



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS



**T E S I S**

**“RELACIÓN DE ADENOVIRUS 36 CON LA OBESIDAD,  
EXPRESIÓN DE GENES (*C/EBPB* Y *HIF-1A*) Y LA  
MORFOLOGIA DEL TEJIDO ADIPOSO”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**P R E S E N T A:**

M.C. JORGE BARRERA ALCOCER

**DIRECTORA DE TESIS**

DRA. ISELA PARRA ROJAS

CHILPANCINGO, GRO., ENERO DEL 2021







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS


En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 11 días del mes de enero del dos mil veintiuno, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Relación de Adenovirus 36 con la obesidad, expresión de genes (C/EBPB y HIF-1A) y la morfología del tejido adiposo", presentada por el alumno Jorge Barrera Alcocer, para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

  
Dra. Isela Parra Rojas  
Dirección de tesis


  
Dra. Mónica Espinoza Rojo

  
Dr. Daniel Hernández Sotelo

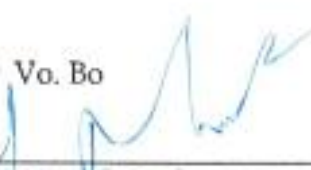
  
Dr. José Francisco Muñoz Valle

  
Dr. Ramón González García Conde

Vo. Bo

  
Dra. María Fernández Tilapa  
Directora del Doctorado en Ciencias Biomédicas

Vo. Bo

  
Dr. Oscar del Moral Hernández  
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas

## AGRADECIMIENTOS

**A la Dra. Isela Parra Rojas:** Por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo, por sus enseñanzas, su valioso tiempo y sobre todo paciencia. Por sus conocimientos compartidos desde mi formación en la Licenciatura, Maestría y Doctorado. Por mostrarme que la dedicación y la disciplina nos permiten alcanzar nuestras metas, por todo lo que me ha enseñado dentro y fuera del Laboratorio. Le estaré siempre agradecido. **Muchas Gracias Dra. Isela.**

**Al Dr. Ramón González García Conde:** por su valioso tiempo invertido en la culminación de este trabajo de investigación, sus conocimientos y atinadas observaciones durante los seminarios y apoyo académico, sin el cual no podría haber concluido satisfactoriamente mis estudios. Muchas Gracias.

**Al Dr. José Francisco Muñoz Valle:** por haberme guiado y compartido sus conocimientos para lograr mi meta, por haberme aceptado en la Estancia de Investigación en el Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas (IICB) en el Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS) de la Universidad de Guadalajara, por guiarme desde la Maestría hasta el Doctorado. Muchas Gracias.

**A la Dra. Mónica Espinoza Rojo:** por su valioso tiempo y aportaciones para la culminación de este trabajo de investigación, por todos buenos consejos, conocimientos, y las tutorías durante el Doctorado que me ayudaron a seguir adelante y no desistir. Muchas Gracias.

**Al Dr. Daniel Hernández Sotelo:** por su valioso tiempo y aportaciones para la culminación de este trabajo de investigación, por todos conocimientos compartidos desde la Maestría y culminación del Doctorado. Muchas Gracias.

**Al Dr. Leonel García Benavides:** por haberme guiado y compartido su valioso tiempo en la captación de pacientes y cirugías, que sin duda me dejaron una gran enseñanza y buenos momentos. Muchas Gracias.

**A la Dra. Sonia Luquín de Anda:** por haberme compartido sus conocimientos, su valioso tiempo en el Departamento de Neurociencias, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México. Muchas Gracias.

**A la Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero:** por guiarme desde el primer año en la Licenciatura como mi Tutora y darme consejos para seguir adelante, por sus aportaciones en el área de la Histología y Citología. Muchas Gracias.

**A la Dra. Mónica Ruano:** por los consejos para no desistir y culminar el trabajo experimental, su tiempo y sobre todo su amistad. Muchas Gracias.

**Al Dr. Lorenzo Salgado Goytia:** por todo el apoyo recibido desde la Licenciatura hasta el Doctorado, la confianza, guía y conocimientos compartidos dentro y fuera del Laboratorio, que sin duda me acompañaran en mi desempeño académico. Muchas Gracias.

**A Dra. Alejandra Guadalupe García Zapién:** por todos los conocimientos compartidos y guía desde la Maestría como mi Codirectora de tesis y sobre todo por los buenos momentos compartidos desde Guadalajara. Muchas Gracias.

**A la Bióloga Paola Macedo:** por estar siempre apoyándome en los trámites administrativos todos estos años, por tu paciencia y sobre todo amistad. Muchas Gracias.

**A mis compañeros y amigos de Laboratorio: Maestra Aralia, Dra. Linda Anahí, Dra. Inés,** que me y guiaron constantemente en los aspectos experimentales y sobre todo por los momentos agradables dentro del LIOD, Muchas Gracias. **A la Dra. Luz Elena, Adriana, Fernanda, Walter, Cecilia,** y todos aquellos con los que conviví durante mi estancia, los buenos momentos que hemos pasado juntos.

**A mis amigos y compañeros: Martha Isela, Johana, Monse, Judith, Migue y Cesar** que hemos compartido muchos momentos agradables y siempre nos hemos apoyado. **A mis amigos y compañeros que tuve el gusto de compartir excelentes momentos en Guadalajara, Ulises, Elizabeth** y todos los integrantes del IICB.

## DEDICATORIAS

A **Dios** por permitirme llegar a este momento tan importante de mi vida y culminar satisfactoriamente rodeado de las personas que más aprecio, por ser el apoyo y sostén en los momentos más difíciles de mi carrera.

A mi **Madre Cira Alcocer García**: porque me has dado el mejor regalo que es la vida, por estar siempre a mi lado, aun en la distancia y guiarme por el camino de la rectitud, honestidad y humildad. Este logro es gracias a todo lo que me has enseñado, por tu voluntad de sacarme adelante en mis estudios. Gracias por todo Mamá.

A mis hermanos **Nef y Abi**, que me han acompañado en los buenos y malos momentos, por el apoyo incondicional, sin el cual no habría logrado todos mis objetivos. Que juntos hemos alcanzado muchas metas y propósitos. Y que siempre contarán con mi apoyo incondicional. Gracias por todo.

A mis sobrinitas **Lucero e Isabel**, que llegaron para complementar mi vida y familia, estar contento de seguir adelante hoy y siempre juntos.

A mis **Familia** en general, pero muy especialmente a mis abuelos (**Flora e Isauro**) y a mi tío **Noé**, que me apoyó en todo momento, por su compañía y experiencias compartidas. Mi tía **Elena** que me han acompañado en mi crecimiento académico.

Y con mucho cariño, admiración y profundo agradecimiento, a mi segunda familia que me “adoptó”, **Doña Rosa, Don Cirilo, Lili, Rosita, Magda, Javi, José, Cirilo** y todos a los que en los momentos más complicados de mi vida académica y laboral me tendieron la mano para lograr salir adelante, que espero corresponder siempre. Les agradezco profundamente su cariño, amistad y compañía. Muchas gracias por todo.

“RELACIÓN DE ADENOVIRUS 36 CON LA OBESIDAD, EXPRESIÓN  
DE GENES (*C/EBPB* Y *HIF-1A*) Y LA MORFOLOGÍA DEL TEJIDO  
ADIPOSO”

# ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>CAPITULO 1</b>	
<b>Presence of Adenovirus-36 DNA in adipose tissue of women: Relationship with adipocyte morphology and the expression of C/EBP<math>\beta</math> and HIF-1<math>\alpha</math>.....</b>	<b>14</b>
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>50</b>

## RESUMEN

Introducción: Al origen infeccioso de la obesidad se le conoce como “infectoobesidad”. Los primeros estudios realizados en modelos animales, como pollos, ratones y primates no humanos, asociaron la presencia de anticuerpos contra HAd36 con el desarrollo de la obesidad y la ganancia de peso, de igual manera los ensayos realizados en preadipocitos (3T3-L1) y células madre adiposas humanas (hASCc) han demostrado que HAd36 se asocia con la expresión de genes implicados en la diferenciación celular y el metabolismo de lípidos. Los estudios realizados para identificar el DNA viral en tejido adiposo son pocos y los resultados inconsistentes. **Objetivo:** Analizar la presencia del DNA de HAd36 en biopsias de tejido adiposo subcutáneo y su relación con la obesidad, cambios morfológicos de los adipocitos y la expresión de genes adipogénicos y de metabolismo celular. **Materiales y Métodos:** Se recolectaron un total de 52 biopsias de tejido adiposo subcutáneo de mujeres sometidas a liposucción y/o lipectomía. Se realizó una evaluación antropométrica y clínico-bioquímica. La identificación del DNA de HAd36 se realizó por PCR convencional, la expresión de los genes *C/EBP $\beta$* , *HIF-1 $\alpha$*  y  *$\beta$ -actina* se determinó utilizando sondas *TaqMan*. La morfología celular se analizó en secciones de tejido adiposo teñidas con H&E, la estimación del número y tamaño de las células se realizó con el software Image J Fiji. **Resultados:** Se identificó el DNA de HAd36 en 16 muestras de tejido adiposo subcutáneo (31%). La presencia del DNA viral no se asoció con los parámetros antropométricos o metabólicos, tampoco con cambios en la morfología del tejido adiposo. Los niveles de expresión de mRNA para *C/EBP $\beta$*  y *HIF-1 $\alpha$*  no mostraron diferencias significativas entre las muestras positivas y negativas al DNA viral ( $p > 0.05$ ). **Conclusión:** El DNA de HAd36 puede estar presente en el tejido adiposo subcutáneo, pero la presencia del DNA viral no se encontró relacionado con los cambios morfológicos en este tejido, ni con la expresión de genes como *C/EBP $\beta$*  y *HIF-1 $\alpha$* .



## INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad y el sobrepeso se definen como la acumulación excesiva de tejido adiposo, a tal grado que la salud y el bienestar se ven comprometidos **(OMS, 2018; De Lorenzo et al., 2016)**. La OMS reportó que la obesidad se ha triplicado en el mundo desde 1975, para el 2016, más de 1900 millones de adultos mayores de 18 años padecían sobrepeso, de los cuales más de 650 millones eran obesos. De manera general el 13% de la población adulta padece obesidad, siendo mayor en el sexo femenino (15%), con respecto al masculino (11%) **(OMS, 2018)**.

En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, reportó que en el 2018 la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en población mayor a 20 años es del 75.2% (39.1% sobrepeso y 36.1% obesidad), la cual incrementó con respecto a lo reportado en el año 2012 (71.3%). Así mismo, se reportó que la prevalencia de la obesidad es mayor en mujeres (40.2%) que en hombres (30.5%) **(ENSANUT 2018)**. Los individuos que padecen obesidad están expuestos al desarrollo de otras comorbilidades metabólicas, principalmente la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), resistencia a la insulina (RI), dislipidemias, hipertensión arterial (HTA), enfermedades cardiovasculares (EC), apnea del sueño y algunos tipos de cáncer **(Kim y Plutzky, 2016; Mathieu et al., 2010)**.

El desarrollo de la obesidad es multifactorial, en la cual participan factores genéticos, ambientales, metabólicos, sociales y culturales **(Ponterio y Gnessi, 2015)**. Una de las primeras clasificaciones de la obesidad de acuerdo con la etiología fue propuesta por Anthony Sclafani: puede ser de origen neural, endocrino, farmacológico, nutricional, ambiental, estacional, genético, idiopático o viral **(Sclafani, 1984)**.

En la actualidad el Índice de Masa Corporal (IMC) se utiliza para establecer si un individuo padece obesidad o sobrepeso, sin embargo, en personas que incrementan su masa magra como resultado del ejercicio intenso o el entrenamiento de resistencia como los fisicoculturistas no resulta preciso. El IMC está estrechamente relacionado con el porcentaje de grasa corporal, pero el sexo, la edad y la raza influyen de manera independiente esta relación (**Jackson et al., 2002; Purnell, 2018**). Actualmente la clasificación para el sobrepeso y obesidad que se aplica tanto en hombres como mujeres de edad adulta fue propuesta por el comité de expertos de la OMS, y el punto de corte para definir la obesidad es de un valor de IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> (Tabla I).

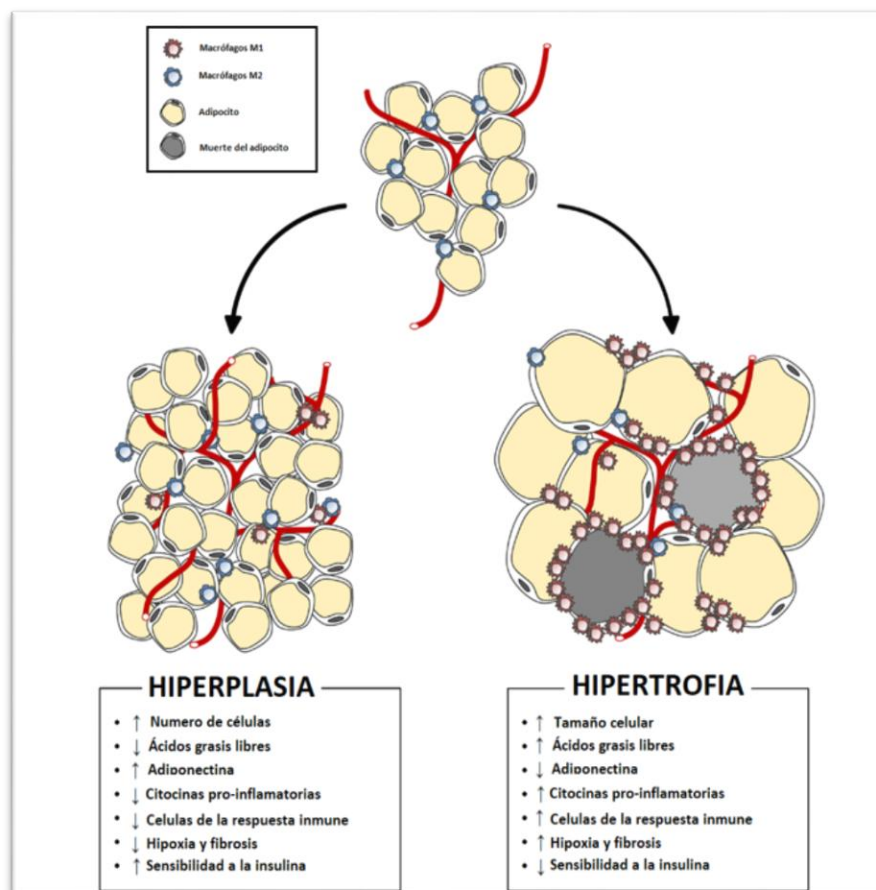
**Tabla I.** Clasificación del sobrepeso y obesidad de acuerdo con el IMC.

