



SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
TECNOLOGICO NACIONAL DE MEXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MERIDA

ITM

“DETERMINACIÓN DE LA INFECCIÓN PERSISTENTE POR ADENOVIRUS 36 EN TEJIDO ADIPOSO HUMANO OBTENIDO POR MEDIO DE BIOPSIA POR ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA.”

TESIS PROFESIONAL

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

MC. ENRIQUE EDUARDO PERAZA LÓPEZ

DIRECTOR DE LA TESIS:

DRA. ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ

CODIRECTOR DE LA TESIS:

DRA. MARIANNE SOLEDAD LUNA RIVERO

MÉRIDA YUCATÁN MÉXICO

JUNIO DE 2020



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.

No. DE OFICIO: X-281/20

Mérida, Yucatán, 15/Septiembre/2020

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

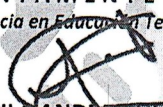
C. ENRIQUE EDUARDO PERAZA LÓPEZ
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
PRESENTE.

De acuerdo al fallo emitido por su directora Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, codirigida por Marianne Soledad Luna Rivero y la comisión revisora integrada Sara Elena Solís Pereira, y Karen Geneve Castillo Hernández, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

"DETERMINACIÓN DE LA INFECCIÓN PERSISTENTE POR ADENOVIRUS 36 EN TEJIDO ADIPOSO HUMANO OBTENIDO POR MEDIO DE BIOPSIA POR ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA"

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica


HERMILANDA ULBARRI BENÍTEZ
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
HAUB/EOV/fja



S.E.P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MÉRIDA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mi familia la cual me ha brindado su apoyo y ha sabido guiarme a lo largo de mi vida.

A mi padre, Enrique Eduardo Peraza Gonzáles, por sus consejos, apoyo y solidaridad en cada uno de los proyectos que he emprendido a lo largo de mi camino académico.

A mi madre, Rosalía López Díaz, por el incondicional apoyo emocional que me ha brindado desde que nací y me ha posibilitado llegar a ser la persona que soy ahora.

A mi hermana, Rosalía Peraza López, quien ha sido una fuente constante de entusiasmo y motivación en todo este recorrido académico y de vida.

Así mismo quisiera dedicar este trabajo a tres profesionistas que considero que me han demostrado como el quehacer científico puede compaginarse con el desarrollo humano:

A la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, por sus consejos y guía en este trayecto académico, no solamente como asesora de tesis sino como una verdadera mentora en relación a los asuntos relacionados a la investigación científica en México.

A la Dra. Sara Solís Pereira, quien me ha acompañado en este viaje académico, no solamente desde el punto de vista académico sino en mi desarrollo como persona.

A la Dra. Alicia Zapata Peraza, quien para mi representa uno de los profesionistas más cercanos al arquetipo del médico completo. Le agradezco la guía y seguimiento que me ha brindado en forma sostenida desde que nos conocimos en la Facultad de Medicina, le agradezco por hacerme ver que no importa que tan pequeña sea, siempre podemos hacer una contribución en beneficio de este mundo y de los demás.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT la oportunidad que me ha brindado para la realización de mis estudios de posgrado a través del otorgamiento de la beca de maestría 2018-000012-01NACF-00676.

Agradezco al Tecnológico Nacional De México Campus Mérida y a la Unidad de Posgrado e investigación la oportunidad que se me ha brindado para realizar el curso de mis estudios en sus instalaciones. Así mismo se agradece al TecNM el apoyo económico brindado al proyecto 6746-18P, mismo que financió el costo de los reactivos y materiales empleados en la presente investigación.

Agradezco a la Universidad Marista Campus Mérida por toda la ayuda brindada en la realización del presente proyecto, tanto su apoyo material como humano. Especialmente quisiera agradecer a los integrantes del Comité de Bioética de dicha institución por haber tenido a bien aprobar el presente protocolo de investigación, sin dicho apoyo esta investigación no hubiese podido realizarse.

Un agradecimiento especial al Dr. Ramón Gonzales de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por habernos proporcionado el control positivo del genoma del Adenovirus 36, su aportación fue de gran ayuda en el desarrollo y validación del protocolo de detección empleado en esta investigación.

A la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, quien su guía y consejos ha posibilitado la realización de este trabajo y muchos más aprendizajes en el laboratorio.

A la Dra. Sara Solís Pereira, por sus valiosísimos consejos en relación al contenido del presente trabajo, así como a la mejor manera de presentarlos, así como su apoyo y guía constante en la realización del mismo.

A la Dra. Marianne Soledad Luna Rivero, por hacerme ver el proyecto desde otras perspectivas en el curso del mismo, así como por sus valiosas sugerencias en relación a las pruebas empleadas y diversas formas de hacer más valiosa la presente investigación.

A la Dra. Karen Castillo Hernández, por su invaluable apoyo durante la realización del presente proyecto, en especial en la etapa comunitaria, sus aportaciones en el campo de la nutrición humana han sido sumamente valiosas en la realización del presente trabajo.

Al Maestro en Ciencias Jesús Manuel Ramon Sierra, por su permanente apoyo en la realización de este trabajo, su guía en la operación de equipo de laboratorio y su orientación en relación a la manera práctica de abordar situaciones relacionadas con las pruebas de laboratorio.

Al Dr. Alejandro Yam Puc quien nos facilitó enormemente el acercamiento a diversas personas que participaron como voluntarios en el estudio, así como por sus consejos y recomendaciones que ayudaron a dar forma final al presente trabajo.

Así mismo agradezco a todos mis compañeros de laboratorio por hacer de mi estancia en este un periodo de tiempo sumamente agradable.

ÍNDICE

Nomenclatura	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO	
1. El sobrepeso y la obesidad	9
1. La obesidad en México.....	12
2. La obesidad en Yucatán.....	14
2. Etiología de la obesidad	16
3. Leptina	21
4. Proteína C Reactiva (PCR)	22
5. El Síndrome Metabólico	24
1. Diagnostico.....	26
6. La infectoobesidad	27
1. El Adenovirus 36	28
2. Métodos diagnósticos para el Adenovirus 36	29
3. Deteccion del genoma del Adenovirus 36 en tejido adiposo humano	30
4. Prevalencia de la infección por Adenovirus 36 en poblaciones humanas.....	31
5. Evidencia en contra del rol del Adenovirus 36 en la fisiopatología de la obesidad	32
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. OBJETIVOS	
1. Objetivo general	36
2. Objetivos específicos	36

5. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Delimitación del problema de estudio	37
2. Tipo de estudio.....	37
3. Selección de participantes	
1. Criterios de inclusión	38
2. Criterios de exclusión	38
3. Criterios de eliminación	38
4. Aspectos bioéticos de la investigación.....	38
5. Plan de análisis estadístico.....	39
1. Cálculo del tamaño muestral.....	39
6. Protocolo experimental	
1. Obtención de la muestra de tejido adiposo	40
2. Extracción del material genético.....	41
3. Evaluación de la integridad del ADN genómico.....	42
4. Detección del genoma del Adenovirus 36 mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa	43
5. Diseño de cebadores específicos para Adenovirus 36 mediante PCR enclavada.....	45
6. Obtención de las muestras de suero sanguíneo	46
7. Determinación de la concentración de Proteína C Reactiva Sérica	47
8. Determinación de las concentraciones de leptina sérica	48
9. Pruebas de Campo	50

6. RESULTADOS

1. Extracción de ADN de muestras obtenidas mediante Biopsia por Punción con Aguja Fina (BAAF).....	51
2. Evaluación de la integridad del ADN genómico	54
3. Análisis de la presencia del genoma del Adenovirus 36 empleando los cebadores descritos en la literatura (Pasarrica 2008).....	56

4.	Evaluación de los cebadores específicos para Adenovirus 36 mediante PCR enclavada.....	58
	1. Validación del protocolo mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos de los fragmentos amplificados	60
5.	Muestreo poblacional	62
	1. Descripción de la muestra poblacional	63
	2. Determinación de la presencia del genoma del Adenovirus 36 en el tejido adiposo de los participantes	66
	3. Determinación de Proteína C Reactiva sérica.....	71
	4. Determinación de leptina sérica	73
7.	DISCUSIÓN	75
8.	CONCLUSIONES	87
	1. Perspectivas y limitaciones del estudio	89
9.	BIBLIOGRAFÍA	91
10.	ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1.- Prevalencia del sobrepeso-obesidad en países de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) entre 1980 y 2010	11
Figura 1-2.- Sobrepeso y obesidad en México (IMC) de acuerdo a los datos de la encuesta nacional de salud y nutrición 2000,2006, 2012	13
Figura 1-3.- Comparación entre la prevalencia porcentual de Sobrepeso y Obesidad en adultos de 20 años y más entre 2012 y 2018 en la población mexicana.....	14
Figura 1-4.- Prevalencia porcentual de sobrepeso y obesidad en Yucatán (IMC), de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 y 2012	15
Figura 1-5.- La obesidad es reconocida como una problemática biopsicosocial.....	17
Figura 1-6.- Diagrama de las relaciones metabólicas alteradas que se observan en el desarrollo de la obesidad.....	20
Figura 6-1.- Diagrama esquemático del proceso para la realización de Biopsia Por Aspiración Con Aguja Fina (BAAF).....	51
Figura 6-2.- Resultado de la extracción de material genómico del tejido adiposo (7 participantes).....	54
Figura 6-3.- Electroforesis en gel de agarosa, bandas correspondientes a la amplificación del gen de β -actina humana	55
Figura 6-4.- Evaluación de los productos de amplificación empleando los cebadores descritos por Pasarrica 2008.	57
Figura 6-5 . Bandas de amplificación por PCR empleando los cebadores externos descritos en TABLA 6-6.....	59
Figura 6-6 . Bandas de amplificación por PCR empleando los cebadores internos descritos en TABLA 6-6.....	59
Figura 6-7 . Bandas de amplificación empleando control positivo para Ad36, preparadas para envío a secuenciación.	61
Figura 6-8: Ubicación geográfica de los sitios de muestreo.....	62
Figura 6-9: Distribución de los participantes por edad y sexo.....	63
Figura 6-10: Distribución de los participantes por IMC y porcentaje de grasa corporal	64
Figura 6-11: Distribución de los participantes en función de la presencia de patologías.....	65

Figura 6-12: Evaluacion de la presencia del Ad36 participantes de la comunidad de Yaxnik empleando Cebadores externos AD36-1 al AD36-6.....	67
Figura 6-13: Evaluacion de la presencia del Ad36 participantes de la comunidad de Yaxnik empleando Cebadores internos AD36-1 al AD36-6.....	68
Figura 6-14: Evaluacion de la presencia del Ad36 participantes las comunidades de Chapab y Komchem empleando el cebador Ad36-2 Interno	69
Figura 6-15: Evaluacion de la presencia del Ad36 participantes las comunidades de Chapab y Komchem empleando el cebador Ad36-6 Interno	69
Figura 6-16: Evaluacion de la presencia del Ad36 participantes las comunidades de Chapab y Komchem empleando el cebador Ad36-7 Interno	70
Figura 6-17: Niveles sericos de Proteina C Reactiva (PCR) de acuerdo al sexo de los participantes del estudio	72
Figura 6-18: Niveles sericos de Leptina de acuerdo al sexo de los participantes del estudio	74

LISTA DE FIGURAS COMPLEMENTARIAS

ANEXO I: Carta de aprobación del protocolo por Comité de Bioética	102
Figura 5-1: Grafica complementaria para el cálculo del tamaño muestral	103
Figura 6-6.1- Curva de calibración para la determinación de Proteína C Reactiva Sérica mediante ELISA	103
Figura 6.6.2- Curva de calibración para la determinación de leptina sérica mediante ELISA	104

LISTA DE TABLAS

Tabla 1-1: Comparación de los criterios diagnósticos para el diagnóstico de síndrome metabólico según las guías Adult Treatment Panel III (ATP III), La Asociación Americana De Cardiología (AHA), y la Federación Internacional De La Diabetes (IDF)	105
Tabla 2-1.- Comparación de los resultados de algunos de los estudios realizados acerca de la prevalencia del Adenovirus 36 en poblaciones humanas	106
Tabla 5-1. Composición del buffer de lisis tisular	110
Tabla 5-2 – Reactivos empleados para la realización de una Reacción en Cadena de la Polimerasa empleando como enzima Taq Polimerasa marca Invitrogen	111
Tabla 5-3.- Condiciones del termociclador empleadas para la amplificación del gen de β -actina humana por PCR	111
Tabla 5-4 – Reactivos empleados para efectuar una Reacción en Cadena de la Polimerasa empleando la enzima Phusion High-Fidelity	112
Tabla 5-5 - Condiciones de amplificación por medio de PCR gradiente evaluando los cebadores descritos por Pasarica 2008.	113
Tabla 5-6 .- Secuencia de los cebadores diseñados para la determinación específica del genoma del Adenovirus 36 por medio de PCR enclavada (diseñados en laboratorio)	113
Tabla 5-7.- Condiciones de amplificación por medio de PCR enclavada para los cebadores para Adenovirus 36. Empleando Taq polimerasa.	114
Tabla 6-1.- Comparación entre el resultado de las secuencias de los fragmentos amplificados del ge-noma del Adenovirus 36 empleando los cebadores descritos en TABLA 6-6 y control positivo.	115

NOMENCLATURA

Abrevia- tura	Significado
aa	Aminoácidos
Ad36	Adenovirus 36
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AHA	Asociación Americana del Corazón
ATP-III	Guías del Adult Treatment Panel 3a edición
BAFF	Biopsia por aspiración con aguja fina
BAV	Virus de la Enfermedad de Borna
cCDV	Virus del distemper canino
CT	Colesterol total
DE	Desviación estándar
DM2	Diabetes Mellitus 2
ELISA	Ensayo de Inmunoadsorción Acoplada a Enzima
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
GPC	Guía de Práctica Clínica
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HTA	Hipertensión Arterial
IDF	Federación Internacional de la Diabetes
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Masa Corporal
Kb	Kilobase
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MCP-1	Proteína quimiotáctica de macrófagos tipo 1
mmHG	Milímetro de mercurio
NCEP	National Cholesterol Education Program
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Perímetro Abdominal
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR	Proteína C Reactiva
RAV-7	Virus asociado a Rous tipo 7
SBP	Presión Arterial Sistólica
SNA	Ensayo por neutralización con suero
TAE	Buffer para electroforesis Tris/Ácido acético/Ácido Etilendiaminotetra- acético
TG	Triglicéridos
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS) el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede repercutir en forma negativa sobre la salud de un individuo.

México es considerado el 2º país a nivel mundial en prevalencia de obesidad en población adulta, solamente superado por Estados Unidos de América. De acuerdo con los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 (ENSANUT 2018) el 76.4% de las mujeres y el 73% de los varones mexicanos presentan sobrepeso u obesidad definidos en términos del Índice de Masa corporal.

El sobrepeso y la obesidad han sido implicados como causa directa o contribuyente en las cinco principales causas de mortalidad por enfermedades crónicas degenerativas a nivel nacional.

El sobrepeso y la obesidad acontecen cuando la ingesta energética de un individuo supera la demanda metabólica, permitiéndose que el excedente se acumule en forma de grasa. Diversos factores modifican la tendencia de un individuo a la acumulación excesiva de grasa, destacándose factores neurológicos, inmunitarios y hormonales.

La infectoobesidad representa un campo de estudio novedoso el cual vincula la presencia de un fenotipo obesogénico con la exposición a ciertos agentes infecciosos, particularmente virales. En seres humanos el Adenovirus 36 (Ad36) es el ejemplo mejor estudiado.

Estudios en múltiples países revelan que la prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra el Ad 36 es mayor en pacientes que presentan sobrepeso-obesidad respecto a controles en normopeso, estableciéndose una correlación estadística sólida, mas no probando causalidad.

Se ha reportado que el Ad36 puede infectar adipocitos y sus precursores, generando una infección persistente y favoreciendo la formación de un fenotipo obesogénico.

Sin embargo, aún falta que se demuestre en forma causal la relación de este virus con la obesidad en seres humanos. Una de las principales dificultades para el establecimiento de relación causal es el empleo únicamente de pruebas serológicas para el diagnóstico de infección, las cuales se ha demostrado son pronas a falsos positivos.

Existen pocos estudios que investiguen la presencia del genoma viral directamente en el tejido adiposo, principalmente porque esta aproximación diagnóstica requiere de métodos invasivos.

En México existen pocos estudios que evalúen la prevalencia de infección por Ad36 en la población. Debido al costo económico y de salud que representa el sobrepeso y la obesidad para el Estado Mexicano se considera necesario el estudio de los diversos factores que pudiesen estar fomentando la alta prevalencia de esta patología.

En el presente trabajo describimos la aplicación de la metodología de Biopsia por Aspiración con Aguja Fina (BAAF) como un método rápido, económico y mínimamente invasivo que permita obtener muestras de tejido adiposo humano en condiciones de campo. A la vez se documenta un procedimiento para la determinación molecular de la presencia del genoma del Ad36 mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa Enclavada diseñado específicamente para evitar la aparición de falsos positivos.

El protocolo para la determinación de la presencia del genoma del Ad36 ha sido validado a escala laboratorio y corroborado mediante determinación de la secuencia de nucleótidos de la amplificación. Previa aprobación de Comité de Bioética se procedió a realizar un muestreo piloto en poblaciones con elevada prevalencia de obesidad (n=72), sin encontrar evidencia de la presencia del genoma del Ad-36 en las poblaciones muestreadas.

La metodología generada en la presente investigación permitirá realizar muestreos poblacionales amplios a bajo costo y riesgo mínimo, permitiendo clarificar el rol que desempeña el Ad36 en el desarrollo de la obesidad.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), overweight and obesity are defined as an abnormal or excessive accumulation of fat that can negatively impact an individual's health.

Mexico is regarded as the 2nd country worldwide in the prevalence of obesity in the adult population, second only to the United States of America. According to data from the 2018 National Health and Nutrition Survey (ENSANUT 2018) 76.4% of women and 73% of Mexican men are overweight or obese, defined in terms of the Body Mass Index.

Overweight and obesity have been implicated as a direct or contributing cause to the top five causes of death from chronic degenerative diseases nationwide.

Overweight and obesity occur when an individual's energy intake exceeds the metabolic demand, allowing the excess to accumulate in the form of fat. Various factors modify the tendency of an individual to accumulate fat excessively, highlighting neurological, immune and hormonal factors.

Infectobesity represents a novel field of study which links the presence of an obesogenic phenotype with exposure to certain infectious agents, particularly viral ones. In humans Adenovirus 36 (Ad36) is the best studied example.

Studies in multiple countries reveal that the prevalence of neutralizing antibodies against Ad36 is higher in patients who are overweight-obese than in normal controls, establishing a solid statistical correlation, but not proving causality.

It has been reported that Ad36 can infect adipocytes and their precursors, generating a persistent infection and favoring the formation of an obesogenic phenotype.

However, the relationship of this virus with obesity in humans remains to be demonstrated causally. One of the main difficulties in establishing a causal relationship is the use of only serological tests for the diagnosis of infection, which have been shown to be prone to false positives.

There are few studies investigating the presence of the viral genome directly in adipose tissue, mainly because this diagnostic approach requires invasive methods.

