne system (Applied Biosystems) was used for real-time thermocycling. The cDNA samples were analyzed using the DDCT comparative method. The U1 cellular gene was used as the internal reference and the samples at the earliest time-point

were used as the calibrator. All experiments were performed in technical duplicates for two independent experiments.

Primers

The CLC Sequence Viewer (CLC Bio), Primer Plex (Premier Biosoft), and Primer-BLAST (NCBI) programs were used to design primers specific for the viral and cellular gene sequences of interest. These primers allowed the amplification of a unique product of the expected size, as determined by melt curve analyses. All primers were validated to confirm an amplification efficiency of 100% ± 10%, as calculated by the linear regression obtained from standard curve assays. The primers used to quantify viral and cellular mRNAs are shown in Table 1.

Intracellular lipid staining

The accumulation of intracellular lipids was determined with the Lipid Oil Red O (ORO) Staining; 3T3-L1 cells were grown in 35 mm culture plates and 12 days after confluence were infected as described above. The cells were fixed for 10 min with 10% formalin; formalin was removed and the cells were gently washed 2X with sterile Milli-Q water. Isopropanol (60%) was

TABLE 1 Primers used for qPCR and RT-qPCR.

Target genes	Primer sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)
E1A 21k	Fw. CGGCGACCTGGCTGTGATTATG Rv. TTCAGGTATGGGAGGCAGAGTGG	253
L3 Hexón	Fw ATCGCAGTCGCAAATGGCCA Rv CCCAGGCTGAAGTACGTGTC	149
IVa2	Fw. TGGAGACGCGAGGGCGAAG Rv. ACGTCACCGAGCTCTGGGAC	112
HAdV-D36 DNA	Fw. CCGTGTGGTTAAAGAGCAGC Rv. TTCCACATTCCTCCGCATGG	184
HK2	Fw. CGGCCGTGCTACAATAGG Rv. CTCGGGATCATGTGAGGG	80
PFK	Fw GGC GGAGATCACATCAGG Rv GTAATCCCACGCTTACCAG	88
GAPDH	Fw. CCCACCACACTGAATCTCCC Rv. TACATGACAAGGTGCGGCTC	88
LDHA	Fw. ACGTCAGCATAGCTGTCCACT Rv. TGAGATCCGGAATCGGCGG	83
PPAR α	Fw GCCTGCGAAAGCCTTTGGTG Rv GGCTTCACATTCAGCAAACCTGG	151
C/EBP α	Fw AGGAACACGAAGCAGCATCAG Rv CGCACATTCACATTGCACAA	141
C/EBP β	Fw CCGACTGCAAGCGGAAGGAGGA Rv GGCTGGACGACGAGGATGTGGA	150

added to each well and incubated for 5 min. Isopropanol was removed and Oil Red O Working Solution (0.5% W/V Oil Red/ Isopropanol 100%) was added and incubated for 1 h. The cells were washed five times with Milli-Q water and viewed and photographed using bright field microscopy. For ORO quantification, stained cells were treated with 100% isopropanol to elute the staining and absorbance of the eluate was measured at 510 nm.

Statistical analyses

All data were analyzed with two-way analysis of variance (ANOVA) and multiple t tests using GraphPad 8.0.2 for Microsoft (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

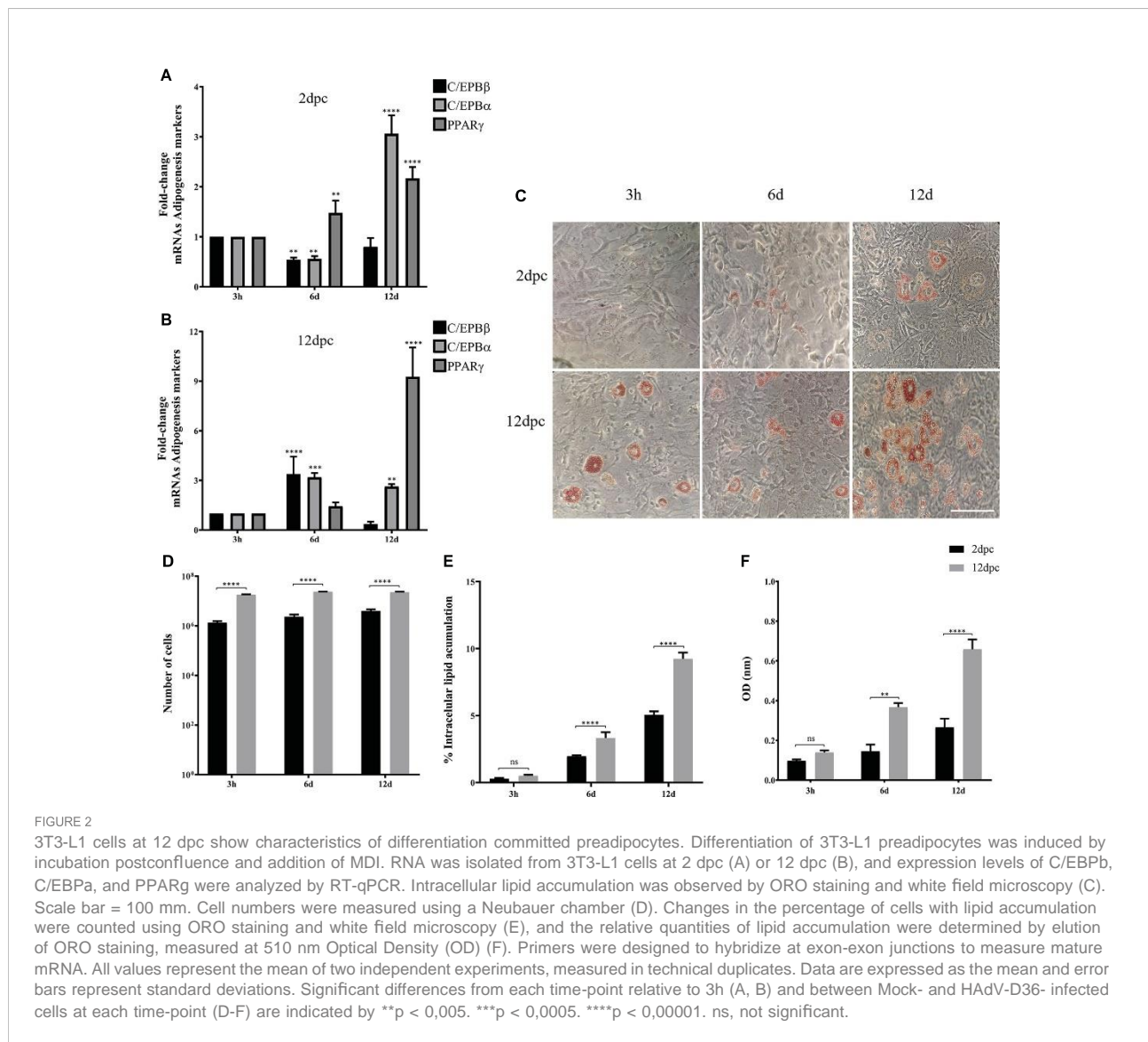
3T3-L1 cells that have initiated adipocytedifferentiation are susceptible but not permissive to HAdV-D36 infection

The 3T3-L1 adipocyte model has been used extensively to study the process of cell differentiation and commitment. When the cells reach confluence proliferation is arrested and initial preadipocyte differentiation ensues. By 12 days post-confluence (dpc) the cells commit to differentiation, undergo mitotic clonal expansion and progress to adipocyte maturation (Scott et al., 1982; Wille and Scott, 1982). Cell differentiation and commitment can also be induced by dimethyl-ethyl-xanthine, dexamethasone and insulin (MDI) (Yeh et al., 1995). In both conditions the differentiation process is accompanied at the early phase by increased expression of the C/EBPs adipogenic regulators, which lead to PPAR γ expression and lipid accumulation induced by adiponectin and fatty acid synthase (FAS) for mature adipocyte formation at the later phase (Gregoire et al., 1998; Mosefi et al., 2016).

To evaluate if the phase of cell differentiation determines whether the 3T3-L1 cells are permissive for HAdV-D36 replication, and analyze the effect of productive viral replication on adipogenesis, we decided to compare the effect of HAdV-D36 infection in 3T3-L1 cells at 2 and 12 dpc, in the presence of MDI. Initially the expression levels of C/EPBb, C/EPBa, PPAR γ mRNAs and lipid accumulation were measured comparing uninfected 3T3-L1 cells in medium supplemented with MDI at 2 and 12 dpc. The cells were then harvested at 3 h, 6 d and 12 d after MDI addition (Figure 2), as described in the Materials and Methods section. The cellular mRNAs were measured by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) with primers targeting mature mRNA sequences, and lipid accumulation was measured with the ORO reagent. As expected, the cell number increased approximately ten-fold from

2 dpc to 12 dpc in the presence of MDI, but only approximately 2-fold every 6 days when cells at 2 dpc were stimulated with MDI, and increased only by approximately 30% between 2 and 6 days when MDI was added to cells at 12 dpc (Figure 2D and Table 2). Also as expected, both the percentage of cells (Figure 2E) and the total lipid accumulation per cell (Figure 2F) was significantly higher in the cells supplemented with MDI at 12 dpc. The levels of C/EBPb and C/EBPd have been shown to increase transiently during the early phase of differentiation and to decrease at the later stage, when C/EPBa and consequently PPAR γ accumulate leading to synthesis and storage of fatty acids (MacDougald and Lane, 1995). Significant differences in the patterns of expression of CEBPs and PPAR γ were observed between the cells at 2 dpc and 12 dpc (Figures 2A, B). The cells at 12 dpc displayed 2 to 4-fold higher levels and a pattern of C/EPBb, C/EPBa, PPAR γ mRNAs that would be expected for committed adipocytes at 12 d after MDI addition to the medium (Figure 2B), where a transient increase of C/EPBb and C/EPBa was followed by higher levels of PPAR γ .