Clasificación	IMC (kg/cm <sup>2</sup> )	Riesgo Asociado a la Salud*
<i>Bajo peso</i>		
<i>Normopeso</i>	18.5-24.9	-
<i>Exceso de peso (sobrepeso)</i>	25-29.9	<i>Aumentado</i>
<i>Obesidad grado I</i>	30-34.9	<i>Alto</i>
<i>Obesidad grado II</i>	35-39.9	<i>Muy alto</i>
<i>Obesidad grado III o Mórbida</i>	$\geq 40$	<i>Extremadamente alto</i>

\*Riesgo de padecer HTA, DM2 y EC. Adaptado de Prunell, 2018.

La distribución del Tejido Adiposo (TA) puede variar tanto en el género masculino como femenino, los varones presentan una mayor cantidad de TA visceral en comparación con las mujeres pre-menopáusicas, las cuales presentan una mayor cantidad de TA subcutáneo (**Link y Reue., 2017**). Una mayor acumulación de TA visceral se relaciona con el desarrollo de Síndrome Metabólico (SM); por el contrario, algunos estudios han sugerido que el TA subcutáneo podría tener un papel protector contra el desarrollo del SM, confiriendo mayor protección al sexo femenino que masculino (**Kvist et al., 1988; Lemieux et al., 1993**).

El desarrollo de la hipertrofia e hiperplasia está regulada por factores genéticos y ambientales (**Spiegelman y Flier, 2001**). La expansión del tejido adiposo hipertrófico a través del aumento del tamaño de los adipocitos se asocia con fenómenos como el aumento de la liberación de ácidos grasos basales, mayor liberación de citocinas e incremento de células de la respuesta inmune que se asocian con procesos proinflamatorios, disminuye la disponibilidad de oxígeno (hipoxia), aumenta la fibrosis, disminuye la adiponectina y la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, cuando el tejido adiposo se expande a causa de la hiperplasia los cambios fisiológicos son beneficiosos, como el aumento de la adiponectina, la disminución de los siguientes mecanismos, como la liberación de ácidos grasos basales, la liberación de citocinas proinflamatorias, el reclutamiento de células inmunitarias, la hipoxia, la fibrosis y una mejor respuesta a la insulina (Figura 1) (**Choe et al., 2016**).



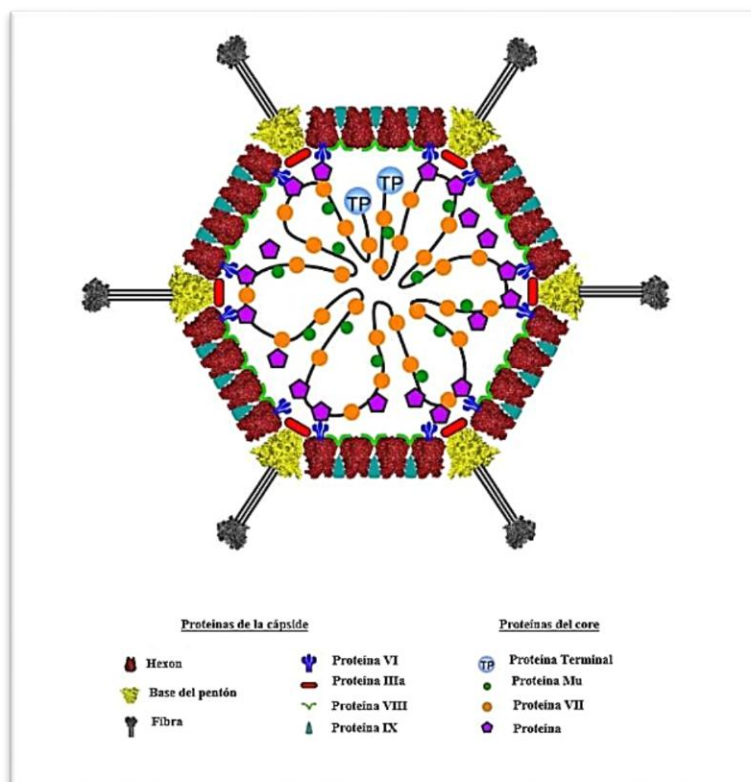
**Figura 1.** Características metabólicas de la hiperplasia e hipertrofia del tejido adiposo. Modificado de Choe et al., 2016.

Con relación al origen etiológico de la obesidad, existe evidencia del papel de ciertos microorganismos como posibles agentes que podrían contribuir con su desarrollo. En el año 2001, Nikhil Dhurandhar acuñó el término “Infectoobesidad”, con el cual proponía que la obesidad podría estar relacionada con algún componente infeccioso **(Dhurandhar, 2001)**. El Virus del Moquillo Canino (CDV), relacionado con enfermedades respiratorias, gastrointestinales y enfermedades del sistema nervioso, también se ha asociado con la obesidad en ratones, con el aumento del peso corporal y el tamaño de los adipocitos **(Pasarica y Dhurandhar, 2006)**. De acuerdo con algunos estudios, CDV induce cambios morfológicos en el hipotálamo, el cual desempeña un papel importante en la regulación del apetito, el consumo de energía y el sistema neuroendocrino **(Dhurandhar, 2004; Bernard et al., 1993)**. Por otro lado, el Virus del Sarcoma de Rous tipo 7 (RAV-7) es otro virus que induce obesidad, mediante la disminución en los niveles de las hormonas tiroideas, sin embargo, el mecanismo molecular por el cual se generan estos cambios se desconoce **(Bernard et al., 1999)**. El Virus de la Enfermedad de Borna (BDV) se ha asociado con hiperplasia de los islotes pancreáticos, aumento en los niveles de triglicéridos y glucosa **(Mitra et al., 2010; Lyons et al., 1982; Ponterio y Gnessi, 2015)**.

El Citomegalovirus (CMV) y el Virus del Herpes Simple 1 (HSV-1), parecen ser lipogénicos, ya que la infección tiene un efecto en algunos de los componentes del SM, afectando incluso a la población general sin obesidad **(Voss y Dhurandhar 2017; Hamer et al., 2016)**. SMAM-1 es un adenovirus aviar que al ser inoculado en pollos incrementa los depósitos de grasa visceral, el agrandamiento del hígado y los riñones, la infiltración de grasa hepática y disminuye los niveles de los lípidos séricos **(Dhurandhar et al., 1992; Whigham et al., 2006; Vincent et al., 2009)**. Además, se encontró que el 20% de las personas obesas presentan anticuerpos contra SMAM-1 y consistentemente niveles bajos de colesterol y triglicéridos en suero **(Dhurandhar et al., 2001)**.

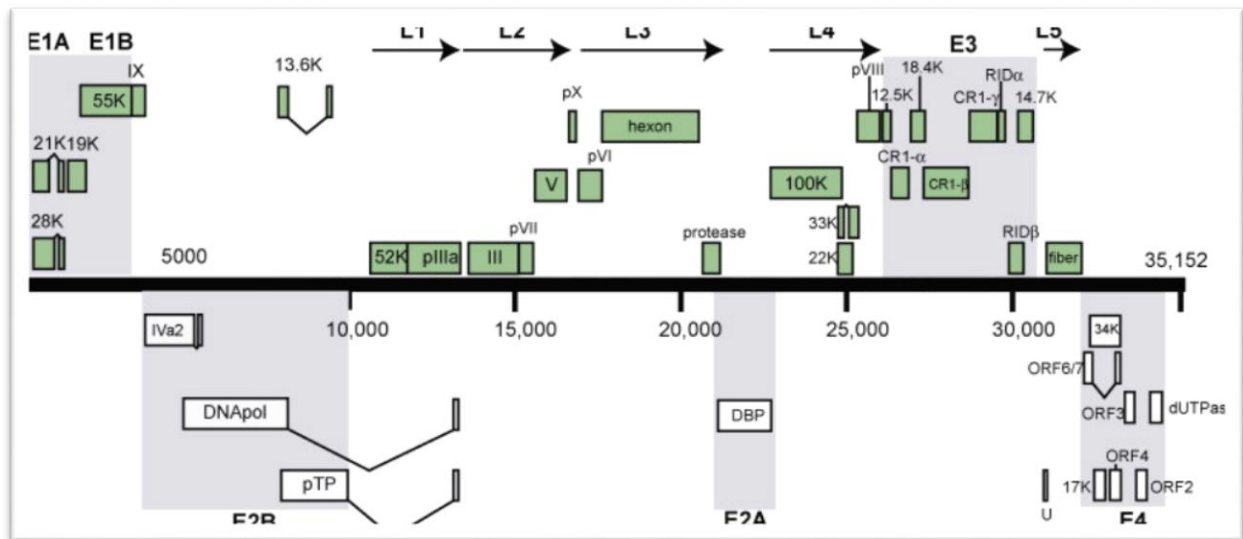
## Generalidades de los adenovirus

Los adenovirus humanos (HAd, por sus siglas en inglés) han sido implicados como agentes infecciosos en el desarrollo de la obesidad, aunque están más asociados con enfermedades del tracto respiratorio, trastornos oculares y del tracto gastrointestinal. Estos virus generalmente causan enfermedades respiratorias leves y autolimitadas (**Cook y Radke, 2017**). La cápside del virus está conformada por 252 capsómeros, de los cuales 240 son hexones que conforman la superficie icosaédrica y 12 son pentones que conforman los vértices (**Ponterio y Gnessi, 2015; Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009**). Algunos otros componentes son: las proteínas IIIa, VI, VIII y IX asociadas a la cápside. En el interior de la cápside se encuentra la proteasa del virión, que desempeña un papel vital en el ensamblaje y el genoma del DNA de doble cadena asociado con cinco polipéptidos (proteína terminal (TP), V, VII, Mu y IVa2) (Figura 2).



**Figura 2.** Representación de la estructura de adenovirus (Modificado de Cook y Radke, 2017).

El genoma de los HAd consta de una molécula de DNA bicatenario lineal de aproximadamente 36 kb, asociado a una proteína terminal que se une covalentemente al extremo 5' del DNA genómico. El cromosoma viral posee cinco genes de transcripción temprana (E1A, E1B, E2, E3 y E4) y una unidad de transcripción tardía que codifica para cinco familias de mRNA (L1-L5) (Ponterio y Gnessi, 2015). La organización de los 39 marcos de lectura abierta (ORFs) de HAd36 es similar a la de otros *Mastadenovirus*, y posee Regiones de Repetición Terminal Invertida (RRTI) de aproximadamente 86 pb de longitud, siendo los más pequeños entre todos los adenovirus humanos secuenciados (Figura 3) (Arnold *et al.*, 2010).



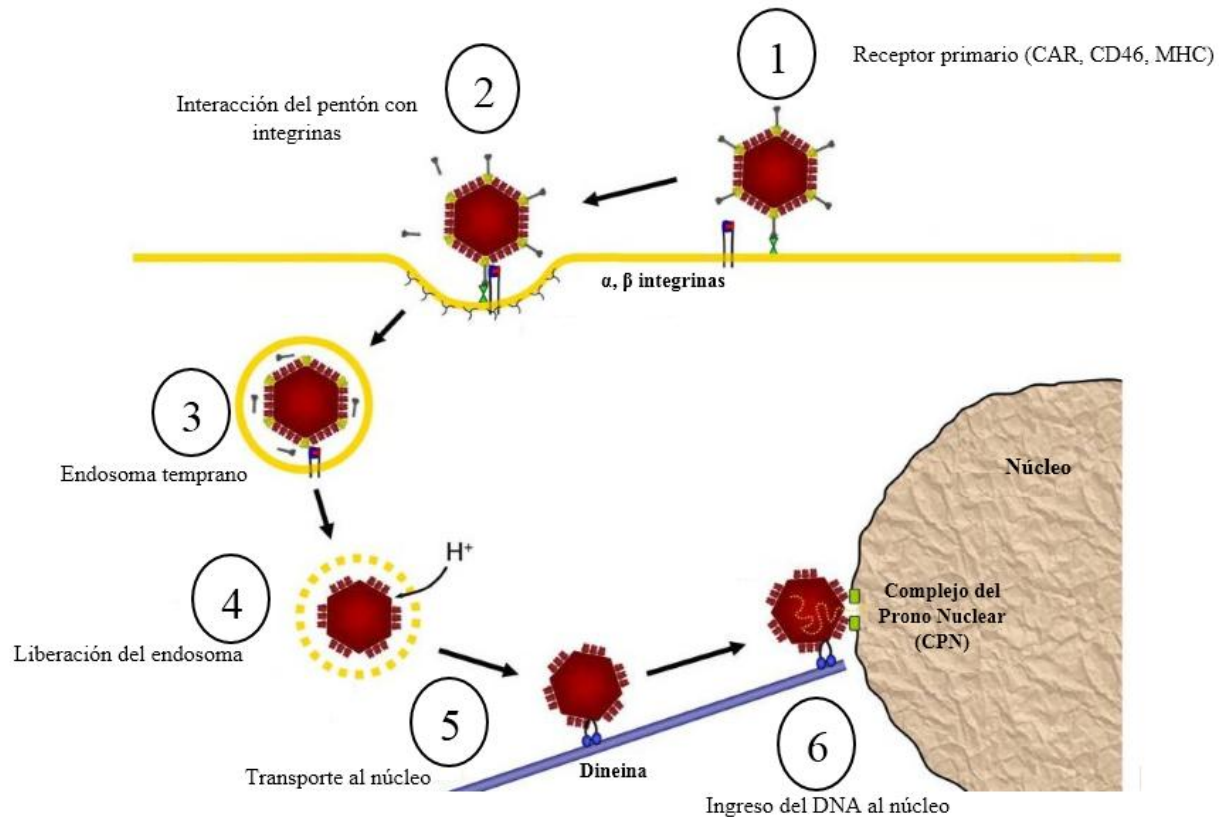
**Figura 3. Estructura del genoma de HAd36.** Cuenta con 4 genes que codifican las proteínas tempranas (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 y E4) participan en la regulación de la replicación del DNA viral, mientras que los genes que codifican para las proteínas tardías (L1-L5), son productos de la traducción de mRNA tardío, y componen las proteínas estructurales de la cápside.