In Mexico there are few studies evaluating the prevalence of Ad36 infection in the population. Due to the health and economic cost that overweight and obesity represents for the Mexican State it is considered necessary to study the various factors that could be promoting the spread of this pathology.

In this work we describe the application of the Fine Needle Aspiration Biopsy (FNAB) technique as a fast, economical and minimally invasive method that allows to obtain samples of human adipose tissue under field conditions. At the same time, we document a procedure for the molecular determination of the Ad36 genome by means of the Nested Polymerase Chain Reaction specifically designed to avoid the appearance of false positives due to environmental contamination.

The protocol for determining the presence of the Ad36 genome has been validated on a laboratory scale and corroborated by determining the nucleotide sequence of the amplification. With the approval of the Bioethics Committee, a pilot sampling was carried out in populations with a high prevalence of obesity ($n = 72$), without finding evidence of the presence of the Ad-36 genome in the sampled populations.

The methodology generated in the present investigation will allow carrying out wide population samplings at low cost and minimal risk, making it possible to clarify the role that Ad36 plays in the development of obesity.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN.

En México las enfermedades crónico-degenerativas son responsables de las 5 principales causas de morbimortalidad en la población ¹.

Este fenómeno se explica debido a la transición sociodemográfica y epidemiológica que ha experimentado México en los últimos decenios, con un incremento significativo en la expectativa de vida al nacimiento, disminución de la morbimortalidad por enfermedades infecciosas e incremento en la morbimortalidad por enfermedades crónico-degenerativas ².

El síndrome metabólico representa una base fisiopatológica común a la mayor parte de las enfermedades crónico-degenerativas presentes en la actualidad ³. Este síndrome se define como un conjunto de alteraciones metabólicas, clínicas y bioquímicas las cuales son capaces de iniciar o agravar diversas enfermedades crónico-degenerativas, en particular la Diabetes Mellitus 2 y las enfermedades cardiovasculares ⁴.

El síndrome metabólico representa un diagnóstico operacional útil en la práctica clínica mas no una patología única. El mismo se encuentra conformado por diversas variables que predicen el desarrollo de desenlaces metabólicos adversos, a saber: alteraciones en el metabolismo de la glucosa, dislipidemia aterogénica, hipertensión arterial y obesidad ⁵.

La obesidad, particularmente en lo referente a la obesidad visceral, se ha calificado como una condición indispensable para el diagnóstico del síndrome metabólico.

En México de acuerdo a los datos de la encuesta nacional de salud y nutrición 2012 el 32.4% de las personas mayores de 20 años presentaron obesidad en términos del IMC mientras que el 76.6% de la población presentó obesidad abdominal ⁶.

Se considera que la existencia de un balance energético positivo sostenido a lo largo del tiempo es una condición indispensable para el desarrollo de sobrepeso-obesidad, ya sea a consecuencia de una ingesta excesiva, una disminución en el gasto energético o ambas. Sin embargo, evidencia reciente apunta a que la obesidad presenta una fisiopatología compleja, correspondiendo a un fenómeno sistémico en el cual intervienen los sistemas endocrinológico, inmunológico y neurológico. Cobra particular importancia en la fisiopatología de la obesidad es el estado proinflamatorio crónico que esta genera en el individuo afectado ^{7,8}.

El estudio de la infectoobesidad corresponde a uno de los avances más recientes en el campo de estudio del sobrepeso-obesidad. El estudio de la infectoobesidad es un campo interdisciplinario el cual se encarga del estudio de aquellas situaciones obesogénicas que ocurren debido a la existencia de procesos infecciosos pasados o presentes en el organismo ⁹. Se ha prestado un énfasis especial al estudio del Adenovirus 36 (Ad36), virus con genoma basado en ADN que se ha demostrado capacidad de infectar múltiples tipos celulares en mamíferos y aves, incluyendo entre ellos fibroblastos, preadipocitos y adipocitos ⁹.

El Ad36 ocasiona cambios en la expresión genética en las células infectadas. En el tejido adiposo favorece su hiperplasia e hipertrofia a expensas de la acumulación de lípidos en los adipocitos infectados, así como la diferenciación de precursores (fibroblastos y preadipocitos) hacia adipocitos maduros. De este modo, el Ad36 favorece la aparición de un fenotipo obesogénico en el individuo afectado. Sin embargo, otro de los efectos generados por la infección por Ad36 es el incremento en la captación de glucosa por parte del tejido adiposo ,mejorando de esta manera el perfil glucémico de la persona afectada ^{10,11}.

La presencia de anticuerpos neutralizantes (seropositividad) al Ad36 ha sido asociada a la presencia de obesidad en numerosos estudios, mismos que hacen referencia a la existencia de un perfil metabólico favorable en relación al metabolismo de glúcido en aquellos individuos considerados con infección persistente ¹². Existen pocos estudios que evalúen la presencia del Ad36 en la población mexicana ¹³.

Debido al elevado costo tanto en términos económicos como humanos que representan las consecuencias de la obesidad para la población del país y el sector salud, se considera pertinente el investigar aquellos factores que pudiesen estar involucrados en su génesis o modificar la historia natural de la enfermedad ^{1,14}.

Mejorar el conocimiento de los factores implicados en la fisiopatología de la obesidad en la población mexicana permitirá el desarrollo de mejores políticas públicas de salud, repercutiendo en última instancia en una mejor calidad de vida para los individuos afectados ¹⁵.

CAPITULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 EL SOBREPESO Y LA OBESIDAD

De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS) el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede repercutir en forma negativa sobre la salud de un individuo ¹⁶ .

En México, las definiciones de sobrepeso y obesidad aceptadas son las descritas en la NOM-008-SSA3-2017, en donde se define al sobrepeso y la obesidad como “trastornos clínicos caracterizados por un incremento en la masa adiposa de los individuos” ¹⁷.

La guía de práctica clínica (GPC) para la prevención y tratamiento del sobrepeso y la obesidad exógena abunda más en su descripción, caracterizando a la obesidad como “una enfermedad sistémica, crónica, progresiva y multifactorial que se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa. En su etiología se involucran alteraciones en el gasto energético, desequilibrio en el balance entre aporte y utilización de las grasas, causas de carácter neuroendocrino, metabólicas, genéticas, factores del medio ambiente y psicógenas. La obesidad se clasifica fundamentalmente con base en el índice de masa corporal (IMC) o índice de Quetelet, que se define como el peso en kg dividido por talla expresada en metros y elevada al cuadrado, en el adulto un $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ determina obesidad” ¹⁸.

La obesidad es una de las enfermedades metabólicas con mayor prevalencia en México. Desde 1980 hasta la fecha el porcentaje de adultos que padecen obesidad en México se ha incrementado hasta alcanzar más del 30% en la presente década ^{2,6}.

México es considerado a la fecha como el segundo país a nivel mundial en relación a la prevalencia de obesidad en su población general, solamente por detrás de Estados Unidos de América ^{18,19} (Figura 1-1).

En la Figura 1-1 se observa el incremento paulatino que ha presentado la prevalencia de obesidad en todos los países occidentales, incluido México. De continuarse esta tendencia se estima que hacia 2050, la prevalencia mundial de obesidad determinada por IMC será del 54 % de los hombres y del 57 % de las mujeres ^{2,6}.

El sobrepeso y la obesidad condicionan múltiples desenlaces metabólicos adversos, encontrándose implicados en forma directa en las cinco principales causas de morbilidad en adultos mexicanos: cardiopatía isquémica, complicaciones de la diabetes mellitus, neoplasias malignas, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades hepáticas ²⁰.

La obesidad y sus consecuencias representan un costo enorme para el Sistema de Salud Mexicano. En una investigación dirigida por Rtveldze se determinó que la obesidad y sus complicaciones supusieron en 2010 un costo para el sistema de salud pública en México de aproximadamente 806 millones de dólares anuales, mismo que se espera que incremente hasta 1 700 millones de dólares anuales hacia 2050 en caso de mantenerse las tendencias demográficas actuales ²¹.

La tendencia ascendente en la prevalencia de obesidad y sobrepeso en México ha sido confirmada a través de múltiples estudios epidemiológicos ^{6,22,23}.

Comentado [DE1]: Utilizar el mismo formato al citar la figura. Figura 1.1, no mayúsculas, no negrillas. Coincido con la Dra.Elizabeth

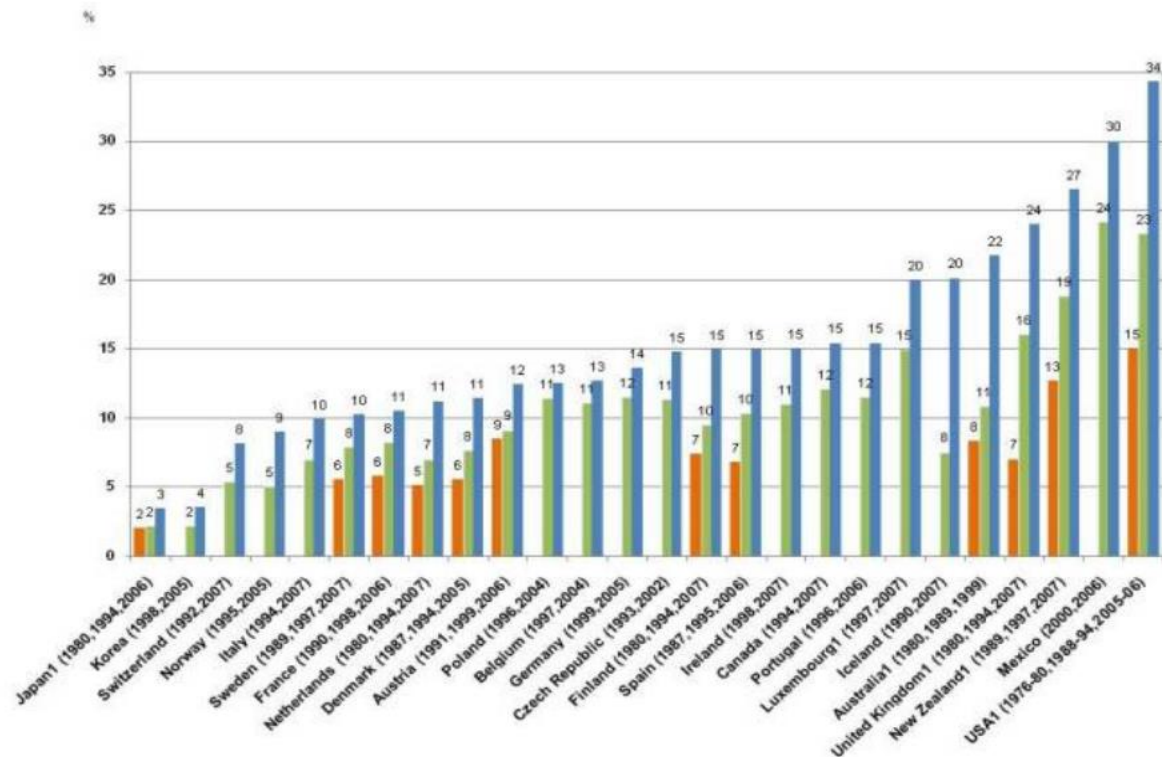


Figura 1-1.- Prevalencia del sobrepeso-obesidad en países de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) entre 1980 y 2010, datos en porcentaje de afectados en la población adulta ¹⁸.

2.1.1 LA OBESIDAD EN MÉXICO

De acuerdo con los datos proporcionados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en 2012, 32.4% de los mexicanos mayores de 20 años presentaban obesidad definida en términos del IMC⁶. Sin embargo, estudiar únicamente la prevalencia de obesidad conlleva a subestimar la magnitud real del problema.

En 2016 se realizó la encuesta nacional de salud y nutrición de medio camino (ENSANUT 2016) la cual reporta una prevalencia combinada de sobrepeso/obesidad del 72.5% en la población mayor de 20 años²².

La obesidad abdominal representa el mejor correlato antropométrico de la resistencia a la insulina a nivel corporal, mismo que condiciona la mayor parte de las alteraciones generadas por el síndrome metabólico. La prevalencia global de obesidad abdominal en México en 2016 fue del 76.6%, con una prevalencia del 87.7% y 65.4% en mujeres y hombres respectivamente²².

De acuerdo con los resultados preliminares de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 el 76.4% de las mujeres y el 73% de los varones mexicanos presentan sobrepeso u obesidad definidos en términos del IMC²⁴ (Figura 1-2 Y 1-3).

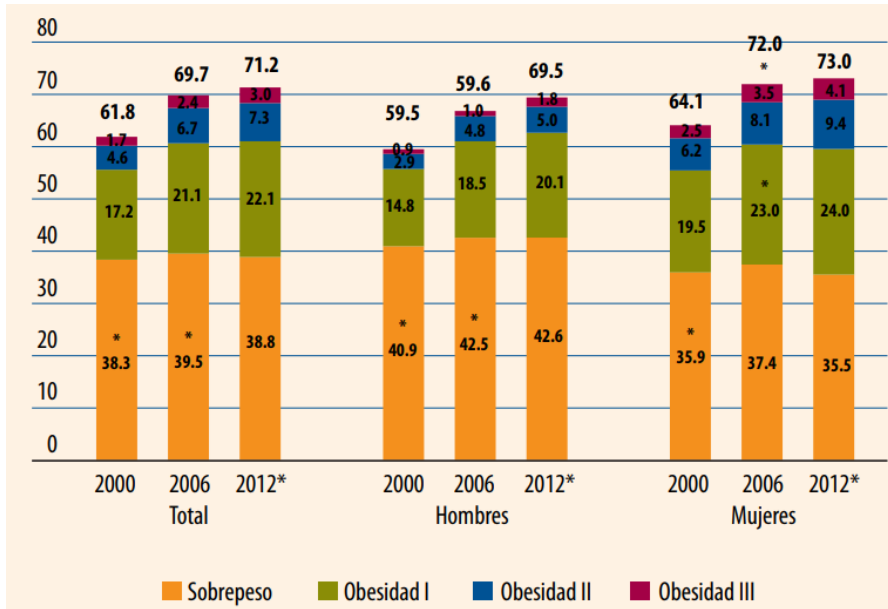


Figura 1-2.- Sobrepeso y obesidad en México (IMC) de acuerdo a los datos de la encuesta nacional de salud y nutrición 2000,2006, 2012, valores presentados como porcentaje de la población adulta en cada categoría. Tomado de ENSANUT 2012⁶

Como se observa en las figuras 1-2 y 1-3, la prevalencia global del sobrepeso y la obesidad en México ha mantenido una trayectoria ascendente en las últimas décadas. Las mujeres en forma global presentan una mayor prevalencia de sobrepeso-obesidad que los hombres. Sin embargo, son los hombres el grupo que ha presentado el mayor incremento en la prevalencia del sobrepeso-obesidad en años recientes ^{6,22}.

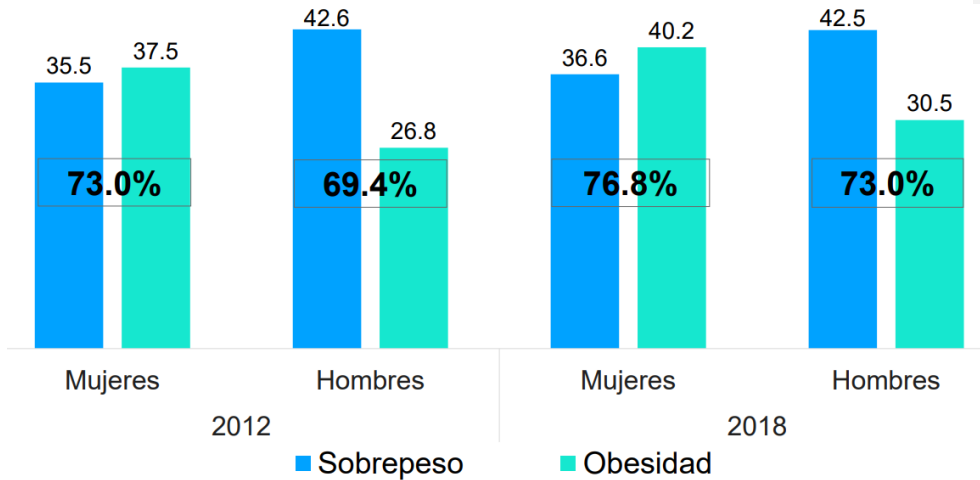


Figura 1-3.- Comparación entre la prevalencia porcentual de Sobrepeso y Obesidad en adultos de 20 años y más entre 2012 y 2018 en la población mexicana. Tomado de ENSANUT 2018²⁴

2.1.2 LA OBESIDAD EN YUCATÁN

Yucatán, de acuerdo con los datos de ENSANUT 2012, posee una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en términos del IMC del 82% para mujeres y 78.6% para hombres. Si se toma únicamente en cuenta obesidad, en 2012 se reporta una prevalencia del 44.7% en adultos mayores de 18 años, cifras por encima media nacional de la media nacional (32.4%) para el mismo año ⁶. De acuerdo a la misma encuesta, la obesidad definida en términos de perímetro abdominal presentó una prevalencia del 76% en la población yucateca durante 2012 ⁶(Figura 1-4).

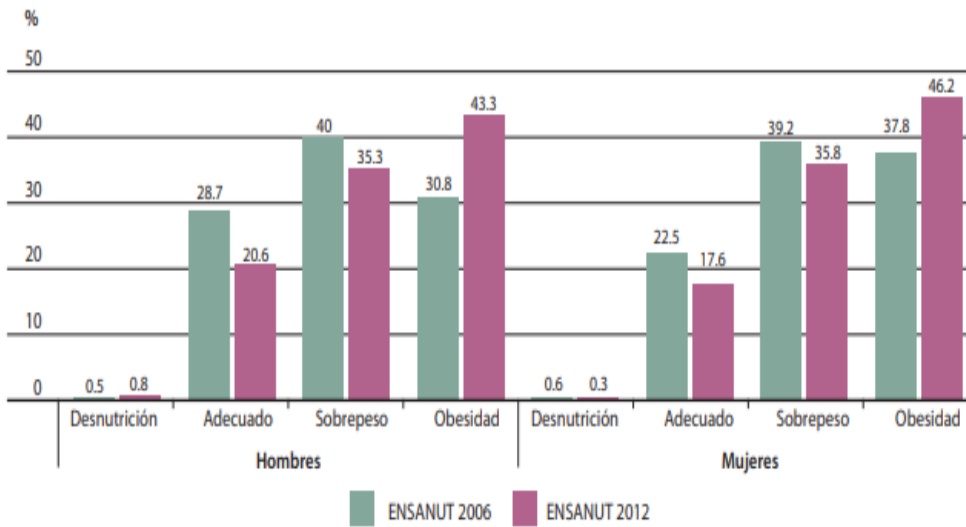


Figura 1-4.- Prevalencia porcentual de sobrepeso y obesidad en Yucatán (IMC), de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 y 2012. Tomado de ENSANUT 2012, resultados por entidad federativa ⁶.

En Yucatán se observa una tendencia semejante a la nacional, con un incremento paulatino en la proporción de la población que padece sobrepeso u obesidad, siendo este incremento observable en ambos sexos ⁶. Debido a los importantes daños que la obesidad puede ocasionar a la salud de un individuo esta representa un importante factor de riesgo para la población yucateca

20,25,26.

