



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Xochimilco**

**“Evaluación de la expresión de las proteínas del Adenovirus humano 36 en infección persistente, en biopsias de tejido graso de pacientes con obesidad mórbida, comparada con infección aguda, en líneas celulares HEp-2 y A549”**

PROYECTO GENÉRICO CORRESPONDIENTE:  
Evaluación de productos relacionados con la salud

ETAPA:

Evaluación fisicoquímica y de estabilidad de fármacos, medicamentos, productos biológicos y otros insumos

**Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**

**Alumno:** Flores Estrada Joselin

**Matricula:** 2173063157

## **RESUMEN**

Los Adenovirus son un importante grupo de patógenos humanos, altamente prevalentes (alrededor del 40 al 88%) con variaciones inter e intraregiones geográficas. Recientemente, se ha demostrado que la infección por el Adenovirus humano 36 (Ad-36) es un factor que contribuye al desarrollo de la obesidad en adultos y niños. No se ha evaluado la expresión de las proteínas tempranas y tardías de Ad-36 en la infección persistente que establece este virus en el tejido adiposo de pacientes con obesidad mórbida, lo que sugiere la alteración de manera estable de diversos genes virales después de la infección. El objetivo del presente trabajo es comparar la expresión de las proteínas del Ad-36 en biopsias de pacientes con obesidad mórbida con células epiteliales infectadas de manera aguda utilizando una cepa control. En donde se infectarán líneas de células epiteliales HEp-2 y A549 con Ad-36, a baja multiplicidad (MOI) con la cepa Ad-36 (ATCC VR-913). Se comprobará la presencia del virus con PCR punto final. La cuantificación de la expresión de los mRNA de las proteínas del virus en el estado de infección lítica, post-infección 48 a 72 h, se realizará por qPCR y por Western blot para evaluar las diferencias de la expresión de las proteínas de Ad-36. Teniendo como resultado la expresión de las proteínas tempranas y tardías del virus, en la grasa de pacientes con obesidad mórbida, se comparará con el perfil proteico expresado en infecciones agudas por la cepa control, en células epiteliales A549 y HEp-2, lo que nos dará conocimiento sobre la regulación génica del virus en la infección del tipo persistente. Los resultados podrían aportar conocimiento de la patogenia de la infección crónica por Ad-36 asociada con la obesidad.

## **INTRODUCCIÓN**

### **OBESIDAD**

En los últimos 40 años la prevalencia global de la obesidad se ha triplicado y la coloca como una de las mayores epidemias de salud pública del siglo XXI con cerca de 650 millones de adultos clasificados como obesos y más de 1900 millones con sobrepeso (Martin, Mani, y Mani 2015).

México es el segundo país con mayor prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos y el primer lugar en sobrepeso y obesidad infantil. De acuerdo con los datos de la encuesta nacional de salud y nutrición de medio camino 2016 (ENSANUT MC 2016) en México 7 de cada 10 adultos, 4 de cada 10 adolescentes y 1 de cada 3 niños tienen sobrepeso u obesidad y es hoy uno de los problemas de salud pública prioritarios en nuestro país, con una mayor frecuencia en las mujeres (75.6%) que en los hombres (69.4%) (INSP. ENSANUT MC2016) (Shamah-Levy et al. 2018)

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multicausal donde participan componentes ambientales y sociales en estrecha relación con factores genéticos, psicológicos, nutricionales, metabólicos, de estilo de vida e infecciosos. Se caracteriza por el incremento de peso corporal con la acumulación excesiva de masa grasa con distribución corporal anormal, originando numerosas complicaciones biomédicas, sicosociales y económicas (Aburto-López

y cols., 2018), (Gao y Liu 2014). Asimismo, la OMS la define como un índice de masa corporal (IMC, definida como peso/estatura<sup>2</sup>) igual o superior a 30 kg/m<sup>2</sup> y cuando el índice supera la cifra de 35 y se acerca a 40 se considera obesidad mórbida u obesidad clase IV para aquellos pacientes con 200% más de su peso ideal (Salas-Salvadó et al. 2007; Delgado 2001).

En un estudio sobre la carga económica de la obesidad y sus comorbilidades se estimó que para 2021 se invertiría más de 150 mil millones de pesos al año, lo que representaría aproximadamente un 25% del gasto público en salud (Shamah-Levy et al. 2018; 2015)(Molina et al. 2015).

Las estrategias para el control de la obesidad se dirigen principalmente a los componentes de estilo de vida, nutrición y ambientales (Rivera Dommarco et.al., 2013), pero solo son marginalmente eficaces (ENSANUT MC, 2016). Atender los demás factores asociados con la obesidad, como las infecciones por virus, podría proporcionar enfoques de manejo más efectivos.

Diversos estudios muestran la potencial asociación de infecciones virales y bacterianas con la adiposidad en el humano (McAllister et al. 2009), las evidencias de estudios *in vitro* y en modelos animales han encontrado que los adenovirus, y en particular el Ad-36, induce la adipogénesis y procesos proinflamatorios. La exposición a la infección por Ad-36 parece ser otro predictor de aumento de peso en los humanos (N. V. Dhurandhar, Bailey, y Thomas 2015).

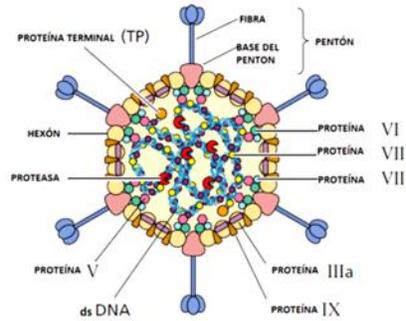
## **ADENOVIRUS HUMANOS**

Los Adenovirus son un importante grupo de patógenos humanos que muestran amplia seroprevalencia mundial, del 38.9% al 88% (Ahmad et al. 2016; Costa et al. 2017; Zhou et al. 2018; Barrero et al. 2012) y variaciones inter e intra-regiones geográficas que se modifican con el tiempo (Lynch, Fishbein, y Echavarría 2011).

Los Adenovirus son capaces de infectar al humano mostrando amplio tropismo para realizar su multiplicación en las células epiteliales del tracto respiratorio, tubo digestivo, vías urinarias, conjuntiva, córnea y tejido adiposo (Ponterio et al. 2015a). Causando diversos cuadros clínicos, como la gastroenteritis, conjuntivitis, infecciones del tracto respiratorio alto y bajo, miocarditis, hepatitis, meningoencefalitis, cistitis, pero también condiciones crónicas no inflamatorias, como la obesidad (Lion 2014). Las vías de transmisión incluyen el contacto directo, oral-fecal, por fómites y en algunos casos a través de agua contaminada (Lynch, Fishbein, y Echavarría 2011), (Mena y Gerba 2009). Posterior a la transmisión del Ad, el periodo de incubación puede ser de 2 a 15 días, dependiendo del tipo viral y de la vía transmisión.

