



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Relación del HAdV-D36 con la expresión de los genes *ADIPOQ*,
MYC, *HK2* y *PFKM* en tejido adiposo de personas con exceso de
peso y su relación con la sensibilidad a la insulina”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta:

Q.B.P. Dulce Elena Silva Silverio

Directora de tesis:

Dra. Isela Parra Rojas

Chilpancingo, Gro. Junio del 2018.



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

APROBACIÓN DE TESIS

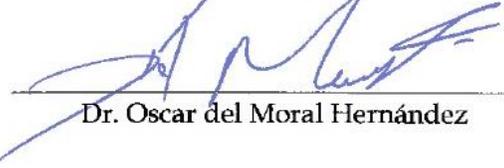
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 28 días del mes de noviembre de dos mil diecisiete se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “Relación del HAdV-D36 con la expresión de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM* en tejido adiposo de personas con exceso de peso y su relación con la sensibilidad a la insulina”, presentada por la alumna Dulce Elena Silva Silverio, para obtener el Grado de Maestría 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


Dr. Lorenzo Salgado Goytia


Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán


Dr. Oscar del Moral Hernández


Dr. Ramón González García Conde

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



UAGro
Coordinación del
Posgrado de la UAGro

Vo. Bo

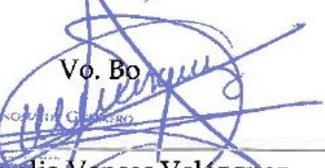

Dra. Isela Parra Rojas

Coordinadora del Posgrado de la Facultad de
Ciencias Químico Biológicas
Coordinación 2014-2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



Vo. Bo


Dra. Angélica Vences Velázquez

DIRECTORA 2014-2018
Directora de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes, de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Isela Parra Rojas

La asesoría de:

Dr. Lorenzo Salgado Goytia

Dr. Oscar del Moral Hernández

Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán

Dr. Ramón González García Conde

Durante el periodo en que se cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Dulce Elena Silva Silverio recibió la beca del CONACYT (Del 1 de Septiembre del 2015 al 31 de Agosto del 2017).

Agradecimientos

Un especial agradecimiento a mi mamá académica, la Dra. Isela Parra Rojas por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su dirección. Por creer en mí, por su paciencia y comprensión en los momentos difíciles; por sus consejos que me ayudaron a crecer como ser humano y no sólo como científica; por eso y mucho más, mi más sincero reconocimiento y admiración. La quiero Doc.

A mis sinodales, la Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán, el Dr. Óscar del Moral Hernández, el Dr. Lorenzo Salgado Goytia y el Dr. Ramón González por su amabilidad y disponibilidad para orientarme, así como por sus valiosos consejos, observaciones y correcciones para mejorar este trabajo, sin los cuales no habría podido culminar con este proyecto.

A mí amada familia por ser el motor que me ha impulsado para alcanzar mis metas incondicionalmente. En especial a mis abuelitos Ernesta Guevara y David Silverio por la confianza, compañía y comprensión que me brindaron en los momentos difíciles de esta etapa de mi vida.

A mis amigos quienes han estado a mí lado, brindándome siempre palabras de aliento y apoyándome de mil maneras más para seguir adelante en todo momento. A David, por haber llegado cuando más lo necesitaba y convertirse en una de las personas más importantes en mi vida.

Finalmente gracias a Dios por permitirme culminar con este sueño y disfrutarlo a lado de mis seres queridos.

ÍNDICE

I. RESUMEN	8
II. ABSTRACT	9
III. MARCO TEÓRICO.....	10
1. Insulina y homeostasis de la glucosa	10
2. Señalización de la insulina.....	11
2.1 Eventos de señalización proximales al receptor de insulina	11
2.2 Eventos de señalización distales al receptor de insulina	12
2.3 Tráfico vesicular de las GSVs.....	13
3. Resistencia a la insulina.....	15
3.1 Mecanismos celulares extrínsecos de resistencia a la insulina	15
3.2 Mecanismos celulares intrínsecos de resistencia a la insulina	18
4. Adenovirus humano 36 y la sensibilidad a la insulina	19
4.1 Generalidades del HAdV-D36.....	19
4.2 Mecanismo de infección del HAdV-D36.....	20
4.3 HAdV-D36 y mecanismos que favorecen la sensibilidad a la insulina	21
5. HAdV-D36 y sensibilidad a la insulina en humanos	26
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
V. JUSTIFICACIÓN.....	29
VI. HIPÓTESIS.....	30
VII. OBJETIVOS.....	31
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
IX. RESULTADOS.....	37
X. DISCUSIÓN	44
XI. CONCLUSIONES	52
XII. PERSPECTIVAS	52
XIII. ANEXOS	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Oligonucleótidos empleados para la RT-qPCR.....	36
Cuadro 2. Características clínicas, antropométricas y bioquímicas de la población de estudio por IMC.....	37
Cuadro 3. Características clínicas, antropométricas y bioquímicas entre las pacientes positivas y negativas, con exceso de peso.....	38
Cuadro 4. Características clínicas, antropométricas y bioquímicas entre las pacientes positivas y negativas, con y sin resistencia a la insulina.....	39
Cuadro 5. Características clínicas, antropométricas y bioquímicas entre las pacientes positivas y negativas, con exceso de peso, con y sin resistencia a la insulina.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación del metabolismo por la insulina.....	10
Figura 2. Acciones de la señalización de la insulina.....	13
Figura 3. Modelos propuestos de las vías de señalización que dirigen la translocación de GLUT4 desde las GSVs hasta la membrana plasmática.....	14
Figura 4. Mecanismo molecular de resistencia a la insulina inducida por los FFA propuesto por Randle y cols., en 1965.....	17
Figura 5. Mecanismo alternativo de resistencia a la insulina inducida por los FFA propuesto por Shulman y cols., en el 2000.....	17
Figura 6. Mapa de los marcos de lectura abiertos y sus identidades en el genoma del HAdV-D36.....	20
Figura 7. Efecto del HAdV-D36 en la vía PI3K/Akt en tejido adiposo, músculo esquelético e hígado.....	24
Figura 8. Mecanismo de sobrerregulación de la glucólisis por las proteínas virales E4orf1, E4orf6 y E1A de los adenovirus propuesto por Thai y cols., en el 2014.....	26
Figura 9. Tipificación de las muestras mediante la técnica de PCR punto final.....	34
Figura 10. Expresión relativa del ARNm de los genes <i>ADIPOQ</i> , <i>MYC</i> , <i>HK2</i> y <i>PFKM</i> en muestras de tejido adiposo de mujeres con y sin exceso de peso.....	41

Figura 11. Expresión relativa del ARNm de los genes <i>ADIPOQ</i> , <i>MYC</i> , <i>HK2</i> y <i>PFKM</i> en muestras de tejido adiposo de mujeres con exceso de peso, positivas y negativas al HAdV-D36.....	41
Figura 12. Expresión relativa del ARNm de los genes <i>ADIPOQ</i> , <i>MYC</i> , <i>HK2</i> y <i>PFKM</i> en muestras de tejido adiposo de mujeres con y sin resistencia a la insulina.....	42
Figura 13. Expresión relativa del ARNm de los genes <i>ADIPOQ</i> , <i>MYC</i> , <i>HK2</i> y <i>PFKM</i> en muestras de tejido adiposo de mujeres sin resistencia a la insulina, positivas y negativas al HAdV-D36.....	42
Figura 14. Expresión relativa del ARNm de los genes <i>ADIPOQ</i> , <i>MYC</i> , <i>HK2</i> y <i>PFKM</i> en muestras de tejido adiposo de mujeres con resistencia a la insulina, positivas y negativas al HAdV-D36.....	43

I. RESUMEN

Introducción. El adenovirus humano 36 del grupo D (HAdV-D36) ha sido asociado con una mejor sensibilidad a la insulina en animales y en humanos. Los mecanismos propuestos implican la expansión del tejido adiposo, el incremento en la expresión génica y secreción de la adiponectina y la sobrerregulación de la vía PI3K/Akt en los tejidos insulino-sensibles. Recientemente se propuso que los adenovirus podrían incrementar la captación de la glucosa de manera independiente de la activación de la vía PI3K/Akt, sobrerregulando la glucólisis a través del incremento en la expresión de enzimas claves que participan en este proceso como HK2 y PFKM, genes blanco del factor de transcripción MYC, sin embargo se desconoce si el HAdV-D36 utiliza este mecanismo para mejorar la sensibilidad a la insulina.

Material y métodos. Se incluyeron 30 mujeres adultas, con una edad promedio de 38 años. Se obtuvieron muestras de sangre periférica y biopsias de tejido adiposo. A partir de las muestras de suero, se midieron los niveles de glucosa e insulina. Los niveles séricos de insulina se determinaron con un kit comercial de ELISA y la expresión del ARNm de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM* se determinó por RT-qPCR.

Resultados. Se detectó el ADN viral en el tejido adiposo de mujeres con peso normal (n=1) y con exceso de peso (n=6). La presencia del ADN viral en el tejido adiposo de mujeres adultas se asoció con una mayor sensibilidad a la insulina, menores niveles triglicéridos y mayor circunferencia de cintura y cadera. Las mujeres con resistencia a la insulina tuvieron mayores niveles de expresión de *ADIPOQ* y las mujeres sin resistencia a la insulina tuvieron mayores niveles de expresión de *HK2* y *PFKM*.

Conclusión. La presencia del ADN viral del HAdV-D36 en tejido adiposo de mujeres adultas, no se asocia con un incremento en la expresión de *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM*.

Palabras clave: Sensibilidad a la insulina, HAdV-D36, *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM*

II. ABSTRACT

Introduction. The human adenovirus 36 of group D (HAdV-D36) has been associated with better insulin sensitivity in animals and in humans. The proposed mechanisms involve the expansion of adipose tissue, the increase in gene expression and secretion of adiponectin, and upregulation of the PI3K/Akt pathway in insulin-sensitive tissues. Recently, it was proposed that adenoviruses could increase glucose uptake independently of activation of the PI3K/Akt pathway, by upregulating glycolysis through the increase in the expression of key enzymes involved in this process, such as HK2 and PFKM, target genes of the transcription factor MYC however, it is unknown if HAdV-D36 uses this mechanism to improve insulin sensitivity. **Material and methods.** We included 30 adult women with an average age of 38 years. Peripheral blood samples and adipose tissue biopsies were obtained. From the serum samples, the glucose and insulin levels were measured. The serum insulin levels were determined with a commercial ELISA kit and the mRNA expression of the *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* and *PFKM* genes was determined by RT-qPCR. **Results.** Viral DNA was detected in the adipose tissue of women with normal weight (n = 1) and with excess weight (n = 6). The presence of viral DNA in the adipose tissue of adult women was associated with an increased sensitivity to insulin, lower triglyceride levels and greater waist and hip circumference. Women with insulin resistance had higher levels of *ADIPOQ* expression and women without insulin resistance had higher expression levels of *HK2* and *PFKM*. **Conclusion.** The presence of the viral DNA of HAdV-D36 in adipose tissue of adult women is not associated with an increase in the expression of *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* and *PFKM*.

Key words: Insulin sensitivity, HAdV-D36, *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* and *PFKM*

III. MARCO TEÓRICO

1. Insulina y homeostasis de la glucosa

En una persona saludable los niveles de glucosa en plasma se encuentran en un rango de 4 mM a 7 mM, a pesar de los periodos de ayuno y de alimentación. Este control es el resultado de un equilibrio entre la absorción de glucosa por el intestino, la producción de glucosa por el hígado y la absorción y metabolismo de la glucosa por los tejidos periféricos. La insulina regula las concentraciones de glucosa sanguíneas estimulando la captación de glucosa en músculo esquelético y en tejido adiposo, e inhibiendo la producción de glucosa hepática. También promueve el almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas en hígado, tejido adiposo y músculo mediante la estimulación de la lipogénesis, la síntesis de glucógeno y de proteínas, y la inhibición de la lipólisis, la glucogenólisis y la degradación de proteínas (Figura 1), estimula también el crecimiento y diferenciación celular (Saltiel and Kahn, 2001).

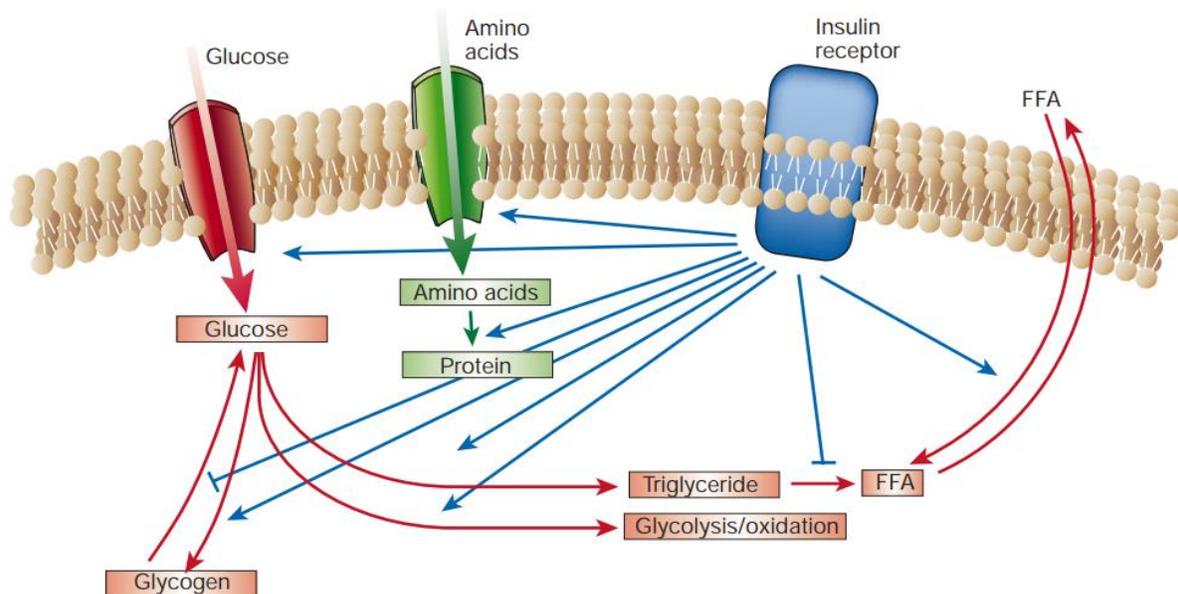


Figura 1. Regulación del metabolismo por la insulina. La insulina es la hormona anabólica más potente, promueve la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas, mientras inhibe su degradación y liberación a la circulación. La insulina estimula la captación de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos en las células, e incrementa la expresión o actividad de enzimas que catalizan la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas, mientras inhibe la actividad o expresión de aquellas que catalizan su degradación (Saltiel and Kahn, 2001).

En respuesta a la insulina, la captación de glucosa en el músculo esquelético y el tejido adiposo, es mediada por el transportador de glucosa GLUT4, una proteína transmembranal que permite la internalización de la glucosa sanguínea a las células mediante un mecanismo de difusión facilitada. En las células no estimuladas por la insulina, GLUT4 es secuestrado en compartimentos intracelulares especializados denominados vesículas de almacenamiento de GLUT4 (GSVs). También se localiza en diversos compartimentos intracelulares incluidos los endosomas tempranos (EE), el compartimento de reciclaje endosomal (ERC) y la red trans golgi (TGN). El GLUT4 localizado en la membrana plasmática se incorpora a los ERC a través de endocitosis, y el GLUT4 sintetizado *de novo* es transportado a través de la red TGN. Después de la estimulación con insulina, GLUT4 se transloca de las GSVs a la membrana plasmática por una vía exocítica (Satoh, 2014).

2. Señalización de la insulina

2.1 Eventos de señalización proximales al receptor de insulina

La insulina es una proteína de 51 aminoácidos, sintetizada y secretada por las células β de los islotes pancreáticos. Consiste en dos cadenas polipeptídicas, A y B, de 21 y 30 aminoácidos, respectivamente, que están conectados por puentes disulfuro. La insulina ejerce sus efectos biológicos mediante la unión y activación de su receptor celular específico, el receptor de insulina (IR). El IR es una proteína heterotetramérica que está constituida por dos subunidades α y dos subunidades β unidas mediante puentes disulfuro. La insulina se une a la subunidad extracelular α , transmitiendo una señal a través de la membrana plasmática que activa al dominio intracelular con actividad tirosina cinasa de la subunidad β , la activación de la subunidad β conduce a la transfosforilación de las subunidades β en residuos de tirosina (Pessin and Saltiel, 2000).

Una vez activado, el IR fosforila a varios sustratos en residuos de tirosina. Se han identificado al menos 9 sustratos para el receptor de insulina. 4 de estos pertenecen a la familia de los sustratos receptores de insulina (IRS 1, 2, 3 y 4). Otros sustratos incluyen a Gab1, p60^{dok}, Cb1, APS e isoformas de Shc. Las tirosinas fosforiladas en

estos sustratos actúan como sitios de acoplamiento para proteínas que contienen dominios SH2 (Src-Homology-2). Muchas de las proteínas con dominios SH2 son moléculas adaptadoras, como la subunidad reguladora p85 de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), Grb2 y CRKII, que activan a proteínas G pequeñas mediante la unión a factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs). Los sustratos de unión a las proteínas SH2 pueden regular su actividad, o en algunos casos, su ubicación subcelular (Saltiel and Kahn, 2001).