2.2. ETIOLOGÍA DE LA OBESIDAD

La obesidad es considerada como la consecuencia de un balance energético positivo sostenido a lo largo del tiempo, condición que permite que el excedente de energía procedente de la dieta sea acumulado en forma de triglicéridos en el tejido adiposo del individuo ⁷.

Si bien la existencia de un balance energético positivo resulta una condición indispensable para el desarrollo del sobrepeso y la obesidad, la fisiopatología de este fenómeno involucra interacciones múltiples entre el sistema nervioso, el sistema endócrino y el sistema inmunológico con el tejido adiposo ⁷ (Figura 1-5).

En relación a la etiología de la obesidad, la Sociedad Internacional de Endocrinología reconoce como uno de los elementos más relevantes el consumo de dietas abundantes en alimentos procesados, las cuales se caracterizan por poseer grandes cantidades de calorías en forma de azúcares y grasas de fácil asimilación ⁸.

Como consecuencia directa de la transición sociodemográfica hacia una sociedad industrializada basada en una economía de servicios, cada vez resulta más fácil y económico el acceso a productos ultraprocesados abundantes en calorías de fácil asimilación, toda vez que se presenta un descenso continuado en la producción y consumo de alimentos agrícolas producidos en forma tradicional ²⁵.

Se ha demostrado que la gente desfavorecida económicamente privilegia el consumo de alimentos ultraprocesados debido a su practicidad. Estos alimentos se han diseñado de forma que activen el sistema de recompensa a nivel cerebral^{4,8}. Se ha reportado que el consumo repetido de azúcares induce las mismas modificaciones en la expresión genética que el consumo de sustancias adictivas tradicionales, favoreciendo de este modo su consumo subsecuente ²⁷.

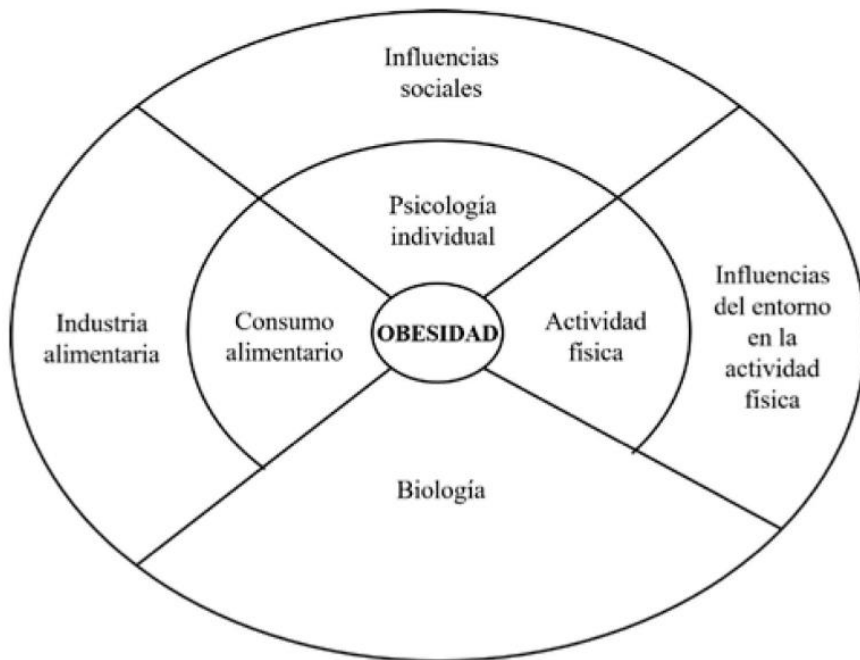


Figura 1-5.- La obesidad es reconocida como una problemática biopsicosocial. Tomado de Suárez-Carmona, 2017²⁸.

Otro de los elementos clásicos en el estudio del sobrepeso y obesidad es el gasto energético mediado por la actividad física. En una forma análoga a lo que se observa con el consumo de alimentos procesados, la sociedad posindustrial favorece el desarrollo de hábitos de vida sedentarios. La disminución del gasto calórico mediado por ejercicio es considerado uno de los elementos clave en la génesis de la obesidad, así como uno de los principales responsables de las consecuencias metabólicas adversas de esta ²⁹.

Sin embargo, si bien el consumo de alimentos ultraprocesados y la falta de actividad física representan elementos angulares en el desarrollo del sobrepeso y la obesidad, este resulta un fenómeno complejo y multifactorial involucrando multitud de sistemas fisiológicos ⁷.

Uno de los elementos que más influye en la determinación del contenido adiposo de un individuo es el destino final que el cuerpo otorga al excedente energético adquirido desde los alimentos, particularmente en lo referente a su distribución entre el tejido adiposo y los demás sistemas corporales ^{7,30}. Es en este mecanismo en el que se observan las complejas interacciones que existen entre los sistemas nervioso, endócrino e inmunológico con la génesis y mantenimiento de la obesidad, así como sus consecuencias metabólicas adversas ^{7,30}.

Diversos agentes pueden modificar el destino final de los recursos que ingresan a un organismo en forma de proteínas, carbohidratos y lípidos. Uno de los ejemplos clásicos ha sido el empleo de agonista adrenérgico clenbuterol en nutrición animal. El clenbuterol (al margen de sus efectos nocivos) ha demostrado ser capaz de modificar la composición final de la carne de los animales tratados al influir en la forma en la que se distribuyen los recursos alimentarios entre la síntesis de proteína muscular (inducida, efecto β -3) y la acumulación de tejido adiposo (reprimida β -2), funcionando de este modo como un agente particionante ^{30,31}.

Situaciones semejantes demuestran las complejas interacciones que existen en entre los sistemas hormonales, nervioso e inmunológico. Tal es el caso de la obesidad y consumo de masa muscular en el Síndrome de Cushing (hipercortisolismo), la pérdida tanto de grasa como de tejido muscular en el hipertiroidismo, la obesidad y letargo en el hipotiroidismo, la caquexia en el caso de enfermedades autoinmunitarias, etc. ^{16,32,33}.

El tejido adiposo es reconocido actualmente como un importante órgano endócrino y un regulador esencial en metabolismo de los lípidos e hidratos de carbono ³⁴.

Es capaz de secretar múltiples mediadores hormonales y no hormonales, destacándose la leptina. Esta última es una hormona peptídica producida por los adipocitos en respuesta a la acumulación de triglicéridos, funciona como un marcador de suficiencia energética en un organismo influyendo a nivel del hipotálamo para la inducción de la saciedad ¹⁶.

En condiciones habituales el tejido adiposo actúa como un importante regulador en el metabolismo glucídico postprandial. Es capaz de responder a la elevación en niveles séricos de insulina que ocurren inmediatamente posteriores a una comida captando glucosa y triglicéridos desde la sangre disminuyendo rápidamente sus niveles séricos ⁸.

Esta función permite minimizar la cantidad de insulina total que el páncreas necesita secretar para controlar los niveles de glucosa en plasma, contribuyendo de este modo a mantener la sensibilidad a la insulina y previniendo el desarrollo de consecuencias metabólicas deletéreas ¹⁶.

Debido a que la hipertrofia del tejido adiposo disminuye su sensibilidad a la insulina, esta condición contribuye al establecimiento de un estado hiperglucémico, inicialmente compensado mediante una secreción aumentada de insulina por parte de las células β del páncreas (hiperinsulinismo). El estado hiperglucémico es compensado solamente en forma parcial en la mayor parte de las ocasiones, esta serie de fenómenos induce la formación de un sistema de retroalimentación positiva característico de la resistencia a la insulina ⁷ (Figura 1-6).

El desarrollo de la resistencia periférica a la insulina es uno de los elementos clave para la génesis del síndrome metabólico así como de diversas enfermedades relacionadas, tales como la Diabetes Mellitus 2⁴.

En términos antropométricos la resistencia periférica a la insulina induce una redistribución de la grasa presente en el tejido adiposo subcutáneo hacia los depósitos viscerales de grasa. La presencia de adiposidad visceral ha sido el criterio antropométrico aislado que ha demostrado mayor correlación con el desarrollo de consecuencias metabólicas adversas y es posible valorarlo mediante la determinación del perímetro abdominal ^{4,5}.

2.3- LEPTINA

El tejido adiposo es reconocido en la actualidad como un órgano endocrino, teniendo un papel central en la regulación del metabolismo de los lípidos e hidratos de carbono. Entre las hormonas producidas por el tejido adiposo destaca la leptina ³⁶.

La leptina es una hormona proteica (167aa) producida por los adipocitos, cuyos niveles de secreción se correlacionan directamente con el grado de acumulación de triglicéridos en el interior del adipocito ³⁶.

Debido a que los niveles séricos de leptina presentan una estrecha correlación con la masa adiposa del individuo, éstos constituyen uno de los principales indicadores fisiológicos de las reservas energéticas de un organismo en particular ⁷.

La leptina es transportada por el torrente sanguíneo hasta las células diana. En el caso de la obesidad las neuronas de los centros orexiógenos del hipotálamo basolateral representan las dianas mejor estudiadas ^{36,37}.

En el hipotálamo basolateral (Núcleo Arcuato) existen grupos neuronales encargados de inducir patrones de comportamiento encaminados a la adquisición de elementos nutritivos desde el entorno (centros orexiógenos) ¹⁶.

La leptina es capaz de atenuar la actividad de los centros orexiógenos, vinculando de este modo el consumo de alimentos con las reservas energéticas del organismo ¹⁶.

Así mismo el tejido adiposo posee una importante función como regulador del metabolismo glucídico postprandial ⁷.

Los adipocitos son capaces de responder a la elevación en los niveles séricos de insulina mediante la captación de glucosa y triglicéridos desde el torrente sanguíneo. Esta acción minimiza el lapso de tiempo en el que las concentraciones de glucosa e insulina superaran niveles basales ³⁸.

Comentado [S2]: La relación entre la infección por el Ad36 y los niveles de leptina se expone en el apartado del adenovirus 36, como aun no se ha definido a la infectoobesidad no lo incluí en este punto del texto

La rápida eliminación del exceso de glucosa desde la circulación es una condición necesaria para mantener la sensibilidad a la insulina a nivel sistémico. Esto cobra especial relevancia en el caso de la obesidad, ya que se considera esta el principal correlato anatómico de la resistencia a la insulina ¹⁶.

Existe una amplia variación en los niveles séricos de leptina determinados en diferentes estudios (1.01–80.8 ng/mL)³⁹. Estas variaciones han sido correlacionadas con las diferencias individuales en la acumulación de grasa corporal, el sexo de los participantes de los estudios, la edad y el estado metabólico (DM2, suplementación hormonal, etc.)⁴⁰.

Diversos estudios reportan niveles séricos de leptina superiores en el sexo femenino con respecto a controles masculinos con IMC comparable ^{39,40}. Existe una importante discrepancia en los valores de leptina reportados en distintas poblaciones. Gijón-Conde ⁴⁰ (2015) reporta en España unos valores medios de leptina sérica de 24.5 ng/mL en mujeres (rango intercuartil 14.1-37.0 ng/mL) y 7.2 ng/mL en hombres (rango intercuartil 3.3-14.3 ng/mL), Considine ³⁴ (1996) reporta en Reino Unido valores de leptina de 31.3 +/- 24.1 ng/mL (rango intercuartil) en participantes obesos y 7.5 +/- 9.3 ng/mL (rango intercuartil) en participantes no obesos.

Comentado [DE3]: Son rangos? Es desviación estándar?

Comentado [S4R3]: Representa el rango comprendido entre final del primer cuartil (percentila 25) hasta el final del 3er cuartil (percentila 75), es una medida ampliamente reportada en estudios en humanos

2.4 LA PROTEÍNA C REACTIVA

La Proteína C Reactiva (PCR, 224 aminoácidos) es una proteína generada en el hígado de los mamíferos en respuesta a una amplia gama de elementos estresores ⁴¹.

Se ubica en el grupo de sustancias conocidos como reactantes de fase aguda y representa uno de los elementos más antiguos del sistema de respuesta al peligro presentes en organismos superiores ⁴².

Su función fisiológica radica en su capacidad de vincularse con la fosfatidilcolina que se expone en la superficie de células dañadas (propias o ajenas) e iniciar la respuesta inmunitaria innata a través del sistema del complemento. Representa uno de los elementos más versátiles del sistema

inmunitario innato y sus niveles séricos se encuentran estrechamente vinculados al grado de inflamación presente en el individuo en un momento dado ⁴¹.

En el curso de la fisiopatología de la obesidad el tejido adiposo sufre numerosos cambios metabólicos, los cuales modifican en gran medida su habilidad para realizar sus funciones reguladoras ⁴².

En primer lugar los adipocitos hipertróficos entran en un estado permanente de estrés metabólico, liberando múltiples mediadores tales como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP) la cual contribuye a inducir un estado de inflamación crónica de bajo grado en el individuo (cuantificable a través de Proteína C Reactiva de alta sensibilidad)⁷.

Se ha documentado que los adipocitos presentes en pacientes obesos son propensos a sufrir una forma particular de muerte celular programada denominada piroptosis. La piroptosis representa una forma particular de apoptosis inducida por la exposición a citosinas proinflamatorias ⁴³. La muerte de los adipocitos hipertróficos puede conllevar al desarrollo de alteraciones sistémicas en el metabolismo de los glúcidos y los lípidos. Los eventos apoptóticos en el tejido adiposo se han correlacionado con la infiltración de macrófagos en el mismo, el desarrollo de la resistencia a la insulina y al desarrollo de esteatosis hepática ⁴⁴.

Por la relación que presenta con la inflamación sistémica, y el vínculo que esta última posee con el desarrollo de desenlaces cardiovasculares adversos, la Proteína C Reactiva se ha convertido en uno de los principales marcadores empleados en la evaluación del riesgo de enfermedad cardiovascular precoz ⁴².

De acuerdo con la Asociación Americana del Corazón (American Heart Association, AHA) niveles séricos de proteína C reactiva inferiores a 1 mg/l predicen un riesgo cardiovascular reducido, niveles comprendidos entre 1 y 3 mg/l representan un riesgo cardiovascular promedio y niveles superiores a los 3 mg/l representa un riesgo cardiovascular incrementado ^{42,45}.

Se ha reportado que la obesidad es una condición inflamatoria sistémica y como tal es capaz de incrementar los niveles de proteína C Reactiva⁸. Se ha corroborado que la obesidad es el componente del síndrome metabólico que mas eleva los niveles séricos de Proteína C Reactiva en los pacientes con esta patología⁴⁶.

2.5. EL SÍNDROME METABÓLICO COMO VINCULO ENTRE LA OBESIDAD Y LA PATOLOGÍA SISTÉMICA

El síndrome metabólico es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en nuestro país ¹.

Representa una entidad clínica definida por un agregado de factores metabólicos, clínicos y bioquímicos los cuales tanto en forma aislada como en conjunto participan en forma directa en el desarrollo de diversas patologías crónico degenerativas, en particular de aquellas que involucran al sistema cardiovascular ³.

Entre las enfermedades en cuya fisiopatología se ha demostrado que el síndrome metabólico juega un papel determinante se encuentran: diabetes mellitus, hipertensión arterial, aterosclerosis, enfermedades coronarias, demencia vascular, diversos tipos de neoplasias, entre otras ⁵.

De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) las cinco primeras causas de muerte en adultos mayores de 20 años en nuestro país fueron en 2010, en orden decreciente: la cardiopatía isquémica, las complicaciones de la diabetes mellitus, neoplasias malignas, enfermedades cerebrovasculares y las enfermedades hepáticas. El síndrome metabólico juega un patrón causal o coadyuvante en la fisiopatología de todas las anteriores ^{1,2}.

El síndrome metabólico, más que representar una enfermedad *per se*, se define como el resultado metabólico de la interacción entre diversas condiciones patológicas para el individuo destacando:

hipertensión arterial, dislipidemia aterogénica, obesidad, hiperuricemia, entre otros ⁴⁷ (Tabla 1-1, disponible en anexos).

La existencia de un estado proinflamatorio crónico en conjunto con la existencia de resistencia a la insulina representa la condición fundamental a para el establecimiento de la patología y el desarrollo de sus complicaciones ^{16,27}.

La cuantificación del grado de inflamación sistémica en un individuo, así como la determinación cuantitativa de su sensibilidad a la insulina podrían representar marcadores útiles para el diagnóstico oportuno del síndrome metabólico y el desarrollo de tratamientos individualizados para el mismo ⁴⁸⁻⁵⁰. Mediante la determinación cuantitativa de ciertos marcadores tales como la Proteína C Reactiva sérica existe la posibilidad de realizar una estimación cuantitativa respecto al estado inflamatorio sistémico de un individuo en un momento dado ⁵⁰.

Esta clase de determinaciones aporta información útil sobre el estado metabólico del individuo, su riesgo de complicaciones y la eficacia de las medidas terapéuticas establecidas, sin embargo su empleo en la práctica clínica no se ha generalizado debido a las limitantes económicas y técnicas que existen para su determinación a escala poblacional ⁴⁹.

Con la finalidad de solventar la limitante antes descrita se emplea para el diagnóstico del síndrome metabólico una definición operacional basada en datos antropométricos y de laboratorio fácilmente disponibles en la práctica clínica habitual ⁴.

2.5.1- DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME METABÓLICO

Con el objetivo de establecer el diagnóstico de síndrome metabólico en la práctica clínica, se emplean fundamentalmente los criterios sugeridos por 3 organismos internacionales: La Organización Mundial De La Salud ²⁷ (OMS), La Federación Internacional De La Diabetes (IDF)⁴ y las guías ATP-III-IV publicadas por el National Cholesterol Education Program (NCEP)⁵ (Tabla 1-1, disponible en anexos).

Las definiciones antes citadas emplean unos criterios antropométricos y de laboratorio comunes para el establecimiento del diagnóstico de síndrome metabólico: obesidad, alteración en el metabolismo de la glucosa, dislipidemia aterogénica y alteraciones en la presión arterial. Los puntos de corte varían de acuerdo a cada una de las definiciones ³⁻⁵.

Los tres criterios citados concuerdan en que la resistencia a la insulina representa el eje central para el inicio y mantenimiento de la fisiopatología del síndrome metabólico. Para su evaluación en la clínica se sugieren dos parámetros mínimos: la glucosa sérica en ayuno y la evaluación de la presencia de obesidad tanto por índice de masa corporal IMC como por perímetro abdominal ³.

Las alteraciones en el metabolismo de la glucosa, ya sea por sus niveles séricos en ayuno o posprandiales (prueba de tolerancia oral a la glucosa) representan un indicador útil en la práctica clínica habitual con respecto al funcionamiento del sistema regulador de la insulina. Sin embargo, a pesar de constituir un indicador altamente específico, este posee poca sensibilidad en el diagnóstico precoz de las alteraciones propias del síndrome metabólico ³. En particular en pacientes jóvenes los cuales poseen una gran capacidad funcional de contrarrestar la resistencia a la insulina mediante un estado de hiperinsulinismo sistémico ⁵¹.

La presencia de obesidad, definida tanto en términos de IMC como de por incremento en el perímetro abdominal ha sido reconocida a la vez como causa y consecuencia del conjunto de alteraciones metabólicas causantes en última instancia del síndrome metabólico ¹⁶.

De acuerdo con los criterios del ATP-III y los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en el año 2000 en México 26.6% de la población con edades comprendidas entre 20 y 69 años cumplían con los criterios para el diagnóstico de síndrome metabólico, proporción que se eleva al 49.8% en 2005²³.