Using the same experimental set-up, we then evaluated the conditions in which 3T3-L1 cells are permissive for HAdV-D36 replication. The 3T3-L1 cells supplemented with MDI at 2 and 12 dpc were infected at a MOI of 5 PFU/cell. DNA and RNA were isolated and viral early and late mRNA expression levels, as well as viral DNA and progeny production were determined at 3 hours, 6 days and 12 days post infection (hpi or dpi). The viral early, E1A, and viral late, hexon, mRNAs were chosen because E1A expression is required to induce expression of all viral genes and the hexon gene is only expressed after viral DNA replication initiates (Berk, 2013). Very low and transient levels of viral mRNAs were measured in cells infected at 2 dpc, and no viral DNA replication or progeny production were detected (data not show), in agreement with previous results (Rathod et al., 2007). In contrast, steady state levels of both E1A and hexon mRNA increased when the cells were infected at 12 dpc. Interestingly, E1A and hexon mRNA, and viral DNA peaked at 6 dpi, and although viral progeny production accumulated until 12 dpi it did not significantly increase after 6 dpi (Figures 3A–D). These results indicate that in the presence of MDI at 2 dpc the 3T3-L1 cells are susceptible to infection, but only cells at 12 dpc are permissive for productive viral replication. The patterns of C/EBPb, C/EPBa and PPAR γ differed markedly between the cells infected at 2 and 12 dpc (Figures 3E, F). High C/EBPb levels were detected at 12 dpi in the cells infected at 2 dpc, but were not accompanied by higher PPAR γ . In contrast, higher levels of PPAR γ were observed in the cells infected at 12 dpc at 6 dpi, but accumulation of C/EPBa was higher at 12 dpi, an expression pattern that was different from the uninfected cells (compare Figures 2A, B with Figures 3E, F). Both the percentage of cells and the total lipid accumulation increased sharply in the cells infected at 12 dpc, while the lipid increase in cells infected at 2 dpc was similar to that of uninfected cells (compare Figures 2C–F to Figures 3G–J). As mentioned above, after differentiation is



induced the preadipocytes undergo postconfluent mitosis with at least one round of DNA replication and cell division, and subsequent growth arrest (Scott et al., 1982; Wille and Scott, 1982). In the infected cells the number of cells at 2 dpc (Figure 3H black bars and Table 3) doubled by 6 dpi and continued to proliferate. In contrast, cells at 12 dpc increased

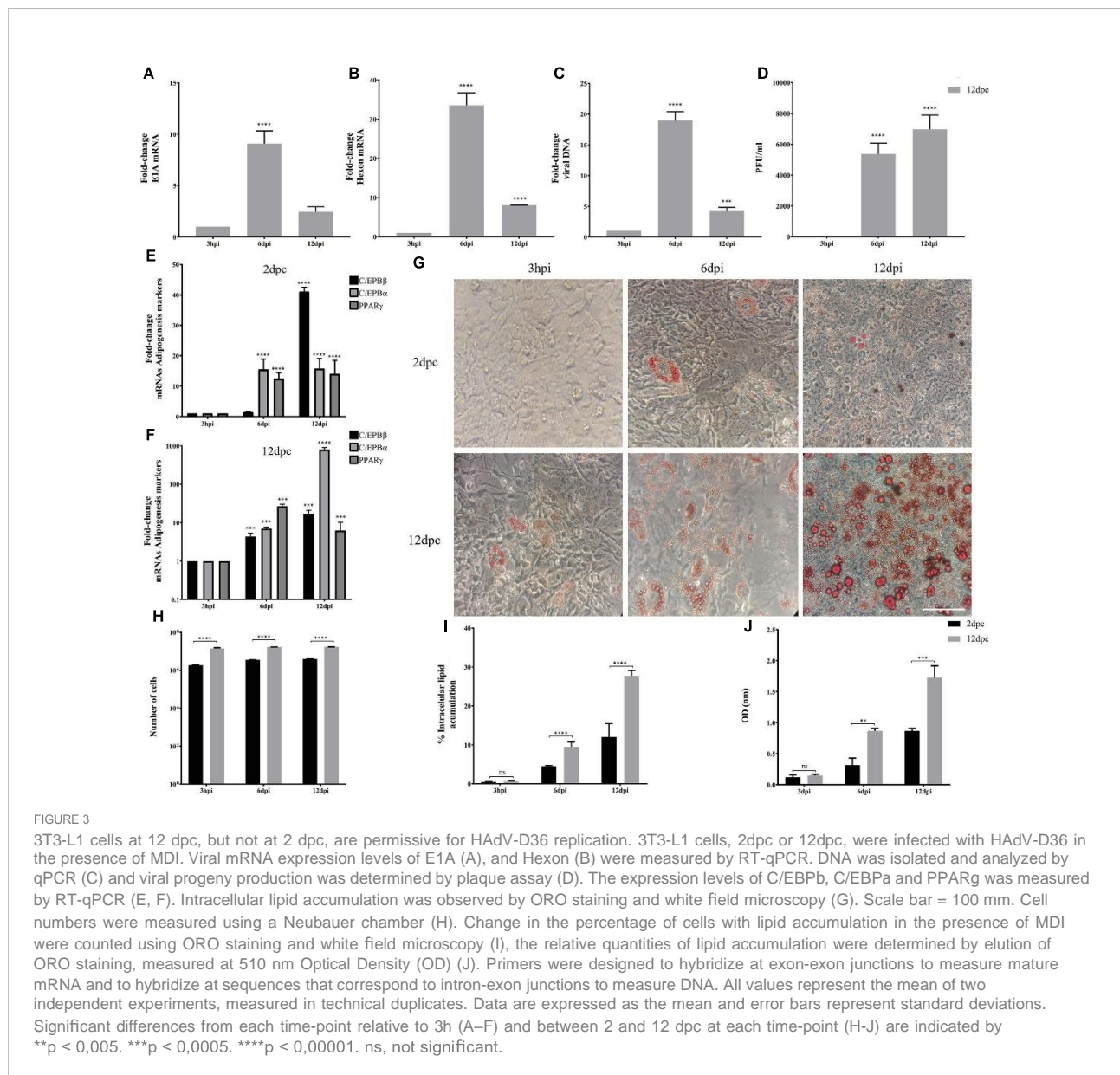
only by 20%, and there was no increase by 12 dpi (Figure 3H gray bars and Table 3).

TABLE 2 Number of 3T3-L1 cells at different time-points at 2 and 12 dpc in MDI.

Time	Number of cells	
	2dpc	12dpc
3h	1.36 X 10 ⁶	1.82 X 10 ⁷
6d	2.35 X 10 ⁶	2.36 X 10 ⁷
12d	4.02 X 10 ⁶	2.30 X 10 ⁷

3T3-L1 adipocyte commitment is required to support HAdV-D36 productive replication

Taken together, the results described above suggest that adipocyte commitment may be required to support HAdV- D36 productive viral replication, and that the effect of HAdV- D36 infection on adipogenesis may be greater when cells are committed to adipocytes. Therefore, we decided to compare C/EBP β , C/EBP α and PPAR γ mRNAs, and lipid levels as above, in both mock-infected (MK) and HAdV-D36-infected 3T3-L1 cells at 12 dpc, in the absence (Figure 4) or in the presence (Figure 5)



of MDI. The cells were harvested at 3 h, 2 d, 6 d, 12 d and 18 d (3 hpi, 2 dpi, 6 dpi, 12 dpi and 18 dpi for infected cells). The 2 and 18 d time-points were included in these experiments in an attempt to gain better insight into the initial effect of MDI,

TABLE 3 Number of 3T3-L1 cells at different time-points. HA Δ V-36-infected at 2 and 12 days dpc in MDI.