La entrada del virus a la célula está determinada por la interacción entre la fibra viral y el receptor presente en la superficie celular, generalmente la mayoría de los adenovirus interactúan con el Receptor de Coxsackie y Adenovirus (CAR, por sus siglas en inglés), sin embargo, el subgrupo B puede usar moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CMH), CD46 o CD80 como receptores (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

En los seres humanos, CAR es un receptor que se expresa ampliamente en tejidos como corazón, páncreas, sistema nervioso central, próstata, testículos, pulmón, hígado e intestino, tejido adiposo y muy poco frecuente en células B y T (**Tomko et al., 2000 Carson., 2001, Bernaola y Luque, 2002**), recientemente se ha descubierto que el tejido adiposo visceral y subcutáneo también expresan CAR, lo que haría susceptible a las células adiposas a la infección por HAd (**Serrano et al., 2015**).

Una vez que el virus interacciona con su receptor (CAR, CD48 o CMH) el pentón se asocia con integrinas de unión a vitronectina ( $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 3$ , y  $\alpha\beta 5$ ), lo que facilita la internalización del virus a la célula permisiva, la cual es regulada por moléculas de señalización celular como Fosfatidilinositol 3-Cinasa (PI3K), p130Cas y pequeñas GTPasas de la familia *Rho* (**Li et al., 2000; Bai et al., 1993**). Estas moléculas inducen la polimerización de los filamentos de actina, este proceso es necesario para una eficiente internalización del virus (**Wang et al., 2000**). El ingreso del virus se da por endocitosis en vesículas revestidas por clatrina, posteriormente la membrana de la vesícula endocítica se rompe por acción tóxica del pentón, dejando libre la partícula viral dentro del citoplasma. Esta partícula viral migra desde el citoplasma hasta el núcleo, mediante los microtúbulos y posteriormente el DNA viral ingresa al núcleo a través de los poros nucleares (Figura 4) (**Cook y Radke, 2017**).

La replicación del DNA viral ocurre en el núcleo, en donde tres proteínas codificadas por el virus participan en la replicación: la proteína terminal (TP) que funciona como primer o cebador, la Ad-DBP la cual esta implicada en la replicación del genoma y estabilización de la molécula de DNA una vez que se han separado las hebras y Ad-DNA-pol participa en la replicación del genoma viral utilizando la proteína viral TP que está unida al extremo 5' del DNA viral. Además, hay proteínas celulares en el núcleo que participan en la replicación del genoma viral. Primero se sintetizan los genes virales tempranos responsables de la síntesis de productos que modifican el metabolismo celular y de factores de virulencia, posteriormente, las proteínas estructurales a partir de los genes virales tardíos, transcritos sólo del DNA viral replicado (**Bernaola y Luque, 2002**).



**Figura 4. Entrada del virus a la célula.** 1. Interacción de la fibra del virus con los receptores celulares CAR, CD46 o MHC). 2. La endocitosis es mediada por proteínas de clatrina y la interacción de la base del pentón con integrinas. 3. Disociación del virión por el entorno del pH bajo del endosoma. 4. Liberación completa del virión. 5. Transporte del virión a través de los microtúbulos por la proteína dineína hacia el Complejo del Poro Nuclear (CPN). 6. Incorporación del material genético viral (DNA) al núcleo. (Modificado de Nemerow *et al.*,2009)

La transcripción viral está modulada por la proteína E1A, esta proteína activa la transcripción de los promotores tempranos del genoma viral. E1A promueve activadores transcripcionales que, junto con las proteínas de la célula huésped, activan la expresión de promotores tempranos como E1B, E2E, E3 y E4 (**Bernaola y Luque, 2002**).

Las proteínas tempranas preparan a la célula para llevar a cabo la replicación viral y evadir la respuesta inmune. Durante esta fase el Promotor Principal Tardío (por sus siglas en inglés MLP) es débilmente activo hasta la transición a la fase tardía. La transcripción del gen E2E resulta en la acumulación de la Proteína de Unión al DNA (DBP, por sus siglas en inglés), la proteína terminal E2B-pTP y la DNA polimerasa, encargada de la replicación del DNA viral, dando inicio a la fase tardía.



Las proteínas pIX y IVa2 regulan la actividad transcripcional del MLP, la expresión de L4-22K del promotor L4 activa la expresión máxima de MLP. L4-22K y L4-33K regulan el patrón de empalme de transcritos tardíos, los cuales codifican para las proteínas estructurales del virus. El ensamblaje del virión ocurre en el núcleo, pero los polipéptidos estructurales se ensamblan en capsómeros (hexones y pentones) en el citoplasma. Las cápsides inmaduras y vacías son ensambladas en el núcleo celular, donde el *core* es formado por el DNA genómico y proteínas asociadas, estas partículas se encuentran en el núcleo celular y que posteriormente conformaran a la partícula viral **(Bernaola y Luque, 2002)**.

### **Adenovirus 36 y Obesidad**

Adenovirus humano 36 (HAd36) se ha asociado con el aumento en la adiposidad y paradójicamente con la disminución en los niveles séricos de colesterol y triglicéridos en pollos, ratones y primates no humanos **(Dhurandhar, 2001)**. En el año 2000, Dhurandhar y cols., llevaron a cabo uno de los primeros estudios en modelos animales, al infectar pollos y ratones con HAd36 a través de vías de inoculación intranasal e intraperitoneal, observando que sin importar la vía de entrada, HAd36 aumentó la adiposidad, principalmente del tejido adiposo visceral y paradójicamente los niveles séricos de colesterol y triglicéridos disminuyeron, los cambios del tejido adiposo se observaron a partir de la tercera semana de la inoculación **(Dhurandhar et al., 2000)**.

Posteriormente, el primer estudio de asociación se realizó en una población de 502 adultos estadounidenses donde se observó que la prevalencia de anticuerpos contra HAd36 fue significativamente mayor en individuos obesos en un 30%, en comparación con los no obesos con el 11% ( $p < 0.001$ ). Los individuos seropositivos presentaban un IMC mayor ( $44.9 \text{ kg/cm}^2$ ), con respecto a los seronegativos ( $35.8 \text{ kg/cm}^2$ ). Se reportó que los niveles séricos de colesterol y triglicéridos se encontraban disminuidos en aquellos individuos seropositivos en comparación con los seronegativos **(Atkinson et al., 2005)**. Goossens y cols., evaluaron la asociación de anticuerpos contra HAd36 con la obesidad en una población de 509 individuos

de Europa Occidental, en donde observaron que no existía una diferencia significativa entre seropositivos y negativos con respecto al IMC y que la seropositividad para HAd36 fue del 5.5% en la población total. Concluyendo los autores que en los Países Bajos y en Bélgica, HAd36 no tiene un papel en el incremento del IMC y la obesidad **(Goossens et al., 2012)**.

Atkinson y cols. en el 2010 evaluaron la asociación de HAd36 con la obesidad infantil, reportando que la presencia de anticuerpos contra HAd36 se relacionó con un mayor índice de masa corporal (IMC) y circunferencia de cintura (CC) en comparación con los seronegativos (Z-score y  $p < 0.05$ ). En población infantil mexicana, Parra-Rojas y cols. reportaron una seropositividad general del 73.9%, siendo de 58.6% en niños obesos y de 41.4% en niños con normopeso. La seropositividad para HAd36 se asoció con la obesidad ( $OR = 2.66$ ;  $p = 0.01$ ) y con niveles bajos de HDL-c ( $OR = 2.85$ ;  $p = 0.03$ ) **(Parra-Rojas et al., 2013)**.

La infección por HAd36 se ha relacionado con un incremento en los niveles de expresión de genes que participan en la adipogénesis y metabolismo de lípidos, tales como el PPAR $\gamma$  y C/EBP $\beta$  **(Dhurandhar, 2013)**. De igual manera, en cultivos celulares de preadipocitos murinos (3T3-L1) y células madre derivadas de tejido adiposo humano (hASC), HAd36 aumenta la señalización del cAMP y PI3K por una mayor fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (SREBP), y la proteína cinasa B (PKB o AKT). Esta señalización celular induce la cascada de genes adipogénicos (PPAR $\gamma$ , C/EBP $\beta$ ) que conduce a una mayor diferenciación y acumulación de lípidos. Se ha demostrado que esta señalización adipogénica podría ser inducida por la proteína codificada en el marco de lectura abierto 1 (ORF1) del gen *E4* de HAd36 (*E4orf1*). *E4orf1* es suficiente y necesaria para que HAd36 pueda inducir la adipogénesis **(Rogers et al., 2008)**.

Estudios realizados en células 3T3-L1 por Vangipuram y cols., demostraron que HAd36 pero no HAd2, incrementó el número de adipocitos diferenciados, los niveles de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), así como el contenido total de lípidos celulares. Estos experimentos indican que HAd36

contribuye al efecto adipogénico en modelos *in vivo* (**Vangipuram et al., 2004**). Pasarica y cols, observaron que HAd36 regula genes como C/EBP $\beta$ , C/EBP $\alpha$ , y *GPDH*, los cuales son activadores específicos de la diferenciación y adipogénesis (**Pasarica et al., 2006, Arnold et al., 2010, Rogers et al., 2008 y Ponterio y Gnessi, 2015**).

Por otro lado, la presencia de HAd36 en biopsias de tejido adiposo humano se estableció en un caso clínico reportado por Salehian y cols., demostró la presencia del DNA de HAd36 mediante PCR anidada y PCR en tiempo real en 3 de 4 biopsias de tejido adiposo, de un paciente de 62 años con un IMC de 34 kg/m<sup>2</sup>, el cual mostraba una acumulación excesiva de tejido adiposo en la región abdominal y torácica, así como lipomatosis diseminada. El paciente presentaba seropositividad para anticuerpos IgG contra HAd36, pero no para IgM y disminución en los niveles séricos de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL y LDL (**Salehian et al., 2010**). Actualmente, se han publicado dos estudios que se han centrado en la identificación de HAd36 en biopsias de tejido adiposo. Posteriormente en el año 2015, se analizó la presencia de HAd36 en 49 biopsias de tejido adiposo lipoaspirado, sin que se lograra identificar la presencia del DNA viral, y la presencia de anticuerpos neutralizantes contra HAd36 fue del 12.2% de los 49 individuos obesos, pero en el grupo control no se logró identificar (**Ergin et al., 2015**).

Posteriormente, en el año 2015, Ponterio y cols. lograron identificar la presencia del DNA viral en 4 de 21 biopsias de TA visceral de pacientes con sobrepeso y obesidad, lo que indica que algunos individuos son susceptibles de adquirir la infección a nivel de tejido adiposo, por lo que su papel adipogénico sigue siendo controversial en humanos (**Ponterio et al., 2015**). Sin embargo, los meta-análisis publicados concluyen que la infección por HAd36 aumenta el riesgo de obesidad y ganancia de peso en población adulta (*OR: 1.60; p<0.01*) y un riesgo significativamente mayor en niños (*OR: 1.89; p<0.05*), además de que la infección por HAd36 se asoció más con la acumulación de grasa subcutánea que con la grasa visceral (**Yamada et al., 2012; Shang et al., 2014; Xu et al., 2015**).

Por todos los antecedentes antes mencionado, y considerando que la obesidad es consecuencia de una gran variedad de factores genéticos, hormonales y ambientales, y que la infección por HAd36 podría estar contribuyendo en la etiología de la obesidad; el objetivo de este estudio es identificar la presencia de DNA viral en muestras de tejido adiposo de mujeres que se sometieron a una cirugía de liposucción y/o lipectomía, su asociación con el perfil clínico-bioquímico, con los niveles de expresión del mRNA de *C/EBP-β* y *HIF-1α* y con la morfología del tejido adiposo, para contribuir al conocimiento del papel del HAd36 s en la obesidad.

## **CAPITULO 1**

**Presence of Adenovirus-36 DNA in adipose tissue of women: Relationship with adipocyte morphology and the expression of C/EBP $\beta$  and HIF-1 $\alpha$**

# **Presence of Adenovirus-36 DNA in adipose tissue of women: Relationship with adipocyte morphology and the expression of C/EBP $\beta$ and HIF-1 $\alpha$**

Jorge Barrera-Alcocer<sup>1</sup>, Leonel García-Benavides<sup>2</sup>, José F Muñoz-Valle<sup>3</sup>, Ulises de la Cruz-Mosso<sup>3</sup>, Ramón A González<sup>4</sup>, Sonia Luquín<sup>5</sup>, Luz del C Alarcón-Romero<sup>1</sup>, Linda A Marino-Ortega<sup>1</sup>, Ines Matia-Garcia<sup>1</sup>, Isela Parra-Rojas<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México.

<sup>2</sup>Instituto de Terapéutica Experimental y Clínica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

<sup>3</sup>Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

<sup>4</sup>Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.

<sup>5</sup>Departamento de Neurociencias, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

Correspondence to: Isela Parra-Rojas, Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Avenida Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Guerrero, 39090, México, Tel/Fax +52 7474719310, Email iprojas@yahoo.com

## Abstract

**Background:** Human adenovirus 36 (HAd36) infection has been associated with obesity. Experiments using 3T3-L1 adipocyte cultured cells and human adipose stem cells (hASCc) have shown that HAd36 stimulates the expression of genes implicated in cell differentiation and increased lipid accumulation. The presence of HAd36 in adipose tissue of overweight and obese women has also been confirmed. This study aims to analyze the presence of HAd36 DNA in the adipose tissue of women undergoing surgery for weight reduction and its relationship with obesity through changes in adipocyte morphology as well as the expression of C/EBP $\beta$  and HIF-1 $\alpha$ .

**Methods:** Fifty-two subcutaneous adipose tissue biopsies were collected. The anthropometric parameters measured were weight, height, skin folds, body circumferences, and body fat percentage. Biochemical measures were performed for glucose, cholesterol, triglycerides, cholesterol HDL-c, and LDL-c. The presence of HAd36 DNA was performed by conventional PCR. Adipocyte morphology was analyzed in H&E-stained sections using ImageJ/Fiji software. The expression of genes C/EBP $\beta$ , HIF-1 $\alpha$  and  $\beta$ -actin was determined using TaqMan probes.

**Results:** HAd36 DNA was detected in 31% of adipose tissue samples. The presence of viral DNA was not significantly associated with anthropometric, clinical, or metabolic measurements, or with changes in adipose tissue morphology. The levels of mRNA expression for C/EBP $\beta$  and HIF-1 $\alpha$  did not show significant differences between positive and negative samples for HAd36 ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** The presence of HAd36 DNA in adipose tissue was identified, but it was not related to morphological changes of adipocytes, or the expression of C/EBP $\beta$  and HIF-1 $\alpha$ . Further studies are needed to confirm these findings.