2.6- LA INFECTOBESIDAD

Si bien resulta innegable que la existencia de un balance energético positivo es una condición indispensable para el desarrollo y mantenimiento de la obesidad, cabe destacar que existen diversos elementos que influyen en la manera en la cual se cumple con esta condición tales como son los factores ambientales, endócrinos, idiopáticos, farmacéuticos, nutricionales, genéticos o patogénicos ⁷.

La infectoobesidad representa un campo novedoso el cual estudia el fenotipo obesogénico en función de su asociación con enfermedades infecciosas, particularmente virales ^{52,53}.

El descubrimiento de una relación causal entre las infecciones y la etiología de la obesidad es relativamente nuevo. A la fecha por lo menos 10 diferentes patógenos se han implicado en esta patología tanto en modelos animales como su participación en la obesidad humana ^{52,53}.

Se ha demostrado que ciertos agentes infecciosos pueden influir en la determinación del patrón de adiposidad de un individuo en la misma forma en la que las alteraciones en la regulación endocrinológica, inmunitaria o neurológica ⁹.

Algunos de los patógenos reportados incluyen a *Chlamydia pneumoniae*, la microbiota intestinal y sobre todo se ha observado este fenómeno en infecciones víricas tales como el Paramyxovirus responsable del distemper canino (cCDV), el virus asociado a Rous tipo 7 (RAV-7) en aves, el virus de la enfermedad de Borna (BAV) y diversos adenovirus, en particular el Adenovirus 36 en humanos ⁵².

2.6.1 EL ADENOVIRUS 36

Adenoviridae representa una familia de virus ADN bicatenario con más de 50 miembros. Presentan geometría icosaédrica, un genoma ADN conteniendo entre 25 y 45 kb ¹¹.

Los adenovirus son virus poco selectivos con respecto a las especies, encontrándose virus que pueden infectar indistintamente aves y mamíferos. Aun en un mismo organismo hospedero presentan poca selectividad, siendo capaces de infectar múltiples tipos celulares ¹¹.

Las células epiteliales constituyen su hospedador habitual, en las cuales induce un ciclo lítico.

Los adenovirus habitualmente causan patología en los sistemas respiratorio y digestivo ¹¹.

Durante la viremia primaria y secundaria pueden infectar otros tipos celulares tales como adipocitos, miocitos, hepatocitos, neuronas, linfocitos, etc. En estas células quiescentes (G0) el adenovirus no es capaz de completar su ciclo lítico induciendo una infección persistente ⁵⁴.

La infección persistente por el adenovirus produce diferentes resultados dependiendo del tipo de célula infectada y del serotipo infectante. Por ejemplo el adenovirus 9 ha demostrado poseer capacidad oncogénica sobre adipocitos humanos ⁵⁵.

En el caso particular del Adenovirus 36 (Ad36) se ha reportado una asociación entre la infección persistente por este virus en tejido adiposo y el desarrollo de obesidad ⁷.

El Ad36 es capaz de infectar fibroblastos y preadipocitos humanos induciendo su diferenciación hacia adipocitos maduros. En el adipocito maduro incrementa la captación de glucosa y ácidos grasos desde el medio extracelular, a la vez que favorece la producción de triglicéridos en el mismo ¹¹.

Estos cambios conllevan al desarrollo de un fenotipo particular para los casos de obesidad inducida por adenovirus, en los cuales se observa tanto hiperplasia como hipertrofia del tejido adiposo. Lo anterior contrasta con la obesidad por sobreingesta energética en la cual únicamente se observa hipertrofia adipocitaria ⁵⁶.

Comentado [DES]: Si ya se indicó que puede ser llamado Ad36, se debe continuar así.

Los adipocitos infectados por el Ad36 modifican su patrón de expresión genética, disminuyendo la expresión del gen que codifica leptina, lo cual condiciona un descenso subsecuente en sus niveles séricos ³⁶.

Paradójicamente al incrementar la captación de glucosa y ácidos grasos por parte del adipocito por medio de mecanismos independientes de insulina (permeasas Glut-1) inducen una mejoría en el metabolismo de glúcidos y lípidos por parte de aquellos pacientes infectados respecto a controles no infectados (pareados por grado de adiposidad)¹⁰.

El producto de uno de los genes de expresión temprana en el ciclo de vida del AD36 (*E4ORF1*) ha demostrado ser capaz de incrementar *in vitro* la captación de glucosa por parte de los adipocitos en forma independiente de la insulina ¹⁰. Se ha propuesto a *E4ORF1* como un potencial blanco con interés biotecnológico y se ha otorgado al menos una patente para su empleo potencial ^{57,58}.

2.6.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA EL ADENOVIRUS 36

El método diagnóstico a emplear ante la sospecha de exposición al Ad36 varía dependiendo del tejido a estudiar y del tiempo de exposición al patógeno ³⁵.

En caso de exposición aguda, el virus tiende a replicarse rápidamente en los epitelios respiratorio y digestivo pudiendo demostrarse su genoma en diversas secreciones corporales mediante amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), demostración de sus proteínas de cápside por ELISA o Western Blot o bien cultivo viral ⁵⁹.

Posterior a la primera semana de la infección la cantidad total de virones en sangre disminuye hasta ser indetectable debido a la formación de anticuerpos específicos en contra del virus. A partir de este momento resulta posible determinar la exposición al virus mediante la demostración

de anticuerpos específicos en el suero sanguíneo del paciente ⁶⁰.

El ensayo de neutralización viral mediante suero (Serum Neutralization Assay, SNA) es considerado el *gold standard* para la determinación de la presencia de inmunidad contra el virus, debido a que evalúa funcionalmente la capacidad de los anticuerpos para inactivar el virus en forma específica. Otra opción para el estudio de anticuerpos específicos en contra del Ad36 consiste en la determinación de inmunoglobulina g (IgG) e Inmunoglobulina M (IgM) mediante ELISA y/o Western Blot ²⁸.

A pesar de que el empleo de ELISA resulta más rápido que el SNA aún existe discrepancia respecto a la sensibilidad y especificidad que se reporta en diversos estudios, debido principalmente a reactividad cruzada de los anticuerpos contra múltiples serotipos ⁶¹.

Con el objetivo de demostrar la existencia de infección latente por Ad36 en el tejido adiposo es posible la obtener una muestra del mismo mediante biopsia (escisional o por aspiración) y demostrar subsecuentemente la presencia de genoma vírico mediante PCR ^{11,62}.

2.6.3 DETECCIÓN DEL GENOMA DEL ADENOVIRUS 36 EN TEJIDO ADIPOSO HUMANO.

A pesar de la existencia de múltiples reportes en la literatura respecto a la asociación de la presencia anticuerpos contra el Ad36 y el desarrollo de sobrepeso-obesidad, la demostración del genoma viral en tejido adiposo humano continua siendo una tarea elusiva ⁶³.

Ponteiro, en 2015, reporta haber amplificado el gen de proteína fibrosa de cápside del Ad36 en muestras de tejido adiposo visceral humano. En su estudio (21 pacientes), únicamente 4 (19%) resultaron positivos para Ad36 en relación al gen de la proteína fibrosa de la cápside. De igual manera se evaluó el gen *E4ORF1* encontrándose únicamente 1 caso positivo. No se provee una explicación respecto al porqué de esta discrepancia ⁶³.

Goossens en 2011 estudiando 509 pacientes en los países bajos y Bélgica determinó una prevalencia de anticuerpos contra Ad36 del 5.5%, mucho más baja que las reportadas comúnmente en

la literatura. Así mismo la seropositividad no guardó correlación con la adiposidad del individuo. En el mismo estudio se intentó determinar la presencia del genoma de Ad36 en el tejido adiposo visceral de 31 pacientes obesos mediante (Reacción en cadena de la polimerasa) PCR. Ninguno de los pacientes evaluados fue positivo para el genoma de Ad36 ⁶⁴.

Estas discrepancias han sido el origen de una importante controversia en la literatura. Si bien es incuestionable que los adenovirus son capaces de infectar diversos tejidos y que en modelos animales el Ad36 induce un fenotipo obesogénico, diversos investigadores han cuestionado la validez de la asociación entre el Ad36 y el desarrollo de la obesidad en humanos. Esta controversia se sustenta en la discrepancia que existe entre la seroprevalencia de anticuerpos contra el Ad36 y la posibilidad de detectar su genoma en muestras de tejido humano ⁶⁴⁻⁶⁶.

2.6.4 PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR ADENOVIRUS 36 EN POBLACIONES HUMANAS.

El Adenovirus 36 representa un virus con distribución cosmopolita en diferentes poblaciones humanas ³⁵ (Tabla 2-1, disponible en anexos).

La prevalencia de la infección por este virus ha sido evaluada por diversos estudios entre los que destacan las siguientes investigaciones:

Atkinson¹² en 2005 encontró en una muestra de adultos obesos en los estados unidos una prevalencia de anticuerpos contra el Ad36 del 30% y 11% para obesos y no obesos respectivamente.

Trovato⁶⁷ en 2009 realizó un estudio en adultos italianos encontrando una prevalencia de anticuerpos para Ad36 del 66% en obesos y 33% en controles adultos sin sobrepeso.

En 2010 Atkinson⁶⁸ realizó un estudio en niños con sobrepeso/obesidad en corea del sur encontrando una prevalencia global de anticuerpos contra Ad36 del 30%.

Gabbert⁶⁹ en 2010 realizó un estudio de casos y controles con niños con sobrepeso/obesidad en estados unidos, encontrando una prevalencia de anticuerpos del 22% y 7% en obesos y no obesos respectivamente.

Trovato⁷⁰ en 2010 en Italia evaluó la presencia de anticuerpos contra Ad36 en pacientes obesos que presentaban hígado graso no alcohólico respecto a controles sanos quienes no presentaban esta condición. El 32% de los pacientes que presentaron hígado graso poseían anticuerpos contra Ad36 respecto al 46% de aquellos que no presentaban hígado graso.

Laing⁷¹ en 2013 efectuó un estudio en 115 mujeres estadounidenses con edades comprendidas entre 18 y 19 años, encontró una prevalencia de anticuerpos contra Ad36 del 52% en las pacientes sin incremento en la adiposidad respecto al 64% de las pacientes con incremento en la adiposidad.

Parra-Rojas¹³ efectuó en México durante 2013 la determinación de anticuerpos contra Ad36 mediante Elisa en 75 niños con peso normal y 82 con obesidad, encontrando una presencia de anticuerpos del 41.4% y 58.6% respectivamente.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

2.6.5. EVIDENCIA EN CONTRA DEL ROL DEL ADENOVIRUS 36 EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD

Los estudios que apoyan el papel de diversos agentes infecciosos en el desarrollo de la obesidad se sustentan fundamentalmente en estudios de seroprevalencia a nivel comunitario⁶⁶.

El método diagnóstico empleado por excelencia para la determinación de la presencia del Ad36 es el Ensayo Por Neutralización En Suero (SNA). Esta técnica permite comprobar en forma fidedigna la presencia de anticuerpos neutralizantes en contra de un patógeno (vírico, sobre todo) en el suero de un paciente⁶⁰.

La presencia de títulos elevados de anticuerpos se correlaciona con exposición ambiental a un determinado virus, mas no necesariamente infección activa por el mismo. Más aún, a pesar de

que existen ciertos epítetos definitorios de las serovariedades víricas, muchas veces las respuestas inmunitarias más vigorosas no se encuentran dirigidas contra estos sino contra componentes de cápside (o envoltura) comunes a una familia vírica completa. Esto conlleva a la aparición de un importante número de reacciones inmunológicas cruzadas entre virus estrechamente emparentados ^{60,64,66}.

Debido a lo anterior la Sociedad Internacional de Endocrinología ha puesto en duda el papel que pudiese jugar el Ad36 en relación a la epidemia de obesidad que se ha presentado desde finales del siglo XX⁸. Se argumenta que si bien “la infección por Adenovirus 36 ha reportado inducir la proliferación adipocitaria e incrementar el peso corporal en modelos preclínicos e individuos que presentan sobrepeso tienen títulos más elevados de anticuerpos contra el virus que los individuos sin sobrepeso. Sin embargo, sin mayor evidencia causal, resulta improbable que este mecanismo contribuya en forma significativa a la epidemia actual que representa la obesidad” ⁸.

Esta afirmación se ve respaldada por los estudios de Broderick⁷², Zohu⁷³, Berger⁷⁴, Goosens⁶⁴, Sabin⁷⁵, en los cuales no pudo ser demostrada la asociación entre la presencia de anticuerpos neutralizantes contra Ad36 y la masa adiposa presente en un individuo. Incluso los mismos partidarios del Ad36 como causante de la obesidad, han tenido que reconocer que el fundamento biológico de esta relación resulta poco sustentable ⁷⁶.

CAPITULO 3

JUSTIFICACIÓN

La obesidad es una de las enfermedades metabólicas más prevalentes en México. Desde 1980 hasta la fecha, el porcentaje de personas obesas se ha incrementado hasta alcanzar más del 30% en la presente década ^{2,6}.

De continuar este incremento se estima que para 2050 la prevalencia de obesidad será del 54 % de los hombres y del 57 % de las mujeres ^{2,6}.

Yucatán posee una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad del 82% para las mujeres y del 78.6% para los hombres, lo cual determina una prevalencia por encima de la media nacional ⁶.

Debido a los importantes daños que la obesidad puede ocasionar a la salud de un individuo esta representa un importante factor de riesgo para la población yucateca ^{20,25,26}.

La obesidad representa un evento fisiopatológico complejo en el que interviene un balance energético positivo sostenido a lo largo del tiempo, así como un conjunto de alteraciones en los sistemas endocrino, nervioso e inmunológico, lo que conlleva al establecimiento en forma sostenida de un fenotipo proinflamatorio el cual es responsable de la mayor parte de sus efectos deletéreos ¹⁶.

La infectoobesidad representa un campo novedoso el cual estudia el fenotipo obesogénico en función de su asociación con enfermedades infecciosas, particularmente virales. El Adenovirus 36 (Ad36) es un patógeno ubicuo en la naturaleza el cual ha demostrado capacidad de inducir la sobreacumulación de lípidos en tejido adiposo tanto *in vivo* como *in vitro*. Diversos grupos de investigación han validado este proceso a nivel experimental ³⁵.

Esto es debido a que el virus Ad36 es capaz de establecer una infección persistente en tejido adiposo. Sin embargo, la información referente a la prevalencia de infección persistente por Ad36 en la población mexicana es escasa ¹³.

Actualmente no se cuenta con un método estandarizado que permita detectar en forma rápida y fiable la presencia del genoma del Adenovirus 36 en condiciones de campo ⁷⁷.

Yucatán ocupa uno de los primeros lugares nacionales en relación a la prevalencia de sobrepeso y obesidad, sin embargo, aún no se cuentan con estudios que evalúen el papel que desempeña el Adenovirus 36 en el desarrollo de sobrepeso-obesidad en la población del sureste mexicano. Por ello la presente investigación tiene como objetivo desarrollar un protocolo que permita detectar mediante técnicas moleculares la presencia de infección persistente por Ad36 así como la evaluación de marcadores metabólicos de relevancia para la evaluación integral del paciente con sobrepeso/obesidad, en adultos de una población con alta prevalencia de sobrepeso y obesidad en el estado de Yucatán.

CAPITULO 4

OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de genoma del Adenovirus 36 en el tejido adiposo de adultos provenientes de una población con elevada prevalencia de obesidad en el estado de Yucatán.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar y optimizar una metodología para la obtención de material genómico a partir de muestras de tejido adiposo humano adquiridas por biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF).
- Diseñar y optimizar un protocolo para la detección del genoma de Adenovirus 36 por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Determinar los niveles séricos de leptina y proteína C reactiva en los participantes en el estudio por medio de ELISA
- Determinar la presencia del genoma del Ad36 en las muestras de tejido adiposo obtenidas de los participantes.

CAPITULO 5

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA DE ESTUDIO

El presente estudio tiene la finalidad de generar una primera aproximación al estudio de la infección persistente por Ad36 en el tejido adiposo de la población yucateca. Se evaluará una muestra poblacional limitada, seleccionada de acuerdo a criterios antropométricos, con el objetivo de maximizar la posibilidad de detección del virus. Esto permitirá la planificación de estudios con mayor peso en la escala de causalidad. Debido a lo anterior, los resultados del presente estudio no podrán ser empleados en forma directa para predecir el comportamiento de la infección a nivel poblacional.

5.2 TIPO DE ESTUDIO

El estudio propuesto será de tipo exploratorio: analítico, transversal, observacional, prospectivo. El diseño ha sido seleccionado con el objeto de proveer una primera aproximación al estado de la población yucateca en relación a la infección persistente por Ad36 en el tejido adiposo.

5.3 SELECCIÓN DE PARTICIPANTES

5.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Adultos con edad comprendida entre 18 y 80 años que posean su residencia habitual en la comunidad seleccionada.
- IMC igual o superior a 30 kg/m² (o igual o superior a 25 kg/m² en mujeres de talla menor a 150 cm y en hombres de talla menor a 160 cm) y/o perímetro abdominal ≥80 cm en mujeres o ≥90 cm en hombres.

5.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Negativa del adulto para participar en el estudio, incapacidad o negativa para otorgar consentimiento informado
- Personas que padezcan de alguna enfermedad crónico-degenerativa no controlada, especialmente cualquiera de los siguientes: pacientes diabéticos con Hb1ac >10 o glucosa en ayuno mayor a 350 mg/dL, paciente hipertenso con cifras de presión arterial igual o superior a 160/100 mmHg al momento de la medición, niveles muy elevados de triglicéridos séricos (>400 mg/dL), colesterol de baja densidad muy elevado (LDL > 190 mg/dL).
- Personas con alguna malformación congénita o alteración metabólica conocida.

5.3.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Información incompleta respecto del participante (muestras incompletas/no valorables)
- Retiro del consentimiento informado por parte del paciente

5.4 ASPECTOS BIOÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN

Debido a que se trata de una investigación en la cual se emplearon tejidos provenientes de seres humanos todos los procedimientos han sido sancionados por un comité de bioética. A su vez todos los procedimientos se realizaron cumpliendo con los Lineamientos de Obligación Universal para la Investigación en Humanos, adoptadas por la Secretaría De Salud e Indicadas En El Título

V, Artículos Del 96 Al 103 De La Ley General De Salud De Los Estados Unidos Mexicanos y en las normas relativas a la ética de la investigación biomédica en humanos, en la Declaración De Helsinki y modificadas en la Asamblea Médica Mundial De Hong Kong. Cada participante fue informado de los objetivos del estudio y otorgó su consentimiento por escrito previo a la realización de cualquier procedimiento. Los participantes fueron seleccionados con base en los criterios de inclusión, exclusión y eliminación del presente estudio.

La carta de aprobación del presente protocolo por parte del Comité de Bioética (Universidad Marista Campus Mérida) se encuentra disponible en el Anexo II.

Comentado [DE6]: Checar los tiempos de los verbos.

5.5 PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos recabados en la presente investigación fueron procesados mediante el paquete estadístico SPSS v23. Se determinaron las medidas de tendencia central y dispersión, así como la prevalencia muestral de infección persistente por Ad36.