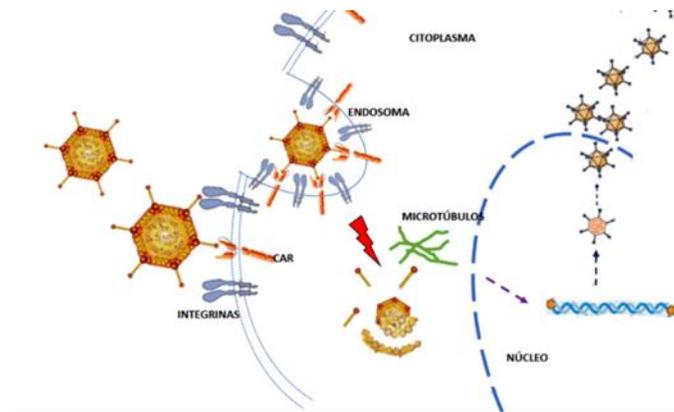
Los Adenovirus están categorizados comúnmente en siete grupos (A-G) y más de 70 tipos basados en sus propiedades de hemaglutinación y la homología de sus secuencias (según el último reporte del Comité Internacional sobre Taxonomía viral, es posible nombrarlos como especies y tipos, respectivamente) (Tollefson et al. 2017; M. Q. King et al. 2012). Son virus

icosaédricos, desnudos de DNA lineal de doble cadena. La cápside está formada por tres proteínas principales: el hexón, la base pentón y la fibra (F), que constituyen los principales antígenos, además de las proteínas menores IIIa, VI, VIII y IX y las proteínas del core: V, VII, IVa2,  $\mu$ , proteína terminal y proteasa. En el proceso de adherencia celular, la estructura de mayor importancia es la protuberancia de la fibra (F), que se encuentra en cada uno de los 12 pentones (Flint et al. 2015), figura 1.



**Figura 1.** Estructura de un Adenovirus

Posterior a la transmisión del Ad, el periodo de incubación puede ser de 2 a 15 días, dependiendo del tipo viral y la vía transmisión. El ciclo se integra en dos fases. La fase temprana que incluye la adherencia celular, entrada a la célula hospedera, transporte del genoma viral al núcleo y la transcripción y traducción selectiva de los genes tempranos E (del inglés *Early*). Además, esta fase favorece la transcripción y traducción de los genes tardíos L (del inglés *Late*). La fase tardía incluye los procesos posteriores a la replicación y termina con el ensamble de las proteínas estructurales, la encapsidación y la maduración del virus infeccioso en el núcleo, finalmente ocurre la lisis celular y liberación de los viriones, la figura 2.

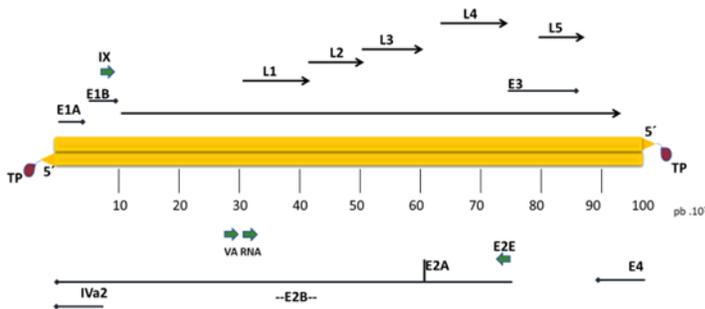


**figura 2.** Ciclo de multiplicación para un adenovirus

## GENOMA VIRAL

El genoma viral de todos los Adenovirus presenta una organización muy parecida, puede tener de 30 a 40 genes y codifican para ~40 proteínas, solo 12 de ellas son constitutivas de la partícula viral. El genoma, es una molécula de aproximadamente 36 kbp (26 a 45 kbp) con una proteína terminal (TP) de 55 kDa anclada covalentemente a los extremos 5', en éstos, se encuentran unas secuencias cortas o repeticiones terminales invertidas (ITRs del inglés inverted terminal repeats) de 50 a 200 pb que constituyen el origen de replicación (Ori). El genoma está dividido en regiones tempranas, intermedias y tardías que corresponden al ciclo viral infectivo y reflejan los patrones de transcripción. La región temprana incluye cuatro familias de genes tempranos (E) con cinco unidades transcripcionales (E1A, E1B, E2, E3, E4) que están involucradas en la regulación de la replicación del DNA, los genes intermedios están representados por dos proteínas (IX y IVa2) y la región tardía contiene cinco familias de genes tardíos (L1 a L5) que constituyen la cápside. De manera general, el Ad está compuesto de alrededor de 1 millón de residuos de aminoácidos con una masa molecular de 150 mDa (Ponterio et al. 2015b; Chen y Lee 2014; Lion 2014).

La replicación de los adenovirus requiere un tiempo entre 12 a 24 h, la expresión de las unidades transcripcionales (E) se activan dos horas después de la entrada del virus a la célula hospedera, después de la internalización la producción de viriones continua durante 40 h, (van Ormondt, Maat, y van Beveren 1980). Narvaiza 2013



**Figura 3.** Organización transcripcional del genoma de un adenovirus

## INFECTOBESIDAD

En las últimas tres décadas se ha estudiado ampliamente la influencia de factores ambientales y genéticos para el desarrollo de la obesidad en el humano, recibiendo poca atención la contribución de algunos agentes infecciosos, como los virus, para el incremento de la adiposidad y el peso corporal, nombrada por algunos autores como infectoobesidad (N. V. Dhurandhar 2001; Pasarica y Dhurandhar 2007).

Sin embargo, se han descrito por lo menos cinco virus relacionados con obesidad en modelos animales, incluyendo varios virus no humanos: virus del moquillo canino (CDV, por sus siglas en inglés *Canine Distemper Virus*) (Lyons et al. 1982), el virus aviar asociado de Rous 7 (RAV-7) (Carter, Ow, y Smith 1983), el virus de la enfermedad de Borna (Gosztanyi y Ludwig 1995; Herden et al. 2000) y el virus aviar SMAM-1 (N. V. Dhurandhar et al. 1997, 1992).

El primer estudio en humanos que mostró que los virus tienen potencial para el incremento de la adiposidad, halló en personas obesas la presencia de anticuerpos (AB) contra el adenovirus aviar SMAM-1 e inoculando los sueros en embriones de pollo lograron reproducir las lesiones macroscópicas compatibles con la infección por este adenovirus aviar (N. V. Dhurandhar et al. 1997).

Posteriormente, se indagó la contribución de diferentes adenovirus humanos para el desarrollo de adiposidad e incremento del peso corporal en humanos y se encontró una mayor frecuencia de los tipos Ad-5, Ad-9, Ad-31, Ad-36 y Ad-37 (Voss, Atkinson, y Dhurandhar 2015). De los virus adipogénicos para los humanos, el más estudiado es el Adenovirus 36 (Ad-36) (Nikhil V. Dhurandhar 2004; Jaworowska y Bazylak 2006; Whigham, Israel, y Atkinson 2006; Richard L. Atkinson 2007; Nikhil V. Dhurandhar 2011; Mitra y Clarke 2010; Lion 2014; Cakmakliogullari et al. 2014).

## **ADENOVIRUS 36 Y SU POTENCIAL ASOCIACIÓN CON EL DESARROLLO DE LA OBESIDAD**

Ad-36 fue el primer virus humano asociado con el potencial adipogénico para el humano, además de ser el más estudiado en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Ad-36 se diferencia de los otros adenovirus en gran parte por la limitada reactividad cruzada que muestra, por los patrones de inhibición de la neutralización y hemaglutinación y por sus particulares características genómicas y proteómicas (muy baja homología de las secuencias de los loop 1 y 2 del hexón, con otros tipos de Ad y muy baja variabilidad genética) (Tambo, Roshan, y Pace 2016; Jae-Hwan Nam 2013; J.-H. Nam et al. 2014; van Ginneken, Sitnyakowsky, y Jeffery 2009; S. D. Vangipuram et al. 2007; Whigham, Israel, y Atkinson 2006; Pasarica et al. 2006; Kapila, Khosla, y Dhurandhar 2004; Nikhil V. Dhurandhar et al. 2002; N. V. Dhurandhar 2001; N. V. Dhurandhar et al. 2000; Nikhil V. Dhurandhar et al. 1992).