2.2 Eventos de señalización distales al receptor de insulina

PI3K tiene un papel fundamental en los efectos metabólicos y mitogénicos de la insulina. PI3K consiste en una subunidad catalítica p110 y una subunidad reguladora p85 que posee dos dominios SH2 que interactúan con los motivos pYMXM y pYXMM fosforilados de los IRSs. Se han identificado al menos 8 isoformas de la subunidad reguladora. El papel exacto de las diferentes isoformas de la subunidad reguladora de PI3K en las acciones de la insulina no está completamente claro. PI3K cataliza la fosforilación de fosfoinosítidos en la posición 3 para producir fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato PI(3,4,5)P3 y fosfatidilinositol-3,4-bifosfato PI(3,4)P2, que se unen a los dominios de homología a pleckstrina (PH) de una variedad de moléculas de señalización alterando así su actividad o localización subcelular. Los PIP3 regulan 3 clases principales de moléculas de señalización: la familia de proteínas cinasas AGC, GEFs de la familia de GTPasas Rho y la familia de tirosina cinasas TEC. La cinasa AGC mejor caracterizada es la cinasa dependiente de fosfoinosítido 1 (PDK1), una de las serina cinasas que activa a la cinasa de serina/treonina Akt, también conocida como proteína cinasa B (PKB). Akt tiene 3 isoformas (Akt 1, 2 y 3), también conocidas como (PKB α , β y γ). Estas isoformas comparten la misma estructura general la cual consiste en un dominio PH en el extremo N-terminal y un dominio catalítico en el extremo C-terminal sin embargo, tienen diferentes efectos biológicos. De las 3 isoformas de Akt, Akt2 es la única que se ha relacionado con la homeostasis de la glucosa (Figura 2) (Taniguchi *et al.*, 2006).

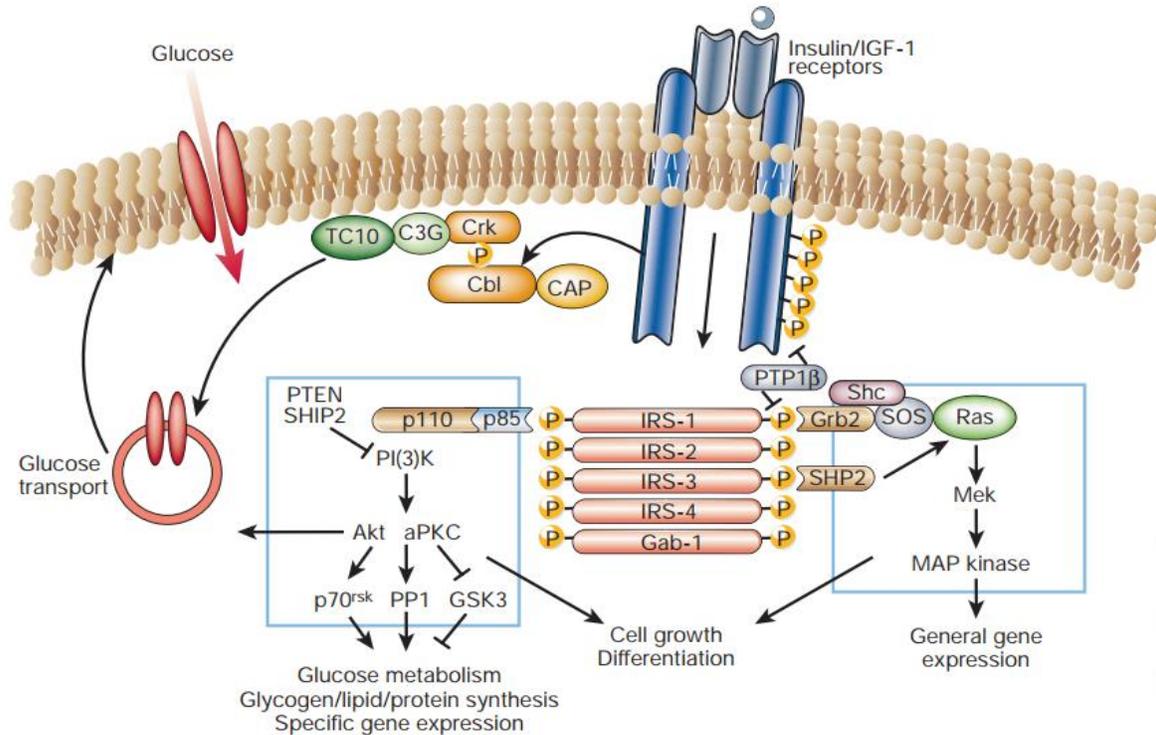


Figura 2. Acciones de la señalización de la insulina. El receptor de insulina es una tirosina cinasa que se autofosforila y cataliza la fosforilación de los IRS, Shc y Cbl. Estas proteínas interactúan con otras moléculas de señalización a través de sus dominios SH2, lo que resulta en la activación de diversas vías de señalización incluida la vía de PI3K-Akt, Ras-MAPK y Cbl/CAP (Saltiel and Kahn, 2001).

2.3 Tráfico vesicular de las GSVs

El mecanismo por el cual la activación de Akt2 converge en la translocación de GLUT4 no está completamente claro, sin embargo, estudios recientes sugieren que Akt2 regula la captación de glucosa a través de la fosforilación e inhibición de la proteína AS160 también denominada Tbc1D4. AS160 es una proteína activadora de GTPasas de la familia Rab. La inhibición de AS160 conduce a la activación de diferentes GTPasas pequeñas Rab, que están involucradas con la reorganización del citoesqueleto que se requiere para la translocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática (Bogan, 2012).

Algunas de las proteínas Rab activadas por AS160 son Rab4, Rab5 y Rab10, las cuales se localizan en las GSVs. Rab5 regula la formación de los endosomas tempranos y su transporte desde la membrana plasmática. Rab10 ha sido implicada

en la translocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática de los adipocitos. Otros miembros de la subfamilia Rab10 como Rab8A y Rab13 están implicados en la translocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática en músculo esquelético (Satoh, 2014).

Por otro lado, dos GTPasas pequeñas de la familia Rho, Rac y CDC42 también han sido implicadas con la translocación de GLUT4. Rac y CDC42 son activadas por el intercambio de GDP a GTP, lo cual conduce a un cambio conformacional que permite la interacción de las GTPasas pequeñas con diferentes proteínas efectoras río abajo, varias de las cuales están involucradas con el rearrreglo del citoesqueleto de actina. Esta propiedad es la que relaciona a Rac con la translocación de GLUT4 en músculo esquelético, mientras que CDC42 podría tener este papel en los adipocitos (Figura 3) (Taniguchi *et al.*, 2006).

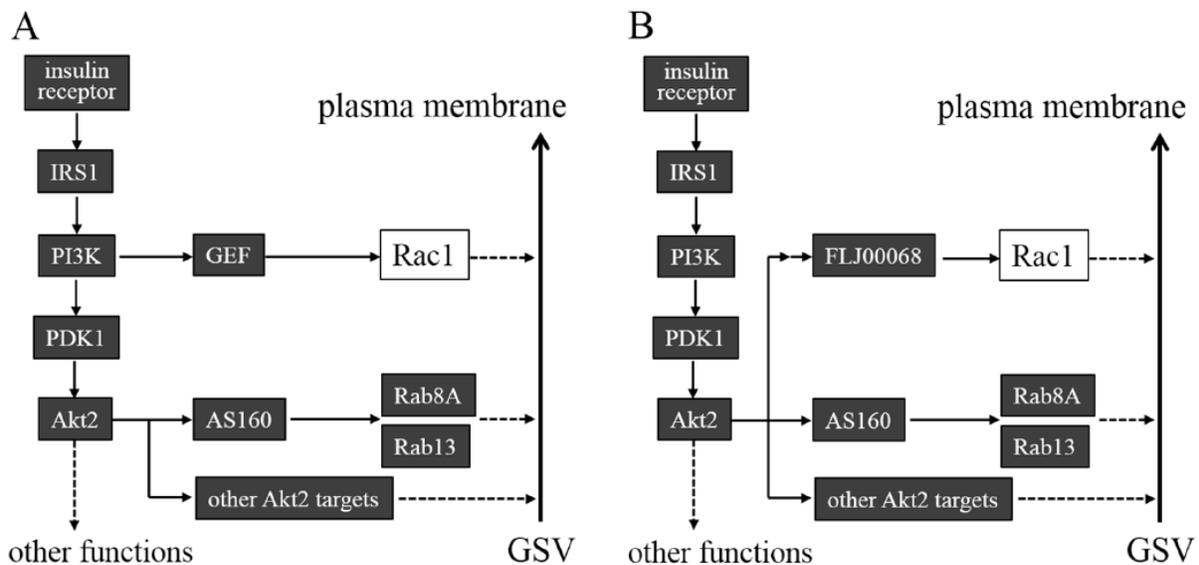


Figura 3. Modelos propuestos de las vías de señalización que dirigen la translocación de GLUT4 desde las GSVs hasta la membrana plasmática. (A) La insulina estimula una cascada de señalización compuesta por el IR, IRS-1, PI3K, PDK1 y Akt2. Akt2 y Rac1 funcionan independientemente río abajo de PI3K. El GEF que regula a Rac1 es desconocido. AS160 es un sustrato de Akt2, la cual actúa como una proteína activadora de GTPasas (GAP) como Rab8A y Rab13. Otros objetivos de Akt2 también pueden regular la exocitosis de GLUT4. (B) Rac1 es regulada río abajo de Akt2. El GEF FLJ00068 ha sido implicado en la regulación de Rac1 río abajo de Akt2 (Satoh, 2014).

3. Resistencia a la insulina

Cuando las células dejan de responder adecuadamente a las acciones de la insulina, se presentan un estado patológico conocido como resistencia a la insulina. Esta señalización deficiente de la insulina es causada por diferentes alteraciones, incluyendo mutaciones y/o modificaciones postraduccionales en el IR, los IRS 1 y 2 o en las moléculas efectoras río abajo. Estas alteraciones provocan una disminución de la captación de glucosa en los tejidos insulino-sensibles promoviendo un estado de hiperglicemia crónica (Gutiérrez-Rodelo *et al.*, 2017). La presencia de dichas alteraciones se ha asociado con diferentes patologías sin embargo, se considera que la obesidad es el principal factor de riesgo asociado con su desarrollo en la población en general (Pessin and Saltiel, 2000). Se han identificado varios mecanismos celulares intrínsecos y extrínsecos, que muestran una relación causa-efecto entre la obesidad y la resistencia a la insulina. Los mecanismos celulares intrínsecos incluyen la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y el estrés de retículo endoplasmático (ER), mientras que las alteraciones en los niveles de adipocinas, ácidos grasos libres (FFA) y la presencia de inflamación en los tejidos insulino-sensibles, representan los principales mecanismos celulares extrínsecos que inhiben las acciones de la insulina (Boucher *et al.*, 2014).

3.1 Mecanismos celulares extrínsecos de resistencia a la insulina

En la obesidad existe una acumulación excesiva de lípidos, particularmente en el tejido adiposo, que provoca un aumento en el tamaño y número de los adipocitos y una secreción alterada de adipocinas y citocinas pro-inflamatorias así como de FFA. Además, se ha demostrado que la obesidad incrementa la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, lo que contribuye a la síntesis y secreción de citocinas en respuesta a la obesidad. Las citocinas pro-inflamatorias secretadas por el tejido adiposo y por los macrófagos incluyen a la resistina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), las interleucinas (IL) 6, 18 y 1 β , la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y la angiotensina (Ang) II. Estos factores, por un lado, contribuyen con el estado inflamatorio local y sistémico de la obesidad y, por otro lado, en el caso del TNF- α , IL-6, IL-18, IL-1 β y Ang I, pueden inducir resistencia a la

insulina directamente. En el caso de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β , inducen resistencia a la insulina por varios mecanismos, como la activación de cinasas de serina/treonina, disminución en la expresión y activación del IRS-1, GLUT4 y SOCS3.

Por otra parte, la acumulación de FFA y sus metabolitos derivados (DAG, acil-CoA y ceramidas) en músculo esquelético e hígado, también se ha asociado con resistencia a la insulina. De acuerdo con los estudios realizados por Randle y cols., en 1963, 1964 y 1965 se propuso que los ácidos grasos compiten con el sustrato para la oxidación de la glucosa, especulando que el incremento en la oxidación de grasas causa la resistencia a la insulina en las personas con obesidad. El mecanismo molecular que propusieron para explicar esto, fue que el incremento de FFA causaría una elevación de los niveles de acetil CoA/CoA y NADH/NAD⁺ intramitocondriales, con la subsecuente inactivación de la piruvato deshidrogenasa (PDH). Esto, a su vez, causaría un incremento en las concentraciones intracelulares de citrato, lo que llevaría a la inhibición de la fosfofructocinasa (PFK), una enzima clave que controla la velocidad de la glucólisis. Subsecuentemente, se incrementarían las concentraciones intracelulares de glucosa-6-fosfato, inhibiendo la actividad de la hexocinasa 2 (HK2), lo cual resultaría en un incremento de las concentraciones intracelulares de glucosa sin ser oxidada y una disminución en la captación de glucosa sanguínea (Figura 4).

Por otra parte, también se ha propuesto que el aumento de metabolitos derivados de los ácidos grasos, tales como, DAG, acil-CoA o ceramidas, activarían una cascada de cinasas de serina/treonina, posiblemente iniciada por PKC, conduciendo a la fosforilación en residuos de serina de los IRS 1 y 2. Los IRS 1 y 2 fosforilados en residuos de serina no pueden unirse a PI3K, resultando en una disminución de la activación del transporte de glucosa y algunos otros eventos de señalización (Figura 5) (Shulman *et al.*, 2000).

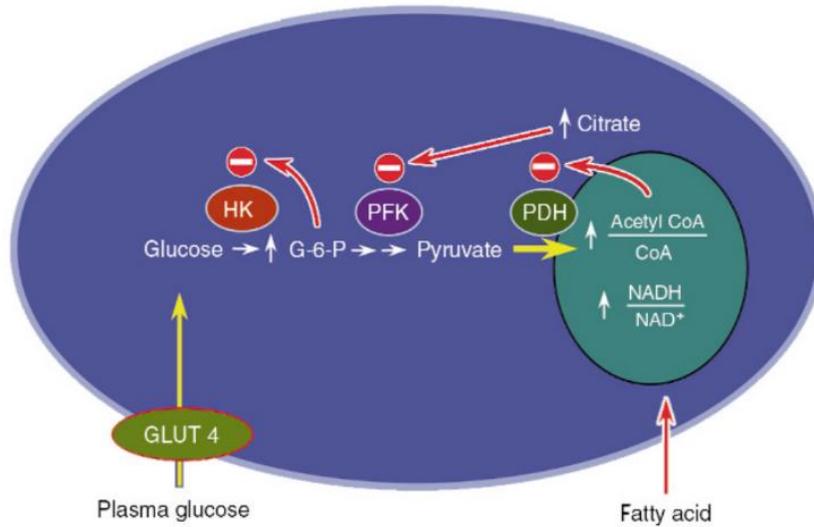


Figura 4. Mecanismo molecular de resistencia a la insulina inducida por los FFA propuesto por Randle y cols., en 1965. Un aumento en la concentración de ácidos grasos da como resultado una elevación de las relaciones intramitocondriales de acetil CoA/CoA y NADH/NAD⁺, con la posterior inactivación de la fosfato deshidrogenasa (PDH). Esto a su vez causa un aumento de las concentraciones de citrato, conduciendo a la inhibición de la fosfofructocinasa (PFK). Subsecuentemente se incrementan los niveles de glucosa-6-fosfato inhibiendo la actividad de la hexocinasa (HK), lo que daría como resultado un incremento de la concentración intracelular de glucosa y una disminución de la captación de glucosa.

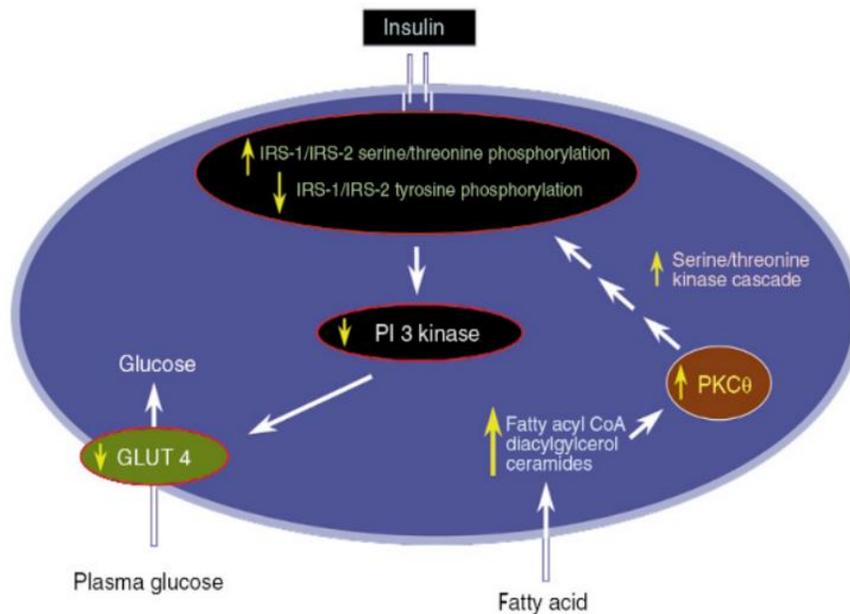


Figura 5. Mecanismo alternativo de resistencia a la insulina inducida por los FFA propuesto por Shulman y cols., en el 2000. Los metabolitos derivados de los ácidos grasos activan una cascada de señalización de cinasas serina/treonina iniciada por la proteína cinasa C (PKC), que conduce a la fosforilación de los sitios de serina/treonina en los sustratos receptores de insulina (IRS1 y 2), que a su vez disminuye la capacidad de los IRS para activar a PI3K. Como consecuencia disminuye el transporte de glucosa.