Aún cuando no es un estudio diseñado para determinar correlación epidemiológica, se pesquisó la presencia de asociaciones potenciales entre las variables citadas en el presente estudio con el objetivo de permitir una mejor planificación para el diseño de estudios posteriores.

5.5.1 CALCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Dado que el objetivo central del presente estudio consiste en demostrar la presencia o ausencia del Ad36 en la población yucateca, se empleó la metodología para la determinación de población libre de enfermedad, tal como propuso Martín et al^{78,79}.

$$p[(x=0) | \text{HERD} -] = \binom{m}{0} \times p_2^0 \times q_2^{m-0} = q_2^m$$

Donde

P{(x=0) | herd-} = probabilidad de animales sanos en una población libre de enfermedad

M= media poblacional

P= prevalencia poblacional estimada (se toma 15%, literatura reporta una prevalencia de anticuerpos entre el 7 y 60%)

$Q=1-p$

Empleando el programa estadístico EpiTools se ajustó por sensibilidad de la prueba diagnóstica (90% de acuerdo a los reportes en la literatura), sensibilidad poblacional del 99%, así como al nivel de significancia esperado para el estudio ($\alpha=0.05$), requiriéndose evaluar **un mínimo de 32 participantes**, todos con resultados negativos para considerar a la población libre de enfermedad (Figura complementaria 5-1) .

5.6. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

5.6.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE TEJIDO ADIPOSO

Se obtuvo una muestra de tejido adiposo de cada participante mediante el protocolo de biopsia por aspiración con aguja fina.

El procedimiento consistió en la asepsia del sitio de punción (panículo adiposo abdominal, región inferior- derecha al ombligo) mediante la aplicación de etanol 70% v/v y povidona yodada, se aplicó lidocaína 10% spray como anestésico tópico.

Posterior a este procedimiento se procedió a puncionar la piel y el tejido adiposo del paciente en un ángulo de 45° respecto a la piel, mediante el empleo de una aguja estéril 21Gx32mm acoplada a una jeringa de 10cc.

Inmediatamente al ubicarse en tejido adiposo se retrajo el embolo de la jeringa y la aguja fue desplazada longitudinalmente en el tejido adiposo manteniendo un vacío constante, tras 10 desplazamientos longitudinales se permitió que el embolo retornase a su posición inicial, extrayendo la aguja de la piel del paciente, aplicando un apósito en el sitio de punción para su protección.

Una descripción gráfica del proceso puede observarse en la (Figura 6-1).

El tejido obtenido mediante la punción fue colocado en un tubo para microcentrífuga estéril, almacenado a 4°C durante el transporte, y posteriormente a -80°C a su llegada al laboratorio.

6.6.2 EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

El material genómico fue extraído mediante la metodología de extracción orgánica por medio de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. El protocolo consta de una etapa de lisis tisular, seguida de extracción orgánica del material genómico ⁸⁰.

Para la lisis de los componentes celulares se empleó el buffer de lisis para cola de ratón (MIT, USA)⁸¹, cuyos componentes pueden consultarse en (Tabla complementaria 5-1).

Para la extracción del material genómico, se ultracongeló cada muestra de tejido adiposo (-80°C), añadiéndosele en forma inmediata 250 µL del buffer de lisis a temperatura ambiente (25°C) bajo condiciones de esterilidad, seguido de homogenización mediante vórtex por 1 minuto.

Posteriormente se añadieron a la muestra 5 µL de proteinasa k (20mg/mL), seguido de incubación a 65°C por 1 hora, con homogenización manual por inversión cada 10 minutos. La muestra fue centrifugada a 2000g por 5 minutos a 25°C.

El sobrenadante fue transferido a un tubo para microcentrífuga estéril añadiéndosele un volumen de fenol saturado con buffer (pH 6.8) y 1 volumen de cloroformo-isoamílico (24:1). La muestra fue homogenizada mediante inversión por 10 minutos, seguido de centrifugación a 16000g por 5 min a 4°C.

Se recuperó la fase superior, misma que fue sometida a un nuevo lavado con un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1). La muestra fue centrifugada nuevamente a 16000 g por 5 minutos a 4°C. Se recuperó la fase superior, misma que se transfirió a un tubo para microcentrífuga estéril.

Se añadió 1/50 volúmenes de NaCl 5M (cantidad necesaria para una concentración final de NaCl 100mM) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a 4°C. La muestra fue homogenizada por inversión y sometida a centrifugación a 16000g durante 1 hora a 4°C.

Se retiró el sobrenadante y el pellet resultante fue lavado con 1 mL de etanol absoluto. Se repitió el proceso de centrifugación a 16000g durante 1 hora a 4°C.

Posteriormente se retiró todo el volumen posible de etanol con ayuda de una micropipeta y se permitió el secado del pellet en campana de flujo laminar con ayuda de un bloque de calentamiento a 50°C. Una vez retirado el etanol, el pellet fue resuspendido en 50 µL de agua libre de nucleasas.

La integridad del material genómico se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (TAE 1X, 80v, 50 min) de 2 µL del ADN resuspendido., revelado con bromuro de etidio, posteriormente SYBR-Green. Véase (Figura 6-2)

5.6.3 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN GENÓMICO

La integridad del ADN obtenido fue evaluada mediante la amplificación de un fragmento del gen de β-actina humana por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los cebadores fueron diseñados en el laboratorio empleando el programa informático Pick Primer de BLAST (NCBI), empleando la secuencia de B-actina humana provista por GeneBank.

Cebador forward: 5'CTGTGCTATCCCTGTACGCC

Cebador Reverse: 5'ATGTGACAGCTCCCCACACA

Longitud esperada del fragmento: 743 pb

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Axigen, empleando Taq-Polimerasa (Invitrogen) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, la temperatura de alineamiento se calculó mediante el programa Tm-calculator de Thermo Scientific (55°C). Véase (Tablas 5-2 Y 5-3, Figura 6-3)

Comentado [DE7]: Fue la integridad o la pureza?

Comentado [S8R7]: Se confirmaron ambos conceptos, se corroboró que el ADN no se había fragmentado en exceso (quedaba al menos una región amplificable de 743 pb) y se corroboró la ausencia de inhibidores de PCR en la muestra.

5.6.4 DETECCIÓN DEL GENOMA DEL ADENOVIRUS 36 MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

La determinación de la presencia del genoma del Ad36 se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final.

Inicialmente se emplearon los cebadores descritos en la literatura por Pasarica⁸² en 2008, mismos que persiguen amplificar un fragmento del gen de proteína fibrosa de cápside y un fragmento del gen *E4ORF1* propio del Ad36.

Los cebadores fueron sintetizados por el Instituto de Biotecnología de la UNAM. A su llegada al laboratorio se alicuotaron en condiciones de esterilidad, diluidos hasta una concentración de trabajo de 10mM y almacenados a -20°C hasta su empleo.

Las secuencias de los cebadores se describen a continuación.

Para el gen de la proteína fibrosa de cápside (PCR enclavada):

- Longitud esperada para el producto de PCR – 821 pb
- cebador externo forward: 5´gtctggaaaactgagtgtggata
- cebador externo reverse: 5´atccaaaatcaaatgtaatagagt
- Longitud esperada para el producto de PCR- 477 pb
- cebador externo forward: 5´ttaactggaaaaggaataggta
- cebador interno reverse: 5´ggtgttggttgcttaggata

Para el gen *E4ORF1*:

- Longitud esperada para el producto de PCR – 138 pb
- Forward: 5´ggcataactaaccagtcgatg
- Reverse: 5´aatcactctctccagcagcagg

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador marca Axigen, empleando ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion y la ADN polimerasa estándar (Taq-polimerasa) ambas de Invitrogen, siguiendo los protocolos del fabricante.

Todos los reactivos empleados fueron de grado biología molecular, preservados a -80°C hasta el momento de su empleo y procesados en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Se empleó el programa *Tm Calculator* de Thermo Scientific para predecir *in silico* las temperaturas de alineamiento de cada pareja de cebadores de acuerdo a la polimerasa de interés.

Para la evaluación de los cebadores descritos por Pasarica⁸² en 2008 se empleó la metodología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa enclavada para la demostración del gen de la Proteína Fibrosa de Cápside del Ad36 y PCR de punto final para el gen de la proteína *E4ORF1*.

La amplificación se llevó a cabo empleando polimerasa "Phusion High-Fidelity" de Invitrogen. Las reacciones de se realizaron con un volumen de 20 µL de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Tabla 5-4).

La reacción fue montada sobre hielo en condiciones de esterilidad, para el proceso se empleó una termocicladora Maxigen II de la marca Axygen con capacidad de gradiente térmico con 6 temperaturas. Se corroboró en forma experimental la idoneidad de la temperatura de alineamiento previsto por cada cebador (Tabla 5-5).

Los resultados de la amplificación fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (TAE 1X, 80v, 50 min) revelado con bromuro de etidio, subsecuentemente SYBR-green (Figura 6-4).

5.6.5 DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA ADENOVIRUS 36 MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA ENCLAVADA

Ante la posibilidad de amplificaciones inespecíficas debidas a la presencia de Adenovirus ambientales, se optó por el empleo de la metodología de PCR enclavada.

El objetivo del diseño consistió en excluir la amplificación del genoma humano en una primera etapa (cebador externo), para posteriormente amplificar en forma específica el genoma del Ad36 (cebador interno).

Los cebadores fueron diseñados en el laboratorio mediante el programa Pick Primer de BLAST tomando como referencia la secuencia genómica del Ad36 disponible en GENE BANK (GQ384080.1).

Se emplearon como parámetros para la selección de los cebadores una longitud esperada de amplificación entre 0.300 y 1.5 Kb, una longitud del cebador entre 18 y 25 nucleótidos, temperatura de alineamiento predicha entre 57 y 65 °C, diferencia de T_m entre cebadores máximo 3°C. Al menos 3 faltas de concordancia contra otras secuencias genómicas, con al menos 2 en extremo 3'. Se solicitó la búsqueda en 100,000 blancos con un valor de E esperado de 30,000.

Se evaluó cada uno de los cebadores en busca de alineamientos inapropiados con el genoma humano. Así mismo, se procuró que los cebadores internos únicamente reconociesen el genoma del Ad36 en exclusión de otros adenovirus emparentados. En adición a la búsqueda general se evaluó en forma dirigida la existencia de concordancia con mamíferos, virus, bacterias y hongos, no se encontró evidencia de alineamiento inespecífico en ninguna de las series evaluadas (Tabla 5-6).

Las temperaturas de alineamiento de cada pareja de cebadores fueron calculadas mediante el programa informático T_m Calculator de Thermo para su empleo con Taq-Polimerasa. Se realiza-

ron corridas experimentales empleando el protocolo estándar de amplificación mediante Taq- Polimerasa con ADN humano en ausencia del adenovirus y con control positivo del genoma del Ad36. Condiciones de amplificación en (Tabla 6-7)

El resultado de la amplificación fue evaluado por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, (TAE 1x, 80 v, 50 minutos), revelado con bromuro de etidio, subsecuentemente SYBR-green. Las bandas correspondientes a las amplificaciones fueron escindidas y purificadas mediante un kit comercial para la recuperación de productos de PCR (Zymoclean Gel Dna Recovery) para su subsecuente secuenciación (Instituto de Biotecnología de la UNAM). (Figura 6.5, Tabla 6-1)

5.6.6 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO SANGUÍNEO

Las muestras de sangre venosa fueron obtenidas mediante técnica de venopunción estándar en región antecubital.

Previa autorización escrita por parte del participante, se colocó al mismo en una posición de sedestación cómoda, con el antebrazo a puncionar colocado en una superficie firme que proporcione acceso a la región antecubital anterior.

Se colocó un torniquete elástico aproximadamente 10 cm por encima del sitio elegido para la punción, solicitándole al participante que abra y cierre su mano en repetidas ocasiones.

Una vez identificada la vena a puncionar, se realizó la antisepsia del área con etanol al 70% y se procedió a la inserción de la aguja en un ángulo de 15° con respecto a la piel del paciente. Se extrajo un mínimo de 3 mL de sangre venosa por participante, se retiró el torniquete, y se coloca un apósito en el sitio de punción.

La sangre extraída fue depositada en un tubo al vacío para suero sanguíneo con activador de la coagulación ("Vacutainer tapa roja") debidamente rotulado. Se permitió la formación del coagulo sanguíneo (10 min a temperatura ambiente), siendo almacenado posteriormente en refrigeración y transportada al laboratorio para donde fue procesada a la brevedad.

En el laboratorio se procedió a separar el suero sanguíneo por medio de centrifugación. Los tubos con la sangre del paciente fueron sometidos a centrifugación a 1000 g por 10 min a temperatura ambiente, recuperándose el sobrenadante. El suero sanguíneo obtenido fue alicuotado en tubos para microcentrífuga estériles, siendo ultracongelado a -80°C hasta su empleo definitivo.

Al tratarse de muestras humanas, los residuos y el material que entra en contacto con ellos ha sido eliminado de acuerdo a la normatividad de los Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (RPBI).

5.6.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA C REACTIVA SÉRICA

La determinación de los niveles séricos de Proteína C reactiva se realizó mediante la técnica de Inmunoadsorción Acoplada a Enzima (ELISA) mediante un kit comercial previamente validado provisto por DRG. El ensayo se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

El kit consta de 12 tiras para lector de ELISA con 8 pocillos cada una. Cada pocillo se encuentra recubierto desde fábrica con anticuerpos monoclonales contra proteína C reactiva humana. Se provee proteína C reactiva en estándares prediluidos para la generación de la curva de calibración (0, 0.4, 1,5, 10 mg/l). Es posible observar la curva de calibración obtenida en la Figura complementaria 6.6.1

En el caso de las muestras de los participantes, estas fueron prediluidas 1:100 en el buffer provisto para tal fin.

Se colocaron 10 µL de la muestra diluida o el estándar en los pocillos de la placa de ELISA, añadiéndose de inmediato 100 µL del conjugado enzimático para Proteína C reactiva.

La tira reactiva fue agitada vigorosamente por 30 segundos, seguido de un periodo de incubación a 25°C por 45 minutos.

El contenido de los pocillos es retirado mediante inversión, y se realiza el lavado de los mismos en 5 ocasiones con agua destilada.

Seguidamente se añadieron a cada pocillo 100 μ L de sustrato cromógeno (Tetrametilbenzina, TMB), agitando gentilmente por 5 segundos y permitiendo su incubación por 20 minutos.

Finalizado el periodo de incubación se añadieron 100 μ L de Stop Solution a cada reacción, agitando gentilmente por 30 segundos. La absorbancia fue determinada de inmediato en un lector para microplacas a una longitud de onda de 450 nm.

Con base en las lectoras proporcionadas por los estándares se construyó una curva patrón con respecto a la cual se calcularon los valores de proteína C reactiva de los participantes.

5.6.8 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LEPTINA SÉRICA

La determinación de los niveles séricos de leptina se realizó mediante la técnica de inmunoadsorción acoplada a enzima (ELISA), empleando mediante un kit comercial provisto por DRG.

El kit contiene 12 tiras para ELISA con 8 pocillos recubiertos desde fábrica con anticuerpos monoclonales contra leptina humana. Así mismo se provee muestras con concentraciones conocidas para la elaboración de la curva patrón. Las determinaciones se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tanto las muestras de suero de los participantes del estudio, como los estándares provistos por el kit se procesaron de la misma manera. Se dispone de estándares para 0, 2, 5,25, 50, 100 ng/mL de leptina sérica. La curva de calibración puede ser observada en la (Figura Complementaria 6.6.2)

Por cada muestra se colocaron 15 μ L de la misma en un pocillo de la tira reactiva, subsecuentemente se añadieron 100 μ L del buffer de ensayo (anticuerpo conjugado contra leptina).

Se efectuó una homogenización vigorosa de las muestras durante 30 segundos posterior a lo cual fueron incubadas a temperatura ambiente por un lapso de 2 horas. Posterior al periodo de incubación, los pocillos fueron vaciados mediante inversión y sometidos a lavado mediante la solución provista en 3 ocasiones.

Después de los lavados se añadieron 100µL de antisuero a cada una de las muestras, seguido de incubación a temperatura ambiente por 30 minutos.

Posterior al periodo de incubación, se repitió el procedimiento de lavado en 3 ocasiones. Seguido del depósito de 100µL del complejo enzimático en cada pocillo, incubando a temperatura ambiente por 30 minutos.

Se repitió el proceso de lavado y vaciamiento por inversión en 3 ocasiones. Subsecuentemente se añadieron 100 µL de la solución de sustrato (Tetrametilbenzina, TMB) en cada pocillo, permitiendo que la reacción proceda a temperatura ambiente por 15 minutos. Transcurrido el periodo de incubación, la reacción es detenida mediante la adición de 50 µL de stop solution, seguido de la determinación inmediata de la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de ELISA.

5.6.9 PRUEBAS DE CAMPO

Debido a que en la presente investigación se empleó material biológico procedente de seres humanos, se requirió que el protocolo de investigación fuese aprobado en forma previa a la fase de campo por parte de un comité de Bioética. La revisión fue llevada a cabo por el Comité de Bioética de la Universidad Marista de Mérida, cuyo dictamen puede consultarse en Anexo I.

Se llevaron a cabo muestreos poblacionales en la Comisaría de Yaxnik, Mérida, Yucatán (Abril 2019), el Municipio de Chapab Yucatán (Noviembre 2019) y la comisaria de Komchen, Mérida Yucatán (Noviembre 2019) (Figura 6-8).

La invitación a participar fue abierta en cada una de las comunidades. Posterior a la firma del consentimiento informado, cada participante respondió un breve cuestionario (datos etarios, somatometría, antecedentes patológicos), se colectó una muestra de sangre venosa de acuerdo a los procedimientos antes descritos (Sección 5.6) y una muestra de tejido adiposo. Las muestras fueron transportadas en hielo al laboratorio y procesadas según la metodología antes descrita.

CAPITULO 6

RESULTADOS

6.1.- EXTRACCIÓN DE ADN PROCEDENTE DE MUESTRAS DE TEJIDO ADIPOSO OBTENIDAS MEDIANTE BIOPSIA POR PUNCIÓN CON AGUJA FINA

La obtención de muestras tisulares mediante Biopsia Por Aspiración Con Aguja Fina (BAAF) representa un procedimiento sencillo, económico y mínimamente invasivo, el cual permite obtener una muestra suficiente de tejido para la realización de estudios histológicos o genéticos.

El procedimiento es rápido (5-10 minutos), con mínimas molestias para el participante, mismo quien puede retornar a sus actividades habituales en forma inmediata. El empleo de BAAF en tejido adiposo es considerada como una técnica estándar en el campo de la medicina para el diagnóstico de diversas patologías del tejido conjuntivo, incluida la amiloidosis sistémica ⁸³. Un diagrama general de la técnica puede observarse en la (Figura 6-1).

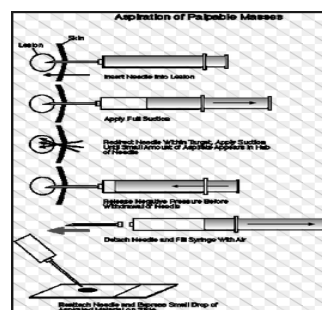


Figura 6-1.- Diagrama esquemático del proceso para la realización de Biopsia Por Aspiración Con Aguja Fina (BAAF). Nótese que la aguja se desplaza en repetidas ocasiones en el interior del tejido a muestrear, manteniendo un vacío constante con el embolo de la jeringa. El material biológico migrará al interior de la aguja desde donde será recuperado.