**Key words:** Human adenovirus 36, obesity, gene expression, adipose tissue.

## Introduction

In the year 2001, the term infectobesity was used to describe the infectious origin of obesity. Nowadays, it has been proposed that obesity may have a viral origin.<sup>1,2</sup> The relationship of avian adenovirus SMAM-1 and human adenovirus 36 (HAd36) with obesity has been extensively studied, and adenovirus 36 has been consistently associated with obesity in both in vitro and in vivo assays and human studies.<sup>3</sup>

The first studies that analyzed the association between Human Adenovirus 36 (HAd36) and obesity were performed in animal models (mice, chickens, and non-human primates), reporting that infection with the virus was associated with the increase in body weight, fat mass gain, and a decrease in serum cholesterol and triglyceride levels.<sup>4-6</sup>

In human studies, the relationship between HAd36 and the development of obesity has also been analyzed, however, observational serological studies have shown contradictory results. Nonetheless, studies in children have found this association repeatedly, but in adults results are inconsistent.<sup>7</sup> Several meta-analyses have concluded that infection by HAd36 confers an increased risk of obesity and weight gain, mainly with the accumulation of subcutaneous fat, but not for metabolic markers.<sup>7,8</sup> This same relationship was reported in children who presented a greater risk for obesity.<sup>9</sup>

In vitro studies have attempted to elucidate the molecular mechanisms of the adipogenic potential of adenovirus 36. The adipogenic effect of HAd36 was assessed by Vangipuram et al, using in vitro models with murine preadipocytes (3T3-L1) infected with HAd36, observing a greater differentiation of preadipocytes and an increase in the total content of cellular lipids. The authors concluded that HAd36 could contribute to the development of obesity.<sup>10</sup> Other researchers determined that HAd36 infection could regulate adipogenic genes, such as CCAAT/enhancer-binding protein- $\beta$  (C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\beta$ ), peroxisome



proliferator-activated  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH), which are specific activators of adipogenesis.<sup>11</sup>

To date, few studies have identified the presence of HAd36 in human adipose tissue.<sup>12,13</sup> However, it is not clear if the virus is related to the development of obesity. Therefore, the objective of this study was to identify the presence of HAd36 DNA in adipose tissue of women undergoing surgery for weight reduction and its relationship with the morphological changes of adipocytes and the expression of genes, such as C/EBP $\beta$  and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in the HAd36 positive samples.

## **Methods**

### **Subjects**

The study population consisted of 52 women from 19 to 60 years of age who underwent abdominal liposuction and/or lipectomy in clinics specializing in weight reduction surgery. The informed consent of all women was obtained before surgery for inclusion in the study. The study was approved by the Research Ethics Committee of the University of Guerrero (CB-004/2017) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

### **Anthropometric and clinical measurements**

Of the 52 women included in the study, 16 had normal weight, 26 were overweight and 10 were obese. Before the surgical intervention, an anthropometric assessment was carried out by an electrical impedance technique using a body composition monitor (Tanita Ironman BC-553, Illinois, USA). The thickness of skinfolds (triceps, biceps and subscapular) and body circumferences (waist, hip, and arm) were measured twice, using a manual plicometer

(Hergom-BF01, China) and a measuring tape (Seca 201, Hamburg, Germany), respectively. Waist-to-hip ratio (WHR) was calculated dividing the waist circumference by hip circumference. The biochemical parameters, glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides were determined by an automated analyzer (Mindray BS-200, Shenzhen, China).

## **Adipose tissue sampling and DNA extraction**

The samples of adipose tissue obtained during the surgical intervention consisted of approximately 50 mL of adipose tissue from liposuction (33 samples) and 10 to 20 mg of tissue from an abdominal lipectomy (19 samples). Approximately 10 to 15 cubic centimeters of adipose tissue from liposuction were used from each patient. The aspirated tissue was separated by centrifugation obtaining 3 fractions, 5 mL were taken from the intermediate fraction and 10 mL from the freezing medium (8% glycerol + 2% human albumin + 0.1 sucrose in physiological solution) were added and then stored at -80 ° C until analysis. The tissue obtained by abdominal lipectomy was fragmented in approximately 1 cm<sup>3</sup> fragments and then washed with 0.9% saline. For the DNA extraction from adipose tissue, 300 µl from the lipoaspirate or 5.0 mg from the adipose tissue from the abdominal lipectomy were used, and both tissues were subsequently incubated in 500 µl of lysis buffer (10 mM Tris·HCl, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 8.0) and proteinase K (Sigma, 0.4 mg/mL) for 1 hour at 37 °C. The organic phase was obtained by adding 250 µl of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1), followed by chloroform/isoamyl alcohol (24/1). Next, isopropanol and NaCl<sub>2</sub> were added to precipitate the DNA for 24 hours at -20 °C. The washes were performed with 75% ethanol and the DNA was resuspended in 50 µl TE buffer (pH 8.0).

## **Adenovirus 36 DNA detection**

The protocol for HAd36 DNA detection was established in the present study. The DNA obtained from both adipose tissue samples was diluted to a final concentration of 100 ng/μl. To perform the PCR, a 300 ng concentration of DNA was used with the following primers: forward, 5'-AGT CAG TGG ACT GAC AAA GAA CG-3' and antisense reverse, 5'-GTC TGC ATA TAT CTC TTC TTC ACC-3'; these primers were directed to a conserved region of the HAd36 hexon protein gene, and a fragment of 171 bp was amplified. The PCR conditions were: 95 °C of denaturation for 5 minutes, followed by 35 cycles, 95 °C for 1 minute, 69 °C for 1 minute, 72 °C for 1 minute, and a final extension at 72 °C for 3 minutes using a Veriti™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, *United States*). An internal positive control consisting of purified DNA from HAd36 was used. To evaluate the viability of the samples and rule out possible PCR inhibitors, the β-actin gene (a fragment of 290 bp) was also amplified, serving as a control for the PCR reaction. Samples were analyzed in duplicate to confirm the results. The visualization of the amplified products was performed using polyacrylamide gels (6%) stained with AgNO<sub>3</sub> (0.3%).

## **Histological analysis of adipose tissue**

A total of 19 adipose tissue biopsies were obtained by lipectomy and fixed in 10% paraformaldehyde. Subsequently, tissue sections of approximately 1 cm<sup>2</sup> were cut in a cryostat, mounted on glass slides, and stained with hematoxylin-eosin. The images were taken using a LEICA DM1000 (Wetzlar, Germany) optical microscope at 40X magnification, for the estimation of the adipocytes diameter 200 cells per patient were analyzed. The diameter was established taking as reference the scale images (200 μm). To evaluate the number of cells, two fields were quantified for each patient. The estimate of the cell diameter was obtained using the "measure and label" tool and for the number of cells per field "Multi-

point" from the ImageJ/Fiji software. A limitation of this study is the morphological analysis used to determine the number of adipocytes to diagnose hyperplasia since it only allows an estimation of the number of cells found during the visual field assessments, so these results must be taken with reservations.

The diameter and number of adipocytes were analyzed in tertiles, using the 1st tertile as reference. The adipocytes that showed a diameter greater than the third tertile ( $>112.9 \mu\text{m}$ ) were considered hypertrophic, and hyperplasia was considered when the number of cells was greater than the third tertile ( $>128$  cells/field). The tissue samples were analyzed by two independent analysts for evaluation of adipocyte morphology. The results were reported as the average of both measurements. All samples were analyzed without prior knowledge of the clinical data from each patient.

## **Gene expression analysis**

The product of adipose tissue harvested by liposuction was collected in 15 ml polypropylene conical tubes for the extraction of total RNA with TRIzol reagent and according to the protocol established by Chomczynski and Sacchi.<sup>14</sup> To carry out the synthesis of cDNA, 1  $\mu\text{g}$  of RNA was used with oligo dT and reagents for reverse transcription in accordance with the specifications of the manufacturer (Promega Corporation, USA). The cDNA was stored at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  until its use for real-time PCR. The expression of genes *C/EBP $\beta$* , *HIF-1 $\alpha$*  and  *$\beta$ -actin*, was carried out in duplicate and using TaqMan probes according to the manufacturer's instructions in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, California, USA). Relative expression analysis of each gene of interest was performed using  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  and  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  methods, and  $\beta$ -actin was the reference gene.

## **Statistical analysis**

The data was captured in STATA (v 11.1) and GraphPad Prism 5 software. For the absolute and relative frequencies of qualitative variables, the comparison between groups was performed with the Chi-Square test ( $X^2$ ) or Fisher exact test, as appropriate. The comparison between groups using the Welch's t-test for the parametric variables (data presented on average  $\pm$ SD), and for non-parametric variables, the Mann Whitney test (median and ranges percentiles) was used. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

The identification of viral DNA by PCR was performed from adipose tissue samples obtained from women undergoing abdominal liposuction or lipectomy, observing that the frequency of viral DNA in patients with normal weight was 44%, for overweight 25%, and 31% for obesity, although no significant differences were found when comparing the study groups ( $p=0.053$ ) (Table 1).

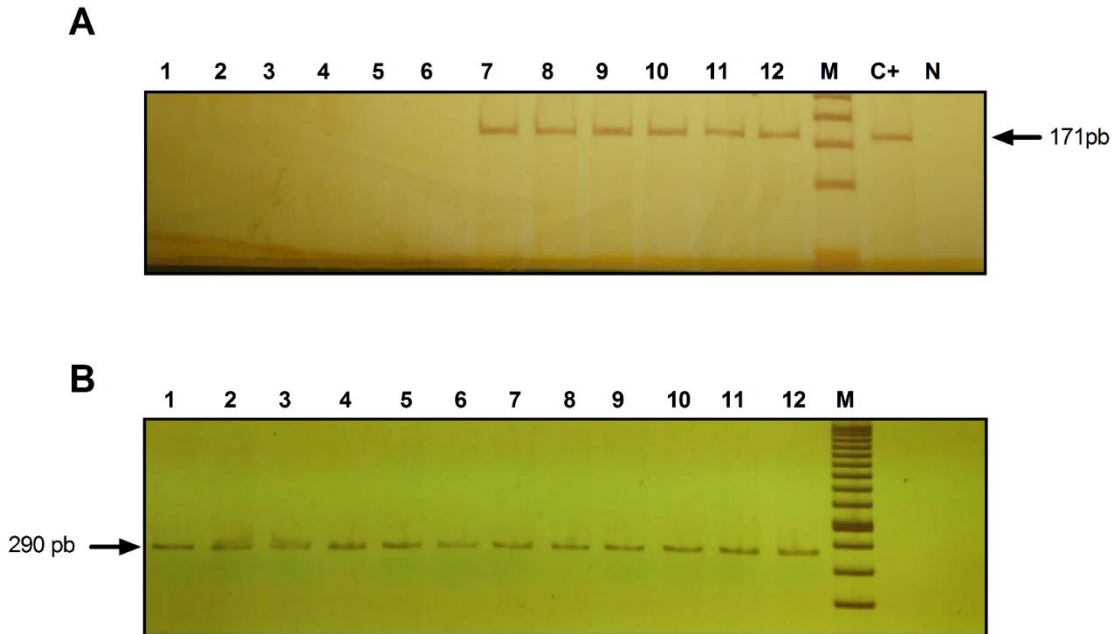
**Table 1** Frequency of viral DNA according to BMI categories

Group	HAd36-negative n=36 (73%)	HAd36-positive n=16 (27%)	<i>P</i>
Normal-weight	9 (25%)	7 (44%)	
Overweight	22 (61%)	4 (25%)	0.05*
Obesity	5 (14%)	5 (31%)	

**Notes:** \*  $\chi^2$  test; Normal-weight 18.5-24.9 kg/m<sup>2</sup>; Overweight 25-29.9 kg/m<sup>2</sup>; Obesity  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>.

**Abbreviation:** BMI, body mass index.

The PCR products were identified by electrophoresis on 6% polyacrylamide gels. In all cases, positive (purified HAd36 DNA) and negative control reactions were performed simultaneously with patient samples (Figure 1).



**Figure 1** Identification of HAd36 DNA in 6% polyacrylamide gel stained with 0.3 % AgNO<sub>3</sub>. (A) Lane 1-6, negative samples for HAd36, 7-12, positive samples for HAd36. The PCR products corresponds to an amplified fragment of 171 bp. (B) PCR products to β-actin, amplified fragment of 290 pb. M, corresponds to the molecular marker of 50 bp. C+, indicates the positive control and N indicates the negative control.

Table 2 shows the clinical and metabolic characteristics of patients grouped by BMI and viral DNA positivity, where the group of women with normal-weight who were positive for HAd36 presented lower tricipital skinfold thickness compared to women who were negative (20 vs 26 mm,  $p=0.03$ ), and they also had higher levels of LDL-c compared to their counterparts (71 vs 53 mg/dL,  $p=0.03$ ), however, no significant differences were observed with respect to other variables. In the overweight and obese groups, no statistically significant differences were found in the comparison of clinical and metabolic characteristics.