3.2 Mecanismos celulares intrínsecos de resistencia a la insulina

El exceso de almacenamiento de lípidos induce ER. La respuesta al ER, también conocida como respuesta a proteínas desplegadas (UPR) es un proceso adaptativo para asegurar el correcto plegamiento y maduración de las proteínas en el retículo endoplasmático. La UPR incluye la activación de tres cinasas sensoras de estrés, la proteína cinasa de ARN del retículo endoplasmático (PERK), la cinasa/endoribonucleasa dependiente de inositol 1 (IRE-1) y el factor de transcripción 6 (ATF6), que actúan en conjunto para reducir la carga de proteínas mal plegadas. PERK promueve la activación de NF- κ B por la supresión de su inhibidor I κ B, esto provoca la translocación NF- κ B al núcleo, donde promueve la expresión de una gran variedad de genes implicados en vías inflamatorias tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6, las cuales activan diferentes cinasas de serina tales como JNK, IKK- β y PKC- θ . La activación de estas cinasas resulta en la fosforilación del receptor de insulina o del IRS-1 en residuos de serina o treonina induciendo resistencia a la insulina. En el caso de IRE-1 la interacción con el factor 2 asociado al receptor del TNF- α conduce a la activación de IKK- β y JNK, que fosforilan al IRS-1, reduciendo su capacidad de activar a la vía PI3K/Akt (Gutiérrez-Rodelo *et al.*, 2017).

La disfunción mitocondrial también se ha asociado con resistencia a la insulina. En términos generales, esta se refiere a la disminución en la oxidación de carbohidratos y lípidos como resultado de una disminución general de la fosforilación oxidativa. La disminución en la oxidación de lípidos contribuye a la acumulación de FFA, DAG y ceramidas, que inhiben la señalización de la insulina. DAG promueve la activación de PKC, la cual fosforila e inhibe al IR. Las ceramidas regulan negativamente a Akt a través de la activación de PP2A, la reducción en la oxidación de lípidos también promueve la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales a altas concentraciones pueden causar estrés oxidativo y severos daños a nivel mitocondrial y celular, que potencialmente pueden conducir a la mitofagia o bajo condiciones de estrés severo a la apoptosis. La eliminación de las mitocondrias llevaría a una disminución de la oxidación de sustratos y la consiguiente

acumulación de lípidos. Las ROS por sí mismas pueden causar la activación de cinasas de serina/treonina, incluyendo IKK- β , JNK y PKC, que fosforilan a los IRS 1 y 2 en residuos de serina, conduciendo a la resistencia a la insulina (Montgomery and Turner, 2015).

4. Adenovirus humano 36 y la sensibilidad a la insulina

La resistencia a la insulina es una de las principales características patológicas asociadas con la diabetes mellitus tipo 2, y la diabetes es una de las principales causas de muerte en México y en el mundo. En la actualidad, el tratamiento para esta enfermedad consiste en dieta, ejercicio y el uso de diferentes fármacos. Los fármacos utilizados para el control de la diabetes actúan como sensibilizadores de la insulina, miméticos de la insulina o secretagogos, que requieren de la señalización de la insulina para obtener beneficios óptimos. Por este motivo, la existencia de fármacos que mejoren el control glucémico independientemente de las acciones de la insulina, ofrecería una gran ventaja. Investigaciones recientes, sugieren que el Adenovirus 36 humano (HAdV-D36), es un virus que incrementa la captación de glucosa independientemente de la señal de la insulina, mejorando el control glucémico. Aunque las propiedades anti-hiperglicémicas del HAdV-D36 podrían tener un gran potencial terapéutico, este virus también ha sido asociado con obesidad por lo que el mecanismo mediante el cual mejora el control glucémico requiere de un mayor esclarecimiento (Hegde *et al.*, 2016).

4.1 Generalidades del HAdV-D36

Los Adenovirus (miembros de la familia *Adenoviridae*) son virus no envueltos icosaédricos cuyo diámetro oscila entre un rango de 65 a 80 nm (Esposito *et al.*, 2012). La cápside se compone de 240 hexones homotriméricos, 12 pentones homopentámicos y 12 fibras homotriméricas, estos son estabilizados por las proteínas IIIa, VIII y IX. En el núcleo del virus se encuentra el genoma viral de tipo ADN bicatenario y proteínas nucleares como la proteína VI unida al penton de la cápside y las proteínas V y VII que empaquetan el ADN (Henaff *et al.*, 2011).

De acuerdo a la clasificación de Baltimore el Adenovirus humano 36 pertenece al grupo I dsDNA, familia *Adenoviridae*, género *Mastadenovirus*, especie *Adenovirus humano D* (HAdV-D), serotipo *Adenovirus humano-36* (HAdV-D36) (Van-Ginneken *et al.*, 2009). La longitud de su genoma es de 35,152 pb, su composición en pares de bases es de 22.5% Adenina, 20.3% Timina, 28.7% Guanina y 28.5% Citosina con un contenido de GC de 57.2 %. Posee 39 marcos de lectura abiertos (ORFs) cuya organización es similar a la de otros *Mastadenovirus*. Las secuencias terminales de repetición invertidas (ITR) son de 86 pb de longitud (Figura 6) (Arnold *et al.*, 2010).

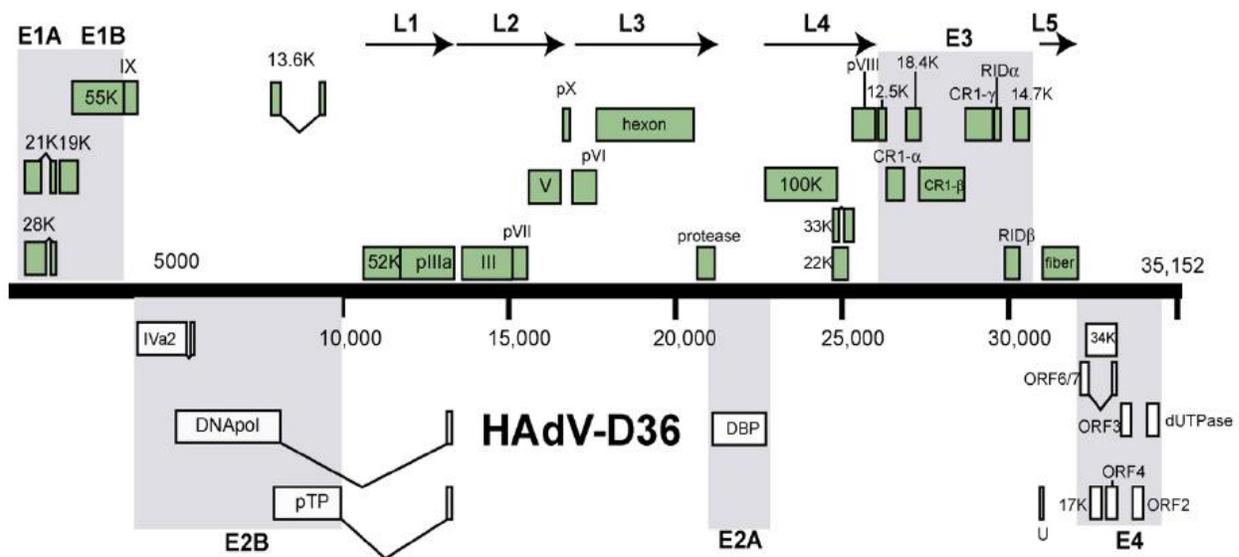


Figura 6. Mapa de los marcos de lectura abiertos y sus identidades en el genoma del HAdV-D36 (Arnold *et al.*, 2010).

4.2 Mecanismo de infección del HAdV-D36

La familia *Adenoviridae* utiliza una gran variedad de receptores que determinan el tropismo celular, en el caso de los HAdV-D se ha descrito que estos pueden interactuar con el Receptor de Coxsaqueivirus y Adenovirus (CAR), CD46, Ácido Siálico (SA) y con Proteoglicano Heparán Sulfato (HSPG) entre otros (Seiradake *et al.*, 2009). El HAdV-D36 interactúa con SA y CAR por medio de su fibra que contiene Tyr315 y Lys350 los cuales son aminoácidos críticos para la unión a SA, estos aminoácidos se encuentran presentes en todas las especies de HAdV-D, también

contiene 4 de los 13 aminoácidos conocidos que se necesitan para hacer contacto con CAR al igual que todos los Adenovirus humanos, sin embargo no contiene Arg279 o Arg280 los cuales son necesarios para la interacción con CD46 (Arnold *et al.*, 2010).

Una vez que la cápside proteica se ha unido a los receptores celulares, el virus entra a la célula mediante diferentes mecanismos endocíticos que van a depender del tipo de receptor al que se unió y el tipo de célula, entre los principales mecanismos que pueden usar los Adenovirus son la endocitosis dependiente de clatrina, macropinocitosis, fagocitosis, endocitosis dependiente de caveolina y algunas veces una combinación de estos mecanismos (Meier and Greber, 2004). Después de la endocitosis de las partículas virales, el endosoma sufre un proceso de maduración el cual se caracteriza por la adquisición de proteínas involucradas en la acidificación (H^+ ATPasa), posteriormente el endosoma se fusiona con un lisosoma adquiriendo enzimas hidrolíticas que se activan a un pH bajo. La acidificación conduce a un desensamblamiento parcial de la cápside que incluye pérdida de las fibras, pentones y liberación de la proteína VI en los endosomas, sin embargo la susceptibilidad al pH varía entre los diferentes tipos de Adenovirus (Wiethoff *et al.*, 2005).

4.3 HAdV-D36 y mecanismos que favorecen la sensibilidad a la insulina

4.3.1 HAdV-D36 y expansión del tejido adiposo

El HAdV-D36 es un virus que ha sido asociado con obesidad, pero con un mejor control de la glucosa en animales y humanos (Ponterio and Gnessi, 2015), este efecto podría parecer contradictorio sin embargo, existen evidencias de que bajo ciertas circunstancias la expansión del tejido adiposo puede mejorar el control glucémico por ejemplo, en el estudio realizado por Kim y cols., en el 2007 se reportó que la sobreexpresión del gen de la adiponectina (*ADIPOQ*) y el tratamiento con agonistas de PPAR γ en ratones ob/ob alimentados con una dieta rica en grasas induce una mayor acumulación de tejido adiposo visceral y menores niveles de

glucosa, insulina, triglicéridos y FFA, en condiciones de ayuno así como después de una carga oral de glucosa.

Este podría ser el caso del HAdV-D36, ya que diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* han reportado que este también es capaz de inducir adipogénesis. La infección experimental de células madre derivadas de tejido adiposo humano (hASC) con HAdV-D36, induce una mayor acumulación de lípidos y diferenciación celular de una manera dosis y tiempo dependiente, lo cual se determinó por un incremento del contenido de lípidos, cambios en la morfología celular y el incremento en la expresión de genes clave que participan en el proceso de adipogénesis y diferenciación celular, como la Proteína de Unión al Enhancer CCAAT-beta (CEBP- β), el Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisomas-gamma (PPAR- γ) y la proteína de unión a ácidos grasos aP2 en ausencia de un medio adipogénico (Pasarica *et al.*, 2008).

4.3.2 HAdV-D36 y adiponectina

Por otra parte también se ha sugerido que el HAdV-D36 mejora la sensibilidad a la insulina sistémica incrementando la secreción de todas las formas moleculares de la adiponectina a través de la sobrerregulación de la vía PI3K/Akt. La adiponectina aumenta la sensibilidad a la insulina favoreciendo la oxidación de ácidos grasos y el transporte de glucosa mediante la activación de la cinasa de AMP (AMPK) y la inhibición de la carboxilasa de la acetil coenzima-A (Krishnapuram *et al.*, 2011). Dubuisson y cols., en el 2010 reportan que el HAdV-D36 incrementa los niveles de adiponectina a través de un mecanismo independiente de la adipogénesis. En humanos la seropositividad al HAdV-D36 también se ha asociado con mayores niveles de expresión génica y secreción de adiponectina (Jiao *et al.*, 2014).

4.3.3 HAdV-D36 y sobrerregulación de la vía PI3K/Akt a través de Ras

Diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* han estudiado el efecto del HAdV-D36 en la señalización de la insulina, y han demostrado que el HAdV-D36 inhibe la señalización proximal de la insulina, disminuyendo la abundancia y fosforilación del IR, IRS-1 e IRS-2 en residuos de tirosina, y aumentando su fosforilación en residuos

de serina en células primarias derivadas de tejido muscular, adiposo y hepático (Rogers *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Krishnapuram *et al.*, 2011). La razón precisa de la inactivación de los IRSs es desconocida, aunque se ha sugerido que a causa de la infección por el HAdV-D36 puede haber un incremento de algunas citocinas pro-inflamatorias como $TNF\alpha$, MCP1 y CD68. $TNF\alpha$ inhibe al IRS-1 induciendo su fosforilación en residuos de serina. Por otro lado MCP1 y CD68 han sido relacionadas con la inactivación del receptor de insulina y con resistencia a la insulina (Krishnapuram *et al.*, 2011).

Aunque el HAdV-D36 inhibe la señalización proximal de la insulina, induce una mayor captación de glucosa a través de la sobrerregulación de la señalización distal, incrementando la abundancia y actividad de PI3K y Akt, esto de una manera dosis dependiente en células HSKM (Wang *et al.*, 2008) y en explantes de tejido adiposo humano (Rogers *et al.*, 2008), en estos estudios también se determinó que el incremento en la actividad de PI3K y Akt es dependiente de Ras (Wang *et al.*, 2008; Rogers *et al.*, 2008). La activación de la vía PI3K/Akt induce la translocación de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 en tejido muscular y adiposo. En hígado además disminuye los niveles de GLUT2 (Figura 7) (Krishnapuram *et al.*, 2011; Hegde *et al.*, 2016) .

La infección experimental con HAdV-D36 de células primarias de músculo esquelético (HSKM) de sujetos diabéticos y no diabéticos, incrementa la captación de glucosa al doble y al triple, respectivamente, a través del incremento en la expresión génica y la abundancia de GLUT1 y GLUT4 y la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Wang *et al.*, 2008). La infección experimental con HAdV-D36 de explantes de tejido adiposo de individuos diabéticos y no diabéticos y células madre derivadas de tejido adiposo humano (hASCs), también induce una mayor captación de glucosa través de la activación de la vía PI3K-Akt de manera independiente de la señal del receptor de Insulina y dependiente de Ras (Rogers *et al.*, 2008). En el año 2011 Dhurandhar y cols., determinan que la proteína viral E4orf1 es necesaria y suficiente para producir el efecto anti-hiperglicémico del HAdV-D36. En cuanto a las características de la proteína viral E4orf1 que le

permiten activar a la vía PI3K/Akt, se sabe que esta posee un motivo de unión al dominio PDZ (PBM), que le permite unirse a proteínas con dominios PDZ (proteínas de tipo scaffold) que facilitan las interacciones proteína-proteína (Chung *et al.*, 2007). E4orf1 se une a la proteína DLG, después de la unión el complejo viaja a la membrana celular donde activa a Ras y subsecuentemente a PI3K (Frese *et al.*, 2003).

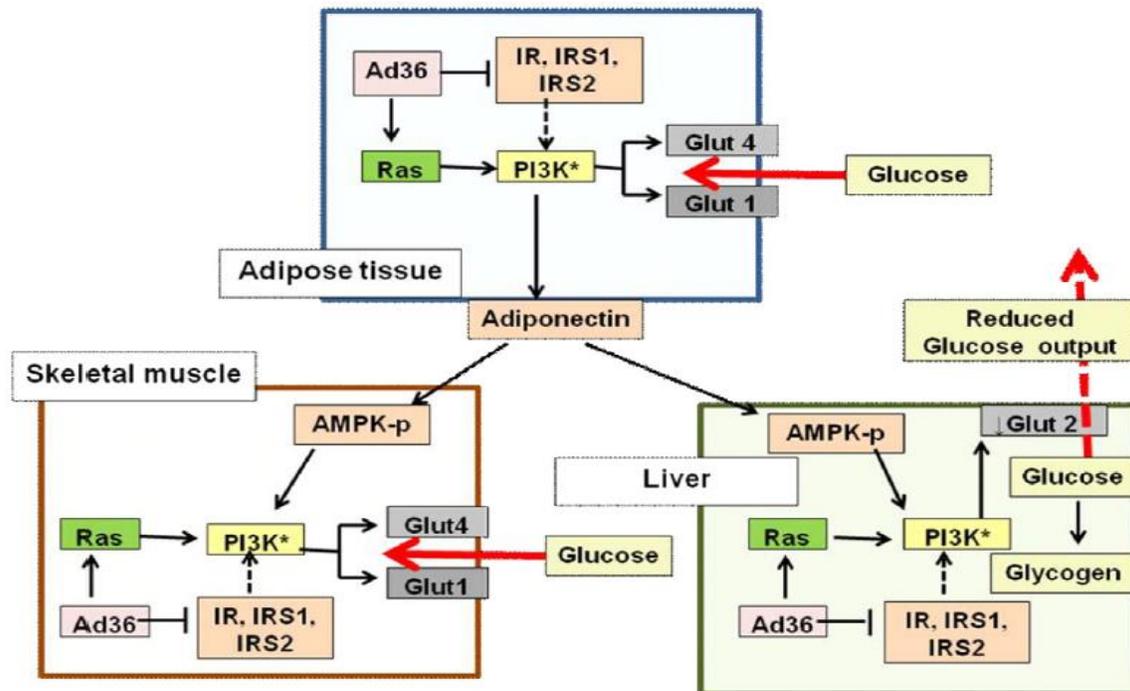


Figura 7. Efecto del HAdV-D36 en la vía PI3K/Akt en tejido adiposo, músculo esquelético e hígado. HAdV-D36 inhibe al receptor de insulina y a los IRS 1 y 2, pero sobrerregula a PI3K a través de la activación de Ras en tejido adiposo, músculo esquelético e hígado, lo cual conduce a un incremento de la translocación de GLUT 1 y 4 en tejido adiposo y músculo esquelético mientras que en hígado disminuye la secreción de glucosa. Conjuntamente esto provoca un mejor control glucémico (Krishnapuram *et al.*, 2011).