La propuesta para la fisiopatogenia del desarrollo de obesidad por la infección por Ad-36, de manera global involucra: regulación positiva de la adipogénesis mediada por el gen E4ORF-1, diferenciación rápida del preadipocito, el compromiso del sistema inmune con la concomitante cascada adipogénica, baja secreción de Leptina y un aumento de la sensibilidad a la insulina (Whigham, Israel, y Atkinson 2006; Pasarica et al. 2008; P. M. Rogers et al. 2008; Ponterio et al. 2015a; Z. Q. Wang et al. 2010).

De tal manera que, la infección por Ad-36 determina el incremento en la actividad de enzimas como: la Acetil-CoA carboxilasa-1, la sintasa de ácido grasos, de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y de varios factores de transcripción, lo que probablemente conduce a un aumento de

la captación de glucosa y disminución en la oxidación de ácidos grasos e incremento en la lipogénesis de novo, probablemente, promoviendo la expresión de proteínas de la familia CIDE (por sus siglas en inglés: *Cell Inducing DFF45-like Effector*): factor de fragmentación de ADN  $\alpha$  como efector A (CIDEA) y de la proteína 27 específica de grasa (CIDEDEC). (Salehian et al. 2010; Z. Q. Wang et al. 2010).

También se ha encontrado reducción de la expresión y secreción de leptina, una mayor sensibilidad a la insulina y secreción disminuida de corticosterona. Lo que conduce a mayor captación de glucosa (S. D. Vangipuram et al. 2007; Pasarica et al. 2006; Pamela M. Rogers et al. 2008).

Por otro lado, los triglicéridos, se han encontrado notablemente disminuidos, el colesterol total, en la mayoría de trabajos se encontró en niveles bajos, y las lipoproteínas de baja (cLDL) y alta (cHDL) densidad, con valores elevados y bajos, respectivamente (S. D. Vangipuram et al. 2007; Bednarska-Makaruk et al. 2017; Kocazeybek et al. 2017; Pasarica et al. 2006; Kapila, Khosla, y Dhurandhar 2004).

Se conoce que las infecciones por Ad provocan que el sistema inmune proteja al hospedero mediante mecanismos de respuesta innata y adaptativa. Generalizando, la respuesta inmune involucra la participación de las barreras primarias como el sistema mucociliar, la respuesta humoral mediada por IgA secretora, la participación de macrófagos y células dendríticas, así como, la proliferación y diferenciación de células T y B, y el reclutamiento y activación de células NK.

Se ha encontrado que la señalización de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y del factor nuclear kappa beta (NF $\kappa$ -b), responden secretando citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, IL-12. TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , proteína inflamatoria de los macrófagos (MIP-1 $\alpha$ ) y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). La inmunogenicidad de Ad causa el reconocimiento por receptores tipo Toll e inducen la expresión de IFN $\alpha$  y  $\beta$  (IFN tipo I), lo que conduce a una respuesta humoral y celular.

En la respuesta adaptativa, los Ad son captados por las células presentadoras de antígeno (ACP), los que por medio del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) presentan los antígenos del virus a los linfocitos T citotóxicos induciendo una respuesta inmune celular. La presentación de los antígenos virales mediante MHC-II, activa a los linfocitos cooperadores y a los linfocitos B, lo que induce una respuesta humoral con producción de anticuerpos anti-Ad que neutralizan a los Ad circulantes evitando la adherencia a otras células (Ponterio et al. 2015a; Chen y Lee 2014; Ha-Na Na y Nam 2012; Russell 2009; Alonso 2013).

Para contrarrestar los mecanismos de defensa antiviral, se ha propuesto que los Adenovirus inhiben la actividad del interferón, sintetizando VA RNA (VA, virus asociado) que evita la activación de la cinasa inducible por interferón, que fosforila e inactiva el factor de iniciación eucariota 2 (eIF2) necesario para el inicio de la traducción. La región E3 codifica varias proteínas responsables de la evasión del sistema inmune. La proteína E3 (gp19kDa) bloquea

el movimiento del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) hacia la superficie celular evitando la lisis celular mediada por linfocitos T citotóxicos, otras proteínas de E3 (E310.4/14.5 kDa y la E314.7 kDa) inhiben la apoptosis mediada por Fas o TNF- $\alpha$  (Alonso 2013).

Los Ad promueven una inmunidad eficaz y duradera contra la reinfección, probablemente por la presencia en la circulación de anticuerpos neutralizantes, lo cual podría explicar las altas prevalencias de tipos de Ad en población abierta (X. Zheng et al. 2017) (Jawetz, 2010). Por otro lado, es frecuente encontrar que los Adenovirus causen infecciones del tipo lítico en las células epiteliales y del tipo persistente (latente o crónico) en las adenoides, amígdalas y linfocitos (Garnett et al. 2002; Lynch, Fishbein, y Echavarría 2011).

## **MARCO TEÓRICO**

### **PERSISTENCIA VIRAL**

La persistencia viral (infección crónica por virus) ha tomado gran relevancia por ser el mecanismo por el cual los virus pueden perpetuarse en los organismos y en la naturaleza, alternando entre ciclos líticos y persistentes, que pueden presentarse en el mismo hospedero en diferentes estirpes celulares (ej. HIV en macrófagos y linfocitos T cooperadores) o en un vector de transmisión y el hospedero (ej. Dengue en el intestino del mosquito y el tejido linfoide del humano). Adicionalmente, la infección persistente es una forma de evasión al sistema inmune ya que el virus se encuentra en tejidos privilegiados, como el cerebro, médula ósea o el tejido adiposo.

Se reconoce la infección del tipo persistente de los Adenovirus desde los primeros trabajos cuando se aislaron de adenoides de personas clínicamente sanas (Rowe et al. 1953), estas infecciones se caracterizan por una producción de progenie intermitente a una tasa baja y durante largos periodos que pueden causar poco o ningún daño al tejido hospedero (King, Zhang, y Mymryk 2016). Asimismo, investigaciones *in vitro* con otros virus, demuestran que las células persistentemente infectadas son capaces de producir factores antivirales, que liberados al medio podrían provocar en otras células resistencia a la infección (Y. Zheng, Stamminger, y Hearing 2016).

Aunque estudios previos concluyeron que las infecciones persistentes por Ad eran benignas, trabajos recientes empleando técnicas de amplificación molecular sugieren el papel de los Ad en diversas enfermedades crónicas, como la obesidad (Whigham, Israel, y Atkinson 2006; Pasarica et al. 2008; Ergin et al. 2015), por ello es importante entender detalles moleculares del mecanismo de persistencia viral.

Por otro lado, estudios en donde se han cuantificado células portadoras de Ad y la carga del DNA viral en tejidos con infección persistente (adenoides y amígdalas) se encontró una

frecuencia tan baja como 1 de cada  $10^4$  a  $10^5$  células infectadas de forma natural y un número de copias de genoma por célula de menos de 10 a más de  $2 \cdot 10^7$  copias/célula, sin evidencia de infección activa. Estos datos hacen suponer que la persistencia en los tejidos se caracteriza por la expresión diferencial de proteínas virales (tempranas y tardías) sin completa replicación viral. (Garnett et al. 2002; Zhang et al. 2010).