Time post infection	Number of cells	
	2dpc	12dpc
3h	1.86 X 10 ⁶	1.42 X 10 ⁷
6d	3.52 X 10 ⁶	1.70 X 10 ⁷
12d	4.00 X 10 ⁶	1.73 X 10 ⁷

and because PPAR γ mRNA levels were lower than those of C/EBP α mRNA at 12 dpi in cells infected both at 2 and 12 dpc, suggesting the possibility that the cells have not reached mature adipocyte phase by 12 days. The data obtained with these experiments are shown in Figures 4, 5 and Table 4, 5, where complex patterns and marked differences in the mRNA levels of C/EBP β , C/EBP α and PPAR γ were observed between all conditions tested. However, only in the infected cells in the presence of MDI, 10- to 500-fold increments in the levels of the adipogenesis markers were observed (compare Figures 4A, B with Figures 5A, B). In the absence of MDI in the MK-infected cells the levels of C/EBP β and C/EBP α mRNA increased reaching a maximum level at 12 d, but the levels of PPAR γ mRNA decreased by 2 d and increased only slightly by 6 d

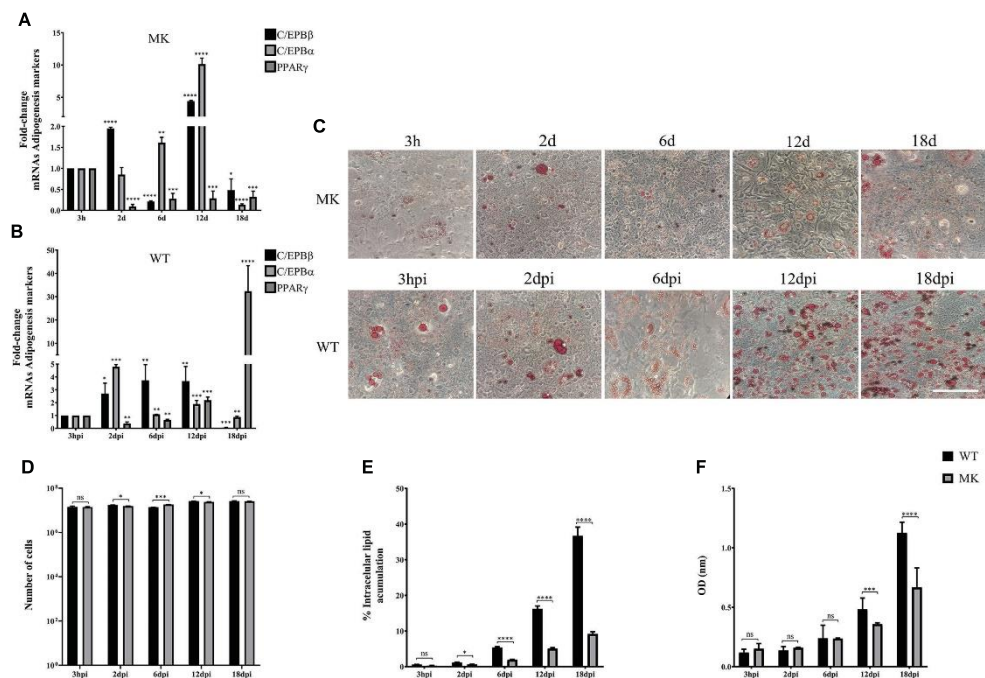
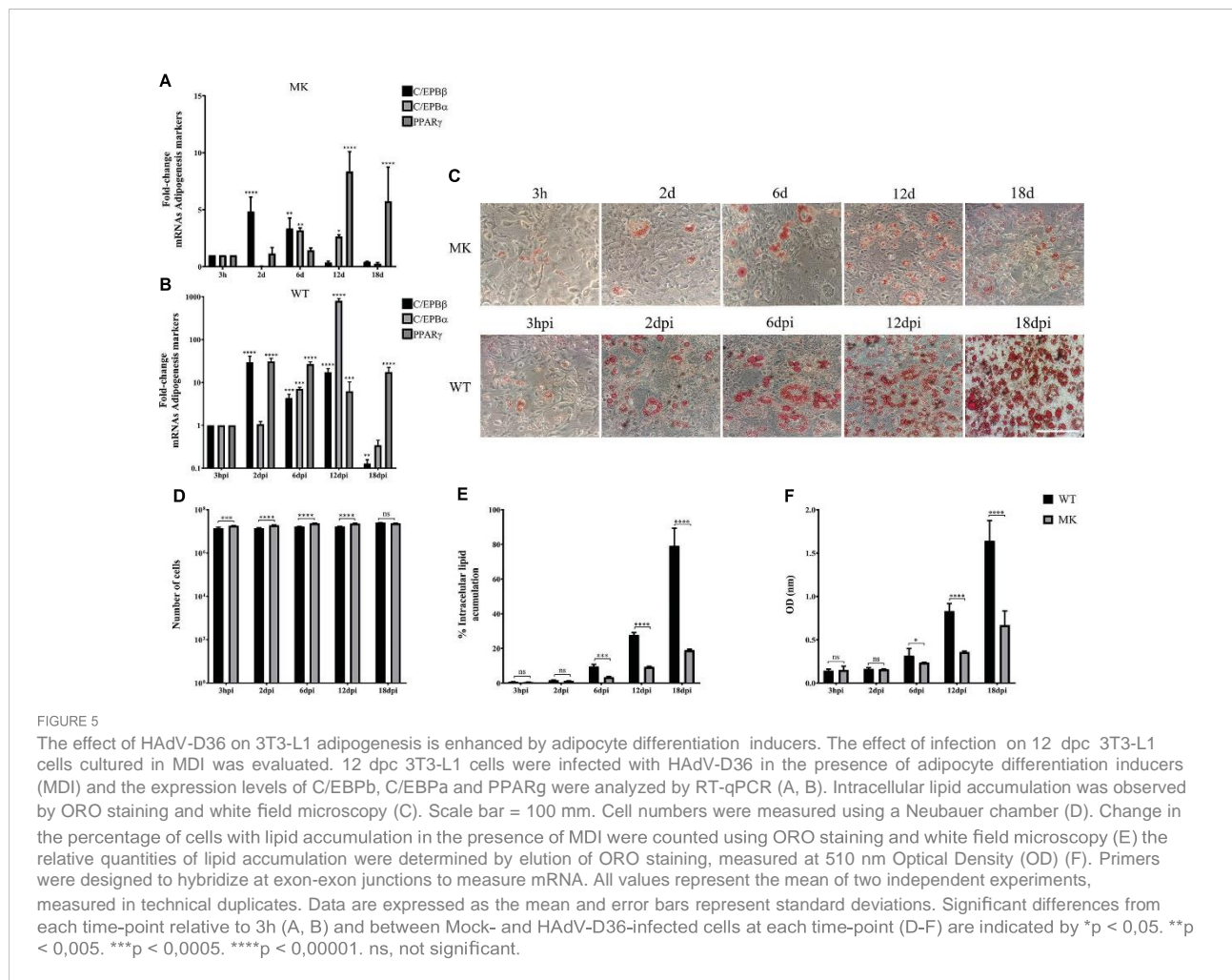


FIGURE 4
 HAdV-D36 infection increases adipogenesis in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells at 12 dpc were infected with HAdV-D36 without adipocyte differentiation inducers (MM) and the expression levels of C/EBPb, C/EBPa and PPARg were analyzed by RT-qPCR (A, B). Intracellular lipid accumulation was observed by ORO staining and white field microscopy (C). Scale bar = 100 mm. Cell numbers were measured using a Neubauer chamber (D). Change in the percentage of cells with lipid accumulation in the absence of MDI were counted using ORO staining and white field microscopy (E), the relative quantities of lipid accumulation were determined by elution of ORO staining, measured at 510 nm Optical Density (OD) (F). Primers were designed to hybridize at exon-exon junctions to measure mature mRNA. All values represent the mean of two independent experiments, measured in technical duplicates. Data are expressed as the mean and error bars represent standard deviations. Significant differences from each time-point relative to 3h (A, B) and between Mock- and HAdV-D36-infected cells at each time-point (D-F) are indicated by *p < 0,05. **p < 0,005. ***p < 0,0005. ****p < 0,00001. ns, not significant.

remaining at a similar level up to the 18 d time-point (Figure 4A), when only about 10% of the cells displayed lipid accumulation (Figure 4E). The infection with HAdV-D36 induced approximately 2-fold and 5-fold rise in C/EBPb and C/EBPa mRNA, respectively, by 2 dpi. PPARg mRNA levels increased 2-fold by 12 dpi, and 30-fold by 18 dpi (Figure 4B), when approximately 40% of the cells accumulated lipids (Figures 4C, E). As expected, the presence of MDI was sufficient to induce a significant rise in the levels of C/EBPb and C/EBPa, and approximately 7-fold increase in PPARg mRNA levels by 12 d (Figure 5A), with close to 20% of the cells displaying lipid accumulation (Figures 5C, E). However, a much sharper increase in C/EBPb, C/EBPa and PPARg mRNAs was observed in HAdV-D36-infected cells. Nearly 80% of the cells accumulated more than 2-fold higher levels of total lipids (Figures 5B, C, E, F), confirming that the most pronounced adipogenic effect was induced in cells infected at 12 dpc in the presence of MDI.