Comentado [DE9]: Sería 6.1 es capítulo 6...

El empleo de Biopsia por Aspiración con Aguja Fina posibilita obtener directamente con células del tejido adiposo (sitio propuesto para la infección del Ad36) permitiendo confirmar la presencia del genoma viral en el tejido.

La búsqueda directa del genoma viral en el tejido resuelve diversas limitaciones que se hubieron presentado en la realización de estudios previos, tales como el empleo aislado de marcadores serológicos como método diagnóstico ⁷⁷.

Así mismo, dado que la metodología de obtención de muestra mediante BAAF es sencilla, económica y relativamente exenta de riesgos nos permitió superar otra de las limitantes que se habían presentado en estudios previos de esta naturaleza: el tamaño muestral.

La estandarización de la metodología de BAAF para su empleo en tejido adiposo en condiciones de campo, nos ha provisto de la oportunidad para realizar la determinación directa del genoma del Ad36 en un número significativo de voluntarios (n=72), ninguna de las cuales reportó efectos adversos derivados del procedimiento con gravedad superior a dolor leve en la zona o hematoma cutáneo (moretón). Estudios previos que han realizado la pesquisa del Ad36 en tejido adiposo han presentado limitaciones importantes en cuanto al número de participantes evaluados, debido a que en muchos casos se dependían de procedimientos diagnósticos invasivos para su realización ⁶².

La estandarización inicial del método se realizó mediante pruebas preliminares en voluntarios sanos bajo condiciones de laboratorio. Se determinó en forma experimental la localización de punción, el volumen de la jeringa y el calibre de la aguja a emplear.

Se concluyó que la aproximación óptima consiste en obtener la muestra de la región abdominal, en el área infraumbilical (Fascias de Camper y Scarpa), debido a la abundancia de tejido adiposo presente en esa zona tanto en hombres como mujeres, así como a la baja densidad de terminaciones nerviosas, y consecuentemente menores molestias durante el procedimiento.

El tipo de aguja idóneo para el proceso resultó una aguja hipodérmica 21G x32 mm y el volumen idóneo de la jeringa se determinó en 10cc. Lo anterior debido a que este calibre de aguja permitió

obtener muestras de tejido adecuadas con un mínimo de contaminación hemática, y a que la jeringa de 10 cc permitió generar un vacío adecuado sin que su manipulación resultase tediosa durante el procedimiento.

Empleando la combinación descrita de sitio de punción, tipo de aguja y volumen de jeringa permitió obtener en forma reproducible muestras de tejido adiposo con una masa de 20 a 60 mg en condiciones de laboratorio.

Empleando la metodología de BAAF es posible obtener la muestra de tejido adiposo en menos de 10 minutos desde iniciado el procedimiento, con molestias mínimas por parte de los voluntarios. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su empleo definitivo.

Se corroboró la viabilidad en la extracción de material genómico a partir de las muestras de tejido adiposo obtenido por BAAF mediante la lisis del material celular y extracción orgánica de ADN (sección de materiales y métodos).

Los resultados del procedimiento pueden observarse en la Figura 6-2 . Las figuras corresponden a geles de agarosa sometidos a electroforesis y revelados con SYBR-green. En cada carril en el que fue colocada una muestra de ADN se observó una banda nítida con un peso molecular superior a los 10 Kb, misma que resulta compatible con ADN genómico de buena integridad, en ausencia de artefactos que pudiesen sugerir degradación de la muestra o contaminación con proteínas. Se concluye que se trata de una muestra genómica integra de calidad adecuada para continuar con el proceso.

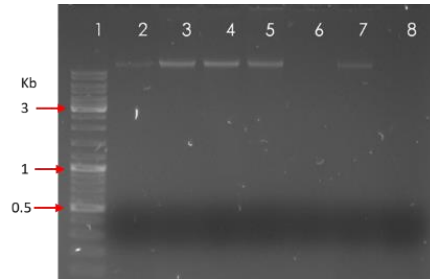


Figura 6-2.- Resultado de la extracción de material genómico del tejido adiposo (7 participantes). Carril 1.- marcador de peso molecular, carriles 2-8 muestras de ADN en evaluación, no fue posible obtener una adecuada extracción en la muestra correspondiente al carril 6. Sistema TAE 1X, agarosa 1%, 80V, 50min. Revelado con SYBR-Green

6.2.- EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN GENÓMICO.

Con el objeto de evaluar la idoneidad del ADN extraído para su empleo en Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó la amplificación de un gen control presente en todas las células de mamífero (β -actina). Los cebadores empleados para la evaluación de este gen se describen en la sección de materiales y métodos.

Los resultados de la amplificación se observan en la Figura 6-3 consistente en un gel de agarosa sometido a electroforesis y revelado con SYBR-green. En él se observa ausencia de amplificación en los carriles 2 y 4 correspondientes a controles negativos (agua) y la presencia de una banda nítida y única en los carriles 3 y 5, en cuya reacción se evaluó la presencia del gen β -actina en el ADN genómico obtenido de dos participantes distintos.

El peso molecular observado en la banda amplificada corresponde a los 743 pb esperados para el fragmento de interés en el gen de β -actina humana.

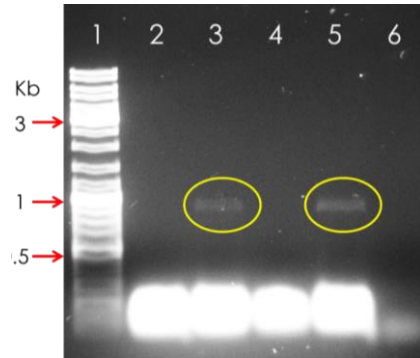


Figura 6-3.- Electroforesis en gel de agarosa en la que se ilustran bandas correspondientes a la amplificación del gen de β -actina humana en 2 participantes. Carril 1- Marcador de peso molecular, Carril 2 y 4 – controles negativos, Carril 3 y 5 banda correspondiente a la amplificación del gen de β -actina empleando ADN genómico de 2 participantes distintos. Tamaño esperado de la amplificación 743 pb. Sistema agarosa 1%, TAE 1X, 80V, 50 min. Revelado con SYBR-Green

La ausencia de amplificación en el caso de controles negativos nos señala una buena descontaminación del equipo de laboratorio (cualquier célula humana presente ofrecería un resultado positivo para este gen) y la adecuada amplificación en el caso de las muestras de ADN genómico nos confirma la integridad del ADN y la ausencia de inhibidores de PCR en las muestras estudiadas.

6.3.- ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL GENOMA DEL ADENOVIRUS 36 EMPLEANDO LOS CEBADORES DESCRITOS EN LA LITERATURA (PASARICA 2008)

Habiéndose comprobado la factibilidad técnica de obtener una muestra satisfactoria de ADN en tejido adiposo por medio de BAAF y la integridad del material genómico extraído de esta, se decidió iniciar la pesquisa por el genoma del Ad36 empleando un enfoque descrito en la literatura.

Para ello se emplearon los cebadores descritos por Pasarrica en 2008⁸² diseñados para amplificar una región del gen E4ORF1 mediante PCR de punto final, y un fragmento del gen de proteína fibrosa de cápside mediante PCR enclavada. En la literatura se ha sugerido que el empleo de estos cebadores permite una detección sensible y específica del genoma del Ad36 en la muestra analizada. La secuencia de los cebadores y la metodología de procesamiento puede consultarse en la sección de materiales y métodos.

Como se observa en la Figura 6-4, la electroforesis en gel reveló un patrón de alineamiento inespecífico de los cebadores, con múltiples bandas de peso molecular dispares, aun en los controles negativos empleando agua destilada y ADN genómico de planta, sugiriendo que la contaminación podía proceder del mismo equipo de laboratorio (microtubos, micropipetas).

El ADN en general y el de los adenovirus en particular ha demostrado ser una molécula altamente resistente a los intentos de descontaminación por medios habituales (autoclavado)⁸⁴⁻⁸⁸. Debido a la presencia de contaminación generalizada, se decidió no proceder con la PCR enclavada para proteína fibrosa de cápside.

Debido a la presencia de un patrón de bandeo coincidente con múltiples alineamientos inespecíficos de los cebadores, se evaluó el diseño de los mismos mediante el programa informático BLAST, en su opción de Pick Primer.

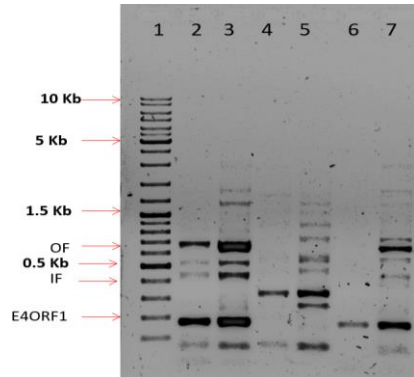


Figura 6-4.- Electroforesis en gel de agarosa en la que se evalúan los productos de amplificación empleando los cebadores descritos por Pasarrica 2008. En todos los casos se evaluaron muestras diseñadas para comportarse como controles negativos. Carril-1: marcador de peso molecular; carriles 2 y 3: cebadores externos para proteína de fibra (OF, 821 pb); carriles 4 y 5: cebadores internos para proteína de fibra (IF, 477 pb); carriles 6-7: cebador para el gen E4ORF1 (131 bp), 8: cebadores control negativo (planta). Alineamiento a 45°C (2,4,6,8), y 49°C (1,2,3,5,7). Sistema agarosa 1.5%, tae 1x, 100 v, 50 min. Revelado con bromuro de etidio.

Se evaluó la capacidad de cada pareja de cebadores para realizar alineamientos inespecíficos con las secuencias contenidas en la base de datos GeneBank prestando especial atención a la existencia de alineamientos inadecuados con genoma humano, bacterias, hongos y otros adenovirus distintos del 36.

Con este análisis se demostró que cada pareja de cebadores resultaba capaz de alinear con el genoma de múltiples serovariedades de mastadenovirus, así como varias especies de bacterias con las que se laboraba en el laboratorio al momento del análisis, incluyendo *Pseudomonas spp*, *Listeria spp*, *Bacillus spp*, *Staphylococcus aureus*.

6.4.-EVALUACIÓN DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA ADENOVIRUS 36 MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA ENCLAVADA

Debido a los resultados insatisfactorios obtenidos mediante el empleo de los cebadores diseñados por Pasarrica 2008⁸², se decidió el diseño *ad hoc* de nuevos cebadores para la identificación específica del Genoma del Ad36.

Estos fueron diseñados en el mismo laboratorio con la ayuda de la herramienta Pick Primer del programa informático BLAST, empleando para ello la secuencia del genoma del Ad36 disponible en la base de datos GeneBank del NCBI. Los cebadores fueron diseñados para ser empleables en la metodología de PCR enclavada.

La secuencia de los cebadores, el tamaño de amplificación esperado y las posiciones de alineamiento en el genoma del Ad36 se pueden observar en la TABLA 6-6 en la sección de anexos. Los cebadores fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (iBT).

El procesamiento de los cebadores y el protocolo de amplificación se encuentra detallado en la sección de materiales y métodos. En total se generaron cinco juegos de cebadores para PCR enclavada y un juego de cebadores para PCR semienclavada.

Se obtuvieron bandas de amplificación con los tamaños estimados para el genoma del Ad36 de acuerdo a lo predicho al diseño de los cebadores. La secuencia de los mismos, región del genoma del Ad36 contra la cual van dirigidos, condiciones de amplificación y tamaño esperado de banda pueden consultarse en la TABLA 6-6.

En la FiguraS 6-5 y 6-6 se ilustran los resultados de la amplificación mediante PCR empleando cada una de las parejas de cebadores diseñados empleando un sistema de electroforesis en gel de agarosa. En esta serie de reacciones se empleó el genoma purificado del Ad36 como control positivo y agua grado biología molecular como control negativo. Como es posible apreciar se obtuvieron bandas con un peso molecular coincidente con el predicho en todos los casos en los

que se empleó el control positivo, no se apreció amplificación en el ninguno de los casos en el que se empleó el control negativo.

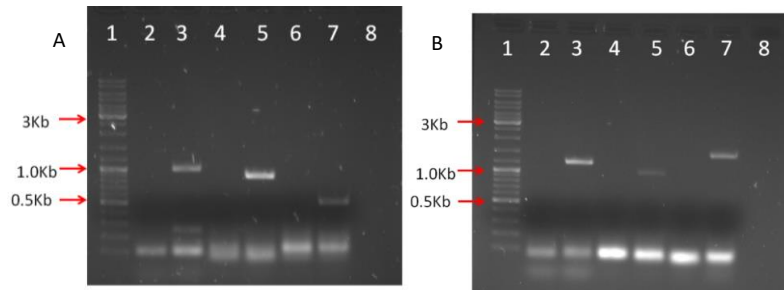


Figura 6-5: Evaluación de los productos de amplificación por PCR de los cebadores externos para Adenovirus 36 empleando control genómico positivo. Figura A: Evaluación de cebadores externos 1-3. Carril 1- marcador de peso molecular; Carriles pares: controles negativos; Carril 2 y 3- cebador Ad36-1(980 pb); Carril 4 y 5 cebador Ad36-2 (879 pb); Carril 6 y 7.- cebador Ad36-3.- (520pb). Figura B: Evaluación cebadores externos 4 -6. Carril 1- marcador de peso molecular; Carriles pares: controles negativos; Carril 2 y 3- cebador Ad36- 4 (1184 pb); Carril 4 y 5 cebador Ad36-5 (985 pb); Carril 6 y 7.- cebador Ad36- 6.- (1486 pb). Sistema tae 1x, agarosa 1%, 80v,40min. Revelado con bromuro de etidio.

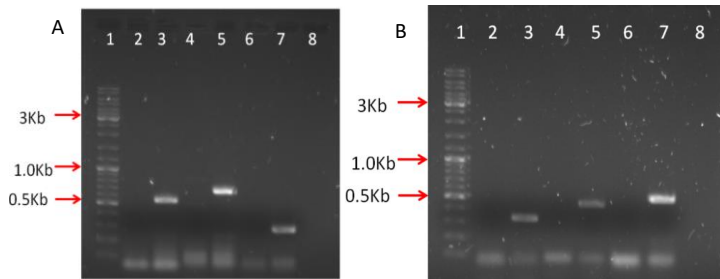


Figura 6-6: Evaluación de los productos de amplificación por PCR de los cebadores internos para Adenovirus 36 empleando control genómico positivo. Figura A: Carril 1- marcador de peso molecular; Carriles pares: controles negativos. Carril 2 y 3.- cebador Ad36- 1 (545 pb); Carril 4 y 5 cebador Ad36-2 (682pb);

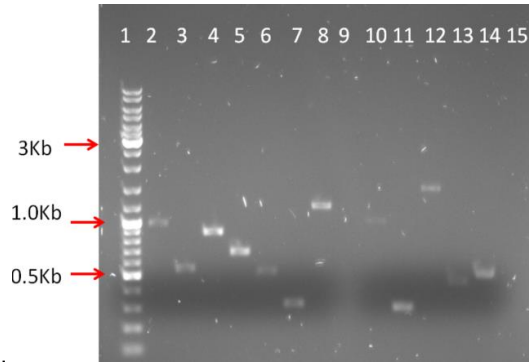
Carril 6 y 7- cebador Ad36-3.- (300 pb). Figura B: Carril 1- marcador de peso molecular; Carriles pares: controles negativos; Carril 2 y 3- cebador Ad36-5 (323 pb); Carril 4 y 5 cebador Ad36- 6 (456 pb); Carril 6 y 7- cebador Ad36-7 (514 pb). Error en síntesis del cebador Interno 4 (excluido). Sistema tae 1x, agarosa 1%, 80v,40min. Revelado con bromuro de etidio.

6.4.1.- VALIDACIÓN DEL PROTOCOLO MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Tal y como se observa en los geles descritos en las Figuras 6-2 Y 6-3 al evaluar los cebadores diseñados para la detección del genoma del Ad36 junto con el control positivo del genoma del mismo, se obtuvieron bandas con los pesos moleculares predichos en todos los casos.

Se solicitó la secuenciación de nucleótidos de cada una de las bandas obtenidas, con el objetivo de demostrar que la secuencia amplificada correspondía en efecto a la región predicha en el genoma del Ad36.

Las bandas de interés se recuperaron mediante el empleo de un kit comercial (Zymoclean Gel Dna Recovery), el resultado de la recuperación de bandas se puede observar en la Figura 6-7.



PRIMER						PRIMER						
1		2		3		4		5		6	6	7
OUTER (2)	INNER (3)	OUTER (4)	INNER (5)	OUTER (6)	INNER (7)	OUTER (8)	INNER (9)	OUTER (10)	INNER (11)	OUTER (12)	INNER (13)	INNER (14)
980	545	879	682	520	300	1184	747	985	323	1506	456	514

Figura 6-7 . Bandas de amplificación por PCR empleando los cebadores descritos en **TABLA 6-6**. Sistema agarosa 1%, TAE 1X, 80V, 50 min. Revelado con SYBR-Green. En la tabla inferior se detalla el primer empleado, el carril que corresponde a en la figura () y el peso molecular esperado para la amplificación (en Pb)

Se solicitó la realización de la secuenciación de las bandas purificadas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT). Las secuencias recibidas fueron alineadas mediante el programa informático MUSCLE (Multiple Sequence Comparison By Log- Expectation). Y subsecuentemente comparadas con el genoma del Ad36 reportado en la base de datos GeneBank mediante el programa informático BLAST del NCBI, haciendo uso de la base de datos de secuencias no redundantes del GeneBank del NCBI.

En la Tabla 6-8 es posible observar el resultado de la comparación de las secuencias obtenidas de las bandas de amplificación descritas en la Figura 6-5 al compararlas con el genoma de referencia del Ad36 contenido en GeneBank (GQ384080.1). Posterior al alineamiento de las secuencias con el programa MUSCLE y subsecuente pesquisa mediante BLAST se confirma la correcta identificación del Ad36 con 5 matches para las secuencias introducidas, una cobertura de secuencia del 99%, un porcentaje de identidad del 99.44% y un valor de E tendiente a 0.

Bajo estas condiciones se consideró que el protocolo de detección para la presencia del genoma del Ad36 mediante PCR enclavada es un proceso sensible y específico, por lo cual resulta posible su implementación para el diagnóstico a escala poblacional.

6.5.- MUESTREO POBLACIONAL

Se realizaron muestreos a escala poblacional en 3 comunidades del Estado de Yucatán: Yaxnik, comisaría de Mérida Yucatán ($20^{\circ}47'24''\text{N}$ $89^{\circ}37'11''\text{O}$) durante abril de 2019, Komchen, comisaría de Mérida Yucatán ($21^{\circ}06'13''\text{N}$ $89^{\circ}39'45''\text{O}$) durante noviembre de 2019 y el Municipio de Chapab Yucatán ($20^{\circ}27'30''\text{N}$ $89^{\circ}27'30''\text{O}$), durante noviembre de 2019. En la Figura 6-8 se describe la ubicación geográfica de cada uno de los sitios de muestreo.