4.3.4 HAdV-D36 y sobrerregulación de la glucólisis

Aunque la estructura de la proteína viral E4orf1 ya se conoce, sus funciones aún son poco claras. En el año 2014, Thai y cols., en la línea celular MCF10A demostraron que la proteína viral E4orf1 del HAdV-C5 es necesaria y suficiente para incrementar la captación de glucosa, sin embargo, sugieren que, es a través de un mecanismo independiente de PI3K. Ellos llegaron a esta conclusión tras realizar un experimento en el que generaron una E4orf1 trunca que carecía de su PBM a la

cual denominaron $\Delta E4$, tras inducir su expresión en un cultivo de células MCF10A, midieron la tasa de consumo de glucosa y de producción de lactato y descubrieron que la proteína $\Delta E4$ seguía induciendo un incremento en la captación de glucosa.

Para obtener información sobre el mecanismo por el cual E4orf1 promueve el aumento de captación de glucosa, llevaron a cabo un análisis global mediante microarreglos, para determinar los cambios en la expresión de genes en todo el genoma de las células MCF10A transfectadas con E4orf1, y encontraron un significativo incremento en la expresión de genes regulados por el factor de transcripción MYC. Posteriormente para investigar la forma en que E4orf1 afecta la actividad de MYC, examinaron la localización celular de MYC en células que expresaban a E4orf1, y encontraron que las células que expresaban a E4orf1 tenían altos niveles de la proteína MYC en la fracción nuclear, además demostraron que E4orf1 y E4orf6 interactúan físicamente con MYC (Thai *et al.*, 2014). El siguiente paso consistió en analizar los genes blanco afectados por el factor de transcripción MYC en presencia de E4orf1, para ello realizaron un análisis de inmunoprecipitación de la cromatina y PCR cuantitativa (ChIP-qPCR). Este análisis mostró que hay mayor unión de E4orf1 y MYC a los genes de la vía de la glucólisis. Posteriormente midieron los niveles de expresión de diferentes genes de las glucólisis, y encontraron un significativo incremento de las dos primeras enzimas promotoras de la glucólisis y limitantes de la velocidad, la Hexocinasa 2 (HK2) y la fosfofructocinasa 1 (PFKM) (Figura 8) (Thai *et al.*, 2014).

Dado que la proteína viral E4orf1 se encuentra altamente conservada entre los adenovirus existe la posibilidad de que el HAdV-D36 también utilice este mecanismo para incrementar la captación de glucosa. En el año 2015 Kusminski y cols., demostraron que la proteína viral E4orf1 del HAdV-D36 no sólo se encuentra presente en el citoplasma como hasta ese momento se creía, sino que también se encuentra presente en el núcleo de las células, sin embargo, sus funciones en el núcleo aún son desconocidas.

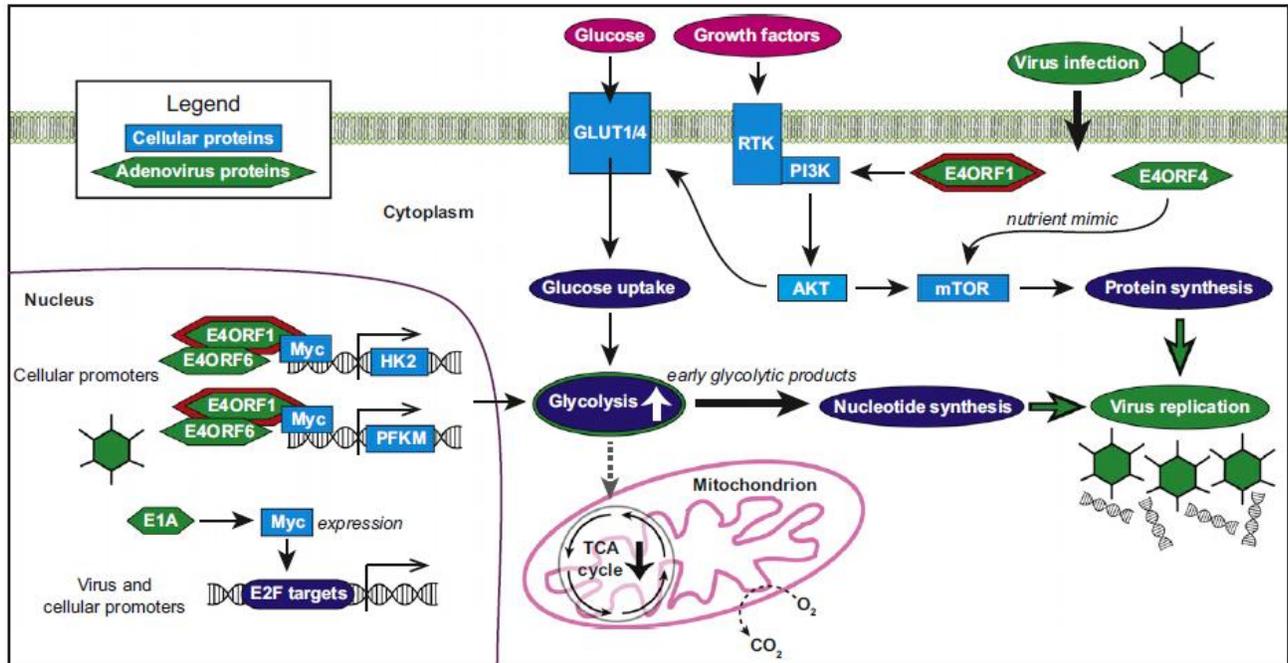


Figura 8. Mecanismo de sobrerregulación de la glucólisis por las proteínas virales E4orf1, E4orf6 y E1A de los adenovirus propuesto por Thai y cols., en el 2014.

5. HAdV-D36 y sensibilidad a la insulina en humanos

Los resultados reportados por los diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* con relación al incremento de la sensibilidad a la insulina son prometedores, por lo que sería importante replicar estos resultados en humanos, sin embargo, la mayor parte de los estudios epidemiológicos se han enfocado en determinar la relación entre la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el HAdV-D36 (seropositividad) con diferentes parámetros antropométricos y metabólicos. En estos estudios la seropositividad al HAdV-D36 se ha asociado en niños y adultos con un mayor IMC y aumento del porcentaje de grasa corporal en diferentes poblaciones de Estados Unidos, China, México, Italia y Checoslovaquia (Atkinson *et al.*, 2005; Trovato *et al.*, 2010; Na *et al.*, 2012; Parra-Rojas *et al.*, 2013; Aldhoon-Hainerová *et al.*, 2014).

Pocos estudios se han enfocado en determinar la relación entre la seropositividad y la sensibilidad o la resistencia a la insulina. Algunos estudios han encontrado que la seropositividad al HAdV-D36 se asocia con una menor incidencia de diabetes tipo 2 (Almgren *et al.*, 2014) y con una mayor sensibilidad a la insulina (Krishnapuram *et al.*, 2011), sin embargo, existe evidencia de que el ensayo de neutralización para

anticuerpos podría estar detectando serotipos adicionales de adenovirus lo cual podría repercutir en los resultados de la investigación del HAdV-D36, por este motivo la detección del ADN viral por técnicas moleculares es de gran importancia. Sólo 4 estudios se han enfocado en la detección del ADN del virus en muestras de humanos (Pasarica *et al.*, 2008; Salehian *et al.*, 2010; Ponterio *et al.*, 2015; Waye *et al.*, 2015), de los cuales sólo 3 han detectado la presencia del ADN viral y ninguno de estos se ha enfocado en determinar la relación entre la presencia del ADN viral con la sensibilidad o la resistencia a la insulina.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿El tejido adiposo de personas con exceso de peso y con HAdV-D36 presentará un incremento en la expresión de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM*, y se relacionará con una mayor sensibilidad a la insulina?

V. JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que la infección con HAdV-D36 mejora la sensibilidad a la insulina sistémica a través de diferentes mecanismos. Los mecanismos propuestos implican la expansión del tejido adiposo (evitando la acumulación de lípidos en tejidos no especializados donde podrían inducir resistencia a la insulina), el incremento en la expresión génica y secreción de la adiponectina (una adipocina que mejora la sensibilidad a la Insulina), y la sobrerregulación de la vía de señalización PI3K/Akt en tejido adiposo, muscular y hepático a través de la activación de Ras como mecanismo molecular (incrementando la captación de glucosa). Sin embargo, un estudio reciente reportó que la proteína viral E4orf1 del HAdV-C5 es capaz de incrementar la captación de glucosa de manera independiente de la activación de la vía PI3K/Akt, sobrerregulando la glucólisis a través del incremento en la expresión de enzimas claves que participan en este proceso como HK2 y PFKM, genes blanco del factor de transcripción MYC. Dado que la proteína viral E4orf1 se encuentra altamente conservada entre los adenovirus, existe la posibilidad de que el HAdV-D36 también utilice este mecanismo para incrementar la captación de glucosa, sin embargo no existe un reporte que sugiera esta asociación y sería importante esclarecer el mecanismo preciso por el cual el HAdV-D36 mejora la sensibilidad a la insulina, ya que este virus podría tener un gran potencial terapéutico para las comorbilidades asociadas con la obesidad como la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2.

VI. HIPÓTESIS

En el tejido adiposo de personas con exceso de peso con el ADN del HAdV-D36 se incrementa la expresión de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM*, lo cual se asocia con una mayor sensibilidad a la insulina.

VII. OBJETIVOS

Objetivo general: Analizar la relación entre la sensibilidad a la insulina y la expresión de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM* en tejido adiposo de personas con exceso de peso, con y sin HAdV-D36.

Objetivos específicos:

- Comparar los niveles de expresión de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM* en tejido adiposo de personas con exceso de peso con y sin el ADN del HAdV-D36.
- Comparar los niveles de expresión de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM* en tejido adiposo de personas con y sin resistencia a la insulina que presentan o no el ADN viral.
- Determinar la asociación entre la presencia del ADN viral con la sensibilidad a la insulina y la expresión de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM*.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y diseño de estudio

Se realizó un estudio observacional transversal comparativo, en el cual se reclutaron un total de 30 mujeres adultas que firmaron un consentimiento informado, 9 con peso normal (IMC 18-24.9 kg/m²), 15 con sobrepeso (IMC 25-29.9 kg/m²) y 6 con obesidad (IMC >30 kg/m²), que acudieron al Hospital Civil de Guadalajara Jalisco a realizarse algún tipo de cirugía estética reductiva (liposucción o lipectomía). Previo a la cirugía, se aplicó una encuesta a todas las participantes para obtener datos como antecedentes clínicos, hábitos alimenticios, estilo de vida, e información socio-demográfica. Posteriormente se tomó una muestra sanguínea por venopunción para las mediciones bioquímicas (glucosa, colesterol total, triglicéridos e insulina). Inmediatamente después de la cirugía se obtuvo la biopsia de tejido adiposo o lipoaspirado. A cada biopsia se le realizó un corte de aproximadamente 1 cm² utilizando un bisturí estéril, el corte de 1 cm² se guardó en un tubo de 1.5 mL con solución salina y el resto de la biopsia se almacenó en un tubo de 15 mL con solución salina a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

Mediciones antropométricas

A todas las participantes se les realizó una medición de parámetros antropométricos (peso corporal, talla, índice de masa corporal, circunferencia de cintura, circunferencia de cadera, índice cintura-cadera, circunferencia de brazo, pliegue bicipital, tricipital y subescapular y porcentaje de grasa corporal). El peso corporal se determinó utilizando un monitor de composición corporal (TFB-300 GS, Tanita Corporation of America Inc. USA). La talla se midió con un estadiómetro (BM-214, Seca, Hamburg, Germany). El índice de masa corporal se calculó, dividiendo el peso corporal expresado en kilogramos entre la talla expresada en metros al cuadrado (kg/m²). Para la medición de las diferentes circunferencias corporales se utilizó una cinta antropométrica (Seca 203, Hamburg, Germany). La circunferencia de la cintura se midió a nivel del ombligo y de la cresta ilíaca superior, la circunferencia de la cadera se midió en el punto máximo por debajo de la cintura, sin comprimir la piel.

A partir de estas mediciones se calculó el índice cintura cadera dividiendo la circunferencia de cintura expresada en cm entre la circunferencia de cadera expresada en cm. Para la medición de los pliegues cutáneos (bicipital, tricipital y subescapular) se utilizó un calibrador pequeño (tipo Glissier). La presión arterial se midió con un baumanómetro automático (Omron MX3 Plus) colocado en el brazo izquierdo de las pacientes después de 10 minutos de reposo, y la lectura se informó en mmHg.

Mediciones bioquímicas

A partir de la muestras de suero se realizó el análisis de los niveles séricos de glucosa, colesterol total y triglicéridos mediante el uso de *kits* comerciales disponibles (Spinreact) en el espectrofotómetro automatizado Mindray B5-200, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las concentraciones séricas de insulina se determinaron por ensayo inmunoenzimático utilizando el kit comercial (Human Insulin ELISA, Life technologies) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 405 nm usando el lector de ELISA (Multiskan FC Thermo Scientific).

La resistencia a la insulina se calculó mediante el índice HOMA utilizando la siguiente fórmula:

$$RI = \frac{[Glucosa \text{ en ayuno (mg/dL)} \times Insulina \text{ en ayuno (uU/mL)}]}{405}$$

Para considerar si un individuo presenta resistencia a la insulina se tomó en cuenta el valor de corte calculado en el grupo con peso normal superior al percentil 75 (HOMA ≥ 3.2).

Identificación del ADN viral en las muestras de tejido adiposo

La extracción del ADN total en las muestras de tejido adiposo se realizó mediante la técnica de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico. Para la identificación del ADN viral se utilizó la técnica de PCR punto final. Los iniciadores utilizados fueron: sentido 5'-AGT CAG TGG ACT GAC AAA GAA CG-3' y antisentido 5'-GTC TGC ATA TAT CTC TTC TTC ACC-3'. El volumen total de la mezcla de reacción fue de 12 μ L, conteniendo buffer 1x, MgCl₂ 0.125 mM, dNTP's 0.075 mM, iniciadores 0.2 mM, 1 U de Taq polimerasa y 3.5 μ g/ μ L de ADN. Las condiciones de reacción para la PCR fueron: 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C, alineamiento de iniciadores a 69 °C y extensión a 72 °C. Como control positivo en cada reacción, se utilizó el ADN del HAdV-D36 proporcionado por el Dr. Ramón A. González, del Centro de Investigación en Dinámica Celular, del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. El producto de amplificación fue de 171 pb para las muestras positivas (Figura 9).