## **PROPAGACIÓN DE ADENOVIRUS 36 EN LÍNEAS CELULARES**

Para entender la fisiopatología molecular de la infección por Adenovirus, se han utilizado los cultivos en diversas líneas celulares (principalmente, células tumorales transformadas). Este método tiene las bondades de ser homogéneo, sencillo y reproducible, logrando que en un solo ciclo el virus replique de manera sincronizada en todas las células infectadas, esto se nombra curva de crecimiento en un paso.

A diferencia de la inoculación en modelos animales, en el cultivo celular la densidad celular, edad del cultivo, multiplicidad de infección, duración de tiempo de adsorción, y demás condiciones de incubación se pueden controlar. Es importante considerar además que las células a utilizar sean permisivas para la replicación del virus que se desea.

En diversas publicaciones la propagación de Ad-36 se ha realizado en algunas líneas celulares: hASC (células madre de tejido adiposo humano) (Pamela M. Rogers et al. 2008), A549 (células de cáncer de pulmón humano) (N. V. Dhurandhar et al. 2001, 2000), HeLa (Wigand, Gelderblom, y Wadell 1980), HEK 293 (de riñón embrionario humano) (Shen et al. 2008), 3T3-L1 (de preadipocitos murinos) (R. L. Atkinson et al. 2005; Sharada D. Vangipuram et al. 2004) y hMSCs (de células madre mesenquimales) (H.-N. Na, Kim, y Nam 2012).

Para monitorear la replicación viral en la línea celular pueden emplearse técnicas de microscopía y de hemadsorción. La microscopía permite observar signos de la replicación tales como: efecto citopático, transformación celular, formación de sincicios, presencia de cuerpos de inclusión, entre otros. Por otro lado, la hemadsorción mide indirectamente la infección detectando la síntesis de proteínas virales en las células mediante la adsorción de eritrocitos a su superficie, y pone de manifiesto la interacción de las proteínas de envoltura con el ácido siálico del glóbulo rojo.

Por lo que se refiere a la obtención de un stock viral, que es cuando el virus se ha adaptado al tipo celular y se trata de lograr la mayor relación del número de unidades formadoras de placa (UFP)/ unidad de volumen. Los stocks virales se obtienen a partir de infecciones con baja multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés, *Multiplicity Of Infection* que es el número de partículas virales infectivas/célula. La probabilidad de que cualquier célula objetivo pueda infectarse basada en el MOI se puede calcular por la distribución de Poisson. Además, para evitar la formación de virus defectivos o incompletos los stocks se preparan a  $MOI < 1$ , por el contrario, con un  $MOI > 1$  la producción de partículas infectivas será menor y por lo tanto aumenta la relación de partículas virales totales (infectivas y no infectivas) (Coll Morales 1993)

La infección aguda o lítica de Ad-36, se ha reproducido fácilmente *in vitro* y en modelos biológicos, por el contrario, el fenómeno de la persistencia viral *in vitro* ha encontrado tropiezos para manifestarse, por ello, no se ha esclarecido completamente los mecanismos moleculares y los genes de Ad-36 involucrados en el establecimiento de este virus en los tejidos de manera crónica o persistente.

El estudio de la expresión génica y la manera que determinada proteína contribuye a la expresión de un fenotipo celular abarca desde la activación del gen hasta la proteína madura se localiza en el lugar adecuado para realizar su función (Hernández et. al., 1994). Este hecho puede ser abordado por técnicas de análisis de proteínas como ELISA, inmunohistoquímica, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y Western Blot, entre otras.

El Western Blot, es una técnica que nos sirve para la inmunodetección y cuantificación de proteínas específicas en homogenados celulares complejos. La detección de los niveles de expresión de las proteínas por esta técnica es posible al transferir las proteínas de un gel de poliacrilamida sodio dodecil sulfato (SDS) a una membrana absorbente para obtener una copia exacta del gel donde han sido separadas por electroforesis. La membrana se incuba con dos anticuerpos (AB), el AB primario se une a las proteínas de la membrana, mientras que el AB secundario se une al AB primario. El empleo de un fluoróforo permite visualizar bandas que corresponden a las proteínas investigadas. Con este proceso se puede detectar proteínas presentes en baja cantidad (Taylor, 2014).

La qPCR, es una técnica muy sensible, específica y con amplio rango de detección, que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia, sin necesidad de realizar una electroforesis. Para cuantificar la expresión génica, se requiere determinar el número de moléculas de mRNA, por lo que se necesita realizar una reacción de transcripción reversa del mRNA a cDNA antes de aplicar la qPCR. Posteriormente, se amplifica el cDNA en un termociclador acoplado a un sistema óptico que monitorea la señal de los fluoróforos para detectar el producto amplificado. La detección-cuantificación de la expresión de una proteína está relacionada con la intensidad de la fluorescencia (Aguilera et al., 2016) (Heim et al. 2003; J. Wang et al. 2017)

El equipo de investigación encabezado por la Dra. en C. Mirza Romero Valdovinos del Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" desarrolló un método por PCR tiempo real para diagnosticar al Ad-36 en grasa visceral de pacientes con obesidad mórbida. Los resultados muestran la presencia de Ad-36 en el 93% de los casos y en el 25% en los controles. Las secuencias de este trabajo fueron comparadas con la cepa de Ad-36 EUA (número de acceso en el GenBank GQ384080) y se tuvo una identidad del 98%. El análisis filogenético en MrBayes, mostró que todas las secuencias obtenidas de los participantes de este estudio y de la cepa control del virus Ad-36, se agruparon en un clúster único. Estos datos sugieren que el virus puede establecer infecciones persistentes en el tejido graso de los pacientes.

En México, no existen estudios que comparen la expresión de las proteínas de Ad-36 en la infección persistente de tejido graso de pacientes con obesidad mórbida en líneas celulares epiteliales humanas, por lo que el presente estudio es importante para clarificar la expresión de proteínas tempranas y tardías de Ad-36 en la infección aguda y persistente.

## **JUSTIFICACIÓN:**

Cada vez son más los estudios que demuestran que el Ad-36 se asocia con el desarrollo de la obesidad en el humano y varios modelos animales. Se ha comprobado que la proteína temprana E4-ORF1 es un inductor rápido del proceso de diferenciación, proliferación y acumulación de lípidos en el adipocito. Asimismo, se conoce que los adenovirus humanos a menudo causan infecciones agudas o líticas y crónicas en tejidos como el cerebro, pulmón o tejido adiposo. La infección crónica con Ad-36 encontrada en el tejido adiposo (Whigham, Israel, y Atkinson 2006; Nikhil V. Dhurandhar et al. 2002; Sharada D. Vangipuram et al. 2004; Pasarica et al. 2006; Ergin et al. 2015) sugiere la probable alteración de manera estable de diversos genes de Ad-36 después de la infección. De tal forma que es de la mayor importancia conocer como se está regulando la expresión de las proteínas virales, como E4ORF-1, en la infección persistente o crónica, en la grasa de pacientes con obesidad mórbida. Los resultados podrían aportar conocimiento de la patogenia de la infección crónica por Ad-36 asociada con la obesidad.

## **OBJETIVOS:**

### General

Comparar la expresión de proteínas de Ad-36 en infección aguda de células epiteliales humanas, con la expresión de las proteínas de Ad-36 en las biopsias de tejido graso de pacientes con obesidad mórbida.

### Específicos

- Estandarizar la técnica de amplificación por tiempo real (qPCR) para evaluar la expresión de las proteínas virales en infección aguda y en las biopsias de los pacientes.
- Estandarizar la técnica de Western Blot para evaluar la expresión de las proteínas virales en infección aguda y en las biopsias de los pacientes.
- Determinar cuáles son los niveles de expresión de proteínas de Ad-36 en biopsias de tejido adiposo de pacientes con obesidad mórbida.
- Determinar cuáles son los niveles de expresión de proteínas de Ad-36 en la infección de tipo agudo desarrollada en cultivos celulares.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

**Adenovirus:** El adenovirus humano Ad-36 (ATCC VR-913) se obtendrán de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) y se usará como control.