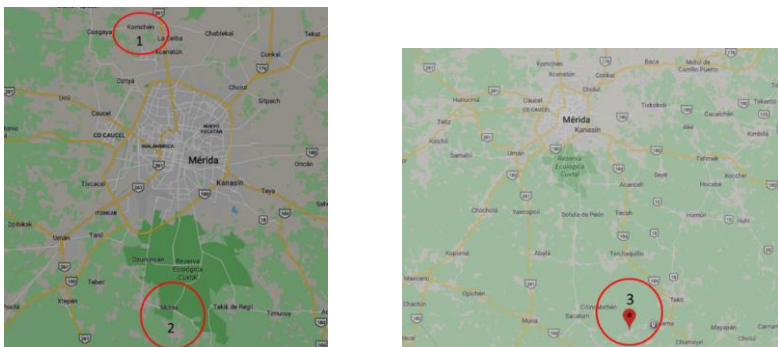


Figura 6-8: Ubicación geográfica de los sitios de muestreo. 1.- Comisaría de Komchen, Mérida Yucatán, 2- Comisaría de Yaxnik, Mérida Yucatán, 3- Municipio de Chapab Yucatán.

La selección de la muestra fue no probabilística incluyéndose a los voluntarios que desearan participar en el estudio. Todos los voluntarios fueron informados respecto al procedimiento a realizar, el motivo de la toma de las muestras y el uso que se le daría a esta información. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado accediendo a participar en el estudio.

6.5.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA POBLACIONAL

Se colectaron muestras completas de un total de 72 participantes en los 3 sitios de muestreo (41, 16 y 15 en Komchen, Yaxnik y Chapab respectivamente). Por las condiciones en las que se realizó el muestreo de campo únicamente fue posible obtener una muestra de tejido adiposo por participante.

La media de edad de los participantes del estudio fue de 49 años, con una desviación estándar de 14.7 años. El 93% de los participantes (67/72) correspondieron a voluntarios del sexo femenino (Figura 6-9).

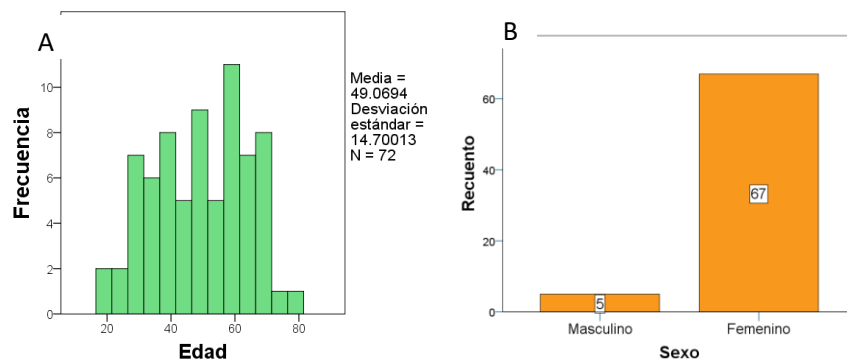


Figura 6-9 – Distribución por edad (A) y sexo (B) de los participantes del estudio

La media del índice de Masa Corporal de los participantes femeninos se ubicó en 30.85 kg/m² correspondiente al rango de obesidad, en forma semejante a lo observado en participantes masculinos, cuya media se ubicó en 30.41 kg/m². No encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 6-10).

Con respecto al porcentaje de grasa corporal, los participantes femeninos presentaron una media de 44.58%, mientras que los participantes masculinos presentaron una media de 33.54% en participantes masculinos, observándose entre los grupos una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) (Figura 6-9).

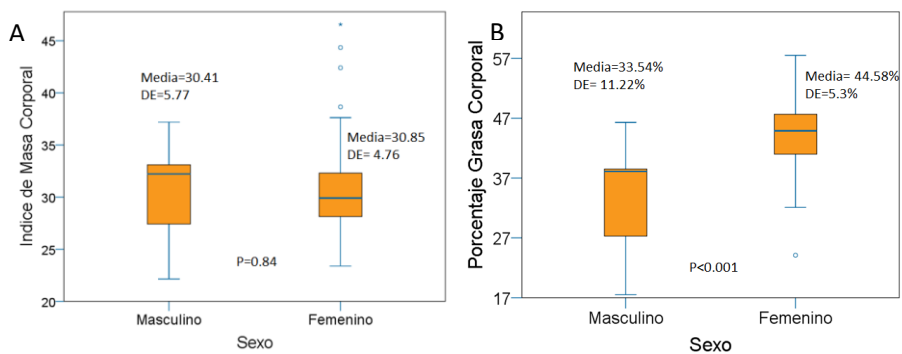


Figura 6-10- Distribución de los participantes del estudio de acuerdo con su Índice de Masa Corporal (A) y su Porcentaje de Grasa Corporal (B).

Asumiendo como punto de corte para el diagnóstico de obesidad un IMC igual o superior a 30 kg/m² en participantes con altura mayor a 1.5m y 25 kg/m² en participantes con una estatura igual o inferior a 1.5 metros, se observó que el 84.72% (61/72) de la muestra presenta obesidad definida en términos de IMC.

Unicamente el 34.7% de los participantes reportó no padecer de al menos una patología crónico-degenerativa conocida al momento del estudio. Las enfermedades crónicas más comunes fueron la hipertension arterial (23/72 participantes), Diabetes Mellitus 2 y prediabetes (33/72 participantes) y dislipidemia (11/72 participantes) (Figura 6-11).

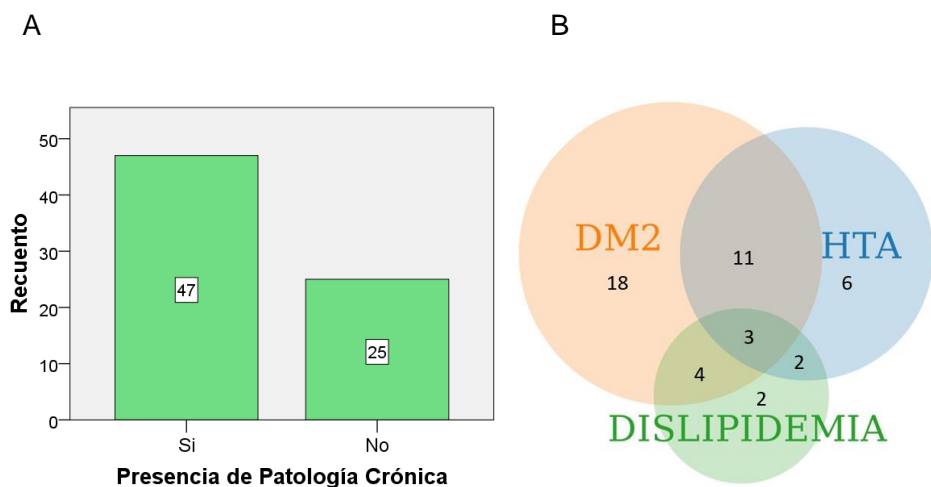


Figura 6-11- Distribucion de los participantes del estudio en funcion de la presencia de patologías crónico-degenerativas(A). Numero de participantes en el estudio que presentaron las patologías cronicodegenerativas mas frecuentes en la poblacion mexicana al momento del estudio (B). DM2= Diabetes Mellitus 2, HTA= hipertension arterial

6.5.2. DETERMINACION DE LA PRESENCIA DEL GENOMA DEL ADENOVIRUS 36 EN EL TEJIDO ADIPOSO DE LOS PARTICIPANTES

Las muestras de tejido adiposo procedentes de los participantes del estudio fueron procesadas de acuerdo al protocolo descrito previamente para la obtencion del material genómico y verificación de la integridad del mismo mediante amplificación del gen de β -actina (Figura 6-3).

Una vez corroborada la adecuada extracción del ADN se procedió a realizar la determinación de la presencia del genoma del Ad36 por medio de la metodología del muestreo por conglomerado. Para ello se generó una muestra combinada (pooled sample) a partir del material genómico de cada 10 participantes de acuerdo a la localización. Estas muestras fueron evaluadas mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa enclavada, de la misma forma descrita para los controles positivos. En las siguientes en las Figuras 6-12 A 6-16 se ilustran los resultados de las amplificaciones empleando el material genómico obtenido de los participantes.

Como se observa en las figuras citadas, no se encontró evidencia de amplificación nítida de algún fragmento de ADN en las muestras evaluadas, aun cuando se realizaron 40 ciclos de amplificación con cebador externo y 40 ciclos de amplificación con cebador interno bajo las mismas condiciones en las que el control positivo amplifica adecuadamente. Por lo tanto, se concluye que el genoma del Ad36 se encontró ausente en la totalidad de las muestras estudiadas.

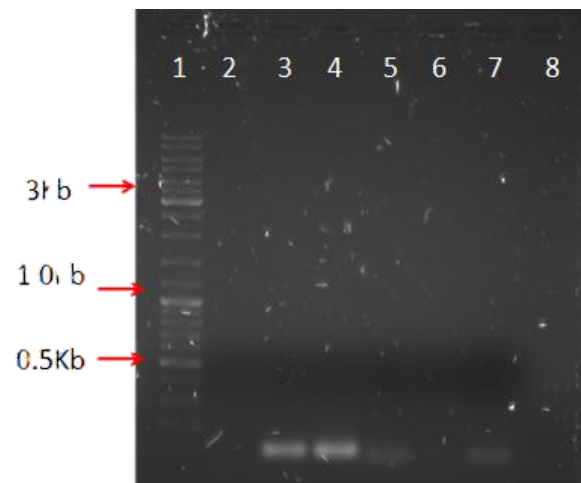
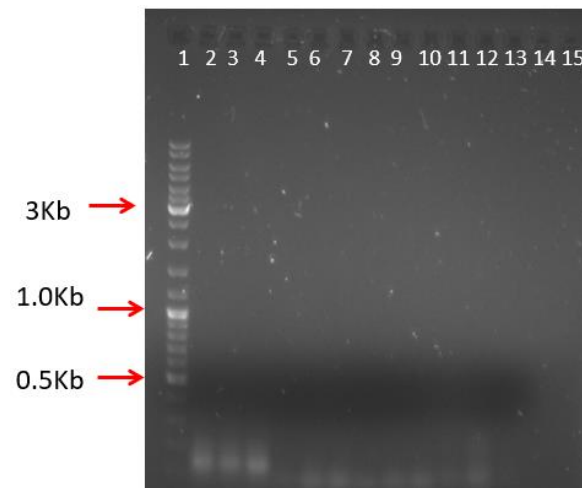
A**B**

Figura 6-12 - Evaluación de la presencia del genoma del Adenovirus 36 en el material genómico procedente de participantes de la comunidad de Yaxnik empleando Cebadores externos AD36-1 al AD36-6. **Figura A**, carril 1- Marcador de peso molecular, carril 2 - control negativo cebador AD36-1, carriles 3,4- ADN problema, cebador AD-36-1, Carril 5- control negativo cebador AD36-2, Carriles 6,7- Adn problema, cebador AD36-2. **Figura B**, Carril 1- Marcador de peso molecular, Carril 2- Control Negativo AD36-3, Carril 3,4- ADN problema, cebador AD36-3, Carril 5- Control Negativo AD36-4, Carril 6,7- ADN problema, cebador AD36-4, Carril 8 – Control negativo Ad36-5, Carril 9,10- ADN problema cebador AD36-5, Carril 11- Control negativo AD36-6, Carril 12,13.- ADN problema cebador Ad36-6. Como control negativo se empleó agua grado biología molecular.

A**B**

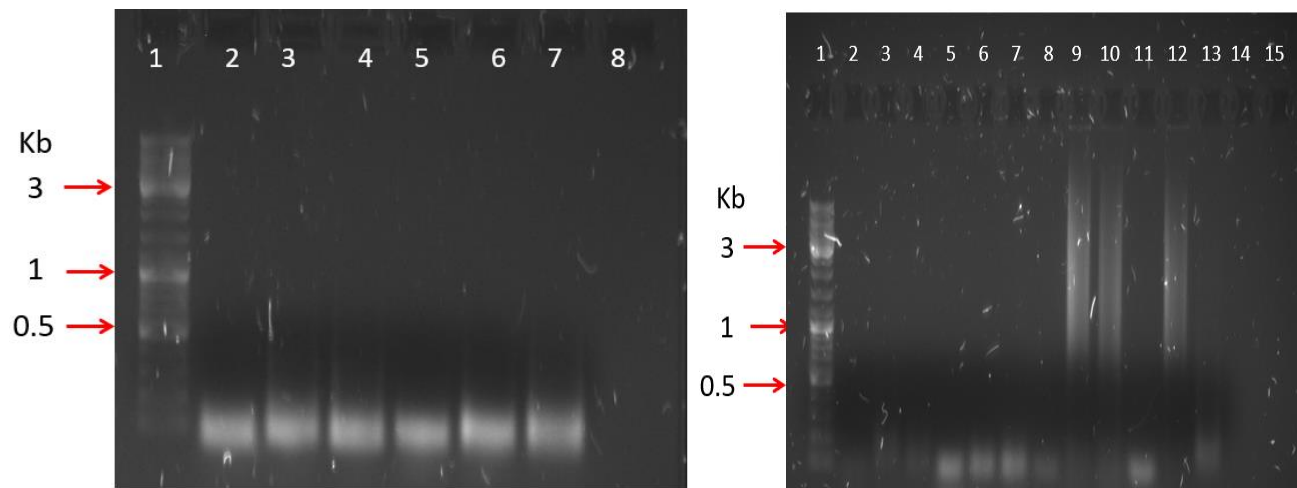


Figura 6-13 - Evaluación de la presencia del genoma del Adenovirus 36 en el material genómico procedente de participantes de la comunidad de Yaxnik empleando cebadores internos AD36-1 a AD36-. **Figura A**, carril 1- Marcador de peso molecular, carril 2 - control negativo cebador AD36-7, carriles 3,4- ADN problema, cebador AD-36-1, Carril 5- control negativo cebador AD36-2, Carriles 6,7- Adn problema, cebador AD36-2. **Figura B**, Carril 1- Marcador de peso molecular, Carril 2- Control Negativo AD36-3, Carril 3,4- ADN problema, cebador AD36-3, Carril 5- Control Negativo AD36-5, Carril 6,7- ADN problema, cebador AD36-5, Carril 8 – Control negativo Ad36-6, Carril 9,10- ADN problema cebador AD36-6, Carril 11- Control negativo AD36-7, Carril 12,13.- ADN problema cebador Ad36-7. Como control negativo se empleó agua grado biología molecular.

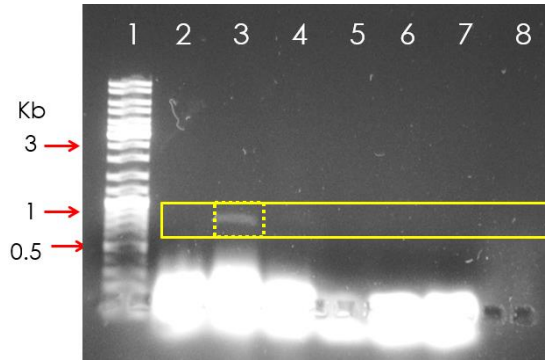


Figura 6-14 - Evaluación del ADN de participantes de las comunidades de Chapab y Komchem empleando el cebador Ad36-2 Interno. Carril 1- Marcador de peso molecular, carril 2- control negativo, carril 3- control positivo, carril 4- ADN de participantes de Chapab, Carril 5-7, ADN de participantes de comunidad de Komchem. El control negativo consistió en agua grado biología molecular.

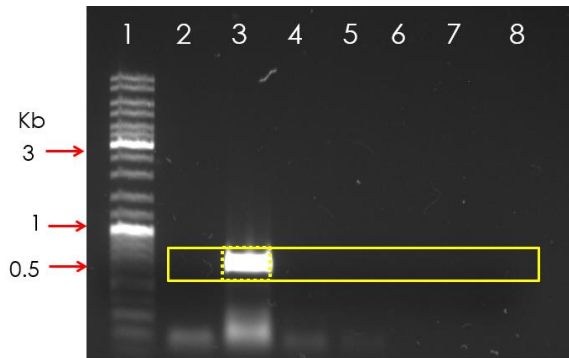


Figura 6-15- Evaluación del ADN de participantes de las comunidades de Chapab y Komchem empleando el cebador Ad36-6 Interno. Carril 1- Marcador de peso molecular, carril 2- control negativo, carril 3- control positivo, carril 4- ADN de participantes de Chapab, Carril 5-7 ADN de participantes de comunidad de Komchem. El control negativo consistió en agua grado biología molecular.

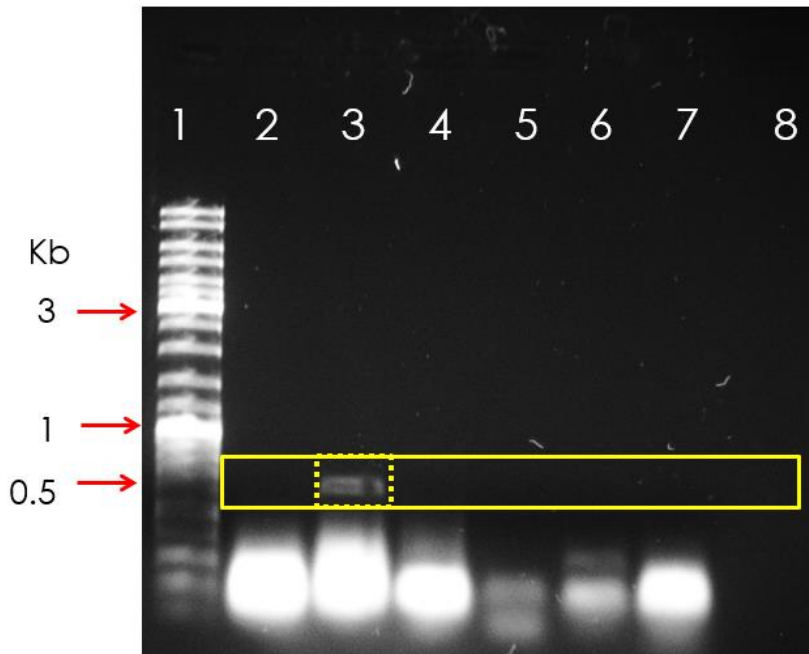


Figura 6-16- Evaluacion del ADN de participantes de las comunidades de Chapab y Komchem empleando el cebador Ad36-7 Interno. Carril 1- Marcador de peso molecular, carril 2- control negativo (agua grado biología molecular), carril 3- control positivo (genoma del Ad36), carril 4- ADN de participantes de Chapab, Carril 5-7 ADN de participantes de comuinidad de Komchem. El control negativo consistió en agua grado biología molecular.

6.5.3 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA C REACTIVA SÉRICA

La Proteína C Reactiva (PCR) representa uno de los marcadores de inflamación sistémica mejor estudiados en el ser humano. La presencia de valores de Proteína C Reactiva por encima de un valor umbral de acuerdo a edad y sexo se ha correlacionado con desenlaces cardiovasculares adversos ⁴⁵.

Dado que el Ad36 genera una reacción inflamatoria persistente en el tejido adiposo ⁷⁴ se plantea la hipótesis de que los niveles de Proteína C Reactiva sérica que presenten una infección persistente por Ad36 presentarán una diferencia estadísticamente significativa con respecto a pacientes que no posean una infección persistente por este patógeno (evaluados según edad y sexo).