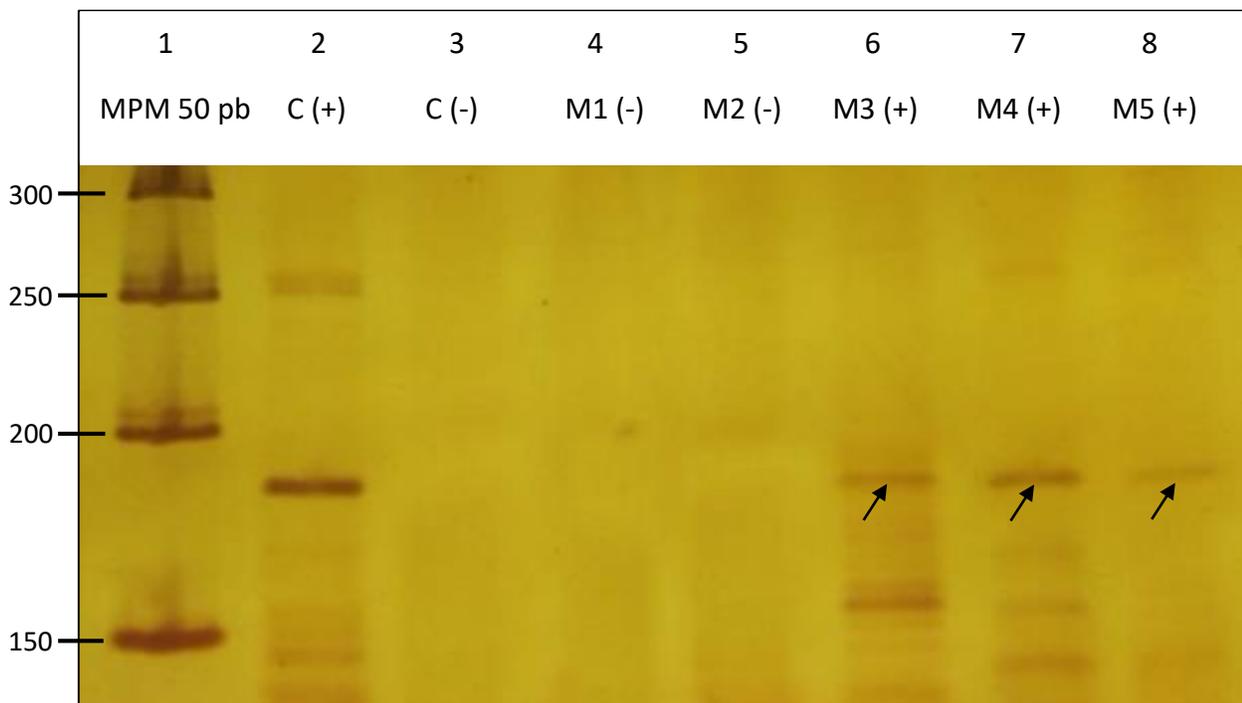


Figura 9. Tipificación de las muestras mediante la técnica de PCR punto final. Carril 2 y 3, control positivo y negativo respectivamente. Carriles 4 y 5: muestras negativas. Carriles 6, 7 y 8: muestras positivas para el HAdV-D36 (Las flechas negras señalan el producto de PCR de 171 pb).

Análisis de la expresión de los genes *MYC*, *ADIPOQ*, *HK2* y *PFKM*

Extracción del ARN del tejido adiposo

Se realizó la extracción del ARN total de las biopsias de tejido adiposo con el reactivo TRIzol® (Trizol®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). La concentración y pureza del ARN se determinó por cuantificación espectrofotométrica (NanoDrop 2000C, Thermo Scientific). La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis observando las bandas del ARN ribosomal 28S y 18S en un gel de agarosa al 1%.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

Para sintetizar el ADN complementario (cDNA) a partir del ARN total extraído de las muestras de tejido adiposo, se utilizó 1 µg de ARN, primer oligo (dT), M-MLV retrotranscriptasa reversa y reactivos de retrotranscripción (Promega corporation, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de cDNA se almacenaron a -80 °C hasta el momento de realizar la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real.

PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Los niveles de expresión de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM* se midieron mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real. La mezcla de reacción contiene: cDNA, Master Mix Universal Taqman (Thermo Fisher Scientific), los iniciadores específicos de cada gen (Cuadro 1) y la sonda “TaqMan® Gene Expression Assays” (Roche Applied Science) en un volumen final de (20 µL), en un Termociclador CFX96 (Bio-Rad) usando las siguientes condiciones de reacción, 95 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 20 seg y 60 °C por 40 seg. Los datos de la PCR en tiempo real se importaron al programa Bio-Rad CFX Manager 3.1. Cada muestra se analizó por triplicado y se normalizó con el gen constitutivo β-actina. Los niveles de expresión relativa de los genes se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Cuadro 1. Oligonucleótidos empleados para la RT-qPCR				
Gen	Descripción	Oligonucleótidos	Secuencia (5' -> 3')	Tamaño del producto
<i>ADIPOQ</i>	Adiponectina	S	CCATACCAGAGGGGCTCAG	68
		AS	ATGACCGGGCAGAGCTAATA	
<i>MYC</i>	MYC	S	CGGTTTTCGGGGCTTTAT	88
		AS	GGCTCTTCCACCCTAGCC	
<i>HK2</i>	Hexocinasa 2	S	TCCTTCCCTGAACCTTTTCC	74
		AS	CAGATTTCAAGAGACATGACATTAGC	
<i>PFKM</i>	Fosfofructocinasa muscular	S	GCCATCAGCCTTTGACAGA	67
		AS	CTCCAAAAGTGCCATCACTG	

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico STATA v.9.2. Para las variables cuantitativas simétricas, se obtuvieron medias y desviación estándar, y para la comparación entre los grupos se utilizó la prueba de Fisher y ANOVA. También se obtuvieron medias y error estándar, y para la comparación entre los grupos se utilizó la prueba *t* de Student. Para las variables cuantitativas no simétricas, se obtuvieron medianas y percentiles 25 y 75 y la comparación entre los grupos se realizó mediante la prueba de Kruskal Wallis. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

IX. RESULTADOS

Se analizaron un total de 30 mujeres con un promedio de edad de 38 años. En el cuadro 2 se observan las características clínicas, antropométricas y bioquímicas de las pacientes comparadas por IMC, al realizar este análisis se encontró que la circunferencia de cintura, cadera y brazo, porcentaje de grasa corporal y los pliegues cutáneos (bicipital, tricípital y subescapular) aumentan significativamente de acuerdo al IMC ($p < 0.05$). En el caso del ICC, los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol total, triglicéridos e insulina) y el índice HOMA también se observó la misma tendencia aunque esta no fue estadísticamente significativa.

Cuadro 2. Características clínicas, antropométricas y bioquímicas de la población de estudio por IMC

	IMC			Valor p
	18 - 24.9 n=9	25 - 29.9 n=15	≥ 30 n=6	
^a Edad (años)	33 \pm 11.80	40 \pm 10.96	40 \pm 12.81	0.375
^a PAS (mmHg)	110.33 \pm 19.41	117.73 \pm 12.66	116.83 \pm 13.22	0.498
^a PAD (mmHg)	74.77 \pm 12.90	78 \pm 14.71	74 \pm 12.18	0.778
^a Circunferencia de cintura (cm)	78.44 \pm 7.73	91.73 \pm 4.41	107.5 \pm 8.93	<0.001
^b Circunferencia de cadera (cm)	93.5 (90-95)	105 (103-107.5)	109.5 (103-136)	<0.001
^a ICC (cm)	.83 \pm .08	.86 \pm .04	.92 \pm .10	0.073
^a Circunferencia de brazo (cm)	25.55 \pm 2.77	30.86 \pm 2.55	35.11 \pm 3.76	<0.001
^a Porcentaje de grasa corporal (%)	27.46 \pm 7.70	35.66 \pm 2.84	36.51 \pm 7.58	0.003
^a Pliegue bicipital (mm)	19.66 \pm 8.54	28.73 \pm 7.27	31.83 \pm 11.32	0.019
^a Pliegue tricípital (mm)	23.55 \pm 4.87	28.06 \pm 6.19	34.5 \pm 6.68	0.006
^a Pliegue subescapular (mm)	24.33 \pm 8.57	31.6 \pm 9.86	39 \pm 9.85	0.022
^a Glucosa (mg/dL)	86.77 \pm 4.94	88.53 \pm 9.80	93.19 \pm 21.92	0.597
^a Colesterol total (mg/dL)	141.22 \pm 40.52	146 \pm 47.21	145.61 \pm 37.36	0.964
^b Triglicéridos (mg/dL)	60 (52.5-86.5)	77 (66-100)	93.55 (76-165)	0.208
^b Insulina (μ U/mL)	9.8 (7.2-14.1)	11.6 (8-18.7)	13.4 (7.5-20.2)	0.619
^b HOMA	2.11 (1.54-2.99)	2.39 (1.82-3.97)	3.25 (1.43-5.65)	0.644

Índice de Masa Corporal (IMC), Presión Arterial Sistólica (PAS), Presión Arterial Diastólica (PAD), Índice Cintura-Cadera (ICC). Los datos indican media \pm desviación estándar, mediana (percentil 25 y 75) y valor p estimado con la prueba de ^aANOVA y ^bKruskall wallis.

Al comparar los parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos en las mujeres con exceso de peso, con o sin el ADN viral, se encontró que las pacientes ADN (+) tuvieron una circunferencia de cintura y cadera significativamente menor que las pacientes negativas ($p < 0.05$), niveles de triglicéridos significativamente más bajos que las pacientes negativas ($p < 0.05$) y mayor sensibilidad a la insulina que las pacientes negativas ($p < 0.05$). En el caso de la edad, el porcentaje de grasa corporal, el ICC, los pliegues cutáneos (bicipital, tricípital y subescapular), los niveles de glucosa, colesterol total e insulina no se observaron diferencias significativas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características clínicas, antropométricas y bioquímicas entre las pacientes positivas y negativas con exceso de peso

	HAdV-D36 (+) n=6	HAdV-D36 (-) n=15	Valor <i>p</i>
Edad (años)	38.33 ± 9.07	40.06 ± 12.1	0.532
Porcentaje de grasa corporal (%)	35.56 ± 2.40	36.04 ± 5.16	0.101
Circunferencia de cintura (cm)	93.25 ± 3.99	97.43 ± 10.63	0.040
Circunferencia de cadera (cm)	104.66 ± 3.01	110.95 ± 12.31	0.005
ICC	.89 ± .05	.88 ± .08	0.304
Circunferencia de brazo (cm)	30.75 ± 1.50	32.61 ± 3.90	0.046
Pliegue bicipital (mm)	29.33 ± 6.15	29.73 ± 9.38	0.359
Pliegue tricípital (mm)	29 ± 6.29	30.26 ± 7.23	0.809
Pliegue subescapular (mm)	29.33 ± 10.93	35.46 ± 9.73	0.667
Glucosa (mg/dL)	84.16 ± 10.99	92.14 ± 14.55	0.557
Colesterol total (mg/dL)	158.33 ± 60.88	140.91 ± 36.25	0.116
Triglicéridos (mg/dL)	69.5 ± 6.94	105.87 ± 47.17	<0.005
Insulina (μIU/mL)	11.53 ± 5.74	16.59 ± 12.89	0.084
HOMA	2.42 ± 1.26	3.86 ± 3.1	0.047

Adenovirus humano 36 (HAdV-D36), Índice Cintura Cadera (ICC), Homeostatic Model Assesment (HOMA). Los datos indican media ± desviación estándar y valor *p* estimado con la prueba de Fisher.

Al comparar los parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos en las mujeres sin resistencia a la insulina (HOMA <3.2), con o sin el ADN viral, se encontró que las pacientes ADN (+) tuvieron una circunferencia de cintura y cadera significativamente mayor que las pacientes negativas ($p < 0.05$) y niveles de triglicéridos significativamente más bajos que las pacientes negativas ($p < 0.05$). En el caso de la edad, el porcentaje de grasa corporal, la circunferencia de brazo, el ICC, el pliegue bicipital, tricípital y subescapular, los niveles de glucosa, colesterol total e insulina no se observaron diferencias significativas sin embargo, cabe destacar que las pacientes sin resistencia a la insulina ADN (+) tuvieron mayor porcentaje de grasa corporal en comparación con las pacientes negativas ($p = 0.059$). Adicionalmente, al comparar los parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos en las mujeres con resistencia a la insulina (HOMA ≥ 3.2), con o sin el ADN viral, no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características clínicas, antropométricas y bioquímicas en las pacientes con y sin resistencia a la insulina, con y sin el ADN viral.

	Pacientes sin RI (HOMA <3.2)			Pacientes con RI (HOMA ≥ 3.2)		
	HAdV-D36 (+) n=5	HAdV-D36 (-) n=15	Valor <i>p</i>	HAdV-D36 (+) n=2	HAdV-D36 (-) n=8	Valor <i>p</i>
Edad (años)	35.2 ± 5.40	36.73 ± 12.15	0.129	43 ± 15.55	39.37 ± 13.83	0.595
Porcentaje de grasa corporal (%)	35.86 ± 2.57	29.68 ± 7.22	0.059	34.45 ± .49	38.46 ± 4.21	0.180
Circunferencia de cintura (cm)	94.1 ± 3.81	86.83 ± 11.86	0.041	84.5 ± 6.36	98.12 ± 13.85	0.680
Circunferencia de cadera (cm)	105.2 ± 3.03	102.42 ± 12.8	0.012	100.5 ± 2.12	109.06 ± 13.73	0.236
ICC	.89 ± .05	.85 ± .07	0.613	.83 ± .04	.90 ± .09	0.767
Circunferencia de brazo (cm)	30.9 ± 1.63	28.76 ± 3.94	0.101	26 ± 5.65	33.21 ± 4.90	0.573
Pliegue bicipital (mm)	29.6 ± 6.84	24.2 ± 11.25	0.346	25 ± 4.24	29.75 ± 7.88	0.785
Pliegue tricípital (mm)	28.4 ± 6.84	25.33 ± 7.34	0.985	30 ± 2.82	32.25 ± 4.94	0.828
Pliegue subescapular (mm)	28.8 ± 12.1	29.4 ± 11.05	0.703	26 ± 8.48	36.25 ± 8.64	0.718
Glucosa (mg/dL)	84.2 ± 12.29	85.87 ± 9.35	0.399	83 ± 1.41	99.12 ± 12.60	0.172
Colesterol total (mg/dL)	155.8 ± 67.62	137.26 ± 40.79	0.141	165 ± 8.48	145.83 ± 32.77	0.393
Triglicéridos (mg/dL)	68 ± 6.59	90 ± 41.71	0.002	68 ± 12.72	110.51 ± 55.69	0.348
Insulina (µIU/mL)	9.32 ± 2.11	9.13 ± 2.78	0.629	26.4 ± 5.37	23.76 ± 14.32	0.562

Adenovirus humano 36 (HAdV-D36), Índice Cintura Cadera (ICC), Homeostatic Model Assesment (HOMA). Los datos indican media ± desviación estándar y valor *p* estimado con la prueba de Fisher.

También se compararon los parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos en las pacientes con exceso de peso, considerando la presencia de resistencia a la insulina y del ADN viral. Las pacientes con exceso de peso, sin resistencia a la insulina y ADN (+), tuvieron menor circunferencia de cadera y niveles de triglicéridos significativamente más bajos que las pacientes negativas ($p < 0.05$). En el caso de la edad, el porcentaje de grasa corporal, el ICC, el pliegue bicipital, tricipital y subescapular y los niveles de glucosa, colesterol total e insulina no se observaron diferencias significativas. En el caso de las pacientes con exceso de peso, con resistencia a la insulina, no fue posible realizar una comparación entre las pacientes debido a la n del grupo HAdV-D36 (+) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Características clínicas, antropométricas y bioquímicas en las pacientes con exceso de peso, de acuerdo con la presencia de resistencia a la insulina y el ADN viral.

	Sin RI (HOMA <3.2)			Con RI (HOMA ≥3.2)	
	HAdV-D36 (+) n=5	HAdV-D36 (-) n=8	Valor <i>p</i>	HAdV-D36 (+) n=1	HAdV-D36 (-) n=7
Edad (años)	35.2 ± 5.40	38.62 ± 12.02	0.141	54	41.71 ± 13.12
Porcentaje de grasa corporal (%)	35.86 ± 2.57	32.95 ± 4.69	0.261	34.1	39.57 ± 3.04
Circunferencia de cintura (cm)	94.1 ± 3.81	94.18 ± 9.02	0.115	89	101.14 ± 11.78
Circunferencia de cadera (cm)	105.2 ± 3.03	110.85 ± 12.12	0.017	102	111.07 ± 13.50
ICC	.89 ± .05	.85 ± .06	0.900	.87	.91 ± .09
Circunferencia de brazo (cm)	30.9 ± 1.63	31.18 ± 3.16	0.220	30	34.24 ± 4.25
Pliegue bicipital (mm)	29.6 ± 6.84	29.5 ± 10.69	0.406	28	30 ± 8.48
Pliegue tricipital (mm)	28.4 ± 6.84	28 ± 8.40	0.725	32	32.85 ± 5.01
Pliegue subescapular (mm)	28.8 ± 12.13	34 ± 10.75	0.730	32	37.14 ± 8.93
Glucosa (mg/dL)	84.2 ± 12.29	85.51 ± 12.64	0.981	84	99.71 ± 13.49
Colesterol total (mg/dL)	155.8 ± 67.62	134.75 ± 38.69	0.188	171	147.95 ± 34.80
Triglicéridos (mg/dL)	68 ± 6.59	95.62 ± 38.61	0.004	77	117.58 ± 56.14
Insulina (μIU/mL)	9.32 ± 2.11	9.3 ± 2.77	0.628	22.6	24.92 ± 15.06

Adenovirus humano 36 (HAdV-D36), Índice Cintura Cadera (ICC), Homeostatic Model Assesment (HOMA). Los datos indican media ± desviación estándar y valor *p* estimado con la prueba de Fisher.

Por último, al comparar los niveles de expresión del ARNm de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM*, de acuerdo con el peso corporal, el estado de resistencia a la insulina y la positividad al ADN viral, no se encontraron diferencias significativas.

Las pacientes con exceso de peso tuvieron menores niveles de expresión génica de adiponectina, *MYC*, *HK2* y *PFKM* que las pacientes con peso normal, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 10).