**Líneas celulares:** A549 (ATCC-CCL-185, tejido de carcinoma bronquial humano) HEp-2 (ATCC-CCL-23, tejido de carcinoma epidermoide humano).

**Reactivos:** Medios de cultivo DMME (modificado de cultivo Eagle modificado de Dulbecco, Thermo Scientific), HEPES (buffer, Thermo Scientific), suero bovino fetal, glutamina, bicarbonato, complementos vitamínicos, piruvato para cultivo celular. Colorante azul de tripano. Estuches para determinación de las proteínas en estudio. Reactivos necesarios para las PCR en tiempo real (oligonucleótidos, Taq-polimerasa y demás reactivos convencionales). Reactivos convencionales para realizar electroforesis en gel de agarosa y gel de poliacrilamida. Marcadores de peso molecular. Estuches para la purificación de los productos de amplificación de los ácidos nucleicos virales.

**Insumos:** Material de plástico como: botellas para cultivo, microplacas de cultivo de 96 pozos, placas para determinaciones en el lighth cycler, tubos para PCR y demás insumos desechables.

**Instrumentos:** Lighth Cycler de ROCHE para PCR en tiempo real. Digital Axygen Maxygene para PCR en punto final. Fotodocumentador Carestream 212 PRO, Gel Logic. Cámara de electroforesis Mini-protean Tetra Cell, Bio-rad. Espectrofotómetro para cuantificar ácidos nucleicos, NanoDrop One de Thermo Scientific. Campana de flujo laminar nivel 2, Thermo Scientific. Estufa de CO<sub>2</sub> para cultivo celular. Microscopio LEICA DM750. Centrífugas refrigeradas para tubos: de 15 y 50 mL, así como para tubos tipo Eppendorf, Thermo Scientific. Balanzas, cámaras de electroforesis horizontal y vertical. Cámara de Neubauer.

**Secuenciación de ácidos nucleicos:** Para asegurar la identidad de los adenovirus en estudio, se enviará a secuenciación los productos purificados de la amplificación genómica viral, al servicio externo del Laboratorio temático de Biología Molecular y Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología de la UNAM.

## **METODOLOGÍA**

- 1. Obtener cepa control del adenovirus (Ad-36).** Ad-36 (ATCC VR-913) se obtendrá de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) se usará como control.
- 2. Obtener DNA del Ad-36 de las biopsias de grasa visceral** de pacientes con obesidad mórbida que fueron sometidos a cirugía bariátrica y obtenidas mediante la técnica de endoscopia. El DNA se obtendrá utilizando el método de extracción fenol/cloroformo. Se conservarán a -20°C hasta su utilización.
- 3. Obtener las líneas celulares HEp-2 y A549,** susceptibles a la infección por Ad-36 y que permitirá aislar el virus. Demostrado en estudios previos y muestran un crecimiento adherente.
- 4. Propagar Ad-36 en las líneas celulares.** En botellas de cultivo que contengan las líneas celulares antes descritas, se infectarán a baja multiplicidad de infección (MOI

0.1). Se incubará a 37°C en medio con antibiótico-antimicótico. Los cultivos se mantendrán en medio al 2%, por 48 a 72 h.

**5. Cuantificar y comprobar viabilidad**

Los cultivos se tratarán con solución buffer Tris-HCl 100 mM pH 8 y EDTA durante 5 min a 37°C. Se realizará cuenta de una alícuota de la suspensión celular en cámara de Neubauer mediante el método de exclusión de azul de tripano.

**6. Cuantificación de la infectividad viral o Ensayo de unidades formadoras de placa**

(PFU, del inglés *Plaque-Forming Units*). Los títulos de los virus purificados se determinarán en las células ensayadas. Las suspensiones se diluirán 1:10, comenzando con 10 µL de suspensión y 90 µL de medio. Las células se crecerán hasta que estén confluentes en placas de seis pozos, usando tres pozos para cada dilución. Tres pozos serán usados como blanco. El medio será removido de cada pozo y se añadirá 100 µL de medio conteniendo diluciones seriadas del virus. Las placas se incubarán a 37°C durante 1 h agitándolas suavemente cada 15 min. Se eliminará la suspensión viral de cada pozo y se cubrirán con 3 mL de agar al 1% con antibiótico-antimicótico 1X. Las placas se invertirán para su incubación a 37°C/ 8 días, hasta que las placas de lisis aparezcan. Posterior a los ocho días, cada pozo de teñirán con 1 mL de cristal violeta por 12 h. Al día siguiente, se retirará el agar y se contará el número de placas formadas. Así, el número de placas formadas se multiplicará por la dilución de la suspensión viral y dará PFU/100 µL de inóculo usado. El resultado se multiplicará por 10 para expresar PFU/mL.

**7. Cosechar cultivos.** Después del tiempo de incubación establecido, los stocks se centrifugarán durante 15 min a 10 000g, luego el sobrenadante se dividirá en alícuotas y se conservará a -70°C hasta su utilización.

**8. Extracción de RNA.** Al finalizar el periodo de incubación, se empleará la extracción del RNA por el método basado en la extracción por tioisocianato de guanidina: Trizol®, Invitrogen, siguiendo el protocolo del fabricante. El RNA se suspenderá en agua libre de RNasa. Se cuantificará la concentración con el uso del espectrofotómetro NanoDrop, Thermo Scientific. Se utilizará la enzima tripticasa reversa para obtener cDNA, se incubará a 37°C/ 1 h, enseguida se inactivará con una incubación a 85°C.

**9. Estandarización de la técnica de amplificación en tiempo real (qPCR),** para la expresión de proteínas virales, en infección aguda y en las biopsias de los pacientes.

**10. Estandarización de la detección de las proteínas virales con anticuerpos por la técnica molecular de Western blot.** Esta técnica nos permitirá detectar los niveles de expresión de las proteínas de Ad-36, mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS), transferencia a nitrocelulosa, marcaje con anticuerpos específicos y posterior detección de los anticuerpos que nos revelarán la proteína de interés.

**11. Comparación de la expresión de las proteínas virales** en infección aguda y en las biopsias de los pacientes, mediante la prueba estadística t-Student

## CONCLUSIONES

Ad36 no incrementa el ingreso de calorías (orexigénico) es más puede facilitar la pérdida de peso cuando se realizan intervenciones dietéticas conductuales, facilitando la pérdida de peso en individuos seropositivos, un gen viral expresado temprano durante la infección por Ad36, ha sido confirmado por experimentos in vitro e in vivo como responsable de este aumento en el transporte de glucosa. Además, E4orf1 reduce la necesidad de insulina endógena, a eso se le llama “efecto ahorrador de la insulina”

El aclaramiento mejorado de la glucosa por E4orf1 reduce indirectamente el estímulo a la liberación de insulina por las células beta pancreáticas reduce la producción de glucosa hepática para el efecto adipogénico relaciona el aumento en la captación de glucosa por el incremento en la exportación de los transportadores GLUT4, puede producir un ARN de horquilla corta que silencia la proteína de unión a ácidos grasos en adipocito.