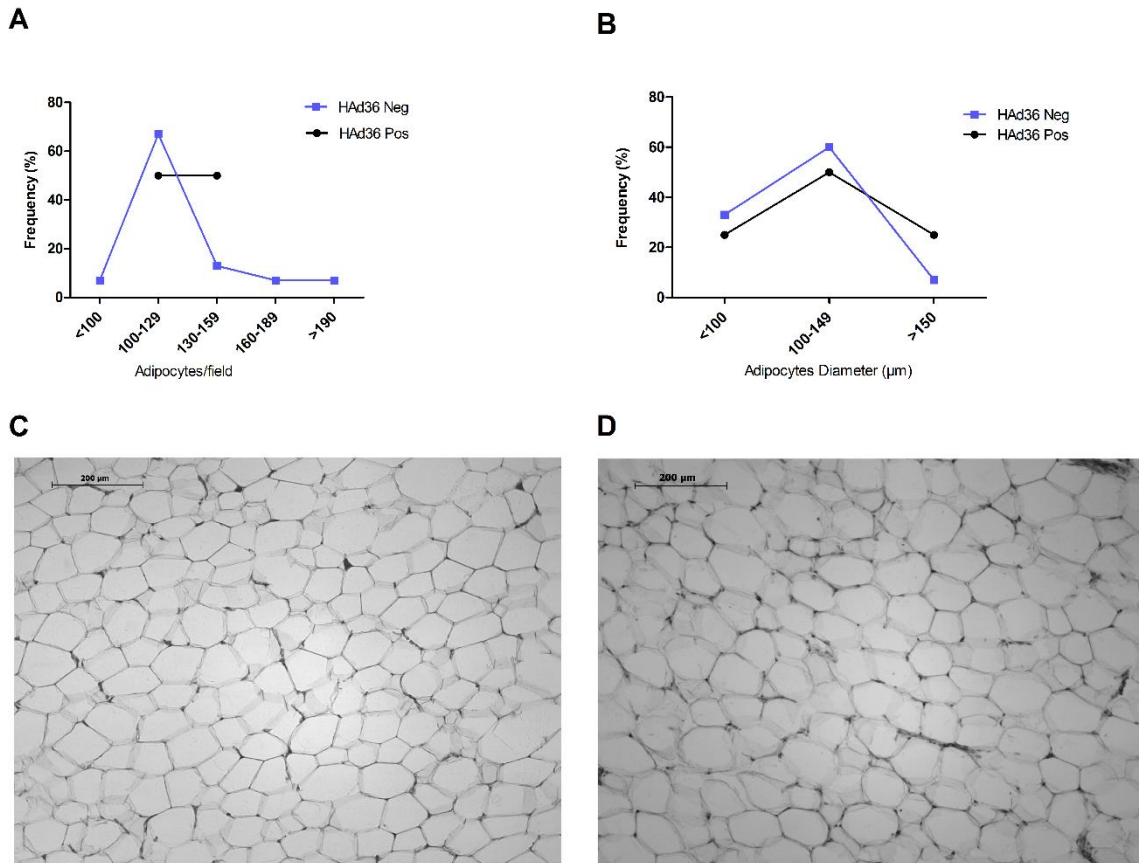
**Table 2** Comparison of clinical and metabolic characteristics according to BMI categories and viral DNA positivity

Variables	Normal-weight		P	Overweight		P	Obesity		P
	n=16			n=26			n=10		
	HAd36-negative n=9	HAd36-positive n=7	HAd36-negative n=22	HAd36-positive n=4	HAd36-negative n=5	HAd36-positive n=5			
Age (years)*	34 (±9)	40 (±14)	0.35	40 (±11)	41 (±10)	0.92	48 (±8.4)	35.4 (±12)	0.10
Height (cm)*	160.0 (±0.05)	160.0 (±0.04)	0.71	158.0 (±0.05)	156.0 (±0.05)	0.47	160.0 (±0.08)	159 (±0.05)	0.72
Waist circumference (cm) *	82.8 (±6.05)	77.2 (±7.8)	0.14	90.8 (±5.3)	93.1 (±4.2)	0.38	104.0 (±9.5)	105.2 (±10.7)	0.86
Hip circumference (cm) **	95.0 (93.5-99.0)	94.0 (90.0-95.0)	0.15	103.8 (102-107)	101.5 (99-104.8)	0.17	113.0 (103.0-116.0)	116.0 (110.0-136.0)	0.34
Weight (kg) *	59.2 (±5.2)	56.7 (±3.7)	0.29	68.1 (±3.4)	67.5 (±4.5)	0.91	80.6 (±5.3)	80.2 (±4.6)	0.89
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) *	22.7 (±1.5)	22.1 (±1.4)	0.44	27.2 (±1.5)	27.7 (±1.0)	0.44	31.6 (±1.3)	31.9 (±2.4)	0.77
Waist-hip-ratio*	0.86(±0.05)	0.83 (±0.08)	0.42	0.86 (±0.05)	0.91 (±0.04)	0.09	0.92 (±0.12)	0.87 (±0.05)	0.45
Body fat mass (%) *	31.9 (±9.3)	25.8 (±6.7)	0.15	36.0 (±2.6)	34.3 (±8.2)	0.70	42.3 (±0.76)	34.4 (±7.2)	0.07
Bicipital skinfold (mm) *	22.3 (±7.1)	17.4 (±8.2)	0.23	27.5 (±5.8)	28.5 (±10.8)	0.87	30.8 (±10.2)	35.4 (±9.6)	0.48
Tricipital skinfold (mm) *	26.0 (±6.4)	20.0 (±3.8)	0.03	28.7 (±5.4)	30.0 (±2.3)	0.47	34.8 (±7.0)	33.8 (±5.3)	0.81
Subscapular skinfold (mm) **	22.0 (20.0-26.0)	22.0 (18-32)	0.86	30.0 (26.0-40.0)	30.0 (23-40.0)	0.99	32.0 (30.0-48.0)	32.0 (30.0-38.0)	0.78
Total cholesterol (mg/dL)*	156.7 (±36.2)	136.8 (±41.0)	0.28	169.0 (±49.5)	144.1 (±71.5)	0.50	156.2 (±48.3)	143.6 (±47.4)	0.67
Triglycerides (mg/dL)**	61.0 (55.0-92.0)	76.0 (54.0-135.0)	0.83	86.0 (72.0-102.0)	65.5 (52.0-76.2)	0.05	62.0 (60.0-222.0)	77.0 (76.0-77.0)	0.92
Glucose (mg/dL)**	83.0 (82.0-95.0)	85.0 (84.0-89.0)	0.59	86.0 (81.0-93.0)	91.4 (87.4-93.0)	0.47	99.9 (88.0-106.0)	77.0 (74.1-99.0)	0.46
HDL-c (mg/dL)**	39.0 (37.0-40)	41.0 (36.0-56.0)	0.31	38.5 (37.0-42.0)	37.0 (37.0-37.5)	0.17	46.0 (41.0-47.0)	44.0 (38.0-52.0)	0.91
LDL-c (mg/dL)**	53.0 (41.0-63.0)	71.0(60.0-125.0)	0.03	71.5 (56.0-86.0)	80.0 (43.5-108.5)	0.89	56.0 (41.0-156.0)	86 (81.0-93.0)	0.60

**Notes:** Normal-weight 18.5-24.9 kg/m<sup>2</sup>; Overweight 25-29.9 kg/m<sup>2</sup>; Obesity ≥30 kg/m<sup>2</sup>; \*Data presented mean ± SD, Welch's t-test.  
 \*\*Data presented as median and 25th and 75th percentile, Mann Whitney test. **Abbreviations:** BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HDL-c, high density lipoprotein-cholesterol; LDL-c, low density lipoprotein-cholesterol.

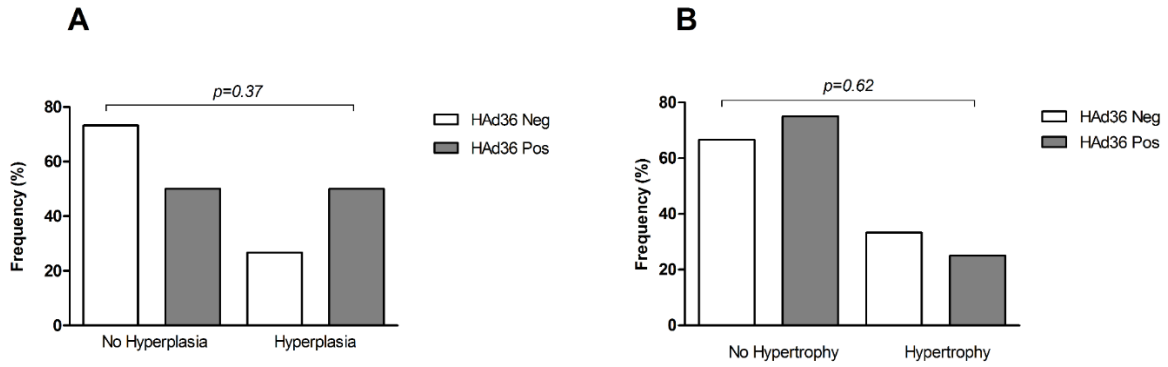


The results obtained from the cell morphology analysis of the adipose tissue obtained by lipectomy are presented in Figure 2. Regarding the number of cells, it was observed that HAd36-positive women had less variation in cell number per field (>100 to 159 adipocytes/field), in comparison with HAd36-negative women who had a wide range of variation in the number of cells (>100 to 190 adipocytes/field, Figure 2A). Regarding to the estimation of cell diameter, results showed that adipocytes had a diameter between 100-149  $\mu\text{m}$  for both HAd36-positive and negative groups (Figure 2B). Representative micrographs from histological sections of adipose tissue obtained by abdominal lipectomy from obese HAd36-positive (Figure 2C) and obese HAd36 negative (Figure 2D) women are shown; where it was observed that the HAd36-positive samples had a greater distribution of various cell sizes compared with the HAd36-negative samples.



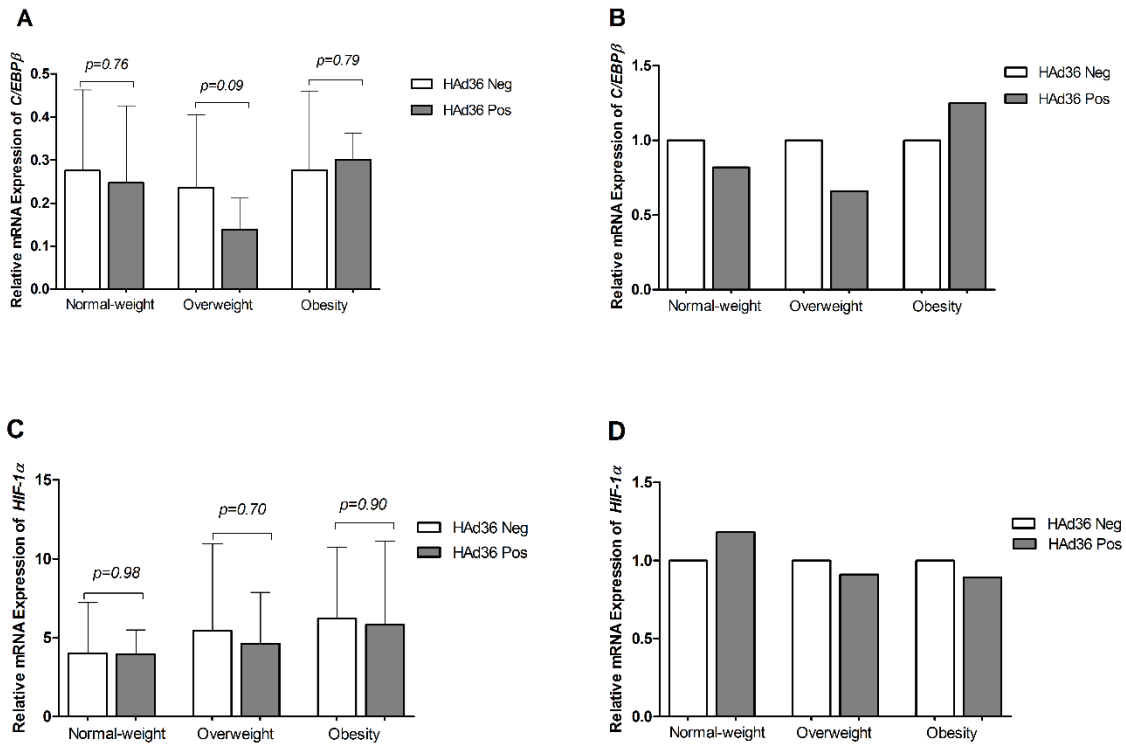
**Figure 2** Morphological analysis and distribution of adipose tissue from women who underwent abdominal lipectomy. **(A)** Distribution (%) of positive and negative samples for HAd36 in relation to the number of adipose cells per field. **(B)** Distribution (%) of positive and negative samples for HAd36 in relation with cell diameter. **(C)** Representative photograph of a sample of adipose tissue positive for HAd36, showing greater cellularity and adipocytes of variable size. **(D)** Photograph representative sample of adipose tissue negative for HAd36 showing a more homogeneous distribution in the number and size of adipocytes.

The morphological analysis of adipose tissue showed that women who were positive for HAd36 DNA presented a higher frequency of hyperplasia in comparison with HAd36-negative women (Figure 3), however, these differences were not statistically significant between study groups ( $p=0.37$ ). With respect to hypertrophy, the results showed a slight increase in the size of HAd36-negative women with respect to positive ones, but these differences were also not significant ( $p=0.62$ ).



**Figure 3** Morphological changes of subcutaneous adipose tissue from women subjected to abdominal lipectomy. (A) Frequency of fat cell hyperplasia in positive and negative women for HAd36. (B) Frequency of fat cell hypertrophy in positive and negative women for HAd36. The P value was calculated using Fisher's exact test.

In Figure 4, the statistical analyses of the mRNA expression levels for *C/EBPβ* and *HIF-1α* are shown, where no statistically significant differences were observed between HAd36-positive and negative women ( $p>0.05$ ).



**Figure 4.** Relative expression of mRNA. (A-B) C/EBPβ mRNA expression of subcutaneous adipose tissue in HAd36-positive and -negative women. (C-D) HIF-1α mRNA expression of subcutaneous adipose tissue in HAd36-positive and -negative women. The *P* value was calculated using the Welch's t-test.

## Discussion

In recent years, HAd36 infection has been associated with higher body weight and obesity in children and adults.<sup>6,7,15</sup> Some studies have summarized the known facts about how HAd36 induced obesity, but more evidence is needed.<sup>16</sup>

Our initial aim was to know the overall frequency of HAd36 DNA in adipose tissue and we found 31% of positive samples (16 out of 52 samples), which is higher compared to 19% (4 out of 21 samples) reported by Ponterio *et al*, (2015) in visceral adipose tissue.<sup>13</sup> These differences could be due to the specificity of the primers used in the PCR assay since the primers of our study were designed to amplify a conserved region of the gene that codes for the hexon protein, unlike those used by Ponterio *et al*, which were designed to amplify a fragment of the gene that codes for the fiber protein. Similarly, a study conducted in Turkish adults in the same year, failed to identify the presence of HAd36 genetic material in the lipoaspirate, and the primers used for the PCR were also directed to the HAd36 fiber gene.<sup>17</sup> The first report that evidenced the presence of HAd36 DNA was from a clinical case published in 2010. The identification of viral DNA was performed in subcutaneous adipose tissue biopsies of a patient with visceral obesity. In this study, the same primers from the Turkish population were used; however, the presence of viral DNA was identified in three of the four tissue biopsies.<sup>12</sup> According to these findings, we could speculate that the primer design, viral load, and the amount of adipose tissue used for the analysis are variables that should be considered for future viral DNA identification assays.