As described in the experiments in Figure 3, as expected (Rathod et al., 2007), barely detectable and transient levels of E1A and hexon mRNA, and no viral DNA replication or virus

production were observed in the 3T3-L1 cells infected at 2 dpc in the presence of MDI. Therefore, to evaluate the effect of the phase of adipocyte differentiation on HAdV-D36 productive replication, we then measured viral early (E1A), intermediate (IVa2), and late (hexon) mRNAs, viral DNA replication, and viral progeny production in 3T3-L1 cells infected at 12 dpc, with or without MDI. The IVa2 mRNA was included in these experiments because the IVa2 protein is required for the transition of the early to the late phase of adenovirus replication and the activation of the viral late genes, which depends on active viral DNA replication during productive virus replication. As before, the cells were harvested at 3 hpi, and 2, 6, 12 and 18 dpi. Interestingly, although transiently the cells infected at 12 dpc, both in the absence or presence of MDI, were permissive for HAdV-D36 replication (Figure 6). In the absence of MDI, lower levels of the viral mRNA and DNA were reproduced (Figures 6A–D, black bars); however, they were sufficient to sustain production of viral progeny, which could be initially detected by 6 dpi and peaked by 12 dpi (Figure 6E). The accumulation of E1A mRNA was very low and transient, and was followed by increased IVa2 expression, which peaked at



6 dpi, and later by hexon mRNA accumulation, which was delayed and reached a maximum level at 12 dpi. In the presence of MDI 2- to 5-fold higher levels of the viral mRNAs were measured, which reached a maximum level at 6 dpi, with a pattern of accumulation that more closely paralleled that of viral DNA (Figure 6D, grey bars). These results confirm that viral gene expression and DNA replication peak when higher levels of both C/EBPα and PPARγ mRNAs are reached (Figure 5B), and

that adipocyte committed 3T3-L1 cells support HAdV-D36 productive viral replication, with a greater effect on increased adipogenesis.

HAdV-D36 infection promotes glucose metabolism through MYC target genes in adipocyte committed 3T3-L1 cells

The metabolic changes induced by HAdV that contribute to the adipogenic effect of the infection are accompanied with increased Myc transcriptional activation of glycolytic genes (Thai et al., 2014) (Prusinkiewicz et al., 2020). Therefore, we wished to determine whether the activation of Myc target genes for glucose metabolism require conditions in the infected cell that support efficient viral replication. The mRNAs of the hexokinase (Hk), phosphofructokinase (PFk), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Lactate dehydrogenase (LDHA) Myc target genes were measured in 3T3-L1 cells that were Mock-infected or infected with HAdV-D36 at 12 dpc, in the absence

TABLE 4 Number of 3T3-L1 cells at different time-points. HAdV-36-infected vs MK-infected at 12 dpc in MM.

Time post infection	Number of cells	
	WT	MK
3h	1.42 X 10 ⁷	1.39 X 10 ⁷
2d	1.73 X 10 ⁷	1.53 X 10 ⁷
6d	1.39 X 10 ⁷	1.81 X 10 ⁷
12d	2.61 X 10 ⁷	2.40 X 10 ⁷
18d	2.62 X 10 ⁷	2.55 X 10 ⁷

TABLE 5 Number of 3T3-L1 cells at different time-points. HAdV-36-infected vs MK-infected at 12 dpc in MDI.

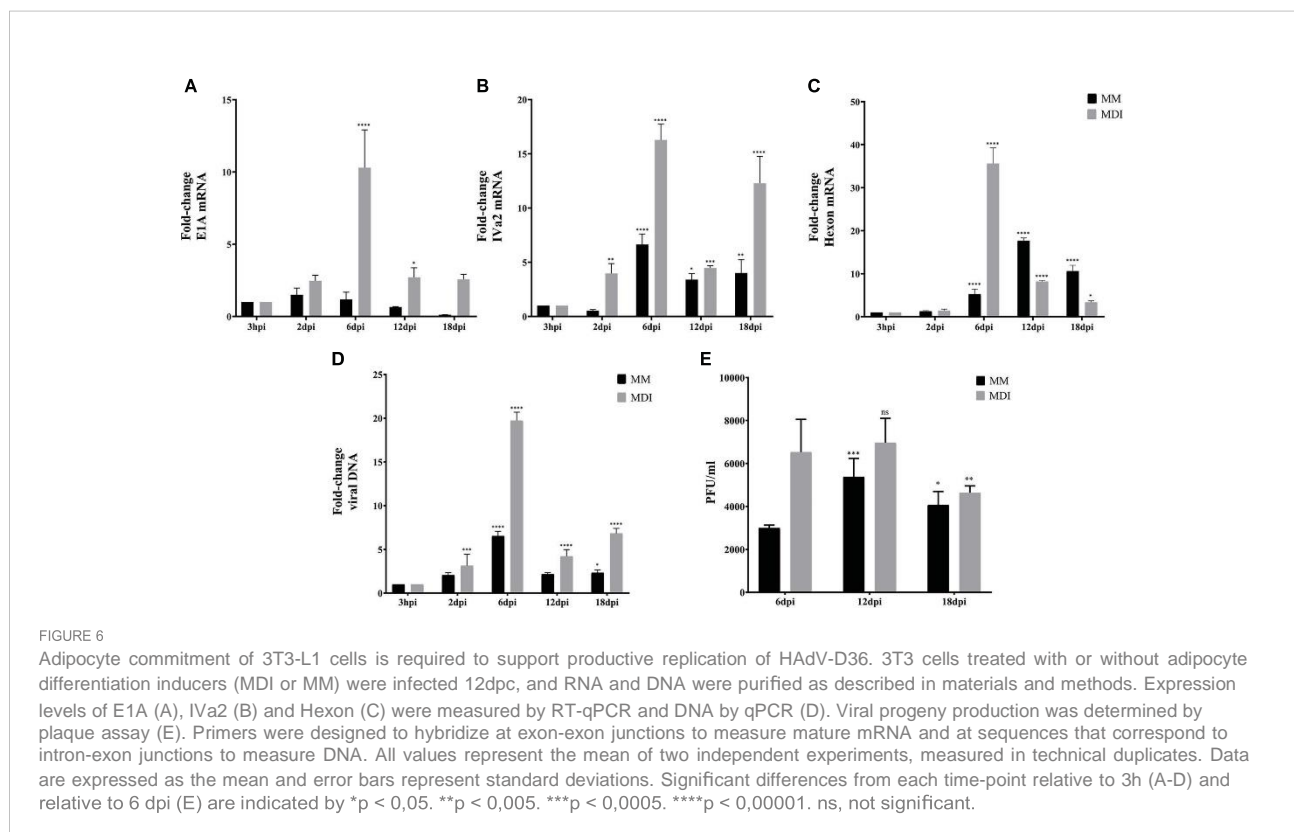
Time post infection	Number of cells	
	WT	MK
3h	1.42 X 10 ⁷	1.82 X 10 ⁷
2d	1.42 X 10 ⁷	1.94 X 10 ⁷
6d	1.70 X 10 ⁷	2.36 X 10 ⁷
12d	1.73 X 10 ⁷	2.30 X 10 ⁷
18d	2.55 X 10 ⁷	2.35 X 10 ⁷

(MM) or presence (MDI) of adipocyte differentiation inducers, at the same time-points as the previous experiments (Figure 7). Except for an unexpected 6-fold rise in the level of the Hk-2 mRNA at 12d, relatively small variations in the levels of mRNA were observed in Mock-infected cells in the absence of MDI through 30 days of cell culture (12 dpc + 18 d), which may be due to the addition of fresh medium to the contact-arrested cells every 48 hrs (Figure 7A). In contrast, the sole presence of MDI in the Mock-infected cells induced a rapid and progressive 5- to 50-fold rise in the levels of mRNA (Figures 7A, C), as would be expected to support the bioenergetic and biosynthetic demands of adipocyte differentiation and lipid accumulation (Figure 2). The adipocyte differentiation inducers showed a clear effect on the increase of Hk-2 and LDHA by 6 d, and all four mRNA increased

by at least 10-fold by 18 d. The effect of infection on the rise of the mRNA levels of all four glycolytic genes was higher than MDI, when already by 2 dpi approximately 10-fold higher levels of Hk-2 and Pfk-2 were measured, and all four mRNA increased between 15- and 150-fold by 6 dpi. Interestingly, an even more pronounced effect was induced in HAdV-D36-infected cells when in the presence of MDI. A general 50- to 100-fold rise in the levels of Hk-2, Pfk, GAPDH and LDHA reached maximum levels that were concurrent with both viral gene expression and DNA replication (Figures 6A-D), and the highest levels of C/EBP α and PPAR γ (Figure 5B). These data suggest that the adipocyte commitment that supports HAdV-D36 productive replication correlates with Myc-dependent activation of glucose metabolism.