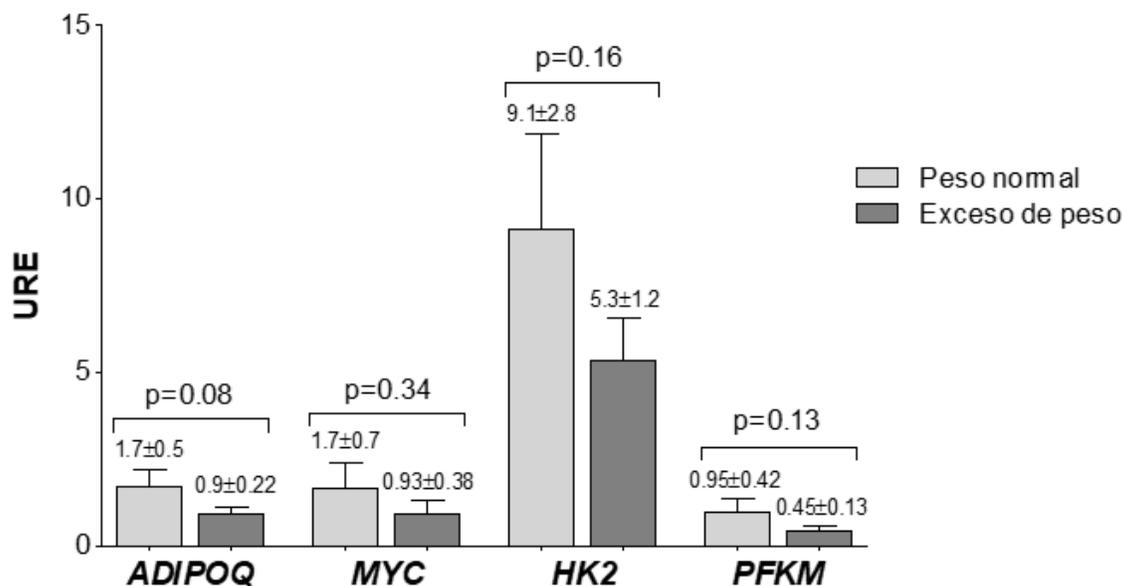


Figura 10. Expresión relativa del ARNm de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM* en muestras de tejido adiposo de mujeres con y sin exceso de peso. Valor *p* estimado con la prueba *t*-Student.

Las pacientes con exceso de peso y ADN (+), tuvieron menores niveles de expresión génica de adiponectina y *MYC*, y mayores niveles de *HK2* y *PFKM* que las pacientes con exceso de peso negativas, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 11).

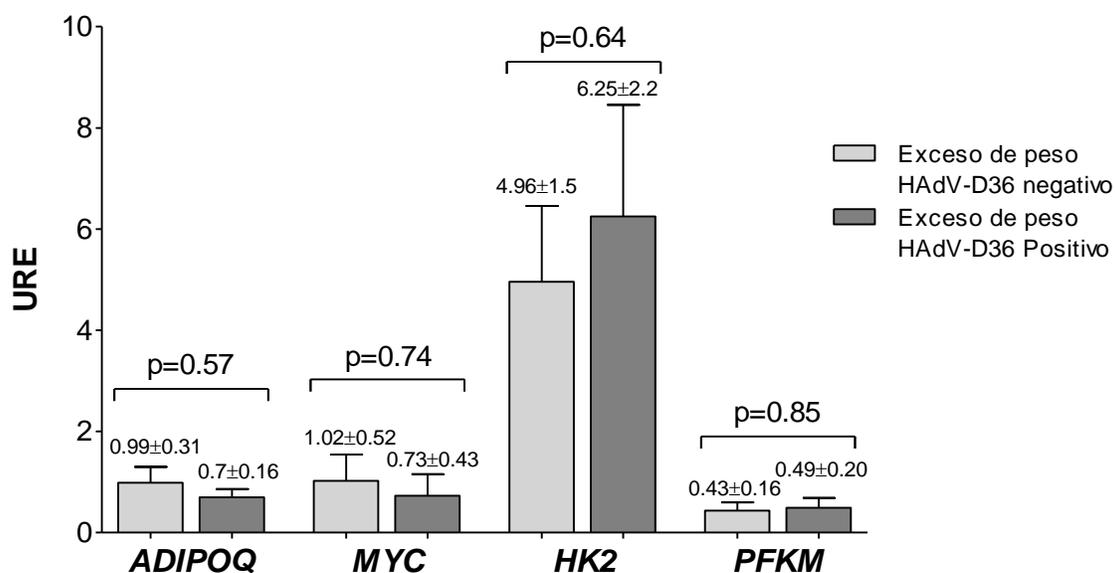


Figura 11. Expresión relativa del ARNm de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM* en muestras de tejido adiposo de mujeres con exceso de peso, positivas y negativas al HAAdV-D36. Valor *p* estimado con la prueba *t*-Student.

Las pacientes sin resistencia a la insulina tuvieron menores niveles de expresión génica de adiponectina, MYC y HK2, y mayores niveles de PFKM que las pacientes con resistencia a la insulina, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 12).

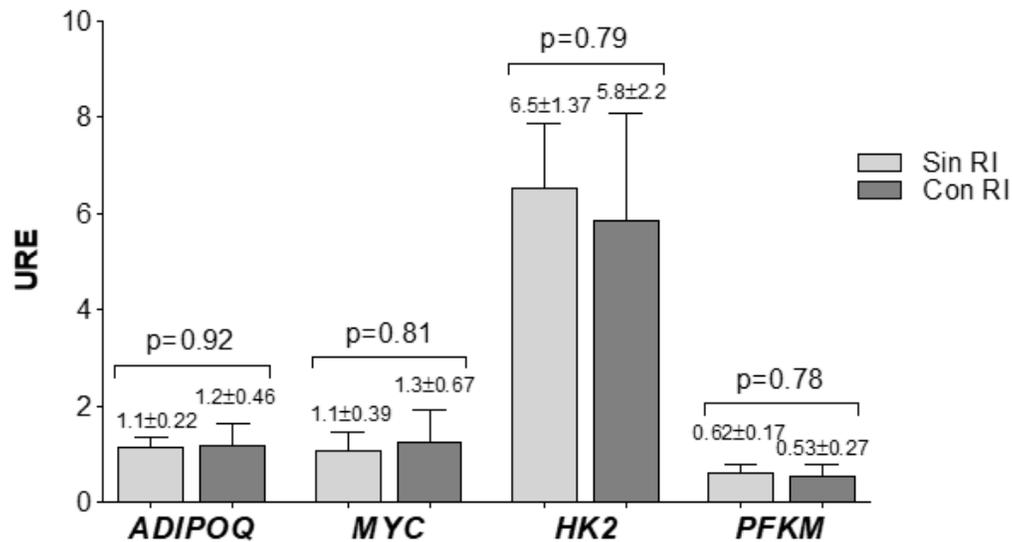


Figura 12. Expresión relativa del ARNm de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM* en muestras de tejido adiposo de mujeres con y sin resistencia a la insulina. Valor *p* estimado con la prueba *t*-Student.

Las pacientes sin resistencia a la insulina y ADN (+) tuvieron menores niveles de expresión génica de adiponectina, MYC y PFKM, y mayores niveles de HK2 que las pacientes sin resistencia a la insulina negativas (Figura 13).

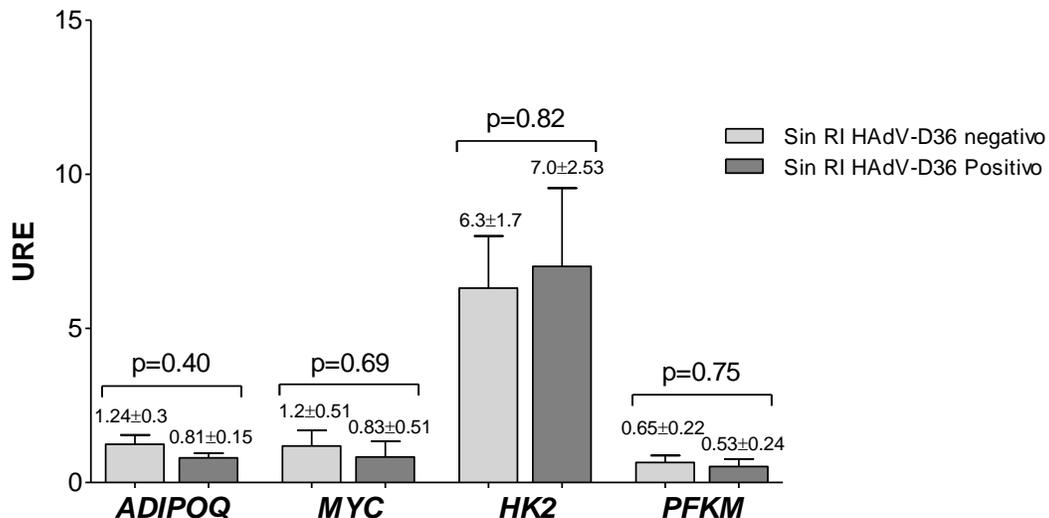


Figura 13. Expresión relativa del ARNm de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM* en muestras de tejido adiposo de mujeres sin resistencia a la insulina, positivas y negativas al HAdV-D36. Valor *p* estimado con la prueba *t*-Student.

Las pacientes con resistencia a la insulina y ADN (+), tuvieron mayores niveles de expresión génica de adiponectina y menores niveles de MYC, HK2 y PFKM (Figura 14).

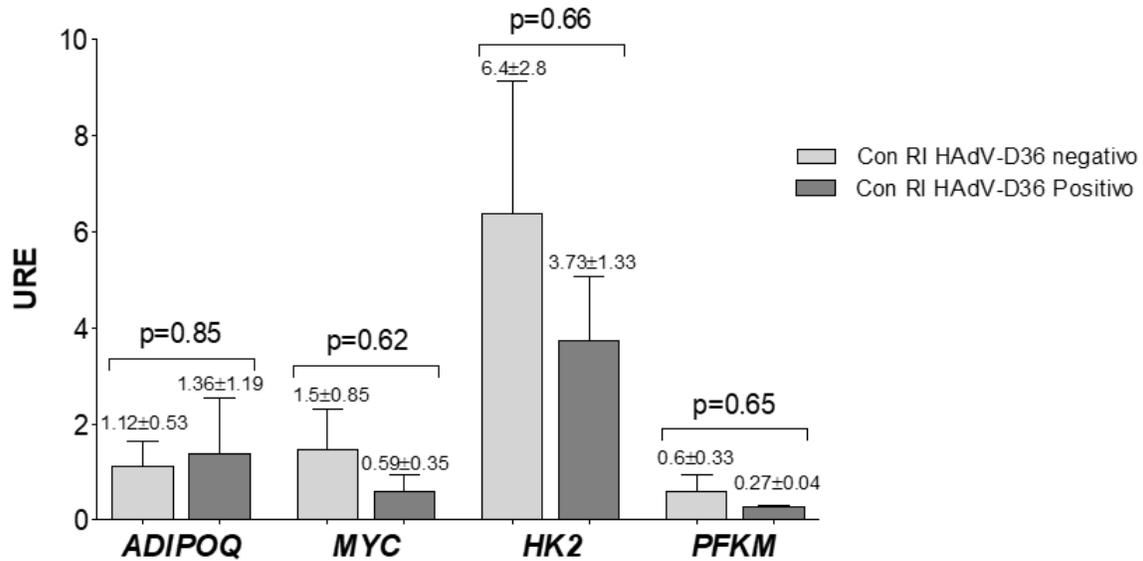


Figura 14. Expresión relativa del ARNm de los genes *ADIPOQ*, *MYC*, *HK2* y *PFKM* en muestras de tejido adiposo de personas con resistencia a la insulina, positivas y negativas al HAdV-D36. Valor *p* estimado con la prueba *t*-Student.

X. DISCUSIÓN

En la población de estudio, de mujeres adultas de 19-54 años, la circunferencia de cintura, cadera y brazo, los pliegues cutáneos (bicipital, tricípital y subescapular) y el porcentaje de grasa corporal se asociaron con el IMC, de acuerdo con la OMS, este índice antropométrico es un buen indicador de las reservas corporales de energía en una persona adulta, independientemente de su sexo, ya que tiene una alta correlación con el porcentaje de grasa corporal estimada por métodos más exactos como la densitometría (Rosales *et al.*, 2012). El ICC en cambio, no se asoció con el IMC, estos resultados coinciden con diferentes estudios que han demostrado un bajo coeficiente de correlación de este parámetro con el IMC, esto debido a que el ICC se utiliza principalmente como un indicador de riesgo metabólico al medir solamente la acumulación de grasa a nivel abdominal y no el porcentaje de grasa corporal total por lo tanto, este índice no refleja el grado de obesidad de un individuo (Hartz *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2002).

Por otra parte, no se encontró asociación de los niveles de glucosa, colesterol total, triglicéridos e índice HOMA con el IMC, esto posiblemente se deba a que el IMC no es un buen indicador de riesgo metabólico, ya que no te permite conocer la distribución de grasa corporal (Domínguez-Reyes *et al.*, 2017) y la obesidad abdominal es un importante factor de riesgo metabólico que se ha asociado con un mayor número de alteraciones metabólicas como la hiperglucemia, dislipidemias, resistencia a la insulina e hipertensión arterial entre otras (Kershaw *et al.*, 2004).

Por otro lado, pocos estudios han detectado la presencia del ADN viral en tejido adiposo humano, probablemente debido a la dificultad de detección del virus o a la baja carga del ADN viral en las muestras (Ponterio *et al.*, 2015) sin embargo, en este estudio se logró detectar el ADN del HAdV-D36 en un 20% de la población de estudio, esta prevalencia fue muy similar a la reportada por Ponterio y cols., en el 2015 de un 19% en una población de adultos italiana y también es similar a la seroprevalencia reportada por Almgren y cols., en el 2012 de un 15 – 20 % en niños y adultos sanos de Suiza.

En este estudio, la presencia del ADN viral en el tejido adiposo de mujeres con exceso de peso se asoció con una circunferencia de cintura y cadera significativamente menor que la de las pacientes ADN (-), estos resultados podrían no tener relevancia biológica, ya que hasta el momento no existen estudios que sugieran una relación entre el HAdV-D36 con una disminución de grasa a nivel abdominal y periférica, por lo que la explicación más probable de este hallazgo es que ninguna de las pacientes ADN (+) presentó obesidad a diferencia del grupo control, esto posiblemente sea debido a que las pacientes ADN (+) se encontraban en una etapa temprana de la infección y/o sus muestras tenían una baja carga del ADN viral, ya que en diferentes estudios, estos factores se han correlacionado positivamente con el peso corporal y el porcentaje de grasa corporal en diferentes animales infectados naturalmente y experimentalmente (Dhurandhar *et al.*, 2000; 2001; 2002), además, en este estudio tampoco se determinó la expresión del ARNm de la proteína viral E4orf1 del HAdV-D36, la cual es necesaria para observar el efecto adipogénico (Rathod *et al.*, 2009), entre otros posibles factores limitantes de este estudio.

La presencia del ADN viral en el tejido adiposo de mujeres con exceso de peso también se asoció con una mayor sensibilidad a la insulina, estos resultados coinciden con diferentes estudios *in vivo* e *in vitro*. El HAdV-D36 se ha asociado con una mayor sensibilidad a la insulina *in vivo* en ratas (Pasarica *et al.*, 2006), e *in vitro* en células primarias derivadas de tejido adiposo humano (Rogers *et al.*, 2008) y de tejido muscular humano (Wang *et al.*, 2008). En humanos, la seropositividad al HAdV-D36 también se ha asociado con una mayor sensibilidad a la insulina en niños y adultos sanos, particularmente en mujeres adultas (Almgren *et al.*, 2014). Lin y cols., en el 2013 también sugieren que la seropositividad al HAdV-D36 se asocia con una mayor sensibilidad a la insulina en personas adultas, especialmente en mujeres y sugieren que esto podría ser debido a que la infección con el HAdV-D36 ha sido asociada con mayores niveles de adiponectina y los niveles de adiponectina son más altos en mujeres que en hombres, lo cual podría contribuir a potenciar el efecto hipoglucémico del HAdV-D36 en mujeres.

Las mujeres con exceso de peso positivas también tuvieron niveles significativamente más bajos de triglicéridos. Estos resultados coinciden con algunos estudios en los que la obesidad asociada con el HAdV-D36 se ha relacionado con bajos niveles de colesterol total y triglicéridos en sangre de diferentes especies de animales (Dhurandhar *et al.*, 2001; 2002), en humanos se ha encontrado que la seropositividad al HAdV-D36 también se asocia con menores niveles de colesterol y triglicéridos en sangre (Atkinson *et al.*, 2005; Almgren *et al.*, 2012). De acuerdo con un estudio realizado por Dhurandar y cols., en el 2012 esta disminución de lípidos en sangre podría ser causada por una mayor captación de lípidos en el tejido adiposo.

El mecanismo preciso a través del cual el HAdV-D36 mejora la sensibilidad a la insulina no está completamente claro, sin embargo, considerando que estas pacientes tuvieron niveles significativamente más bajos de triglicéridos, y que la disminución de los triglicéridos podría ser causada por una mayor captación de lípidos en tejido adiposo, esto evitaría su acumulación en tejidos no especializados como el hígado o músculo esquelético donde podrían inducir resistencia a la insulina (Dhurandhar *et al.*, 2013). En concordancia con esta hipótesis, Dhurandar y cols., en el 2012 sugieren que la presencia de E4orf1 en hígado evita la acumulación de ácidos grasos intermedios que podrían inhibir la señalización de la insulina, también reduce la secreción de ApoB, la cual es indicativa de la exportación de lípidos, por lo que estas dos acciones podrían ser suficientes para atenuar la acumulación de hepática de triglicéridos. En humanos la seropositividad al HAdV-D36 también se ha asociado con una mayor sensibilidad a la insulina y menor acumulación hepática de lípidos en niños y adultos sanos (Almgren *et al.*, 2014).