An intriguing question is how HAd36 enters the adipocyte, however, it was recently reported that the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) is expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue. Most adenovirus serotypes interact with CAR to enter the cell, and this protein is highly expressed in the gastric, respiratory, and ocular mucosa cells.<sup>18</sup>

Furthermore, it is suggested that the HAd36 fiber protein has highly conserved sites in the Tyr315 and Lys350, which would enable it to interact with sialic acid (SA), a component of the membrane involved in cell recognition.<sup>19,20</sup> This background could provide a possible explanation for how adipose tissue is susceptible to HAd36 infection; however, the molecular mechanism by which the virus reaches adipose tissue deposits is still unknown.

In this study, we did not find an association between the presence of HAd36 DNA in adipose tissue with altered anthropometric and metabolic measurements. Similarly, in a study conducted in Italian patients where viral DNA was detected in abdominal adipose tissue, no significant differences were found in serum cholesterol, triglycerides, and glucose levels.<sup>13</sup> Another study published in 2012 reported that there is no positive correlation between seropositivity of HAd36 with BMI. This same study showed that it was not possible to detect viral DNA by PCR in adipose tissue biopsies of 31 patients with severe obesity using primers directed to the gene that code for the hexon protein of HAd36.<sup>21</sup> These results are not in accordance with a study carried out in a HAd36-induced obese rat model where the metabolic profile and the expression of adipokines were analyzed. Findings showed that in HAd36-induced obese rats, no ectopic fat deposition and no increase in serum triglycerides and glucose levels were found, and insulin sensitivity was normal. These results were attributed to the fact that these rats had a significant increase in the expression of adipokines, such as adiponectin which improves insulin sensitivity, Lipin 1 (Lpin1) was shown to favor the deposition of triglycerides in adipose tissue and prevent their ectopic accumulation, and glucose transporter 4 (Glut4) was also shown to favor glucose uptake in adipose tissue, compared to the control group consisting of rats with obesity induced by a high-fat diet.<sup>22</sup> A limitation of our study is that the expression of adipokines was not measured; therefore, the relationship between adipokines, and biochemical parameters and body fat distribution could not be determined.

In terms of the morphological changes, once cut-off points were established for hyperplasia and hypertrophy of adipose tissue, the results showed that women who were positive for HAd36 presented a slight increase in the number of adipocytes per field; however, these differences were not significant in comparison with the negative group. Currently, there is no evidence linking HAd36 infection with hyperplasia and hypertrophy of human adipose tissue, however, some studies performed in animal models have confirmed that HAd36 infection increases fat deposits between 3 and 8 months after infection, and that adipose tissue gain is slow but not transient,<sup>11</sup> and the same results have been observed in non-human primates, mice and chickens.<sup>4-6</sup> This adipose tissue gain could be related to the adipogenic role of HAd36 since the protein encoded by the E4 open reading frame 1 gene (*E4ORF1*) is sufficient and necessary to induce adipogenesis.<sup>23</sup> It has been reported that HAd36 stimulates differentiation of preadipocytes to adipocytes by promoting adipocyte hyperplasia and increasing intracellular lipid accumulation and higher levels of the glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) protein, which favors adipocyte hypertrophy.<sup>16</sup> Some genes related to adipogenesis, that were found to be upregulated in human mesenchymal stem cells (hMSCs) infected with HAd36 are C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , activating transcription factor 3 (ATF3), and fatty acid-binding protein 4 (FABP4).<sup>24</sup> However, our results did not associate the presence of HAd36 DNA in the subcutaneous adipose tissue with differential expression of C/EBP $\beta$  mRNA between positive and negative women; therefore, other studies are needed to confirm the overexpression of adipogenic genes and their relationship with the increase in body fat during the course of viral infection in animal models.

A recent study found that the presence of antibodies against HAd36 was related to the expression of PPAR $\gamma$  and miRNAs in visceral adipose tissue, which participate in the regulation of adipogenesis. Results show that HAd36 seropositive subjects present higher

expression of PPAR $\gamma$  and miR-17 (pro-adipogenic), but lower expression of miR-155 (anti-adipogenic), which may favor a proadipogenic state in these subjects.<sup>25</sup> Therefore, the role of miRNAs in the epigenetic regulation of adipogenesis in HAd36 infection represents a new line of research that will continue to be developed to clarify the underlying mechanisms of this viral infection.

In regard to the expression of the transcription factor the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), it has been reported that some infections due to viruses, such as hepatitis C virus, human cytomegalovirus, and human papillomavirus (HPV), have been linked to increased mRNA levels and the HIF-1 $\alpha$  protein.<sup>26-28</sup> In this sense, evidence suggests that the activity of HIF-1 $\alpha$  is induced by low levels of oxygen in the adipose tissue that is characteristic of obesity,<sup>29</sup> but when analyzing the results obtained from HIF-1 $\alpha$  expression, no significant differences were found between positive and negative women to HAd36. However, it is important to mention that in our study only one adipogenic gene (C/EBP $\beta$ ) and one gene associated with cellular metabolism (HIF-1 $\alpha$ ) were evaluated, and thus, establishing an association between the presence of viral DNA with hyperplasia and hypertrophy of adipose tissue is not sufficient. Therefore, the analysis of transcription factors and the genes they regulate is considered of utmost importance to determine the adipogenic pathways involved in the development of obesity in subjects with HAd36 DNA.

There were additional limitations in the present study, the small sample size reduces its statistical power; therefore, it is necessary to repeat it on a larger sample to confirm these results. In addition, only women were included, so it is important to replicate the study in men; besides matching them by gender, age, and body mass index, considering that hormonal regulation of metabolism is gender related.<sup>30</sup> Another limitation of this study is that the serum neutralization assay was not carried out to analyze seropositivity for HAd36, and



thus, we were unable to assess the concordance between seropositivity and the presence of viral DNA in adipose tissue.

## **Conclusion**

In conclusion, our results show the presence of HAd36 DNA in subcutaneous adipose tissue; however, this finding was not associated with the morphological changes of adipose tissue or with the expression of some genes, such as C/EBP $\beta$  and HIF-1 $\alpha$  related to obesity. However, more studies are needed to replicate these results.

## **Acknowledgments**

The study was supported by the National Council of Science and Technology, Mexico, Grant CB-2014-01/238868 assigned to IPR. JBA was a recipient of a CONACyT fellowship.

## **Disclosure**

The authors report no conflicts of interest in this work.

## References

1. Dhurandhar NV. Infectobesity: Obesity of Infectious Origin. *J Nutr.* 2001;131(10):2794S–2797S.
2. Mitra AK, Clarke K. Viral obesity: fact or fiction? *Obes Rev.* 2010;11(4):289–296.
3. Akheruzzaman M, Hegde V, Dhurandhar NV. Twenty-five years of research about adipogenic adenoviruses: A systematic review. *Obes Rev.* 2019;20(4):499–509.
4. Dhurandhar N, Israel B, Kolesar J, Mayhew G, Cook M, Atkinson R. Transmissibility of adenovirus-induced adiposity in a chicken model. *Int J Obes (Lond).* 2001;25(7):990–996.
5. Dhurandhar NV, Whigham LD, Abbott DH, et al. Human Adenovirus Ad-36 Promotes Weight Gain in Male Rhesus and Marmoset Monkeys. *J Nutr.* 2002;132(10):3155–3160.
6. Dhurandhar NV, Israel BA, Kolesar JM, Mayhew GF, Cook ME, Atkinson RL. Increased adiposity in animals due to a human virus. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24(8):989–996.
7. Yamada T, Hara K, Kadowaki T. Association of Adenovirus 36 Infection with Obesity and Metabolic Markers in Humans: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE.* 2012;7(7):e42031.
8. Xu MY, Cao B, Wang DF, et al. Human Adenovirus 36 Infection Increased the Risk of Obesity: A Meta-Analysis Update. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(51):e2357.
9. Shang Q, Wang H, Song Y, 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):895–900.
10. Vangipuram SD, Sheele J, Atkinson RL, Holland TC, Dhurandhar NV. A Human Adenovirus Enhances Preadipocyte Differentiation. *Obes Res.* 2004;12(5):770–777.

11. Pasarica M, Shin AC, Yu M, et al. Human Adenovirus 36 Induces Adiposity, Increases Insulin Sensitivity, and Alters Hypothalamic Monoamines in Rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(11):1905–1913.
12. Salehian B, Forman SJ, Kandeel FR, Bruner DE, He J, Atkinson RL. Adenovirus 36 DNA in Adipose Tissue of Patient with Unusual Visceral Obesity. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(5):850–852.
13. Ponterio E, Cangemi R, Mariani S, et al. Adenovirus 36 DNA in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(12):1761–1764.
14. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*. 2006;1(2):581–585.
15. Atkinson RL, Dhurandhar NV, Allison DB, et al. Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29(3):281–286.
16. Kim J, Na H, Kim JA, Nam JH. What we know and what we need to know about adenovirus 36-induced obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2020;44(6):1197–1209.
17. Ergin S, Altan E, Pilanci O, et al. The role of adenovirus 36 as a risk factor in obesity: The first clinical study made in the fatty tissues of adults in Turkey. *Microb Pathog*. 2015;80:57–62.
18. Serrano M, Moreno M, Bassols J, et al. Coxsackie and Adenovirus Receptor Is Increased in Adipose Tissue of Obese Subjects: A Role for Adenovirus Infection? *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(3):1156–1163.
19. Arnold J, Jánoska M, Kajon AE, et al. Genomic characterization of human adenovirus 36, a putative obesity agent. *Virus Res*. 2010;149(2):152–161.
20. Traving C, Schauer R. Structure, function, and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci*. 1998;54(12):1330–1349.

21. Goossens VJ, de Jager SA, Grauls GE, et al. Lack of Evidence for the Role of Human Adenovirus-36 in Obesity in a European Cohort. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(1):220–221.
22. Jiao Y, Liang X, Hou J, et al. Adenovirus type 36 regulates adipose stem cell differentiation and glucolipid metabolism through the PI3K/Akt/FoxO1/PPAR $\gamma$  signaling pathway. *Lipids Health Dis*. 2019;18(1):70.
23. Rogers PM, Fusinski KA, Rathod MA, et al. Human adenovirus Ad-36 induces adipogenesis via its E4 orf-1 gene. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(3):397–406.
24. Na HN, Kim H, Nam JH. Novel genes and cellular pathways related to infection with adenovirus-36 as an obesity agent in human mesenchymal stem cells. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36(2):195–200.
25. Manriquez V, Gutierrez A, Morales A, et al. Influence of adenovirus 36 seropositivity on the expression of adipogenic microRNAs in obese subjects. *Int J Obes (Lond)*. 2020;44(11): 2303–2312.
26. Nakamura M, Bodily JM, Beglin M, Kyo S, Inoue M, Laimins LA. Hypoxia-specific stabilization of HIF-1 $\alpha$  by human papillomaviruses. *Virology*. 2009;387(2):442–448.
27. McFarlane S, Nicholl MJ, Sutherland JS, Preston CM. Interaction of the human cytomegalovirus particle with the host cell induces hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ . *Virology*. 2011;414(1):83–90.
28. Nasimuzzaman M, Waris G, Mikolon D, Stupack DG, Siddiqui A. Hepatitis C Virus Stabilizes Hypoxia-Inducible Factor 1 and Stimulates the Synthesis of Vascular Endothelial Growth Factor. *J Virol*. 2007;81(19):10249–10257.
29. Halberg N, Khan T, Trujillo ME, et al. Hypoxia-Inducible Factor 1 Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. *Mol Cell Biol*. 2009;29(16):4467–4483.
30. Dearden L, Bouret SG, Ozanne SE. Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. *Mol Metab*. 2018;15:8–19.

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

La obesidad y el sobrepeso se han convertido en un problema de salud a nivel mundial que está estrechamente relacionado con el desarrollo de complicaciones metabólicas, como la diabetes tipo 2, hipertensión, dislipidemias, cáncer, entre otras. Sin embargo, la susceptibilidad a estas complicaciones no está determinada únicamente por el IMC o el porcentaje de grasa general, sino, que depende en gran medida de la distribución corporal del tejido adiposo, su capacidad de expansión y cambios morfológicos que adquiere como respuesta a los estímulos del medio ambiente **(Piche et al., 2018)**.

En los últimos años, se ha puesto especial atención en el origen infeccioso de la obesidad, especialmente atribuido a la infección por HAd36, por lo que varios estudios han asociado la presencia de anticuerpos contra HAd36 y la ganancia de peso, así como el desarrollo de obesidad en población adulta e infantil **(Yamada, Hara y Kadowaky., 2012; Shang et al., 2014; Xu, Cao y Wang., 2015)**.

El papel adipogénico de HAd36 se ha evaluado en modelos *in vitro* (preadipocitos murinos y adipocitos humanos derivados de células madre) e *in vivo* (pollos, ratones y primates no humanos). Sin embargo, existe poca evidencia de su relación con la obesidad en humanos, debido a la complejidad metodológica para la recolección de las muestras e identificación molecular del material genético viral, y los resultados obtenidos hasta ahora son inconsistentes en las poblaciones estudiadas **(Salehian et al., 2010; Ergin et al., 2015; Ponterio et al., 2015)**.

El primer reporte en documentar la presencia de HAd36 en tejido adiposo fue publicado en el año 2010 que identificó la presencia de DNA de HAd36 en biopsias de tejido adiposo subcutáneo de un paciente con diagnóstico de lipomatosis diseminada y acumulación inusual del tejido adiposo visceral (TAV), la identificación del material genético se realizó mediante PCR anidada, y fueron positivas en tres de 4 biopsias, finalmente, los autores concluyeron que HAd36 podría estar relacionado con el aumento del tejido adiposo en cavidades torácicas y región visceral, así como la reducción de lípidos séricos **(Salehian et al., 2010)**. Posteriormente Goosens y cols. llevaron cabo un estudio en 31 biopsias de tejido adiposo de una población europea, sin embargo, no se logró identificar la presencia de DNA viral o una asociación directa de la obesidad con la infección de HAd36 **(Goossens et al., 2012)**. En el año 2015, se publicó un estudio realizado en 49 biopsias de lipoaspirado correspondientes a individuos obesos y no obesos, sin embargo, al igual que en la cohorte europea, no se logró identificar la presencia de HAd36 en las biopsias. Actualmente, el único estudio publicado que ha identificado la presencia de DNA de HAd36 en tejido adiposo fue realizado en el año 2015 por Ponterio y cols., reportaron una frecuencia del 19%, se detectó en 4 de 21 biopsias de tejido adiposo visceral **(Ponterio et al., 2015)**.