La activación de E4-ORF1 de PI3K en adipocitos recapitula la regulación de la insulina de FoxO1 pero no la regulación de Glut4. Este desacoplamiento de los efectos de PI3K ocurre a pesar de que E4-ORF1 activa PI3K y señala aguas abajo a los niveles alcanzados por la insulina. Aunque E4-ORF1 no recapitula completamente los efectos de la insulina sobre Glut4, mejora la inserción estimulada por insulina de vesículas que contienen Glut4 en la membrana plasmática independientemente de Rab10, un regulador clave del tráfico de Glut4. E4-ORF1 también estimula la translocación de la membrana plasmática del transportador de glucosa Glut1 expresado de manera ubicua, un efecto que probablemente es esencial para que E4-ORF1 promueva un metabolismo anabólico en una amplia gama de tipos de células Chaudhary CREBP.

## CALENDARIO DE ACTIVIDADES

Actividad	feb	feb	Feb-marzo	Marzo-abril	Marzo-abril	abr	mayo	jun	jun	jul	jul	agosto
Revisión bibliográfica												
Captación de muestras de biopsias de tejido adiposo de pacientes con obesidad mórbida												
Adquisición de líneas celulares, cepa control, material y reactivos												
Estandarización de las técnicas de amplificación por tiempo real (qPCR) y Western Blot para la expresión de proteínas en infección aguda y en las biopsias de los pacientes												
Determinación de la expresión de las proteínas virales en biopsias y cultivos agudos												
Análisis estadístico de los resultados												
Preparación de manuscritos												
Escritura de tesis												
Divulgación de resultados												

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, Tahir, Najma Arshad, Fazal Adnan, Najam-Us-Sahar Sadaf Zaidi, Muhammad Talha Shahid, Usman Zahoor, Muhammad S. Afzal, y Sadia Anjum. 2016. "Prevalence of Rotavirus, Adenovirus, Hepatitis A Virus and Enterovirus in Water Samples Collected from Different Region of Peshawar, Pakistan". *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM* 23 (4): 576–80. <https://doi.org/10.5604/12321966.1226849>.
- Alonso, Covadonga. 2013. *Viruses and Apoptosis*. Springer Science & Business Media.
- Atkinson, R. L., N. V. Dhurandhar, D. B. Allison, R. L. Bowen, B. A. Israel, J. B. Albu, y A. S. Augustus. 2005. "Human Adenovirus-36 Is Associated with Increased Body Weight and Paradoxical Reduction of Serum Lipids". *International Journal of Obesity (2005)* 29 (3): 281–86. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802830>.
- Atkinson, Richard L. 2007. "Viruses as an Etiology of Obesity". *Mayo Clinic Proceedings* 82 (10): 1192–98. <https://doi.org/10.4065/82.10.1192>.
- Barrero, P. R., L. E. Valinotto, E. Tittarelli, y A. S. Mistchenko. 2012. "Molecular Typing of Adenoviruses in Pediatric Respiratory Infections in Buenos Aires, Argentina (1999-2010)". *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 53 (2): 145–50. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.11.001>.
- Bednarska-Makaruk, Małgorzata, Ałła Graban, Anna Wiśniewska, Wanda Łojkowska, Anna Bochyńska, Magdalena Gugala-Iwaniuk, Ksenia Sławińska, Agnieszka Ługowska, Danuta Ryglewicz, y Hanna Wehr. 2017. "Association of adiponectin, leptin and resistin with

- inflammatory markers and obesity in dementia". *Biogerontology* 18 (4): 561–80. <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9701-0>.
7. Cakmakliogullari, Elcin Kal, Tamer Sanlidag, Betul Ersoy, Sinem Akcali, Ahmet Var, y Candan Cicek. 2014. "Are Human Adenovirus-5 and 36 Associated with Obesity in Children?" *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research* 62 (5): 821–24. <https://doi.org/10.2310/JIM.0000000000000084>.
  8. Carter, J. K., C. L. Ow, y R. E. Smith. 1983. "Rous-Associated Virus Type 7 Induces a Syndrome in Chickens Characterized by Stunting and Obesity". *Infection and Immunity* 39 (1): 410–22.
  9. Chen, Rong-Fu, y Chun-Yi Lee. 2014. "Adenoviruses Types, Cell Receptors and Local Innate Cytokines in Adenovirus Infection". *International Reviews of Immunology* 33 (1): 45–53. <https://doi.org/10.3109/08830185.2013.823420>.
  10. Coll Morales, Julio. 1993. *Técnicas de diagnóstico en virología*. Madrid: Díaz de Santos.
  11. Costa, Larissa Cristina Prado das Neves, Jones Anderson Monteiro Siqueira, Thayara Morais Portal, Edivaldo Costa Sousa, Alexandre da Costa Linhares, Yvone Benchimol Gabbay, y Hugo Reis Resque. 2017. "Detection and Genotyping of Human Adenovirus and Sapovirus in Children with Acute Gastroenteritis in Belém, Pará, between 1990 and 1992: First Detection of GI.7 and GV.2 Sapoviruses in Brazil". *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* 50 (5): 621–28. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0198-2017>.
  12. Delgado, Francisco Javier Juárez. 2001. "Cirugía en la obesidad mórbida". *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 44 (3): 113–17. <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=10135>.
  13. "Desnutrición y obesidad: doble carga en México". s/f. Consultado el 19 de octubre de 2018. <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num5/art34/>.
  14. Dhurandhar, N. V. 2001. "Infectobesity: Obesity of Infectious Origin". *The Journal of Nutrition* 131 (10): 2794S–2797S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.10.2794S>.
  15. Dhurandhar, N. V., D. Bailey, y D. Thomas. 2015. "Interaction of Obesity and Infections". *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* 16 (12): 1017–29. <https://doi.org/10.1111/obr.12320>.
  16. Dhurandhar, N. V., B. A. Israel, J. M. Kolesar, G. Mayhew, M. E. Cook, y R. L. Atkinson. 2001. "Transmissibility of Adenovirus-Induced Adiposity in a Chicken Model". *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 25 (7): 990–96. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801668>.
  17. Dhurandhar, N. V., B. A. Israel, J. M. Kolesar, G. F. Mayhew, M. E. Cook, y R. L. Atkinson. 2000. "Increased Adiposity in Animals Due to a Human Virus". *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 24 (8): 989–96.
  18. Dhurandhar, N. V., P. Kulkarni, S. M. Ajinkya, y A. Sherikar. 1992. "Effect of Adenovirus Infection on Adiposity in Chicken". *Veterinary Microbiology* 31 (2–3): 101–7.
  19. Dhurandhar, N. V., P. R. Kulkarni, S. M. Ajinkya, A. A. Sherikar, y R. L. Atkinson. 1997. "Association of Adenovirus Infection with Human Obesity". *Obesity Research* 5 (5): 464–69.
  20. Dhurandhar, Nikhil V. 2004. "Contribution of Pathogens in Human Obesity". *Drug News & Perspectives* 17 (5): 307–13.
  21. ———. 2011. "A Framework for Identification of Infections That Contribute to Human Obesity". *The Lancet. Infectious Diseases* 11 (12): 963–69. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70274-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70274-2).
  22. Dhurandhar, Nikhil V., Pushpa Kulkarni, S. M. Ajinkya, y Abhaya Sherikar. 1992. "Effect of adenovirus infection on adiposity in chicken". *Veterinary Microbiology* 31 (2): 101–7. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90068-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90068-5).