Interesantemente, también se encontró que la presencia del ADN viral en el tejido adiposo de mujeres con exceso de peso podría relacionarse con menores niveles de insulina. En algunos estudios, la infección con el HAdV-D36 se ha asociado con menores niveles de insulina (Pasarica *et al.*, 2006; Kusminski *et al.*; 2015). Este “ahorro de insulina” ha sido atribuido principalmente al incremento en la captación de glucosa en los tejidos insulino-sensibles a través de un mecanismo molecular

independiente de la señal de la insulina, dando como resultado una disminución de los niveles de glucosa sanguíneos (Dhurandhar *et al.*, 2013), dado que los niveles de glucosa en sangre regulan la secreción de insulina en las células β del páncreas, las bajas concentraciones de glucosa conducirían a una menor secreción de insulina. En concordancia con nuestros resultados, un estudio longitudinal en el que participaron 1400 mexicanos adultos sin diabetes, se encontró que la seropositividad al HAdV-D36 se asocia con niveles más bajos de glucosa en ayunas en mujeres adultas con sobrepeso al inicio del estudio, y con menores niveles de insulina en ayunas 10 años después (Lin *et al.*, 2013), por lo que es posible que la razón de que los niveles de insulina no fueran significativamente más bajos en este estudio se relacione con el tiempo de infección de las pacientes por un mecanismo desconocido.

De acuerdo con los resultados, se esperaría que la presencia del ADN viral se asociara con una mayor acumulación de grasa corporal. Curiosamente, se encontró que la presencia del ADN viral en mujeres sin resistencia a la insulina se asocia con una circunferencia de cintura y cadera significativamente mayor, lo cual se traduciría en un incremento de adiposidad en la región abdominal y periférica. Estudios *in vivo* han demostrado de manera contundente que el HAdV-D36 se asocia con un incremento de adiposidad en ratones, pollos, primates y ratas (Dhurandar *et al.*, 2000, 2001, 2002; Pasarica *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2008; Na & Nam, 2012), como resultado de una mayor proliferación y diferenciación de preadipocitos y con una mayor acumulación de lípidos en adipocitos maduros (Rathod *et al.*, 2007; Vangipuram *et al.*, 2004; 2007; Pasarica *et al.*, 2006; 2008a; 2008b). En un estudio realizado por Rogers y cols., en el 2008, se propone que la proteína viral E4orf1 del HAdV-D36 es necesaria para inducir adipogénesis a través de la sobrerregulación de CREBP y Akt. La sobrerregulación de estas proteínas induce un incremento en la expresión de genes adipogénicos que conducen a una mayor diferenciación adipogénica y acumulación de lípidos.

Además del significativo incremento de la circunferencia de cintura y cadera que presentaron las pacientes sin resistencia a la insulina positivas, también se encontró

que el ADN viral podría relacionarse con un mayor porcentaje de grasa corporal. En humanos, la seroprevalencia al HAdV-D36 ha sido asociada con un mayor IMC y porcentaje de grasa corporal en diferentes cohortes de Estados Unidos, China, Korea del Sur, Italia y Checoslovaquia (Atkinson *et al.*, 2005; Na *et al.*, 2011; Trovato *et al.*, 2009; Trovato *et al.*, 2010). Cabe mencionar que la presencia del ADN viral en las mujeres sin resistencia a la insulina positivas también se asoció con niveles de triglicéridos significativamente más bajos al igual en los análisis anteriores.

También se analizó si el mecanismo por medio del cual el HAdV-D36 incrementa la sensibilidad a la insulina podría estar relacionado con un incremento en la expresión del gen *ADIPOQ*. Al analizar la expresión del gen *ADIPOQ* de acuerdo con el peso corporal, la presencia de resistencia a la insulina y la positividad al HAdV-D36 no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, se pudo observar que la expresión génica de la adiponectina, disminuye en las mujeres con exceso de peso, tal y como se esperaba, ya que su expresión en el tejido adiposo, así como su concentración plasmática se correlacionan negativamente con el IMC (Palomer *et al.*, 2004). El mecanismo por el que la secreción de adiponectina está disminuida en los individuos con sobrepeso y obesidad es desconocido, sin embargo, dado que la secreción de adiponectina es estimulada por la insulina y es inhibida por el TNF- α , la resistencia a la insulina y el incremento en la expresión del TNF- α en los individuos con exceso de peso podría contribuir con este efecto (Beltowski *et al.*, 2003).

También se observó que las mujeres con resistencia a la insulina tuvieron mayores niveles de expresión génica de adiponectina, en comparación con las pacientes sin resistencia a la insulina, estos resultados fueron inesperados ya que los niveles de adiponectina se han correlacionado positivamente con un mayor grado de sensibilidad a la insulina (Palomer *et al.*, 2004). Por esta razón nos preguntamos si el incremento en los niveles de expresión génica de la adiponectina en las mujeres con resistencia a la insulina podría estar relacionado con la presencia del ADN viral del HAdV-D36.

Interesantemente, las mujeres con resistencia a la insulina positivas sí presentaron mayores niveles de expresión génica de adiponectina que las mujeres con resistencia a la insulina negativas, por lo tanto, existe la posibilidad de que este incremento haya sido causado por el HAdV-D36. De acuerdo con un estudio *in vivo* realizado por Krishnapuram y cols., en el 2011, el HAdV-D36 induce un incremento en la expresión génica de la adiponectina y se sugiere que este incremento podría ser causado por la sobreexpresión de la vía PI3K/Akt, esto debido a que PI3K es un fuerte inductor de la secreción de adiponectina (Pereira *et al.*, 2008). Este mismo efecto también fue observado en biopsias de tejido adiposo humano por el equipo de Rogers y cols., en el 2008.

Por otro lado, las mujeres con exceso de peso positivas tuvieron menores niveles de expresión génica de adiponectina que las mujeres con exceso de peso negativas, estos resultados podrían sugerir que el mecanismo que induce un incremento en la expresión génica de la adiponectina podría ser independiente del mecanismo de adipogénesis. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Dubuisson y cols., en el 2011, en dicho estudio se propuso que el HAdV-D36 incrementa la captación de glucosa y la expresión génica de adiponectina en preadipocitos, con ausencia parcial o total de la expresión génica de PPAR γ , un regulador maestro de la adipogénesis, es decir que el incremento en la expresión génica de la adiponectina es independiente del proceso de adipogénesis.

Al comparar los niveles de expresión del gen *MYC* de acuerdo con el peso corporal de las pacientes, la presencia de resistencia a la insulina y la positividad al HAdV-D36 no se encontraron diferencias significativas. Las mujeres con exceso de peso positivas tuvieron menores niveles de expresión génica de *MYC* que las pacientes negativas con exceso de peso. En el estudio realizado por Thai y cols., en el 2014, se propuso que la proteína viral E4orf1 se une al factor de transcripción *MYC* incrementando su estabilidad y promoviendo su unión a genes glucolíticos como *HK2* y *PFKM*, esto podría explicar porque no es necesario incrementar los niveles de expresión génica de *MYC*.

Por otro lado, al comparar los niveles de expresión génica de HK2 y PFKM de acuerdo con el peso corporal, la resistencia a la insulina y la positividad al HAdV-D36 tampoco se encontraron diferencias significativas, sin embargo se encontró que las mujeres con exceso de peso positivas tuvieron mayores niveles de expresión génica de HK2 y PFKM, que las mujeres con exceso de peso negativas. Hasta el momento no existen estudios en los que se haya relacionado el incremento en la expresión de estas enzimas glucolíticas con el desarrollo de obesidad asociado con el HAdV-D36. Sin embargo, uno de los mecanismos que se han propuesto por el cual el HAdV-D36 podría conducir al desarrollo de obesidad, es el incremento en la captación de glucosa en el tejido adiposo (Ponterio and Gnessi, 2015), por lo que el incremento en la expresión génica de HK2 y PFKM en estas mujeres podría relacionarse indirectamente con un incremento de adiposidad.

Además, también se encontró que las mujeres sin resistencia a la insulina positivas tuvieron mayores niveles de expresión génica de HK2 y PFKM, en contraste las mujeres con resistencia a la insulina positivas tuvieron menores niveles de expresión génica de HK2 y PFKM, estos resultados podrían sugerir que no existe una relación entre la presencia del HAdV-D36 con la expresión de estos genes sin embargo, de acuerdo con un estudio *in vivo* realizado por Kusminski y cols., en el 2015, la insulina regula negativamente la expresión de la proteína viral E4orf1 del HAdV-D36 en tejido adiposo blanco y estimula su relocalización intracelular de la del citoplasma al núcleo celular, por lo que esto podría explicar el incremento en la expresión génica de HK2 y PFKM en las mujeres sin resistencia a la insulina positivas y la disminución en la expresión génica de HK2 y PFKM en las mujeres con resistencia a la insulina positivas.

En conjunto, estos resultados sugieren que el mecanismo por medio del cual el HAdV-D36 incrementa la sensibilidad a la insulina, podría estar relacionado con la disminución de los niveles de triglicéridos sanguíneos y con una mayor adiposidad abdominal y periférica en mujeres, sin embargo, esta relación no es causal por lo cual, no se descarta la posibilidad de que el mecanismo que incrementa la sensibilidad a la insulina sea independiente del mecanismo que induce

adipogénesis tal como se sugiere en un estudio realizado por Dubuisson y cols., en el 2011. También es importante considerar que en este estudio sólo se detectó el ADN viral en tejido adiposo y, este también ha sido aislado en hígado, bazo, corazón, riñones y músculo esquelético (Pasarica *et al.*, 2008a), por lo que también existe la posibilidad de que el mejoramiento de la sensibilidad a la insulina sistémica, sea el resultado de un efecto sinérgico de la presencia del virus en tejido adiposo, músculo-esquelético e hígado (Trovato *et al.*, 2009).

XI. CONCLUSIONES

- La presencia del ADN viral del HAdV-D36 en tejido adiposo de personas con exceso de peso no se asocia con mayores niveles de expresión génica de adiponectina, MYC, HK2 y PFKM.
- La presencia del ADN viral del HAdV-D36 en tejido adiposo de personas con y sin resistencia a la insulina no se asocia con mayores niveles de expresión génica de adiponectina, MYC, HK2 y PFKM.
- La presencia del ADN viral en tejido adiposo de personas con exceso de peso se asocia con mayor sensibilidad a la insulina y con menores niveles de triglicéridos.
- La presencia del ADN viral en tejidos adiposo de personas sin resistencia a la insulina se asocia con una mayor circunferencia de cintura y cadera y con menores niveles de triglicéridos.

XII. PERSPECTIVAS

- Analizar la expresión de los genes *ADIPOQ*, *HK2* y *PFKM* en un mayor número de muestras de tejido adiposo ADN (+) y, adicionalmente determinar la expresión del gen viral E4orf1 y la carga del ADN viral en las muestras.
- Realizar un estudio longitudinal para determinar el efecto del ADN viral presente en el tejido adiposo en la sensibilidad a la insulina y el perfil metabólico a largo plazo.
- Determinar el efecto del HAdV-D36 en tejido adiposo, hígado y músculo esquelético en un modelo *in vivo* con expresión variable del receptor CAR.
- Analizar el mecanismo por el cual el HAdV-D36 disminuye la esteatosis hepática.
- Analizar los blancos moleculares de la proteína viral E4orf1 mediante programas de dinámica molecular.

XIII. ANEXOS
ANEXO 1. ENCUESTA

“ADENOVIRUS 36, OBESIDAD Y METABOLISMO DE LA GLUCOSA”

Fecha: ____/____/____ Folio: _____

A. Datos Generales.

Nombre: _____ Edad: _____ Años

Fecha de Nacimiento: ____/____/____ Lugar de Nacimiento: _____

Domicilio actual: _____

Calle, No. Colonia, Ciudad

Tel. Casa: _____ Tel. Trabajo: _____ Tel. Cel. _____

Estado Civil: 0. Soltero(a) 1. Casado(a) 2. Unión Libre 3. Divorciado (a)

Escolaridad: 0. Analfabeta 1. Primaria 2. Secundaria 3. Preparatoria

4. Licenciatura 5. Posgrado

B. Antropometría del paciente.

1. Estatura actual (talla): _____ m

2. Peso: _____ kg

3. IMC: _____ kg/m²

4. Temperatura: _____ °C

5. Presión Arterial Sistólica _____ mmHg Diastólica _____ mmHg.

6. Perímetro de cintura: _____ cm

7. Perímetro de cadera: _____ cm

8. Perímetro de brazo: _____ cm

9. ICC: _____

10. Pliegue bicipital _____ mm

11. Pliegue tricípital _____ mm

12. Pliegue subescapular _____ mm

10. Distribución de grasa: 0. Ginecoide 1. Androide 2. Mixto

C. Hábitos del paciente.

11. ¿Fuma actualmente? 0. No 1. Si

12. No. de cigarros al día. 0. <3 1. De 3 a 5 2. > 5

13. ¿Ingiere bebidas alcohólicas? 0. No 1. Si

14. ¿Cuántas veces a la semana? 0. < 3 1. 3 a 5 2. > 5
15. ¿Realiza ejercicio? 0. No 1. Si Tiempo al día: _____
 Veces/semana: _____ Tipo de ejercicio: _____
 Intensidad 0. Baja 1. Moderada 2. Alta

E. Hábitos alimenticios del paciente.

16. ¿Cuántas comidas consume al día? 0. Una 1. Dos 2. Tres
 3. Cuatro 4. Cinco 5. Más de 6
17. ¿Cuáles? 0. Desayuno 1. Almuerzo 2. Comida 3. Merienda
 4. Cena
18. ¿Cuáles de las comidas señaladas hace en su casa?
 0. Desayuno 1. Almuerzo 2. Comida 3. Merienda 4. Cena
 5. Ninguna
19. ¿A qué hora del día consume sus alimentos?
 Desayuno _____ Almuerzo _____ Comida _____ Merienda _____ Cena _____
20. ¿Cuánto tiempo invierte regularmente cuando consume sus alimentos?
 Desayuno ___ min / Almuerzo ___ min / Comida ___ min / Merienda ___ min / Cena ___ min
21. ¿Cómo come? 0. Abundante 1. Regular 2. Poco
22. ¿Repite ración de las comidas (plato)? 0. Si 1. No 2. A veces
23. Dentro de su dieta alimenticia señale el alimento que consume y con qué frecuencia lo hace.

	Rara vez (1-2 x semana)	Frecuente (3-4 x semana)	Siempre (>4 x semana)
a. Comida rápida	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. Golosinas y frituras	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. Frutas y verduras	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. Carnes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. Lácteos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. Refrescos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

F. Antecedentes de enfermedades crónicas en la familia.

- | | a | b | c | d | e | f | g | h | i | j | |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------|
| a. Obesidad (Ob) | <input type="checkbox"/> | Mamá |
| b. Diabetes Tipo2 (DM2) | <input type="checkbox"/> | Papá |
| c. Hipertensión Arterial (HA) | <input type="checkbox"/> | Ab. Mat. |
| d. Enfermedad Cardiovascular (ECV) | <input type="checkbox"/> | Ab. Mat. |
| e. Enfermedades Hepáticas | <input type="checkbox"/> | Ab. Pat. |
| f. Enfermedad renal | <input type="checkbox"/> | Ab. Pat. |
| g. Hipotiroidismo | <input type="checkbox"/> | Ud. |
| h. Cáncer | | | | | | | | | | | |
| i. Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) | | | | | | | | | | | |
| j. Diabetes Gestacional (DG) | | | | | | | | | | | |

Otra ¿cuál? _____

24. Acantosis Nigricans

0. Si 1.No

25. ¿Cuánto fue su peso al nacer? _____

26. ¿Ha tenido problemas de peso desde temprana edad?

0. Si 1.No

27. ¿Últimamente ha subido de peso rápidamente?

0. Si 1.No

28. ¿Hace cuánto tiempo lo noto? _____

29. Peso min. _____ Peso max. _____

G. INFECCIONES RECIENTES

30. ¿Ha presentado algún tipo de infección recientemente?

0. Si 1.No

Hace cuánto tiempo: _____

31. ¿De qué tipo y cuantas veces?

Número de veces

1 2 3 4 5

a. Urinaria

- b. Respiratoria
- c. Gastrointestinal
- d. Bucal
- e. Ocular
- f. Otra ¿Cuál? _____

H. Tratamiento.

32. Tratamientos previos de reducción de peso 0. Si 1. No

¿Cuál? _____

33. ¿Utiliza algún tipo de anticonceptivos? 0. Si 1. No

34. ¿De qué tipo? _____

35. ¿Actualmente se encuentra sometido a algún tipo de tratamiento? 0. Si 1. No

36. ¿Para qué padecimiento se lo recetaron? _____

37. Nombre de su medicamento: _____

I. Estado emocional

¿Actualmente cuál es su estado de ánimo?

Tranquilo Nervioso Molesto Cansado

¿Tiene dificultad para dormir?