La frecuencia reportada en el presente trabajo es actualmente la más alta en comparación con los estudios antes mencionados, aunque no existe evidencia clara que relacione la infección de HAd36 y la localización anatómica del tejido adiposo, sin embargo, un meta-análisis publicado en el año 2011 que evaluó la relación entre la infección por HAd36 y el riesgo de obesidad, concluyó que la infección por HAd36

no se asoció con marcadores metabólicos anormales, pero si con la mayor acumulación de grasa subcutánea que visceral (**Yamada, Haray Kadowaki., 2011**). El mecanismo por el cual HAd36 podría infectar tejido adiposo aun es desconocido, sin embargo, una de las principales evidencias que podría explicar este mecanismo es la expresión del receptor CAR, el cual se ha demostrado que interacciona con algunos serotipos de adenovirus humanos y que se expresa en el tejido adiposo visceral y subcutáneo (**Stasiak y Stehele., 2019**). Los resultados obtenidos de un estudio *ex vivo*, en 91 biopsias de Tejido Adiposo Visceral (TAV) y 109 de Tejido Adiposo Subcutáneo (TAS) reportaron que CAR se expresa mayormente en TAV que TAS, sin embargo, los niveles de expresión del mRNA fue mayor en TAS de pacientes obesos en comparación con no obesos (**Serrano et al., 2015**), estos resultados aportan evidencia que podría explicar la relación entre la presencia de HAd36 en depósitos de tejido adiposo visceral y subcutáneo.

Es importante mencionar que, en los estudios llevados a cabo en diferentes poblaciones, se ha determinado la infección por HAd36 a partir de muestras serológicas por técnicas como Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) o ensayo de anticuerpos neutralizantes, pero la relación entre la presencia del DNA de HAd36 con la obesidad y el perfil clínico-bioquímico son pocos y los resultados inconsistentes con los reportados previamente.

Por otro lado, algunos estudios han reportado que no existe una relación entre la presencia de anticuerpos contra HAd36 con la obesidad y los niveles de colesterol sérico y triglicéridos, pero si con la edad, raza y sexo. Sin embargo, la interpretación resulta confusa debido a que no existen reportes previos que relacionen la infección por HAd36 con aspectos culturales y demográficos. Por lo que los autores

especulan que quizás sean factores de confusión dentro del estudio, y que la misma heterogeneidad de la población dificulta la interpretación de los resultados **(Yamada, Haray Kadowaki., 2011; Broderick et al., 2009)**.

En este estudio, las mujeres positivas para HAd36 presentaron un ligero incremento en el número de células adiposas por campo y diámetro celular. Los primeros reportes llevados a cabo en cultivos celulares de preadipocitos murinos (3T3-L1) y células troncales/estromales derivadas de tejido adiposo humano (hASC) demostraron que la infección por HAd36 se asocia con el incremento en la diferenciación celular y mayor acumulación de lípidos en comparación de aquellas células no infectadas **(Vangipuram et al., 2004; Pasarica et al., 2006)**.

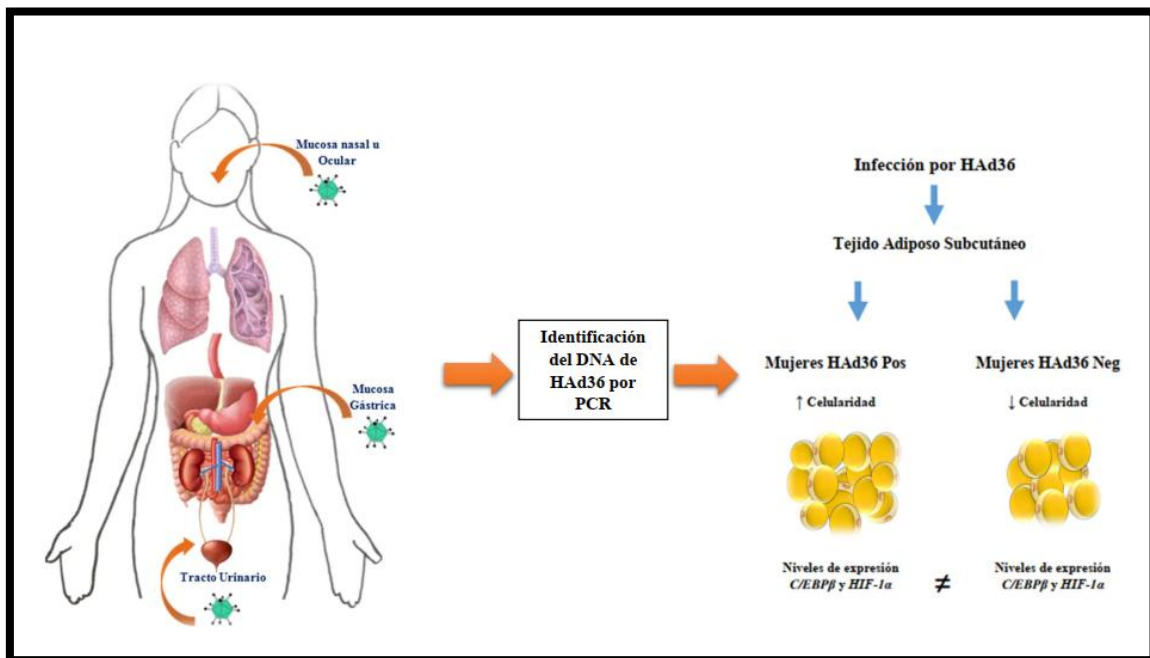
Los hallazgos de la morfología celular no son concluyentes ni con el número de células adiposas (hiperplasia) ni con el diámetro celular (hipertrofia) en muestras positivas al DNA viral. Varios estudios *in vitro*, han demostrado que HAd36 puede sobre regular la señalización del cAMP y PI3K, incrementando la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (SREBP), y la proteína cinasa B (PKB o AKT). Esta señalización celular, está relacionada con la activación de factores de la transcripción adipogénicos como del Receptor Activado por Proliferadores Peroxisomales (PPAR $\gamma$ ) y la Proteína de Unión al Enhancer/CCATT  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) que conduce a una mayor diferenciación y acumulación de lípidos. Esta señalización celular adipogénica también es inducida por la proteína codificada en el marco de lectura abierto (ORF) 1 del gen E4 de HAd36 (E4orf1). E4orf1 es suficiente y necesario para que HAd36 pueda inducir la adipogénesis **(Rogers et al., 2008)**.



Por otro lado, los cambios morfológicos del tejido adiposo vienen acompañados de una adaptación metabólica como consecuencia de la hiperplasia e hipertrofia del tejido. La disposición de oxígeno en el tejido disminuye a medida que aumenta el volumen celular y como consecuencia dan lugar a la expresión de genes de supervivencia celular en condiciones de hipoxia. El más importante es el factor de la transcripción *HIF1- $\alpha$* , que es el mediador clave de la señal de hipoxia, el cual se encuentra incrementado en pacientes con sobrepeso y obesidad. Por lo tanto, medir los niveles de expresión de genes adipogénicos como *C/EBP $\beta$* , *PPAR $\gamma$*  y de supervivencia celular como *HIF1- $\alpha$*  podrían aportar información relevante de los cambios metabólicos en presencia de HAd36 en tejido adiposo. La hipoxia del tejido adiposo previene la hidroxilación de *HIF1- $\alpha$* , promoviendo su translocación al núcleo y unión al factor de transcripción *HIF1- $\beta$* , que a su vez activa los elementos de respuesta a la hipoxia en genes diana como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), transportadores de glucosa (GLUTS) y enzimas glicolíticas (**Jun et al., 2016**). El tejido adiposo visceral es metabólicamente más activo, y más propenso a la expansión que el tejido adiposo subcutáneo. Por lo tanto, la expresión de genes adipogénicos varía con respecto a la localización anatómica del tejido adiposo, y tanto la hiperplasia como la hipertrofia son consecuencia de estímulos intrínsecos como extrínsecos del individuo (**Choe et al., 2016**).

Por todo lo mencionado anteriormente, se ha propuesto un modelo que integra los hallazgos obtenidos en el presente trabajo, donde podemos observar que HAd36 se ha relacionado con la infección de las vías respiratorias, gastrointestinales y urinarias, sin embargo, se ha demostrado que la infección puede trascender a órganos como hígado, cerebro y tejido adiposo. La detección del DNA viral por

medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en biopsias de tejido adiposo subcutáneo de mujeres sometidas a liposucción y lipectomía para determinar que la presencia podría influir en cambios metabólicos, morfológicos y de expresión en adipocitos, sin embargo, al establecer los grupos de mujeres positivas y negativas para HAd36, los resultados no fueron significativos. Morfológicamente, se observó que las mujeres positivas para HAd36 presentaban un ligero incremento en la celularidad de adipocitos, pero de igual manera estos resultados no fueron concluyentes ni significativos. El mismo panorama se observó con respecto a los niveles de expresión del mRNA de genes adipogénicos (*C/EBPβ*, *PPARγ* y *HIF-1α*), donde no se observaron diferencia entre mujeres positivas y negativas para HAd36 (Figura 5).



**Figura 5.** Modelo integrador. Resultados comparativos entre mujeres negativas y positivas para HAd36.

En conclusión, nuestros resultados aportan evidencia sobre la presencia del DNA viral de HAd36 en células del tejido adiposo subcutáneo, lo que sugiere el posible tropismo por este tejido, pero no se asoció con la obesidad o un incremento del IMC en la población de estudio, y de igual manera, no se observaron diferencias estadísticas con características clínicas o antropométricas, con la morfología del tejido adiposo o con la expresión de genes adipogénicos y supervivencia celular.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arnold J., Janoska M., Kajon A.E., Metzgar D., Hudson N.R., Torres S., Harrach B., Seto D., Chodosh J., Jones M.S. (2010). Genomic characterization of human adenovirus 36, a putative obesity agent. *Virus Research*, 149, 152–161.
2. Atkinson R.L., Dhurandhar N.V., Allison D.B., Bowen R.L., Israel B.A., Albu J.B., Augustus A.S. (2005). Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *International Journal Obesity*, 29, 281–286.
3. Avram M., Avram S., James W. (2007). Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *American Academy of Dermatology*, 56, 472-492.
4. Bernard A, Cohen R, Khuth ST, et al. (1999). Alteration of the leptin network in late morbid obesity induced in mice by brain infection with canine distemper virus. *Journal of virology*, 73(9):73, 17–27.
5. Bernard A, Fevre-Montange M, Bencsik A, et al. (1993). Brain structures selectively targeted by Canine Distemper Virus in a mouse model infection. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 52(5), 471–80.
6. Broderick, M. P., Hansen, C. J., Irvine, M., Metzgar, D., Campbell, K., Baker, C., & Russell, K. L. (2009). Adenovirus 36 seropositivity is strongly associated with race and gender, but not obesity, among US military personnel. *International Journal of Obesity*, 34(2), 302–308. doi:10.1038/ijo.2009.224
7. Chomczynski P & Sacchi N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols*, 1, 581–585.
8. De Lorenzo A, Soldati L, Sarlo F, Calvani M, Di Lorenzo N, Di Renzo L. (2016). New obesity classification criteria as a tool for bariatric surgery indication. *World Journal of Gastroenterology*, 22(2), 681-703.
9. Dhurandhar N.V. (2001). Infectobesity: obesity of infectious origin. *Journal Nutrition*, 131:2794S–2797S.

10. Dhurandhar N.V. (2004). Contribution of pathogens in human obesity. *Drug News & Perspectives*, 17(5), 307–13.
11. Dhurandhar NV, Israel BA, Kolesar JM, Mayhew G, Cook ME, Atkinson RL. (2001). Transmissibility of adenovirus-induced adiposity in a chicken model. *International journal of obesity and related metabolic disorders*, 25(7), 990–6.
12. Dhurandhar NV, Kulkarni P, Ajinkya SM, Sherikar A. (1992). Effect of adenovirus infection on adiposity in chicken. *Veterinary microbiology*. 31(2-3), 101–7.
13. Dhurandhar, N.V. (2013). Insulin sparing action of adenovirus 36 and its e4orf1 protein. *Journal Diabetes Complicat*, 27, 191–199.
14. Fox S., Massaro M., Hoffmann U., et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*, 116, 39-48.
15. Gabbert, C., Donohue, M., Arnold, J., & Schwimmer, J. B. (2010). *Adenovirus 36 and Obesity in Children and Adolescents. PEDIATRICS*, 126(4), 721–726. doi:10.1542/peds.2009-3362
16. Goossens VJ, deJager SA, Grauls GE, Gielen M, Vlietinck RF, Derom CA, Loos RJF, Rensen SS, Buurman WA, Greve JW, van Baak MA, Wolffs PF, Bruggeman CA, Hoebe CJPA. (2011). Lack of Evidence for the Role of Human Adenovirus-36 in Obesity in a European Cohort. *Obesity*, 19, 220–221.
17. Hamer M, Batty GD, Kivimäki M. (2016). Obesity, metabolic health, and history of cytomegalovirus infection in the general population. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 101(4), 1680–5
18. Kim H. s., Plutzky J. (2016). Brown Fat and Browning for the Treatment of Obesity and Related Metabolic Disorders. *Diabetes Metabolims Journal*, 40, 12-21.
19. Kvist H, Chowdhury B, Grangård U, Tylén U, Sjöström L. (1988). Total and visceral adipose-tissue volumes derived from measurements with computed

- tomography in adult men and women: predictive equations. *The American journal of clinical nutrition*, 48(6), 1351–61.
20. Lemieux S, Prud'homme D, Bouchard C, Tremblay A, Després JP. (1993). Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness. *The American journal of clinical nutrition*, 58(4), 463–67.
  21. Link JC, Reue K. (2017). Genetic Basis for Sex Differences in Obesity and Lipid Metabolism. *Annual review of nutrition*, 37, 225-245.
  22. Lyons, M.J., Faust, I.M., Hemmes, R.B., et al. (1982). A virally induced obesity syndrome in mice. *Science*, 216, 82–85.
  23. Mathieu P, Lemieux I, Després JP. (2010). Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 87(4), 407-16.
  24. Mitra A.K., Clarke K. (2010). Viral obesity: Fact or fiction?. *Obesity Reviews*, 11, 289–296.
  25. Nemerow GR, Pache L, Reddy V, Stewart PL. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology*. 2008; 384(2): 380-388.
  26. Organización Mundial de la Salud. (2018). Obesidad y sobrepeso. Obtenida el 5 de Enero de 2019, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
  27. Parra-Rojas I., Del Moral-Hernández O., Salgado-Bernabé A.B., Guzmán-Guzmán I.P., Salgado-Goytia L., Muñoz-Valle J.F. (2013). Adenovirus-36 Seropositivity and Its Relation with Obesity and Metabolic Profile in Children. *International Journal of Endocrinology*, 463194.
  28. Pasarica M., Shin A.C., Yu M., Ou Yang H.M., Rathod M., Jen K.L., MohanKumar S., MohanKumar P.S., Markward N., Dhurandhar N.V. (2006). Human adenovirus 36 induces adiposity, increases insulin sensitivity, and alters hypothalamic monoamines in rats. *Obesity*, 14: 1905–1913.
  29. Ponterio E, Cangemi R, Mariani S, Casella G, De Cesare A, Trovato FM, et al. (2015). Adenovirus 36 DNA in human adipose tissue. *International Journal of Obesity*, 39(12), 1761-4.