23. Dhurandhar, Nikhil V., Leah D. Whigham, David H. Abbott, Nancy J. Schultz-Darken, Barbara A. Israel, Steven M. Bradley, Joseph W. Kemnitz, David B. Allison, y Richard L. Atkinson. 2002. "Human Adenovirus Ad-36 Promotes Weight Gain in Male Rhesus and Marmoset Monkeys". *The Journal of Nutrition* 132 (10): 3155–60. <https://doi.org/10.1093/jn/131.10.3155>.
24. Ergin, Sevgi, Eda Altan, Ozgur Pilanci, Serhat Sirekbasan, Oguz Cortuk, Utku Cizmecigil, Idris Ersin, et al. 2015. "The Role of Adenovirus 36 as a Risk Factor in Obesity: The First Clinical Study Made in the Fatty Tissues of Adults in Turkey". *Microbial Pathogenesis* 80 (marzo): 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.02.008>.
25. Flint, S. Jane, Vincent R. Racaniello, Glenn F. Rall, Anna Marie Skalka, y Lynn W. Enquist. 2015. *Principles of Virology*. ASM Press.
26. Gao, Mingming, y Dexi Liu. 2014. "Gene Therapy for Obesity: Progress and Prospects". *Discovery Medicine* 17 (96): 319–28. <http://www.discoverymedicine.com/Mingming-Gao/2014/06/gene-therapy-for-obesity-progress-and-prospects/>.
27. Garnett, C. T., D. Erdman, W. Xu, y Linda R. Gooding. 2002. "Prevalence and Quantitation of Species C Adenovirus DNA in Human Mucosal Lymphocytes". *Journal of Virology* 76 (21): 10608. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.21.10608-10616.2002>.
28. Ginneken, Vincent van, Laura Sitnyakowsky, y Jonathan E. Jeffery. 2009. "Infectobesity: viral infections (especially with human adenovirus-36: Ad-36) may be a cause of obesity". *Medical Hypotheses* 72 (4): 383–88. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.11.034>.
29. Gosztonyi, G., y H. Ludwig. 1995. "Borna Disease--Neuropathology and Pathogenesis". *Current Topics in Microbiology and Immunology* 190: 39–73.
30. Heim, Albert, Carmen Ebnet, Gabi Harste, y Patricia Pring-Akerblom. 2003. "Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR". *Journal of Medical Virology* 70 (2): 228–39. <https://doi.org/10.1002/jmv.10382>.
31. Herden, C., S. Herzog, J. A. Richt, A. Nessler, M. Christ, K. Failing, y K. Frese. 2000. "Distribution of Borna Disease Virus in the Brain of Rats Infected with an Obesity-Inducing Virus Strain". *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 10 (1): 39–48.
32. Jaworowska, Agnieszka, y Grzegorz Bazylak. 2006. "[Obesity development associated with viral infections]". *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)* 60: 227–36.
33. Kapila, M., P. Khosla, y N. V. Dhurandhar. 2004. "Novel Short-Term Effects of Adenovirus Ad-36 on Hamster Lipoproteins". *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 28 (12): 1521–27. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802710>.
34. King, Cason R., Ali Zhang, y Joe S. Mymryk. 2016. "The Persistent Mystery of Adenovirus Persistence". *Trends in Microbiology* 24 (5): 323–24. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.007>.
35. Kocazeybek, Bekir, Harika Oyku Dinc, Sevgi Ergin, Suat Saribas, Bahar Taskin Ozcabi, Utku Cizmecigil, Eda Altan, et al. 2017. "Evaluation of Adenovirus-36 (Ad-36) antibody seropositivity and adipokine levels in obese children". *Microbial Pathogenesis* 108 (julio): 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.034>.
36. Lion, Thomas. 2014. "Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients". *Clinical Microbiology Reviews* 27 (3): 441–62. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-13>.
37. Lynch, Joseph P., Michael Fishbein, y Marcela Echavarría. 2011. "Adenovirus". *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 32 (4): 494–511. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1283287>.
38. Lyons, M. J., I. M. Faust, R. B. Hemmes, D. R. Buskirk, J. Hirsch, y J. B. Zabriskie. 1982. "A Virally Induced Obesity Syndrome in Mice". *Science (New York, N.Y.)* 216 (4541): 82–85.
39. M. Q. King, A. M. J. Adams, E. B. Carstens, y Elliot Lefkowitz. 2012. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*.

40. Martin, Kathleen, Mitra Mani, y Arya Mani. 2015. "New targets to treat obesity and the metabolic syndrome". *European journal of pharmacology* 763 (0 0): 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.093>.
41. McAllister, Emily J., Nikhil V. Dhurandhar, Scott W. Keith, Louis J. Aronne, Jamie Barger, Monica Baskin, Ruth M. Benca, et al. 2009. "Ten Putative Contributors to the Obesity Epidemic". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49 (10): 868–913. <https://doi.org/10.1080/10408390903372599>.
42. Mena, Kristina D., y Charles P. Gerba. 2009. "Waterborne Adenovirus". *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 198: 133–67. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-09647-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-09647-6_4).
43. Mitra, A. K., y K. Clarke. 2010. "Viral Obesity: Fact or Fiction?" *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* 11 (4): 289–96. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00677.x>.
44. Molina, Herman Soto, Iris Ascencio Pérez, Amílcar Azamar Alonso, Juan Pablo Díaz Martínez, Mariel Pizarro Castellanos, Cecilia Fernández del Valle Laisequilla, Juan Gerardo Reyes García, Brenda Botello Estrada, y Aleida Azamar Alonso. 2015. "Carga económica de la obesidad y sus comorbilidades en pacientes adultos en México". *PharmacoEconomics Spanish Research Articles* 12 (4): 115–22. <https://doi.org/10.1007/s40277-015-0045-3>.
45. Na, Ha-Na, y Jae-Hwan Nam. 2012. "Adenovirus 36 as an Obesity Agent Maintains the Obesity State by Increasing MCP-1 and Inducing Inflammation". *The Journal of Infectious Diseases* 205 (6): 914–22. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir864>.
46. Na, H.-N., H. Kim, y J.-H. Nam. 2012. "Novel Genes and Cellular Pathways Related to Infection with Adenovirus-36 as an Obesity Agent in Human Mesenchymal Stem Cells". *International Journal of Obesity (2005)* 36 (2): 195–200. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.89>.
47. Nam, Jae-Hwan. 2013. "Why Is Not There a Match between the Serological and Genomic Prevalence of Adenovirus 36?" *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 56 (4): 370–71. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.12.008>.
48. Nam, J.-H., H.-N. Na, R. L. Atkinson, y N. V. Dhurandhar. 2014. "Genomic Stability of Adipogenic Human Adenovirus 36". *International Journal of Obesity (2005)* 38 (2): 321–24. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.67>.
49. Ormond, H. van, J. Maat, y C. P. van Beveren. 1980. "The Nucleotide Sequence of the Transforming Early Region E1 of Adenovirus Type 5 DNA". *Gene* 11 (3–4): 299–309.
50. Pasarica, Magdalena, y Nikhil V. Dhurandhar. 2007. "Infectobesity: Obesity of Infectious Origin". *Advances in Food and Nutrition Research* 52: 61–102. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(06\)52002-9](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(06)52002-9).
51. Pasarica, Magdalena, Nazar Mashtalir, Emily J. McAllister, Gail E. Kilroy, Juraj Koska, Paska Permana, Barbora de Courten, et al. 2008. "Adipogenic Human Adenovirus Ad-36 Induces Commitment, Differentiation, and Lipid Accumulation in Human Adipose-Derived Stem Cells". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (4): 969–78. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0868>.
52. Pasarica, Magdalena, Andrew C. Shin, Minghuan Yu, Hui-Mei Ou Yang, Miloni Rathod, K.-L. Catherine Jen, Sheba MohanKumar, Puliyur S. MohanKumar, Nathan Markward, y Nikhil V. Dhurandhar. 2006. "Human Adenovirus 36 Induces Adiposity, Increases Insulin Sensitivity, and Alters Hypothalamic Monoamines in Rats". *Obesity (Silver Spring, Md.)* 14 (11): 1905–13. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.222>.
53. Ponterio, E., R. Cangemi, S. Mariani, G. Casella, A. De Cesare, F. M. Trovato, A. Garozzo, y L. Gnessi. 2015a. "Adenovirus 36 DNA in Human Adipose Tissue". *International Journal of Obesity* 39 (12): 1761–64. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.163>.
54. ———. 2015b. "Adenovirus 36 DNA in Human Adipose Tissue". *International Journal of Obesity (2005)* 39 (12): 1761–64. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.163>.