Discussion

Extensive evidence has been obtained of the effect of HAdV-D36 on adipogenesis in animal models (Dhurandhar et al., 2000; Dhurandhar et al., 2001; Dhurandhar et al., 2002; Pasarica et al., 2006), and it has been established that the infection induces preadipocyte differentiation and lipid accumulation in both the 3T3-L1 preadipocyte model (Vangipuram et al., 2004), and in human adipose-derived stem/stromal cells (Pasarica et al., 2008). However, studies of the differentiation phase in which the cells are susceptible and permissive to HAdV-D36 replication leading



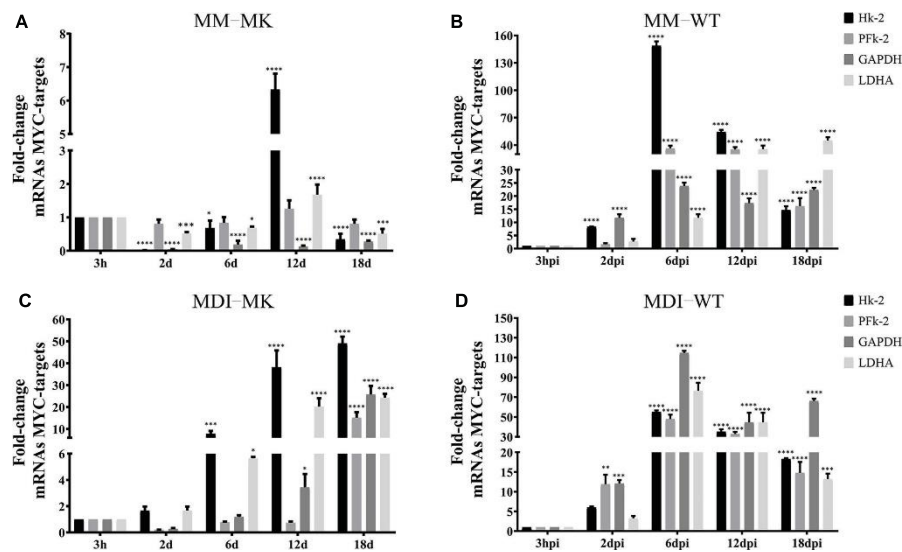


FIGURE 7

HAdV-D36 infection of adipocyte committed cells promotes the expression of MYC- glycolytic target genes. To determine the effect of infection on MYC-target genes, 3T3-L1 cells at 12dpc were HAdV-D36-infected (B, D) or mock-infected (A, C), without adipocyte differentiation inducers (MM) (A, B) or with (MDI) (C, D). RNA was isolated at the indicated time-points and the expression levels of hexokinase (Hk), phosphofruktokinase (PFk), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Lactate dehydrogenase (LDHA) were measured by RT-qPCR. All values represent the mean of two independent experiments, measured in technical duplicates. Data are expressed as the mean and error bars represent standard deviations. Significant differences from each time-point relative to 3h are indicated by *p < 0,05, **p < 0,005, ***p < 0,0005, ****p < 0,00001. ns, not significant.

to viral progeny production are lacking, as is the analysis of the effect of virus replication on adipogenesis. Our results show that 3T3-L1 cells at the initial phase of adipocyte differentiation are susceptible to infection with HAdV-D36, but the expression of viral early genes that is required for viral DNA replication and ensuing late gene expression, was sustained only in cells that were committed to differentiation (Figures 3A–D). In agreement with previous reports, either the effect of the penton and penton-base proteins during initial stages of infection (McIntosh et al., 1971) or the low and transient expression of viral early genes (Rathod et al., 2007) may have been sufficient to induce increased C/EBP β , C/EBP α and PPAR γ mRNAs and lipid accumulation (Figures 3E–G), but only to levels that were comparable to or slightly higher than those induced by MDI in the MK-infected cells (compare Figures 3E, G, I, J with Figures 5A, C, E, F). In stark contrast, HAdV-D36 infection of committed adipocytes resulted in several-fold higher expression of adipogenic markers and lipid levels (compare Figure 4 and Figure 5). Interestingly, although 3- to 10-fold higher levels of viral mRNA or viral DNA were produced in cells infected at 12 dpc in the presence of DMI, the differentiation phase of the 3T3-L1 cells at this stage was sufficient to support comparable levels of viral progeny in the absence of the differentiation inducers (Figures 4–6). These findings indicate that at this stage of differentiation 3T3-L1 cells support productive viral replication and display the most pronounced alteration in lipid metabolism.

It is well established that HAdVs alter the metabolism of the infected cell through a variety of mechanisms that include glucose, glutamine and lipid metabolism to meet the bioenergetic and biosynthetic demands of viral macromolecular synthesis and progeny production (Prusinkiewicz and Mymryk, 2019). HAdV productive replication in permissive cells follows a highly complex viral gene expression program that induces changes in cellular gene expression, signaling pathways and metabolism. Such changes in the infected cell are dynamic and differ as the viral replication cycle progresses (Thai et al., 2015; Carinhas et al., 2017; Valdés et al., 2018). In our experiments, HAdV-D36 viral gene expression, DNA replication and progeny reached maximum levels between 6 and 12 dpi and declined by 18 dpi (Figure 6), suggesting that as the adipocytes mature they become less permissive. Therefore, to gain further insight into the effect of HAdV-D36 infection of adipocytes it will be interesting to determine in further detail in what phase of differentiation the cells are most permissive and support the highest level of virus reproduction and propagation.

The activities of various HAdV gene products that reprogram every step of cellular gene expression, from chromatin remodeling and transcription, to posttranscriptional processing, RNA export and mRNA translation, have been studied extensively (Babich and Nevins, 1981; Babiss et al., 1985; Pilder et al., 1986; Hardy et al., 1989; Huang and

Hearing, 1989; Chang and Shenk, 1990; Hayes et al., 1990; Mathews, 1990; Nordqvist and Akusjärvi, 1990; Bridge et al., 1991; Sandler and Ketner, 1991; Shenk and Flint, 1991; Nordqvist et al., 1994; Tribouley et al., 1994; Lutz and Kedinger, 1996; Lutz et al., 1997; Hershey et al., 2019; Cuesta et al., 2001; Hidalgo et al., 2016; Hidalgo et al., 2022), but their role on the adipogenic effect of HAdV has not been elucidated. To date the only HAdV protein that has been directly linked to the metabolic alterations that result from HAdV infection is the E4Orf1 protein, which interacts with a group of cellular proteins through a PDZ binding domain motif, resulting in activation of PI3K and AKT (Frese et al., 2003; Javier and Rice, 2011). In the case of HAdV-D36, E4Orf1 displays adipogenic effects that depend on increased expression of glucose receptors and glucose uptake (Rogers et al., 2008b; Wang et al., 2008; Krishnapuram et al., 2011; Mostofinejad et al., 2021); increased fatty acid synthase and conversion of glucose to fatty acids (Vangipuram et al., 2007; Kusminski et al., 2015); and the activation of CBEPs and PPAR- α that results in adipocyte differentiation (Vangipuram et al., 2004; Farmer, 2005; Pasarica et al., 2006; Jiao et al., 2017; Afruza et al., 2020). The E4Orf1 protein is sufficient to induce the above adipogenic effects when expressed in transfected cells or through lentiviral vectors (Rogers et al., 2008a; Dhurandhar et al., 2011; Dubuisson et al., 2011), but its adipogenic effect in the context of productive viral replication is incompletely understood. Furthermore, in addition to the well characterized effect of E4Orf1 on metabolic pathways, the E1A viral proteins can also alter metabolism (Tessier et al., 2021). The metabolic effect of E1A is most likely predominantly dependent on the protein's interactions with retinoblastoma (pRB), which results in activation of S phase E2F transcription factors, and with the p300/CBP lysine acetylases (Ferrari et al., 2014), leading to progression of the cell cycle and a sustained proliferative state (Berk, 2013). E1A interacts with Myc-containing complexes and may result in regulation of Myc-target genes impacting energy metabolism through activation of genes involved in glycolysis, glutamine metabolism and mitochondrial biogenesis (Shim et al., 1997; Osthus et al., 2000; Li et al., 2005; Gao et al., 2009; Voss et al., 2015). Interestingly, the E4Orf1 protein produced by HAdV-D9 and HAdV-C5 binds Myc leading to increased transcription of Myc target genes and greater expression of glycolytic enzymes (Thai et al., 2014; Kong et al., 2015). Our results now show that HAdV-D36 infection of 3T3-L1 cells also results in increased levels of glycolytic Myc-target genes displaying a clear effect on Hk-2 and Pfk, in agreement with previous findings (Thai et al., 2014; Kong et al., 2015) (Figure 7), suggesting that the HAdV-D36 E4Orf1 may stimulate glucose metabolism through Myc, in addition to its effect through PI3K.

Although the correlation of HAdV-D36 with obesity in humans has been reported in many studies (Xu et al., 2015), several questions remain, including whether obese subjects are

more susceptible to the infection than non-obese subjects or if the infection causes or increases obesity. A few studies have shown that HAdV-D36 DNA is present in the adipose tissue of some individuals (Goossens et al., 2011). However, evidence of virus replication in human adipose tissue is still lacking. Our findings reveal that the state of differentiation of the 3T3-L1 adipocytes determines whether the cells are permissive for viral replication, and that the greater effects on Myc-glycolytic target genes, C/EBP β , C/EBP α , PPAR α expression, and lipid accumulation occur in adipocytes that support productive viral replication. These findings therefore warrant further detailed studies of the impact of the HAdV-D36 replication on adipogenesis, both in the 3T3-L1 model adipocyte, and in human preadipocytes. In particular, transcriptomic analysis of HAdV-D36 infected cells at different stages of human adipocyte differentiation should lead to identification of viral and cellular genes implicated in adipogenesis, and produce functional insights of HAdV-D36 association with obesity.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Author contributions

VM and GB: investigation, methodology, formal analysis, software, writing - original draft and editing. TD and RG: funding acquisition, investigation, methodology, formal analysis, supervision, writing - review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Mexico CONACyT-BMBF (267746), SRE-CONACyT (280365), the Bundesministerium für Bildung und Forschung - Germany (01DN16031), the Research Group Linkage Program of the Alexander von Humboldt Foundation, and Verónica Márquez received a fellowship from CONACyT (818465).