30. Ponterio E., Gnessi L. (2015). Adenovirus 36 and Obesity: An Overview. *Viruses*, 7(7), 3719-3740.
31. Rathod, M., Vangipuram, S. D., Krishnan, B., Heydari, A. R., Holland, T. C., & Dhurandhar, N. V. (2006). Viral mRNA expression but not DNA replication is required for lipogenic effect of human adenovirus Ad-36 in preadipocytes. *International Journal of Obesity*, 31(1), 78–86. doi:10.1038/sj.ijo.0803358
32. Rogers P.M., Fusinski K.A., Rathod M.A., Loiler S.A., Pasarica M., Shaw M.K., Kilroy G., Sutton G.M., McAllister E.J., Mashtalir N., et al. (2008). Human adenovirus Ad-36 induces adipogenesis via its e4 orf-1 gene. *International Journal of Obesity*, 32, 397–406.
33. S. Ergin, E. Altan, O. Pilanci, S. Sirekbasan, O. Cortuk, U. Cizmecigil, 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, 57-62.
34. Salehian B, Forman S.J, Kandeel F.R, Bruner D.E, He J., Atkinson R.L. (2010). Adenovirus 36 DNA in adipose tissue of patient with unusual visceral obesity. *Emerging Infectious Diseases*, 16(5), 850-852.
35. Sclafani, A. (1984). Animal models of obesity: classification and characterization. *International Journal Obesity*, 8, 491–508.
36. Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, Romero-Martínez M, Mojica-Cuevas J, Cuevas-Nasu L, Santaella-Castell JA, Rivera-Dommarco J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2020.
37. Shang Q, Wang H, Song Y, 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):895–900.
38. Stasiak, A. C., & Stehle, T. (2019). Human adenovirus binding to host cell receptors: a structural view. *Medical Microbiology and Immunology*. doi:10.1007/s00430-019-00645-2

39. Vangipuram S.D., Sheele J., Atkinson R.L., Holland T.C., Dhurandhar N.V. (2004). A human adenovirus enhancer's preadipocyte differentiation. *Obesity Research*, 12 770–777.
40. Vincent van Ginneken A, Laura Sitnyakowsky b, Jonathan E. Jeffery c. (2009). “Infectobesity: viral infections (especially with human adenovirus-36: Ad-36) may be a cause of obesity. *Medical Hypotheses* 72, 383–388
41. Voss, J. D., & Dhurandhar, N. V. (2017). Viral infections and obesity. *Current Obesity Reports*, 6, 28–37.
42. Whigham LD, Israel BA, Atkinson RL. (2006). Adipogenic potential of multiple human adenoviruses in vivo and in vitro in animals. *American journal of physiology*, 290(1), 190–4.
43. Xu MY, Cao B, Wang DF, et al. Human Adenovirus 36 Infection Increased the Risk of Obesity: A Meta-Analysis Update. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(51):e2357.
44. Yamada T, Hara K, Kadowaki T. Association of Adenovirus 36 Infection with Obesity and Metabolic Markers in Humans: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e42031.



ANEXOS.

**Table 1.** Frequency of HAd36 positivity by type of surgery

Type of Surgery	HAd36-negative n=36 (73%)	HAd36-positive n=16 (27%)	<i>P</i>
Liposuction	30 (83)	11 (69)	0.23*
Lipectomy	6 (17)	5 (31)	

**Notes:** \*  $\chi^2$  test

**Abbreviation:** HAd36, Human adenovirus-36; PCR, polymerase chain reaction; BMI, body mass index.

**Table 2.** Frequency of HAd36 positivity grouped by BMI and type of surgery.

Type of Surgery	Normal-weight n=(16)			Overweight n= (26)			Obesity n=(10)		
	HAd36-negative n=9	HAd36-positive n=7	<i>P</i>	HAd36-negative n=22	HAd36-positive n=4	<i>P</i>	HAd36-negative n=5	HAd36-positive n=5	<i>P</i>
Liposuction	8 (89)	6 (86)	0.70*	19 (86)	2 (50)	0.15*	3 (60)	3 (60)	0.73*
Lipectomy	1 (11)	1 (14)		3 (14)	2 (50)		2(40)	3 (40)	

**Notes:** \*Exact fisher test; Normal-weight 18.5-24.9 kg/m<sup>2</sup>; Overweight 25-29.9 kg/m<sup>2</sup>; Obesity ≥30 kg/m<sup>2</sup>.

**Abbreviation:** HAd36 Human adenovirus-36; PCR, polymerase chain reaction; BMI, body mass index.

**Table 3.** Correlation between the expression levels of HIF-1 $\alpha$  and C/EBP $\beta$  with anthropometric and morphological variables of adipose tissue.

Variables	mRNA <i>HIF-1<math>\alpha</math></i>		mRNA <i>C/EBP<math>\beta</math></i>	
	r	p	r	p
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.01	0.94	0.1	0.59
Hip circumference (cm)	0.003	0.98	0.04	0.76
Adipocyte/field	-0.24	0.34	0.04	0.88
Adipocyte diameter ( $\mu$ m)	-0.09	0.72	-0.11	0.65
mRNA <i>C/EBP<math>\beta</math></i>	0.06	0.70	-	-

**Notes:** r = Spearman's correlation coefficient; p = p value; BMI = body mass index; Circ. Waist = waist circumference

**Table 4.** Correlation between *HIF-1 $\alpha$*  and *C/EBP $\beta$*  expression levels by group of positivity with anthropometric and morphological variables.

Variables	mRNA de <i>HIF-1<math>\alpha</math></i>				mRNA de <i>C/EBP<math>\beta</math></i>			
	HAd36-negative		HAd36-positive		HAd36-negative		HAd36-positive	
	r	P	r	P	r	P	r	P
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.06	0.71	-0.1	0.77	-0.04	0.83	0.30	0.32
Hip circumference (cm)	-0.01	0.96	-0.05	0.87	-0.03	0.85	0.03	0.91
Adipocyte/field	-0.26	0.32	0.50	0.67	0.07	0.79	- 0.50	0.67
Adipocyte diameter ( $\mu$ m)	-0.03	0.92	-0.5	0.67	-0.24	0.37	0.50	0.67
mRNA <i>C/EBP</i>	0.05	0.77	0.02	0.95	-	-	-	-

**Notes:** r = Spearman's correlation coefficient; p = p value; BMI = body mass index; Circ. Waist = waist circumference

**Table 5.** Prevalence of seropositivity by ELISA for HAd36 grouped by BMI

Group	HAd36-negative n=35 (67%)	HAd36-positive n=17 (33%)	P
Normal-weight	12 (34%)	4 (23%)	0.18*
Overweight	15 (43%)	11 (65%)	
Obesity	8 (23%)	2 (12%)	

**Notes:** \* X<sup>2</sup> test

**Abbreviation:** HAd36, Human adenovirus-36; ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; BMI, body mass index

**Table 6.** Comparison of clinical and anthropometric characteristics according to seropositivity by ELISA for HAd36

Variable	HAd36-negative n= 35 (67%)	HAd36-positive n= 17 (33%)	P
Age (years)**	40 (31-50)	34 (26-39)	0.128
Height (cm)*	1.58 ± 0.05	1.60 ± 0.05	0.284
Waist circumference (cm)*	91.2 ± 11.2	89.0 ± 9.9	0.509
Hip circumference (cm)**	102 (97-107)	102 (98-107)	0.992
Weight (kg)*	67.1 ± 9.4	67.9 ± 7.4	0.759
BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	26.8 ± 3.9	26.5 ± 3.0	0.797
SBP (mmHg)*	117.3 ± 18.3	114.2 ± 13.4	0.532
DBP (mmHg)*	76.1 ± 15.0	78.6 ± 11.9	0.559
Waist-hip-ratio *	0.87 ± 0.07	0.86 ± 0.05	0.861
Arm Circumference (cm)**	30.0 (27.0-32.0)	30.5 (28.0-32.0)	0.899
Body fat mass (%)*	33.7 ± 7.2	35.4 ± 6.5	0.433
Bicipital skinfold (mm)*	25.2 ± 8.1	28.9 ± 9.8	0.157
Tricipital skinfold (mm)*	27.5 ± 6.9	29.8 ± 6.0	0.264
Subscapular skinfold (mm)**	26.0 (22.0-32.0)	30.0 (28.0-42.0)	0.094
Glucose (mg/dL)**	85.0 (81.3-95.0)	91.0 (81.0-94.0)	0.526
Total Cholesterol (mg/dL)*	160.0 ± 47.0	150.9 ± 45.2	0.513
Triglycerides (mg/dL)**	78.5 (60.0-105.0)	67.0 (60.0-81.3)	0.171

**Notes:**\*Data presented mean ± SD, Welch's t-test. \*\*Data presented as median and 25th and 75th percentile, Mann Whitney test. **Abbreviations:** BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

**Table 7.** Comparison of clinical and anthropometric characteristics grouped by BMI and positivity by ELISA for HAd36.

Variable	Normal-weight			Overweight			Obesity		
	n=16		P	n=26		P	n=10		P
	HAd36- negative n=12	HAd36-positive n=4		HAd36-negative n=15	HAd36-positive n=11		HAd36-negative n=8	HAd36-positive n=2	
Age (years)**	32 (29-45)	38 (30-45)	0.761	40 (36-50)	34 (30-54)	0.310	45 (41-51)	24 (22-25)	0.034
Height (cm)*	1.60 ± 0.04	1.62 ± 0.06	0.405	1.57 ± 0.05	1.59 ± 0.05	0.462	1.58 ± 0.07	1.64 ± 0.06	0.355
Waist circumference (cm)*	81.8 ± 7.6	76.3 ± 4.3	0.190	90.8 ± 4.2	91.7 ± 6.4	0.688	105.8 ± 9.6	100.0 ± 11.3	0.481
Hip circumference (cm)**	94.0 (91.5-98.5)	95.0 (92.5-95.0)	0.807	103.5 (102.0-105.0)	103.3 (101.0-107.5)	0.958	114.5 (106.5-133.5)	109.5 (103.0-116.0)	0.599
Weight (kg)*	57.9 ± 5.0	58.9 ± 3.9	0.715	67.6 ± 3.8	68.6 ± 2.9	0.477	80.0 ± 5.0	82.1 ± 4.5	0.608
BMI (kg/m2)*	22.5 ± 1.3	22.4 ± 2.1	0.926	27.4 ± 1.5	27.2 ± 1.5	0.768	32.0 ± 2.0	30.7 ± 0.7	0.394
SBP (mmHg)*	114.3 ± 22.6	106.8 ± 12.2	0.538	115.9 ± 15.7	118.2 ± 13.4	0.697	124.5 ± 15.8	107.0 ± 11.3	0.187
DBP (mmHg)*	74.4 ± 19.3	77.3 ± 7.7	0.783	76.0 ± 12.2	80.9 ± 13.4	0.341	79.0 ± 14.0	68.5 ± 0.7	0.341
Waist-hip-ratio *	0.86 ± 0.07	0.81 ± 0.02	0.221	0.87 ± 0.05	0.88 ± 0.06	0.588	0.89 ± 0.10	0.91 ± 0.03	0.825
Arm Circumference (cm)**	25.5 (23.5-28.5)	24.5 (23.5-25.5)	0.393	30.5 (29.0-32.0)	30.5 (29.0-32.0)	0.479	35.0 (32.5-38.9)	33.0 (31.0-35.0)	0.428
Body fat mass (%)*	27.9 ± 7.2	33.4 ± 12.4	0.291	35.2 ± 4.1	36.5 ± 3.3	0.387	39.7 ± 5.8	33.0 ± 7.8	0.202
Bicipital skinfold (mm)*	19.9 ± 7.3	21.0 ± 10.4	0.819	25.9 ± 5.7	30.0 ± 7.1	0.117	31.8 ± 8.5	38.5 ± 16.3	0.410
Tricipital skinfold (mm)*	23.5 ± 6.2	23.0 ± 6.6	0.893	27.5 ± 5.8	30.9 ± 3.0	0.093	33.6 ± 5.9	37.0 ± 7.1	0.501
Subscapular skinfold (mm)**	21.0 (17.0-26.0)	27.0 (23.0-31.0)	0.161	28.0 (26.0-32.0)	32.0 (28.0-42.0)	0.209	32.0 (29.0-43.0)	42.0 (30.0-54.0)	0.510
Glucose (mg/dL)**	83.5 (82.0-86.5)	92.9 (87.9-95.0)	0.033	84.0 (79.0-93.0)	91.0 (81.0-94.0)	0.349	99.5 (80.0-109.6)	75.6 (74.1-77.0)	0.296
Total Cholesterol (mg/dL)*	151.2 ± 38.1	139.0 ± 16.6	0.551	168.9 ± 53.2	160.1 ± 53.8	0.680	156.3 ± 49.4	124.5 ± 6.4	0.411
Triglycerides (mg/dL)**	76.0 (55.0-135.0)	55.0 (51.0-58.5)	0.133	85.0 (72.0-103.0)	75.0 (66.0-97.0)	0.334	77.0 (61.0-193.5)	66.0 (56.0-76.0)	0.295

**Notes:**\*Data presented mean ± SD, Welch's t-test. \*\*Data presented as median and 25th and 75th percentile, Mann Whitney test.

**Abbreviations:** BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.