55. Rogers, P. M., K. A. Fusinski, M. A. Rathod, S. A. Loiler, M. Pasarica, M. K. Shaw, G. Kilroy, et al. 2008. "Human Adenovirus Ad-36 Induces Adipogenesis via Its E4 Orf-1 Gene". *International Journal of Obesity (2005)* 32 (3): 397–406. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803748>.
56. Rogers, Pamela M., Nazar Mashtalir, Miloni A. Rathod, Olga Dubuisson, Zhong Wang, Kumar Dasuri, Scott Babin, et al. 2008. "Metabolically Favorable Remodeling of Human Adipose Tissue by Human Adenovirus Type 36". *Diabetes* 57 (9): 2321–31. <https://doi.org/10.2337/db07-1311>.
57. Rowe, W. P., R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott, y T. G. Ward. 1953. "Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 84 (3): 570–73.
58. Russell, W. C. 2009. "Adenoviruses: update on structure and function". *Journal of General Virology* 90 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1099/vir.0.003087-0>.
59. Salas-Salvadó, Jordi, Miguel A. Rubio, Montserrat Barbany, y Basilio Moreno. 2007. "Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica". *Medicina Clínica* 128 (5): 184–96. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(07\)72531-9](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(07)72531-9).
60. Salehian, Behrouz, Stephen J. Forman, Fouad R. Kandeel, Denise E. Bruner, Jia He, y Richard L. Atkinson. 2010. "Adenovirus 36 DNA in Adipose Tissue of Patient with Unusual Visceral Obesity". *Emerging Infectious Diseases* 16 (5): 850–52. <https://doi.org/10.3201/eid1605.091271>.
61. Shamah-Levy, Teresa, Lucía Cuevas-Nasu, Elsa Berenice Gaona-Pineda, Luz María Gómez-Acosta, María Del Carmen Morales-Rúan, Mauricio Hernández-Ávila, y Juan Ángel Rivera-Dommarco. 2018. "[Overweight and obesity in children and adolescents, 2016 Halfway National Health and Nutrition Survey update]". *Salud Publica De Mexico* 60 (3): 244–53. <https://doi.org/10.21149/8815>.
62. Shen, Chao, Meijia Gu, Ci Song, Lixia Miao, Liu Hu, Dan Liang, y Congyi Zheng. 2008. "The Tumorigenicity Diversification in Human Embryonic Kidney 293 Cell Line Cultured in Vitro". *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* 36 (4): 263–68. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2008.02.002>.
63. Tambo, Amos, Mohsin H. K. Roshan, y Nikolai P. Pace. 2016. "The Microbial Hypothesis: Contributions of Adenovirus Infection and Metabolic Endotoxaemia to the Pathogenesis of Obesity". *International Journal of Chronic Diseases* 2016: 7030795. <https://doi.org/10.1155/2016/7030795>.
64. Tollefson, Ann E., Baoling Ying, Jacqueline F. Spencer, John E. Sagartz, William S. M. Wold, y Karoly Toth. 2017. "Pathology in Permissive Syrian Hamsters after Infection with Species C Human Adenovirus (HAdV-C) Is the Result of Virus Replication: HAdV-C6 Replicates More and Causes More Pathology than HAdV-C5". *Journal of Virology* 91 (10). <https://doi.org/10.1128/JVI.00284-17>.
65. Vangipuram, S. D., M. Yu, J. Tian, K. L. Stanhope, M. Pasarica, P. J. Havel, A. R. Heydari, y N. V. Dhurandhar. 2007. "Adipogenic Human Adenovirus-36 Reduces Leptin Expression and Secretion and Increases Glucose Uptake by Fat Cells". *International Journal of Obesity (2005)* 31 (1): 87–96. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803366>.
66. Vangipuram, Sharada D., Jonathan Sheele, Richard L. Atkinson, Thomas C. Holland, y Nikhil V. Dhurandhar. 2004. "A Human Adenovirus Enhances Preadipocyte Differentiation". *Obesity Research* 12 (5): 770–77. <https://doi.org/10.1038/oby.2004.93>.
67. Voss, Jameson D., Richard L. Atkinson, y Nikhil V. Dhurandhar. 2015. "Role of Adenoviruses in Obesity". *Reviews in Medical Virology* 25 (6): 379–87. <https://doi.org/10.1002/rmv.1852>.
68. Wang, Jianchang, Jinfeng Wang, Ping Chen, Libing Liu, y Wanzhe Yuan. 2017. "Development of a TaqMan-Based Real-Time PCR Assay for Rapid and Specific Detection of Fowl

- Aviadenovirus Serotype 4". *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A* 46 (3): 338–43. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1278428>.
69. Wang, Z. Q., Y. Yu, X. H. Zhang, E. Z. Floyd, y W. T. Cefalu. 2010. "Human Adenovirus 36 Decreases Fatty Acid Oxidation and Increases de Novo Lipogenesis in Primary Cultured Human Skeletal Muscle Cells by Promoting Cidec/FSP27 Expression". *International Journal of Obesity (2005)* 34 (9): 1355–64. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.77>.
70. Whigham, Leah D., Barbara A. Israel, y Richard L. Atkinson. 2006. "Adipogenic Potential of Multiple Human Adenoviruses in Vivo and in Vitro in Animals". *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 290 (1): R190-194. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00479.2005>.
71. Wigand, R., H. Gelderblom, y G. Wadell. 1980. "New Human Adenovirus (Candidate Adenovirus 36), a Novel Member of Subgroup D". *Archives of Virology* 64 (3): 225–33.
72. Zhang, Yange, Wen Huang, David A. Ornelles, y Linda R. Gooding. 2010. "Modeling Adenovirus Latency in Human Lymphocyte Cell Lines". *Journal of Virology* 84 (17): 8799–8810. <https://doi.org/10.1128/JVI.00562-10>.
73. Zheng, Xuehua, Xia Rong, Ying Feng, Xikui Sun, Liang Li, Qian Wang, Min Wang, et al. 2017. "Seroprevalence of neutralizing antibodies against adenovirus type 14 and 55 in healthy adults in Southern China". *Emerging Microbes & Infections* 6 (6): e43. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.29>.
74. Zheng, Yueting, Thomas Stamminger, y Patrick Hearing. 2016. "E2F/Rb Family Proteins Mediate Interferon Induced Repression of Adenovirus Immediate Early Transcription to Promote Persistent Viral Infection". *PLoS Pathogens* 12 (1): e1005415. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005415>.
75. Zhou, Yan, Qi Pan, Xiaoxia Wang, Lina Zhang, Fei Xiao, y Lixin Guo. 2018. "The Relationship between Human Adenovirus 36 and Obesity in Chinese Han Population". *Bioscience Reports* 38 (4). <https://doi.org/10.1042/BSR20180553>.