Acknowledgments

We thank Gabriela Rosas Salgado (School of Medicine, UAEM) for providing the 3T3-L1 cells and Fernando Esquivel (School of Medicine, UAEM) for critical reading of the

manuscript. We thank Paloma Hidalgo (CIDC UAEM; presently Leibniz Institute of Virology) for qPCR supervision.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Afruz, R., Akheruzzaman, M., Dhurandhar, N. V., and Hegde, V. (2020). E4orf1, an adeno-viral protein, attenuates renal lipid accumulation in high fat fed mice: A novel approach to reduce a key risk factor for chronic kidney disease. *Heliyon* 6 (10), e05261. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05261
- Atkinson, R. L. (2007). Viruses as an etiology of obesity. *Mayo Clin. Proc.* 82 (10), 1192–1198. doi: 10.4065/82.10.1192
- Babich, A., and Nevins, J. R. (1981). The stability of early adenovirus mRNA is controlled by the viral 72 kd DNA-binding protein. *Cell* 26 (3, Part 1), 371–379. doi: 10.1016/0092-8674(81)90206-3
- Babiss, L. E., Ginsberg, H. S., and Darnell, J. E. Jr. (1985). Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol. Cell Biol.* 5 (10), 2552–2558. doi: 10.1128/mcb.5.10.2552-2558.1985
- Berk, A. J. (2013). Adenoviridae chap. 55 in B. N., D. M. Knipe and P. M. Howley, "Adenoviridae Chap. 55" in *Howley, Fields Virology. 6th Edition*. Eds B.N., D.M. Knipe P.M., (Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).
- Blaut, M., and Clavel, T. (2007). Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J. Nutr.* 137 (3 Suppl 2), 751S–755S. doi: 10.1093/jn/137.3.751S
- Bridge, E., Hemström, C., and Pettersson, U. (1991). Differential regulation of adenovirus late transcriptional units by the products of early region. *Virology* 183 (1), 260–266. doi: 10.1016/0042-6822(91)90138-2
- Carinhas, N., Koshkin, A., Pais, D. A., Alves, P. M., and Teixeira, A. P. (2017). (13) c-metabolic flux analysis of human adenovirus infection: Implications for viral vector production. *Biotechnol. Bioeng.* 114 (1), 195–207. doi: 10.1002/bit.26063
- Chang, L. S., and Shenk, T. (1990). The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters. *J. Virol.* 64 (5), 2103–2109. doi: 10.1128/jvi.64.5.2103-2109.1990
- Chooi, Y. C., Ding, C., and Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism* 92, 6–10. doi: 10.1016/j.metabol.2018.09.005
- Cuesta, R., Xi, Q., and Schneider, R. J. (2001). Preferential translation of adenovirus mRNAs in infected cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 66, 259–267. doi: 10.1101/sqb.2001.66.259
- Dhurandhar, N. V. (2001). Infectobesity: obesity of infectious origin. *J. Nutr.* 131 (10), 2794S–2797S. doi: 10.1093/jn/131.10.2794S
- Dhurandhar, E. J., Dubuisson, O., Mashtalir, N., Krishnapuram, R., Hegde, V., and Dhurandhar, N. V. (2011). E4orf1: A novel ligand that improves glucose disposal in cell culture. *PLoS One* 6 (8), e23394. doi: 10.1371/journal.pone.0023394
- Dhurandhar, N. V., Israel, B. A., Kolesar, J. M., Mayhew, G. F., Cook, M. E., and Atkinson, R. L. (2000). Increased adiposity in animals due to a human virus. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24 (8), 989–996. doi: 10.1038/sj.ijo.0801319
- Dhurandhar, N. V., Israel, B. A., Kolesar, J. M., Mayhew, G., Cook, M. E., and Atkinson, R. L. (2001). Transmissibility of adenovirus-induced adiposity in a chicken model. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25 (7), 990–996. doi: 10.1038/sj.ijo.0801668
- Dhurandhar, N. V., Whigham, L. D., Abbott, D. H., Schultz-Darken, N. J., Israel, B. A., Bradley, S. M., et al. (2002). Human adenovirus ad-36 promotes weight gain in male rhesus and marmoset monkeys. *J. Nutr.* 132 (10), 3155–3160. doi: 10.1093/jn/132.10.3155
- Dubuisson, O., Dhurandhar, E. J., Krishnapuram, R., Kirk-Ballard, H., Gupta, A. K., Hegde, V., et al. (2011). PPARgamma-independent increase in glucose uptake and adiponectin abundance in fat cells. *Endocrinology* 152 (10), 3648–3660. doi: 10.1210/en.2011-0225
- Farmer, S. R. (2005). Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. *Int. J. Obes. (Lond)* 29 Suppl 1, S13–S16. doi: 10.1038/sj.ijo.0802907
- Ferrari, R., Gou, D., Jawdekar, G., Johnson, S. A., Nava, M., Su, T., et al. (2014). Adenovirus small E1A employs the lysine acetylases p300/CBP and tumor suppressor Rb to repress select host genes and promote productive virus infection. *Cell Host Microbe* 16 (5), 663–676. doi: 10.1016/j.chom.2014.10.004
- Frese, K. K., Lee, S. S., Thomas, D. L., Latorre, I. J., Weiss, R. S., Glaunsinger, B. A., et al. (2003). Selective PDZ protein-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by the adenovirus E4-ORF1 oncoprotein. *Oncogene* 22 (5), 710–721. doi: 10.1038/sj.onc.1206151
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T. C., Lee, Y. S., Kita, K., Ochi, T., et al. (2009). C-myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458 (7239), 762–765. doi: 10.1038/nature07823
- Goossens, V. J., deJager, S. A., Grauls, G. E., Gielen, M., Vlietinck, R. F., Derom, C. A., et al. (2011). Lack of evidence for the role of human adenovirus-36 in obesity in a European cohort. *Obes. (Silver Spring)* 19 (1), 220–221. doi: 10.1038/oby.2009.452
- Gregoire, F. M., Smas, C. M., and Sul, H. S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78 (3), 783–809. doi: 10.1152/physrev.1998.78.3.783
- Hardy, S., Engel, D. A., and Shenk, T. (1989). An adenovirus early region 4 gene product is required for induction of the infection-specific form of cellular E2F activity. *Genes Dev.* 3 (7), 1062–1074. doi: 10.1101/gad.3.7.1062
- Hayes, B. W., Telling, G. C., Myat, M. M., Williams, J. F., and Flint, S. J. (1990). The adenovirus L4 100-kilodalton protein is necessary for efficient translation of viral late mRNA species. *J. Virol.* 64 (6), 2732–2742. doi: 10.1128/jvi.64.6.2732-2742.1990
- Hershey, J. W., Mathews, M., and Sonenberg, N. (2019). Principles of Translational Control. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 11 (9), a032607. doi: 10.1101/cshperspect.a032607
- Hershey, J. W. B., and Merrick, W. C. (2000). "Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis and preferential translation of viral mRNAs," in *Translational control of gene expression*. Eds. N. Sonenberg, J. W. B. Hershey and M. B. Mathews (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 901–914.
- Hidalgo, P., Anzures, L., Hernández-Mendoza, A., Guerrero, A., Wood, C. D., Valdés, M., et al. (2016). Morphological, biochemical, and functional study of viral replication compartments isolated from adenovirus-infected cells. *J. Virol.* 90, 7, 3411–3427. doi: 10.1128/JVI.00033-16
- Hidalgo, P., Garcés, Y., Mundo, E., López, R. E., Bertzbach, L. D., Dobner, T., et al. (2022). E1B-55K is a phosphorylation-dependent transcriptional and posttranscriptional regulator of viral gene expression in human adenovirus C5 infection. *J. Virol.* 96, 5, e02062–e02021. doi: 10.1128/jvi.02062-21
- Huang, M. M., and Hearing, P. (1989). The adenovirus early region 4 open reading frame 6/7 protein regulates the DNA binding activity of the cellular transcription factor, E2F, through a direct complex. *Genes Dev.* 3 (11), 1699–1710. doi: 10.1101/gad.3.11.1699
- Jaacks, L. M., Vandevijvere, S., Pan, A., McGowan, C. J., Wallace, C., Imamura, F., et al. (2019). The obesity transition: stages of the global epidemic. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 7 (3), 231–240. doi: 10.1016/S2213-8587(19)30026-9
- Javier, R. T., and Rice, A. P. (2011). Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. *J. Virol.* 85 (22), 11544–11556. doi: 10.1128/JVI.05410-11
- Jiao, Y., Aisa, Y., Liang, X., Nuermaiti, N., Gong, X., Zhang, Z., et al. (2017). Regulation of PPAR γ and CIDEA expression by adenovirus 36 in adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biochem.* 428 (1-2), 1–8. doi: 10.1007/s11010-016-2912-x