Sí No

¿Cuánto tiempo duerme normalmente? _____

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del entrevistador

Fecha

ANEXO 2. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE INSULINA

1. Añadir 50 μ L de los estándares, muestras y controles a los pocillos apropiados de la placa.
2. Añadir 50 μ L del conjugado Anti-insulina HRP.
3. Cubrir la placa con la cubierta e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Aspirar la solución de los pocillos y lavar los pocillos 3 veces con buffer de lavado1x.
5. Añadir 100 μ L de cromógeno estabilizado a cada pocillo dentro de los 15 minutos después de la etapa lavado.
6. Cubrir la placa con la cubierta de la placa e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
7. Añadir 100 μ L de la solución de parada a cada pocillo. Mezclar suavemente la placa. La solución en los pocillos cambia de azul a amarillo.
8. Leer la absorbancia y calcular los resultados.

ANEXO 3. PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN y ARN A PARTIR DE CÉLULAS DEL TEJIDO ADIPOSO

1. Pesar la biopsia (1 mg) y colocarla en un tubo de polipropileno de 15 mL que contenga 1 mL de solución salina fisiológica.
2. Homogenizar durante 4 minutos utilizando un homogeneizador de tejidos a 9, 500 r.p.m. para disgregar completamente el tejido.
3. Entre una muestra y otra el homogeneizador se debe descontaminar de la siguiente manera:
 - a. Lavar con abundante agua.
 - b. Tratarlo posteriormente con HCl 0.2N durante 3 min.
 - c. Enjuagar con agua de la llave
 - d. Tratarlo con NaOH 0.4 N por 3 min y finalmente lavarlo con abundante agua de la llave.
4. Dividir el homogenizado en 2 tubos eppendorf de 1.5 mL, ya que se pueden utilizar 500 μ L para la extracción de ARN por medio de la técnica de TRIZOL y 500 μ L para la extracción del ADN por medio de la técnica de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico.

Extracción de ADN mediante la técnica de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico

Reactivos: Solución salina 0.9 %, proteinasa K (20 mg/mL), solución de extracción, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 24:23:1, cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, LiCl 8M, NaCl 5M, isopropanol concentrado, etanol 70% y agua desionizada estéril.

Procedimiento:

1. Para la extracción del ADN la alícuota del tejido se centrifuga a 13, 000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C. Desechar el sobrenadante y agregar 750 μ L de solución de extracción. Incubar de 16 a 18 horas a 54 °C.
2. A la muestra a procesar agregar 1.5 μ L de proteinasa K para llegar a una concentración final de 100 μ g/ μ L.
3. Incubar 30 min a 65 °C.

4. Adicionar 250 μL de fenol cloroformo alcohol isoamílico. Mezclar vigorosamente con el vortex durante 45 seg. Centrifugar a 13, 000 r.p.m. por 5 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ (Repetir este paso 2 veces).
5. Recuperar la fase acuosa en un tubo limpio eppendorf (cuidando de no llevarse la interfase cuyo contenido es de proteínas degradadas).
6. Checar la fase acuosa y si es necesario hacer otro lavado con fenol cloroformo alcohol isoamílico.
7. Adicionar 250 μl de cloroformo alcohol isoamílico [24:1], mezclar vigorosamente con el vortex durante 45 seg. Centrifugar a 13, 000 r.p.m. por 5 min a 4 $^{\circ}\text{C}$.
8. Recuperar la fase acuosa en un tubo limpio. Agregar 18 μL de LiCl 8M, mezclar aproximadamente 15 seg. Centrifugar por 5 min a 13, 000 r.p.m.
9. Recuperar el sobrenadante en otro tubo limpio dejando un ligero menisco en el tubo anterior. Agregar 33 μL de NaCl 5M al sobrenadante, agregar 850 μL de isopropanol, tapar el tubo y agitar ligeramente por inversión hasta que se forme la hebra de ADN.
10. Incubar la solución a -20 $^{\circ}\text{C}$ toda la noche.
11. Posteriormente centrifugar a 13, 000 r.p.m. por 10 min. Desechar el sobrenadante (por decantación) cuidando de que no se pierda el pellet.
12. Lavar el pellet con 267 μL de etanol al 70%, agitando suavemente por inversión, centrifugar 1 min a 13, 000 r.p.m. a 4 $^{\circ}\text{C}$ (Repetir este paso 3 veces).
13. Escurrir el exceso de etanol en papel absorbente y meter a secar el pellet en la centrifuga de vacío a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min.
14. Resuspender el pellet en 33 μL de agua desionizada estéril.
15. Guardar el ADN a - 20 $^{\circ}\text{C}$.

Extracción de ARN mediante TRIzol

Reactivos: TRIzol (Gibco-BRL), cloroformo, isopropanol, glucógeno, etanol y tampón TE.

Procedimiento:

1. Para la extracción del RNA la alícuota del tejido se centrifuga a 13, 000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C. Desechar el sobrenadante y agregar 1 mL de TRIzol. Incubar durante 5 min de 15 a 30 °C.
2. Añadir 200 µL de cloroformo, mezclar e incubar durante 5 min de 15 a 30 °C. Centrifugar a 12, 000 r.p.m. por 15 min a 4 °C.

Nota: “Se obtienen tres fases al interior del tubo, de las cuales la fase inferior u orgánica, se guarda a –20°C (contiene DNA). La fase inorgánica o superior, contiene el RNA, mientras que la fase intermedia está constituida por proteínas”.

3. Luego de transferir la fase inorgánica superior a un tubo limpio se procede a la precipitación del ARN mediante la adición de 500 µL de isopropanol y 1 µg de glucógeno que por un lado actúa como transportador, mejorando la obtención de ARN y por otro facilita la visualización del precipitado.
4. Incubar durante 10 min a temperatura ambiente, centrifugar a 12, 000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C. Desechar el sobrenadante.
5. Por último se realiza un lavado con etanol al 70 %, mezclar y centrifugar a 7, 500 r.p.m. durante 5 min a 4 °C. Desechar el sobrenadante.
6. El ARN obtenido se deja secar hasta que se haya evaporado el etanol.
7. Posteriormente resuspender el pellet de ARN total en 50 µL de agua tratada con DEPC.

Valoración del ARN:

El ARN debe valorarse de dos maneras: midiendo la concentración obtenida en un espectrofotómetro a 260 nm y comprobando la integridad del ARN, para esto se cargan entre 0.5 a 1 µg de ARN de cada muestra en un gel desnaturizante (formamida/formaldehído) de agarosa al 1%.

ANEXO 4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT-PCR)

Luego de la extracción del ARN, cada muestra se procesa para la obtención del ADN complementario (cDNA).

1. Preparar en un tubo estéril para microcentrifuga el siguiente **mix de reacción**. Asegurarse que el volumen del mix de reacción es suficiente para todas las muestras.

Componente	Mix de reacción	Mix de reacción de transcripción inversa	Concentración final para 20 μ L
Agua libre de nucleasa	1.5 μ L	2.5 μ L	
Buffer de reacción GoScript™	4 μ L	4 μ L	1X
MgCl ₂ (25 mM)	2 μ L	2 μ L	2.5 mM
Mix de nucleótidos para PCR (10 mM)	1 μ L	1 μ L	0.5 mM
Inhibidor de ribonucleasas RNasin® recombinante	0.5 μ L	0.5 μ L	20 unidades
Reverso transcriptasa GoScript™	1 μ L	0 μ L	
Volumen final	10 μ L	10 μ L	

2. Después de preparar el **mix de reacción**, combinar los siguientes componentes de la **reacción de transcripción inversa** en hielo. El volumen del ARN y de los iniciadores de transcripción inversa no debe exceder el 50% del volumen de reacción final.

Componente	Reacción de transcripción inversa
Mix de reacción GoScript™	10 μ L
ARN y primers de transcripción inversa	10 μ L
Volumen final	20 μ L

3. Las **reacciones de transcripción inversa** se incuban bajo las siguientes condiciones en un termociclador.

Paso	Temperatura	Tiempo
Alineamiento	25 °C	5 minutos
Extensión	42 °C	1 hora
Inactivación	70 °C	15 minutos
Enfriamiento	4 °C	Sostenida

4. Colocar las muestras de cDNA en hielo inmediatamente después del análisis y almacenar el cDNA a -20 °C hasta el momento de su uso.

ANEXO 5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

1. Mezclar la acrilamida y bis acrilamida en proporción 1:30 y aforar con agua bidestilada.
2. Agitar la mezcla en una plancha con agitación, hasta que la solución quede cristalina.
3. En un matraz aforado de 500 mL colocar 100 mL de poliacrilamida, 50 mL de buffer TBE y aforar con agua bidestilada.
4. En un recipiente colocar 35 mL de poliacrilamida, 50 μ L de persulfato de amonio y 100 μ L de TEMED.
5. Previamente colocar los vidrios con sus separadores en la cámara para gelificar geles, agregar la solución de poliacrilamida y por último colocar el peine y dejar que el gel polimerice.
6. Una vez que el gel a polimerizado retirar el peine y con agua corriente retirar el exceso de poliacrilamida polimerizada.
7. Colocar el gel en la cámara de electroforesis y agregar buffer TBE, procurando cubrir perfectamente la superficie del gel.
8. Se prepara una mezcla de 3 μ L del producto amplificado y 3 μ L del buffer de carga y se agrega a cada pozo, también se agrega en uno de los pozos un marcador de peso molecular.
9. Se conectan los cables a la fuente de poder y se corre a 100 volts hasta que se separen los colorantes. Después se puede aumentar el voltaje a 180 volts.
10. El gel se deja correr hasta que el colorante de migración rápida (azul de bromofenol) llegue al borde del gel.

XIV. REFERENCIAS

- Aldhoon-Hainerová, I., Zamrazilová, H., Atkinson, R.L., Dušátková, L., Sedláčková, B., Hlavatý, P., Lee, Z.P., Kunešová, M., Hainer, V., 2014. Clinical and laboratory characteristics of 1179 Czech adolescents evaluated for antibodies to human adenovirus 36. *Int. J. Obes.* 2005 38, 285–291. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.72>
- Almgren, M., Atkinson, R.L., Hilding, A., He, J., Brismar, K., Schalling, M., Ostenson, C.-G., Lavebratt, C., 2014. Human adenovirus-36 is uncommon in type 2 diabetes and is associated with increased insulin sensitivity in adults in Sweden. *Ann. Med.* 46, 539–546. <https://doi.org/10.3109/07853890.2014.935469>
- Arnold, J., Jánoska, 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 Res.* 149, 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.01.011>
- 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. *Int. J. Obes.* 2005 29, 281–286. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802830>
- Bogan, J.S., 2012. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 507–532. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060109-094246>
- Boucher, J., Kleinridders, A., Kahn, C.R., 2014. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
- Dhurandhar, E.J., Dubuisson, O., Mashtalir, N., Krishnapuram, R., Hegde, V., Dhurandhar, N.V., 2011. E4orf1: a novel ligand that improves glucose disposal in cell culture. *PloS One* 6, e23394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023394>
- Dhurandhar, N.V., 2013. Insulin sparing action of adenovirus 36 and its E4orf1 protein. *J. Diabetes Complications* 27, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2012.09.006>
- Dubuisson, O., Dhurandhar, E.J., Krishnapuram, R., Kirk-Ballard, H., Gupta, A.K., Hegde, V., Floyd, E., Gimble, J.M., Dhurandhar, N.V., 2011. PPARgamma-independent increase in glucose uptake and adiponectin abundance in fat cells. *Endocrinology* 152, 3648–3660. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0225>
- Esposito, S., Preti, V., Consolo, S., Nazzari, E., Principi, N., 2012. Adenovirus 36 infection and obesity. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 55, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.06.009>
- Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., Olivares-Reyes, J.A., 2017. [Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update]. *Gac. Med. Mex.* 153, 214–228.
- Hegde, V., Na, H.-N., Dubuisson, O., Burke, S.J., Collier, J.J., Burk, D., Mendoza, T., Dhurandhar, N.V., 2016. An adenovirus-derived protein: A novel candidate

- for anti-diabetic drug development. *Biochimie* 121, 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.12.002>
- Henaff, D., Salinas, S., Kremer, E.J., 2011. An adenovirus traffic update: from receptor engagement to the nuclear pore. *Future Microbiol.* 6, 179–192. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.162>
- Jiao, Y., Mao, X., Chang, X., Abudureyimu, K., Zhang, C., Lu, J., Wang, Y., Nuermaimaiti, N., Aisa, Y., Gong, X., Guan, Y., 2014. Adenovirus36 infection expresses cellular APMI and Visfatin genes in overweight Uygur individuals. *Diagn. Pathol.* 9, 83. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-9-83>
- Krishnapuram, R., Dhurandhar, E.J., Dubuisson, O., Kirk-Ballard, H., Bajpeyi, S., Butte, N., Sothorn, M.S., Larsen-Meyer, E., Chalew, S., Bennett, B., Gupta, A.K., Greenway, F.L., Johnson, W., Brashear, M., Reinhart, G., Rankinen, T., Bouchard, C., Cefalu, W.T., Ye, J., Javier, R., Zuberi, A., Dhurandhar, N.V., 2011. Template to improve glycemic control without reducing adiposity or dietary fat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300, E779–789. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00703.2010>
- Kusminski, C.M., Gallardo-Montejano, V.I., Wang, Z.V., Hegde, V., Bickel, P.E., Dhurandhar, N.V., Scherer, P.E., 2015. E4orf1 induction in adipose tissue promotes insulin-independent signaling in the adipocyte. *Mol. Metab.* 4, 653–664. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.07.004>
- Meier, O., Greber, U.F., 2004. Adenovirus endocytosis. *J. Gene Med.* 6 Suppl 1, S152–163. <https://doi.org/10.1002/jgm.553>
- Montgomery, M.K., Turner, N., 2015. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocr. Connect.* 4, R1–R15. <https://doi.org/10.1530/EC-14-0092>
- Na, H.-N., Kim, J., Lee, H.S., Shim, K.W., Kimm, H., Jee, S.H., Jo, I., Nam, J.-H., 2012. Association of human adenovirus-36 in overweight Korean adults. *Int. J. Obes.* 2005 36, 281–285. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.102>
- 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. *Int. J. Endocrinol.* 2013, 463194. <https://doi.org/10.1155/2013/463194>
- Pasarica, M., Mashtalir, N., McAllister, E.J., Kilroy, G.E., Koska, J., Permana, P., de Courten, B., Yu, M., Ravussin, E., Gimble, J.M., Dhurandhar, N.V., 2008. Adipogenic human adenovirus Ad-36 induces commitment, differentiation, and lipid accumulation in human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 969–978. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0868>
- Pessin, J.E., Saltiel, A.R., 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, 165–169. <https://doi.org/10.1172/JCI10582>
- Ponterio, E., Gnessi, L., 2015. Adenovirus 36 and Obesity: An Overview. *Viruses* 7, 3719–3740. <https://doi.org/10.3390/v7072787>
- Rogers, P.M., Mashtalir, N., Rathod, M.A., Dubuisson, O., Wang, Z., Dasuri, K., Babin, S., Gupta, A., Markward, N., Cefalu, W.T., Dhurandhar, N.V., 2008. Metabolically favorable remodeling of human adipose tissue by human adenovirus type 36. *Diabetes* 57, 2321–2331. <https://doi.org/10.2337/db07-1311>

- Saltiel, A.R., Kahn, C.R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806. <https://doi.org/10.1038/414799a>
- Satoh, T., 2014. Molecular mechanisms for the regulation of insulin-stimulated glucose uptake by small guanosine triphosphatases in skeletal muscle and adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 18677–18692. <https://doi.org/10.3390/ijms151018677>
- Seiradake, E., Henaff, D., Wodrich, H., Billet, O., Perreau, M., Hippert, C., Mennechet, F., Schoehn, G., Lortat-Jacob, H., Dreja, H., Ibanes, S., Kalatzis, V., Wang, J.P., Finberg, R.W., Cusack, S., Kremer, E.J., 2009. The cell adhesion molecule “CAR” and sialic acid on human erythrocytes influence adenovirus in vivo biodistribution. *PLoS Pathog.* 5, e1000277. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000277>
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., Kahn, C.R., 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 85–96. <https://doi.org/10.1038/nrm1837>
- Thai, M., Graham, N.A., Braas, D., Nehil, M., Komisopoulou, E., Kurdistani, S.K., McCormick, F., Graeber, T.G., Christofk, H.R., 2014. Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell anabolic glucose metabolism and virus replication. *Cell Metab.* 19, 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.009>
- Trovato, G.M., Martines, G.F., Garozzo, A., Tonzuso, A., Timpanaro, R., Pirri, C., Trovato, F.M., Catalano, D., 2010. Ad36 adipogenic adenovirus in human non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 30, 184–190. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2009.02127.x>
- Wang, Z.Q., Cefalu, W.T., Zhang, X.H., Yu, Y., Qin, J., Son, L., Rogers, P.M., Mashtalir, N., Bordelon, J.R., Ye, J., Dhurandhar, N.V., 2008. Human adenovirus type 36 enhances glucose uptake in diabetic and nondiabetic human skeletal muscle cells independent of insulin signaling. *Diabetes* 57, 1805–1813. <https://doi.org/10.2337/db07-1313>
- Wiethoff, C.M., Wodrich, H., Gerace, L., Nemerow, G.R., 2005. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J. Virol.* 79, 1992–2000. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.4.1992-2000.2005>