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

- Kong, K., Kumar, M., Taruishi, M., and Javier, R. T. (2015). Adenovirus E4-ORF1 dysregulates epidermal growth factor and Insulin/Insulin-like growth factor receptors to mediate constitutive myc expression. *J. Virol.* 89 (21), 10774–10785. doi: 10.1128/JVI.01463-15
- Krishnapuram, R., Dhurandhar, E. J., Dubuisson, O., Kirk-Ballard, H., Bajpeyi, S., Butte, N., et al. (2011). Template to improve glycemic control without reducing adiposity or dietary fat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300 (5), E779–E789. doi: 10.1152/ajpendo.00703.2010
- Kusminski, C. M., Gallardo-Montejano, V. I., Wang, Z. V., Hegde, V., Bickel, P. E., Dhurandhar, N. V., et al. (2015). E4orf1 induction in adipose tissue promotes insulin-independent signaling in the adipocyte. *Mol. Metab.* 4 (10), 653–664. doi: 10.1016/j.molmet.2015.07.004
- Linhart, H. G., Ishimura-Oka, K., DeMayo, F., Kibe, T., Repka, D., Poindexter, B., et al. (2001). C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (22), 12532–12537. doi: 10.1073/pnas.211416898
- Li, F., Wang, Y., Zeller, K. I., Potter, J. J., Womsey, D. R., O'Donnell, K. A., et al. (2005). Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol. Cell Biol.* 25 (14), 6225–6234. doi: 10.1128/MCB.25.14.6225-6234.2005
- Lutz, P., and Keding, C. (1996). Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phase-dependent activation of the major late promoter. *J. Virol.* 70 (3), 1396–1405. doi: 10.1128/jvi.70.3.1396-1405.1996
- Lutz, P., Rosa-Calatrava, M., and Keding, C. (1997). The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator. *J. Virol.* 71 (7), 5102–5109. doi: 10.1128/jvi.71.7.5102-5109.1997
- MacDougald, O. A., and Lane, M. D. (1995). Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 345–373. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.002021
- McIntosh, K., Payne, S., and Russell, W. C. (1971). Studies on lipid metabolism in cells infected with adenovirus. *J. Gen. Virol.* 10 (3), 251–265. doi: 10.1099/0022-1317-10-3-251
- Mathews, M. B. (1990). Control of translation in adenovirus-infected cells. *Enzyme* 44 (1-4), 250–264. doi: 10.1159/000468763
- Mitra, A. K., and Clarke, K. (2010). Viral obesity: Fact or fiction? *Obes. Rev.* 11(4), 289–296. doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00677.x
- Moseti, D., Regassa, A., and Kim, W. K. (2016). Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (1), 124. doi: 10.3390/ijms17010124
- Mostofinejad, Z., Akheruzzaman, M., Abu Bakkar Siddik, M., Patkar, P., Dhurandhar, N. V., and Hegde, V. (2021). Antidiabetic E4orf1 protein prevents hepatic steatosis and reduces markers of aging-related cellular damage in high fat fed older mice. *BMJ Open Diabetes Res. Care.* 9 (1), e002096. doi: 10.1136/bmjdr-2020-002096
- Munger, J., Bennett, B. D., Parikh, A., Feng, X. J., McArdle, J., Rabitz, H. A., et al. (2008). Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. *Nat. Biotechnol.* 26 (10), 1179–1186. doi: 10.1038/nbt.1500
- Na, H. N., Kim, J., Lee, H. S., Shim, K. W., Kimm, H., Jee, S. H., et al. (2012). Association of human adenovirus-36 in overweight Korean adults. *Int. J. Obes. (Lond)* 36 (2), 281–285. doi: 10.1038/ijo.2011.102
- Nordqvist, K., and Akusjärvi, G. (1990). Adenovirus early region 4 stimulates mRNA accumulation via 5' introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (24), 9543–9547. doi: 10.1073/pnas.87.24.9543
- Nordqvist, K., Ohman, K., and Akusjärvi, G. (1994). Human adenovirus encodes two proteins which have opposite effects on accumulation of alternatively spliced mRNAs. *Mol. Cell Biol.* 14 (1), 437–445. doi: 10.1128/MCB.14.1.437
- Osthus, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., et al. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-myc. *J. Biol. Chem.* 275 (29), 21797–21800. doi: 10.1074/jbc.C000023200
- Pasarica, M., and Dhurandhar, N. V. (2007). Infectobesity: obesity of infectious origin. *Adv. Food Nutr. Res.* 52, 61–102. doi: 10.1016/S1043-4526(06)52002-9
- Pasarica, M., Mashtalir, N., McAllister, E. J., Kilroy, G. E., Koska, J., Permana, P., et al. (2008). Adipogenic human adenovirus ad-36 induces commitment, differentiation, and lipid accumulation in human adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 26 (4), 969–978. doi: 10.1634/stemcells.2007-0868
- Pasarica, M., Shin, A. C., Yu, M., Ou Yang, H. M., Rathod, M., Jen, K. L., et al. (2006). Human adenovirus 36 induces adiposity, increases insulin sensitivity, and alters hypothalamic monoamines in rats. *Obesity (Silver Spring)* 14 (11), 1905–1913. doi: 10.1038/oby.2006.222
- Pilder, S., Moore, M., Logan, J., and Shenk, T. (1986). The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol. Cell Biol.* 6 (2), 470–476. doi: 10.1128/mcb.6.2.470-476.1986
- Prusinkiewicz, M. A., and Mymryk, J. S. (2019). Metabolic reprogramming of the host cell by human adenovirus infection. *Viruses* 11 (2), 141. doi: 10.3390/v11020141
- Prusinkiewicz, M. A., Tu, J., Dodge, M. J., MacNeil, K. M., Radko-Juettner, S., Fonseca, G. J., et al. (2020). Differential effects of human adenovirus E1A protein isoforms on aerobic glycolysis in A549 human lung epithelial cells. *Viruses* 12 (6), 610. doi: 10.3390/v12060610
- Rathod, M., Vangipuram, S. D., Krishnan, B., Heydari, A. R., Holland, T. C., and Dhurandhar, N. V. (2007). Viral mRNA expression but not DNA replication is required for lipogenic effect of human adenovirus ad-36 in preadipocytes. *Int. J. Obes. (Lond)* 31 (1), 78–86. doi: 10.1038/sj.ijo.0803358
- Rogers, P. M., Fusinski, K. A., Rathod, M. A., Loiler, S. A., Pasarica, M., Shaw, M. K., et al. (2008a). Human adenovirus ad-36 induces adipogenesis via its E4 orf-1 gene. *Int. J. Obes. (Lond)* 32 (3), 397–406. doi: 10.1038/sj.ijo.0803748
- Rogers, P. M., Mashtalir, N., Rathod, M. A., Dubuisson, O., Wang, Z., Dasuri, K., et al. (2008b). Metabolically favorable remodeling of human adipose tissue by human adenovirus type 36. *Diabetes* 57 (9), 2321–2331. doi: 10.2337/db07-1311
- Romieu, I., Dossus, L., Barquera, S., Blottière, H. M., Franks, P. W., Gunter, M., et al. (2017). Energy balance and obesity: what are the main drivers? *Cancer Causes Control* 28 (3), 247–258. doi: 10.1007/s10552-017-0869-z
- Rosen, E. D., Hsu, C. H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J., et al. (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* 16 (1), 22–26. doi: 10.1101/gad.948702
- Salma, N., Xiao, H., Mueller, E., and Imbalzano, A. N. (2004). Temporal recruitment of transcription factors and SWI/SNF chromatin-remodeling enzymes during adipogenic induction of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma nuclear hormone receptor. *Mol. Cell Biol.* 24 (11), 4651–4663. doi: 10.1128/MCB.24.11.4651-4663.2004
- Sandler, A. B., and Ketner, G. (1991). The metabolism of host RNAs in cells infected by an adenovirus E4 mutant. *Virology* 181 (1), 319–326. doi: 10.1016/0042-6822(91)90498-Z
- Scott, R. E., Florine, D. L., Wille, J. J., and Yun, K. (1982). Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle: GD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 (3), 845–849. doi: 10.1073/pnas.79.3.845
- Shang, Q., Wang, H., Song, Y., Wei, L., Lavebratt, C., Zhang, F., et al. (2014). Serological data analyses show that adenovirus 36 infection is associated with obesity: a meta-analysis involving 5739 subjects. *Obes. (Silver Spring)* 22 (3), 895–900. doi: 10.1002/oby.20533
- Shenk, T., and Flint, J. (1991). Transcriptional and transforming activities of the adenovirus E1A proteins. *Adv. Cancer Res.* 57, 47–85. doi: 10.1016/S0065-230X(08)60995-1
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C. S., Dang, G., Jungmann, R. A., et al. (1997). C-myc transactivation of LDH-a: Implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (13), 6658–6663. doi: 10.1073/pnas.94.13.6658
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 16 (24), 7432–7443. doi: 10.1093/emboj/16.24.7432
- Tessier, T. M., Dodge, M. J., MacNeil, K. M., Evans, A. M., Prusinkiewicz, M. A., and Mymryk, J. S. (2021). Almost famous: Human adenoviruses (and what they have taught us about cancer). *Tumour Virus Res.* 12, 200225. doi: 10.1016/j.tvr.2021.200225
- Thai, M., Graham, N. A., Braas, D., Nehil, M., Komisopoulou, E., Kurdastani, S. K., et al. (2014). Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell anabolic glucose metabolism and virus replication. *Cell Metab.* 19 (4), 694–701. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.009
- Thai, M., Thaker, S. K., Feng, J., Du, Y., Hu, H., Ting Wu, T., et al. (2015). MYC-induced reprogramming of glutamine catabolism supports optimal virus replication. *Nat. Commun.* 6, 8873. doi: 10.1038/ncomms9873
- Tribouley, C., Lutz, P., Staub, A., and Keding, C. (1994). The product of the adenovirus intermediate gene IVa2 is a transcriptional activator of the major late promoter. *J. Virol.* 68 (7), 4450–4457. doi: 10.1128/jvi.68.7.4450-4457.1994
- Valdés, A., Zhao, H., Pettersson, U., and Lind, S. B. (2018). Time-resolved proteomics of adenovirus infected cells. *PLoS One* 13 (9), e0204522. doi: 10.1371/journal.pone.0204522
- Vangipuram, S. D., Sheele, J., Atkinson, R. L., Holland, T. C., and Dhurandhar, N. V. (2004). A human adenovirus enhances preadipocyte differentiation. *Obes. Res.* 12 (5), 770–777. doi: 10.1038/oby.2004.93
- Vangipuram, S. D., Yu, M., Tian, J., Stanhope, K. L., Pasarica, M., Havel, P. J., et al. (2007). Adipogenic human adenovirus-36 reduces leptin expression and secretion and increases glucose uptake by fat cells. *Int. J. Obes. (Lond)* 31 (1), 87–96. doi: 10.1038/sj.ijo.0803366
- Voss, J. D., Atkinson, R. L., and Dhurandhar, N. V. (2015). Role of adenoviruses in obesity. *Rev. Med. Virol.* 25 (6), 379–387. doi: 10.1002/rmv.1852
- Wang, Z. Q., Cefalu, W. T., Zhang, X. H., Yu, Y., Qin, J., Son, L., et al. (2008). Human adenovirus type 36 enhances glucose uptake in diabetic and nondiabetic

human skeletal muscle cells independent of insulin signaling. *Diabetes* 57 (7), 1805–1813. doi: 10.2337/db07-1313

Whigham, L. D., Israel, B. A., and Atkinson, R. L. (2006). Adipogenic potential of multiple human adenoviruses *in vivo* and *in vitro* in animals. *Am J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, 1, R190–R194. doi: 10.1152/ajpregu.00479.2005

Wille, J. J.Jr., and Scott, R. E. (1982). Topography of the predifferentiation G0 growth arrest state relative to other growth arrest states in the G1 phase of the cell cycle. *J. Cell Physiol.* 112 (1), 115–122. doi: 10.1002/jcp.1041120117

Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., et al. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Mor., a 10 de octubre de 2023

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS
Presente

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: **Efecto de la proteína E4Orf1 de adenovirus 36 en la glucólisis y adipogénesis en células infectadas**, que presenta la alumna Verónica Mercedes Márquez Vergara (10024357) para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Director de tesis: Dr. Ramón González García Conde
Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama FM - UAEM	APROBADO	
Dr. Otoniel Rodríguez Jorge CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Delia Vanessa López Guerrero FN - UAEM	APROBADO	
Dra. Gabriela Rosas Salgado FM - UAEM	APROBADO	
Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Tomás David López Díaz IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Ramón Antonio González García Conde CIDC-UAEM	APROBADO	





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

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

TOMÁS DAVID LÓPEZ DÍAZ | Fecha:2023-10-18 11:49:38 | Firmante

fwlZtIEmlOWZko+5+Cq158bHC3yQebobhyDlyrdGKSE1BxqqCxaKFQ1tFqsfGRHKaGnmxEa4QbqzDH9AfXCLDtrPKJ102c8JHkSgnppqT240RWMVQtc4kyWHIHOUXgSvS2qBaLxPcKs/mXM01EYwtKtsJ5RGfUHvoU3BytwsKX8V4hgN4xFTRBX/r9ZovgBW5UAIEUf9aLnJlL03NclU7DDZJ8DOg9A8bmCTIROK6VMtRytogccJY3iZwxSMaL9tgBkcYTEDG5l4zNIEf3+pAV6fUJw0PUL5F174LmjRZg45JL1kZTor+9ncmLBikAeZUPaAZqVXtEfpznIFOK7tBw==

OTONIEL RODRIGUEZ JORGE | Fecha:2023-10-18 11:58:38 | Firmante

aNZoXiEU3474Isi3crB+jFH47H0tRW7o537naufpJRK9Jpg0BCSKg2wcpv+5A44ylyRin2zx1+JC0+wB/H7yKoipHzPpipZS16QWS7aYkhFAnBsDOGFQtzJEd17NzYqLBPni9Fig15wJmREdamD9z6EYF7d7/JqFacMpOOx7gN9d4GaMV+hEFZAbzmDrrUMjGuNwLzY8UL9OBPS7PZnJUzN9bDYrgSj+n2jrQxqd4tVZBlrAifU3PMncQzAC6swz63lCuhLaJNXl1gXN0fgNxnwTq2+0CWClIwMposLbQRWOP5wrY8HSdHJ3Dxcn6FBQ28tS9d9dL66nbGJ87zyvQ==

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2023-10-18 12:01:07 | Firmante

sW42sdYsXwSzdW9GCNI3l+buiik9+hF1jHrNNXfOUpfiDG5Uz8t5jLqGqKQIUe/NYcukzUK4ImxFk1DB5klN9U8HWUhfTgmc1NbB8MERYUle0NBjuh7O8Er+0SeSsPWI49mTksbvOPHFkXxiO+JMDPnfGMxhIEySWxBEB3xww1SR9PX+VJhmZ971F2/W4ClUnNr2DyHwH6UKiaw28nBIZBq7nBRklZHIOSkct48kpHX0tSu6PrxUQ41+blOfDmmbNDGNXuAeB59l7slWaGT6B8ik5CaCm9b215qPiwNp+hKGd8OAg3nVSEkaFbLULVvYDw6Y9luA4bL484ubIMiA==

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2023-10-18 12:15:46 | Firmante

PVV7k6PEjOhl4IEf+J/dPQRUjKUTEIKgvs01msfEiSCJtqjMfQbZWN7CXGNDSLia0bvDWxle7DLsrpKhwnoEyELeaCFnJcYQO6vcFkPuW8xucqDF4OwBj1f0tYb2ZA9Eo7fY0TNYvLLH8YF2oLZHpx1kVjnSHWVg5Jxmg4rhopJcFwum53/wgYwj0kOOz3+xtUO5T1Pp4j4kS+XxO6Ki4S3+nu5LAJhw2lc+gbwJbNh+KnA58hoC5rwm0vkuASEm/uW9VNWkrr5HZ4BhQl6olaUwN77rg+KN92yg3sl8c8qubdmyRAv0OjGH2y+Ct557TGuJH11VWdqpEME02cNQ==

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2023-10-18 12:27:17 | Firmante

Hxe9outlou/ESO+eUXqw+ugU5a2N2SyQXjuMHEJH1WetVfOAOzi4WGi6HF0AOH5DzFzS0D8vS66uu1KUFUJEklqHjmwmmKilUWEkw9LJLq1yEzeSHWfdhgbD8Ky3tlQXwkurRCZVHcuVOveN89Ay9QuzHp0Puodjp9Qi5nAVzXzNCBf+xwTM/vdjbpIgvY26kcyMahQthqmTN3E6BsU4DsosUPyZg11CSMy1TFBH8oa5WrgX6qj9EHdMh14kuZHSKZEXsnwzRNxaN++d+X8nTQpDyaj5ySw+KdDHggNZZtOtbncPztgBNeDUedVICQnNjJQKJO6tsSmkApEkXFCFA==

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2023-10-18 13:14:39 | Firmante

g3Rvf93+job/l0m9DDLRTZmmT4hJsSY4Nf1Qi5R0K0Ea8RmmLsPf+b6O8fsEjEjG8WUrnckEo+oADADtaaE2fNWOPZFw+Xvko7yntXnBwdlacJkSF4UUnQ4Us4ijncutaxV0Pgwb/1TQeDy7EkAnPaqP0ZmqbtpIafsjc1VckOIAVmCfPtxNjn9nt/Fi03RRvr2ZUJLkVPWJcQFP/3g9BNUjtwPNTTDCGWJFWK82gPRmhnzjnNBLinrEYt+xheFsB9aSwSV81vM7+6s5QrbGKO/t9IBTLpLw0HlBxKN5o0M9GcZscdGdqkszaAw0SBQnzawBpY17GUlF7zhSbMTw==

MARTÍN GUSTAVO PEDRAZA ALVA | Fecha:2023-10-19 10:28:28 | Firmante

8FOfSxi8bCUcaEKLWDOLkKhxGmvrFvOu1JEY4uCJhgGvUMDJCSfq/c7JgFVDIohAOuUSNi1G2xoDBM8WWGngfmTvMtOTEdxGwhEvmGfWP83cGbidFIE3W1Y6iOywL6N5T0Rv1qI8cPMb7oDI6x0BBbb2rakBcBj0LsugxnlBPPHPcJd7x+wB6R6nJhpnLXzUu7XZnxuarquz/1grhK+oNHLwn6plwniOG29wnOm+xyiDCrS+GUx0iZ/W8qqnlYgfrUq3SbJhBd1oY1hYFAc7LwyZhw+jdUxB7IU6SatOKhXcdJL3tqpuovpWYU+cy2O9HndGyMCPaobHOGPlgg==

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



CRK5UTNnQ

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/sgtGhSwCMRP8C9D483Jb8WF6ZagzWBqJ