La determinación de la concentración sérica de Proteína C Reactiva (PCR se realizó por medio de ELISA. Los en el caso de los participantes de sexo masculino la concentración media de Proteína C reactiva fue de 3.48 mg/l (\pm 3.25 mg/L) respecto de 6.54 mg/ (\pm 2.92 mg/L) en el caso de las participantes de sexo femenino. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de Proteína C reactiva en ambos sexos (Figura 6-17).

El 79% de los participantes del estudio (57/72) presento niveles de Proteína C reactiva Sérica superiores al punto de corte (3 mg/L) que la Asociación Americana de Cardiología (American Heart Association, AHA) recomienda para una salud cardiovascular óptima.

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de Proteína C Reactiva y la presencia de Diabetes Mellitus o Hipertensión en los participantes de este estudio ($p > 0.05$).

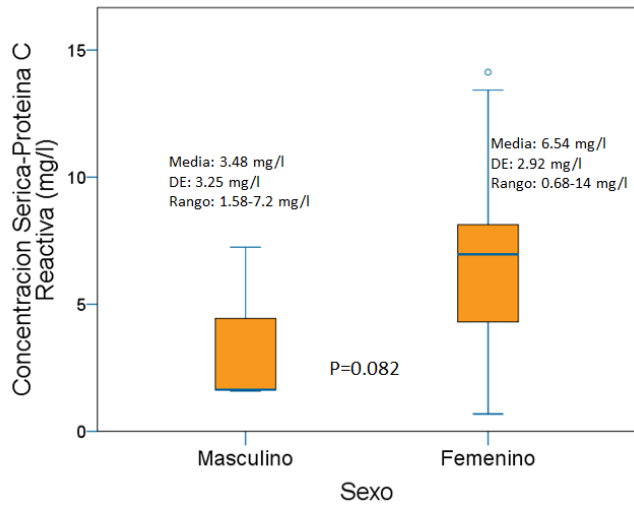


Figura 6-17- Determinación de los niveles de Proteína C Reactiva sérica de acuerdo al sexo de los participantes del estudio.

Al no haberse encontrado ningún caso positivo a infección persistente por Ad36 en tejido adiposo, la comparación de las concentraciones de Proteína C Reactiva en los pacientes afectados respecto a los sanos no pudo realizarse.

6.5.4. DETERMINACIÓN DE LEPTINA SÉRICA

La leptina es una hormona proteica generada por los adipocitos del tejido adiposo blanco en relación al contenido de triglicéridos presentes en los mismos ⁸⁹.

Fisiológicamente cumple con la función de indicador del estado basal de energía almacenada en forma de grasa en el organismo, señales que son interpretadas por el hipotálamo y participan activamente en la regulación del apetito y otros componentes del metabolismo energético ³⁴.

Diversas condiciones relacionadas con el sobrepeso-obesidad han sido vinculadas a una desregulación del apetito en el eje leptina-hipotálamo ⁸⁹. Como parte de las alteraciones metabólicas que el Ad36 es causa en las células adiposas infectadas se destaca la disminución en la producción de leptina y liberación de la misma al torrente sanguíneo. Esto ocurre como parte del secuestro de la maquinaria de síntesis proteica celular como parte del ciclo de vida viral ⁵⁹.

Como parte de la investigación respecto a las modificaciones fisiológicas causadas por la infección persistente por Ad36 en tejido adiposo se decidió estudiar los niveles séricos de leptina en los participantes del estudio, con el objetivo de determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos participantes portadores del virus respecto a participantes que no lo poseen (pareadas variables sociodemográficas).

La determinación de la concentración sérica de Leptina realizó por medio de ELISA. Los en los participantes del sexo masculino presentaron una concentración sérica media de leptina de 4.85 ng/mL (± 6.33 ng/mL) respecto a 7.46 ng/mL (± 11.23 ng/mL) en participantes del sexo femenino (Figura 6-18).

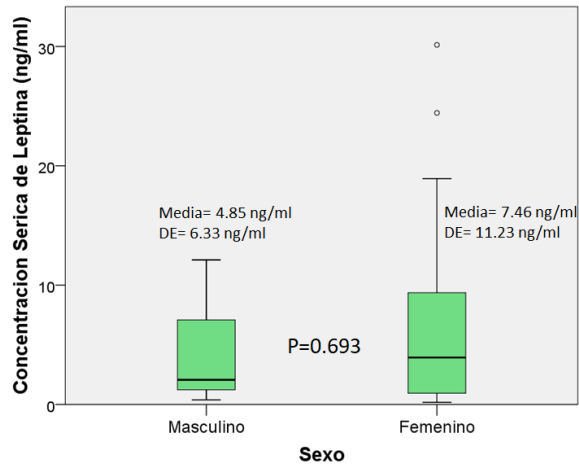


Figura 6-18- Determinación de las concentraciones de leptina sérica de acuerdo al sexo de los participantes del estudio.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas de leptina entre ambos sexos. Al no haberse encontrado ningún caso positivo a infección persistente por Ad36 en tejido adiposo, la comparación de las concentraciones de leptina en los pacientes afectados respecto a los sanos no pudo ser realizada.

CAPITULO 7

DISCUSIÓN

El sobrepeso y la obesidad se encuentran considerados entre los principales problemas de salud pública en los países desarrollados y en vías de desarrollo ⁹⁰. Ambas condiciones se encuentran íntimamente vinculadas al desarrollo de diversas patologías cronicodegenerativas tales como las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades cerebrovasculares, las enfermedades hepáticas, las Diabetes Mellitus tipo 2, neoplasias malignas, entre otras ²¹.

Para que el sobrepeso o la obesidad puedan instaurarse y mantenerse, resulta necesaria la existencia de un balance energético positivo sostenido, de modo tal que la ingesta energética, supere las demandas metabólicas del individuo por un tiempo prolongado ⁷.

Diversos factores han sido implicados en la génesis de este balance energético positivo, entre los que destacan una ingesta energética superior a las demandas del organismo (favorecida por alimentos ultraprocesados), el incremento en el sedentarismo en la población de los países industrializados, así como diversos factores genéticos y hormonales ⁹⁰.

Actualmente existe un consenso en la literatura científica en el cual se acepta que el estilo de vida (alimentación, actividad física, etc) es el factor más relevante en el desarrollo y mantenimiento de esta patología en la población general ⁸.

Se han desarrollado múltiples trabajos de investigación que buscan explicar el porqué de la variación interindividual en el desarrollo de la obesidad, aun con estilos de vida comparables. Se ha determinado que la carga genética puede explicar hasta el 30% del riesgo que posee un individuo para desarrollar obesidad, siendo este efecto el resultado de la interacción de más de 70 alelos en el genoma ⁸.

Uno de los enfoques de más reciente desarrollo en el campo de la obesidad, corresponde a la infectoobesidad. La infectoobesidad representa el campo de estudio interdisciplinario encaminado a entender la forma en la cual las patologías infecciosas se relacionan con la acumulación de grasa en el individuo ⁵².

Los agentes infecciosos representan un blanco atractivo para el estudio en el campo de la obesidad. Muchos de ellos, en especial los agentes virales, son ubicuos en la especie humana, lo cual los hace candidatos atractivos para explicar el incremento en las cifras de sobrepeso y obesidad que se han desarrollado en las últimas décadas en los países industrializados. Adicionalmente los efectos ocasionados por los agentes infecciosos son fácilmente replicables en modelos animales, lo cual aporta ventajas adicionales a su análisis ⁵³.

Se ha determinado que diversas infecciones víricas son capaces de favorecer un fenotipo obesogénico en modelos animales. Se ha documentado un incremento en la adiposidad de animales infectados con el Virus del Distemper Canino, El virus asociado a Rous tipo 7 y el Virus de la Enfermedad de Borna ⁵². Sin embargo, el mayor énfasis en la investigación se ha enfocado en el estudio del Ad36.

El Ad36 es un virus ADN bicatenario dotado de un genoma de 35Kb, posee una geometría de cápside icosaédrica y destaca por su escasa selectividad en cuanto a su especie hospedadora, pudiendo infectar tanto a células de aves como a mamíferos. Posee un tropismo hacia células epiteliales, en las cuales puede completar un ciclo de vida lítico propio de la familia *Adenoviridae* ³⁵.

Adicionalmente el Ad36 es capaz de infectar otros tipos celulares, entre ellos músculo, tejido adiposo, e hígado. En estos tejidos el virus genera una infección persistente. En células quiescentes (G0) el virus no es capaz de completar su ciclo de vida lítico, tampoco posee la dotación enzimática requerida para insertarse en el genoma celular e iniciar un ciclo lisogénico. El genoma viral permanece en el citoplasma de la célula, replicándose continuamente y modificando el patrón de expresión genética de la célula hospedera ¹⁰.

El Ad36 ha sido señalado por diversos estudios epidemiológicos como un agente potencial para la infectoobesidad en humanos. Se ha demostrado una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de anticuerpos neutralizantes a este virus y la presencia de obesidad en sujetos humanos. Se plantea en la literatura que este virus posee una distribución cosmopolita, encontrándose seroprevalencias en adultos que van desde 5.5% en noruega hasta el 64% en Estados Unidos ³⁵.

La elevada prevalencia de anticuerpos neutralizantes en la población, la correlación estadística probada en múltiples ocasiones entre la presencia de inmunidad y obesidad en el mismo individuo y la información disponible que sugiere un sustrato fisiopatológico plausible han desencadenado la generación de un gran número de investigaciones con respecto al papel que el Ad36 desarrolla en la fisiopatología de la obesidad a escala poblacional ^{8,76}.

Sin embargo se debe de tomar en cuenta que las correlaciones establecidas en la literatura son del tipo epidemiológico, basado en serología (memoria inmunitaria), quedando aun en debate la relación causal que existe entre la infección por Ad36 y el desarrollo de obesidad en seres humanos ^{8,64,66}.

En México existen pocos estudios que evalúen el papel que el Ad36 puede desempeñar en el desarrollo de obesidad a nivel poblacional. El más relevante es el efectuado por Parra-Rojas en 2013¹³. En este estudio se investigó la seroprevalencia de anticuerpos contra el Ad36 mediante un kit comercial de ELISA en niños en normopeso y obesidad en el estado de Guerrero en México. Los resultados reportados concuerdan con lo descrito en la literatura, argumentando que un 58.6% de los participantes con obesidad eran seropositivos al Ad36, respecto a un 41.4% de los participantes en normopeso. Sin embargo diversos investigadores han demostrado que múltiples kits comerciales de ELISA para la determinación de anticuerpos anti-Ad36 presentan reactividad cruzada en presencia de anticuerpos contra otros adenovirus ⁹¹.

La presencia de reactividad cruzada y la diferente sensibilidad en los métodos de detección puede explicar en parte la existencia de resultados tan dispares disponibles en la literatura en cuanto a la prevalencia del Ad36 en diversas poblaciones humanas ⁶⁴.

Se ha señalado por la Asociación Internacional de Endocrinología que es necesario el demostrar la presencia de infección persistente por Ad36 en tejido adiposo humano a nivel poblacional previo a considerar a este adenovirus un verdadero agente responsable de la infectoobesidad en humanos ^{8,77}.

El procedimiento para la determinación del genoma del adenovirus en tejido adiposo a escala poblacional representa un tema en continuo debate en la literatura médica, habiendo numerosos casos de falsos positivos por detección de adenovirus ambientales, alineamiento de cebadores con genoma humano, etc ^{12,64,92}.

Una de las principales limitantes para la evaluación del genoma del Ad36 en tejido adiposo humano a escala poblacional es el procedimiento de obtención de la muestra. Tradicionalmente la toma de biopsia corresponde a un proceso dedicado en el cual se extrae una muestra macroscópica de tejido para análisis histológico. Este proceso implica costos, tiempo, riesgos e incomodidad por parte del participante, de modo que su empleo en el estudio del Ad36 se ha visto limitado a casos en los cuales la muestra de tejido adiposo podía ser obtenida por algún otro motivo tal como la cirugía estética ⁹². Esto represento importantes limitaciones al estudio poblacional de la presencia de infección persistente por Ad36 en tejido adiposo humano, a la vez que resulto una fuente importante de sesgo en estudios que se realizaron de esta manera.

Debido a la dificultad logística que existe en la obtención de muestras de tejido adiposo, la metodología del análisis por neutralización en suero fue aceptada como estándar de referencia para el diagnóstico de infección por Ad36 en poblaciones humanas. Si bien esta metodología es económica y reproducible, a la vez que aporta datos epidemiológicos útiles, únicamente aporta datos

respecto a la presencia de inmunidad en contra del virus, no necesariamente al estado de infección activa. Prueba de lo anterior es que las seroprevalencias contra Ad36 tienden a aumentar en forma paralela a la edad de los pacientes monitorizados ⁷⁵.

La biopsia por Aspiración con Aguja Fina (BAAF) representa una alternativa viable para la obtención de muestras de tejido adiposo aptas para análisis genómico a escala poblacional. Su aplicación en tejido adiposo es un proceso relativamente simple, capaz de ser realizado por gran parte del personal del área de la salud previa capacitación. Entraña mínimos riesgos para el participante, es un procedimiento ambulatorio y puede realizarse en condiciones de campo ⁸³. Si bien la biopsia por punción aspiración con aguja fina presenta la limitante de no preservar el detalle histológico de la muestra (es una técnica citológica), el tejido obtenido es apto para la extracción del material genético. El papel de la Biopsia por Aspiración con Aguja Fina en pániculo adiposo como elemento diagnóstico ya ha sido ampliamente documentado en el caso de amiloidosis ⁸³.

En la presente investigación demostramos que la biopsia por aspiración con aguja fina permite obtener en condiciones de campo muestras tisulares aptas para el aislamiento genómico mediante el protocolo de extracción orgánica de ADN. La integridad de las muestras genómicas obtenidas fue demostrada mediante la adecuada amplificación de un fragmento del gen de la β -actina.

La metodología desarrollada en el presente protocolo permite evaluar directamente la presencia del genoma del Ad36 en el tejido adiposo humano obtenido en condiciones de campo. La metodología es sencilla, económica, segura y reproducible requiriendo únicamente de 10 minutos del tiempo del participante, haciéndola apta para la realización de muestreos a escala poblacional.

Lo anterior permite solventar una de las principales dificultades que se habían planteado para el estudio de la prevalencia del genoma del Ad36 a escala poblacional directamente en tejido adiposo humano. Esto resulta especialmente relevante debido a que se propone que la mayor parte

de las acciones fisiopatológicas *in vivo* del virus dependen de la expresión sostenida del producto proteico del gen *E4ORF1* en adipocitos y sus precursores ^{10,57,58}.

Otra de las ventajas que presenta el empleo de la determinación de ácidos nucleicos del Ad36 en tejido adiposo con respecto a la serología consiste en su especificidad. El genoma del Ad36 (y otros adenovirus) ya ha sido secuenciado en diversas ocasiones y esta información se encuentra disponible en bases de datos públicas tales como GenBank. Esta información, en conjunto con las secuencias disponibles del genoma humano permite el desarrollo simple y eficiente de protocolos de detección específicos del genoma viral por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) u otras técnicas de biología molecular. Esto permite cumplir con diversos objetivos que no es posible realizar mediante las técnicas de serología convencional: Demostrar la presencia del genoma del Ad36 en su diana biológica propuesta aportando datos respecto a la plausibilidad de su papel en la infectoobesidad, un diagnóstico sensible, específico y reducido en costos (económicos, materiales y tiempo) de la infección por Ad36 y la posibilidad de cuantificar la carga viral del individuo para el establecimiento de estudios de asociación ⁷⁷.

En adición a las dificultades implicadas en la obtención de la muestra, la elevada tasa de falsos positivos ha representado una de las limitantes principales para el desarrollo de protocolos diagnósticos para el Ad36 basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta situación pudo observarse en las primeras ampliaciones efectuadas empleando los cebadores descritos por Pasarica 2008⁸². Estos cebadores fueron diseñados para ser empleados en tejido de ratón, generando múltiples alineamientos espontáneos en el genoma humano.

En la literatura han sido reportados múltiples casos de identificación potencialmente espuria del genoma viral en tejidos corporales, los cuales pudieron ser causados por alineamiento de los cebadores empleados con genoma propio del organismo, o bien, por contaminación ambiental ^{66,93}. Los resultados de la literatura se vuelven especialmente difíciles de comparar cuando en el

estudio no se lista la secuencia de los cebadores empleados, ya sea por omisión o por estar protegidos por patentes ⁶².

La disponibilidad de las secuencias genómicas de diversos adenovirus, incluido el Ad36, y la secuencia del genoma humano en bases de datos abiertas permitió en este estudio el desarrollo de una metodología específica para la determinación del genoma de este virus. El empleo de la metodología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) enclavada fue útil para asegurar la especificidad en la detección de la secuencia de interés. El 100% de los cebadores diseñados consiguieron una amplificación del tamaño predicho para el genoma del Ad36 mediante el empleo del control positivo (especificar). Los resultados fueron corroborados mediante la secuenciación de los fragmentos amplificados. No se presentó evidencia de amplificación en presencia de genoma humano en las mismas condiciones en las que se efectuó la prueba con el control positivo. Con respecto a la fase poblacional del estudio, el protocolo de investigación fue aprobado sin restricciones por parte de un Comité de Bioética (Universidad Marista de Mérida Yucatán), coincidiendo con que se trata de un procedimiento de riesgo mínimo que puede ser efectuado en condiciones de campo.

En la fase poblacional participaron 72 voluntarios de 3 comunidades del Estado de Yucatán, con edades comprendidas entre los 18 y los 78 años de edad, de los cuales 67 (93%) correspondieron participantes del sexo femenino. El 65.3% de los participantes presentó al menos una enfermedad crónico-degenerativa. El 84.72% de los participantes presentaron obesidad definida por IMC de acuerdo a los criterios de inclusión. La toma de muestras biológicas se realizó sin incidencias, reportándose únicamente dolor leve en el caso de la Biopsia por Aspiración con Aguja Fina (BAAF).

La extracción del material genómico de las muestras de tejido adiposo se realizó de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos obteniéndose muestras de ADN genómico aptas para su empleo en PCR, verificadas mediante la amplificación de un gen control positivo para ADN mamífero (β -actina).

No se demostró la presencia del genoma del Ad36 en ninguna de las muestras de tejido adiposo humano. Consideramos que las pruebas realizadas para la demostración del genoma del Ad36 en tejido adiposo han sido exhaustivas, ya que para las mismas se empleó la metodología de PCR enclavada y semienclavada con 7 juegos de cebadores dirigidos contra regiones distribuidas en distintas partes del genoma del Ad36.

Mediante este enfoque prevenimos la posibilidad de encontrar falsos positivos tal y como pudo haber ocurrido en otros estudios, en los cuales únicamente se consigue la amplificación de un gen en ausencia de amplificación de otras partes del genoma viral ⁷⁶.

Un ejemplo particular de este fenómeno se observa en la investigación dirigida por Ponterio en 2015, en la cual reporta la demostración del genoma del Ad36 mediante PCR en el tejido adiposo de 4 pacientes con obesidad (muestra total de 21 pacientes en el estudio). Sin embargo, en estos 4 participantes únicamente fue detectable en forma consistente el gen de la proteína fibrosa de cápside viral, detectándose el gen *E4ORF1* únicamente en uno de los participantes. Los autores de este estudio no ofrecen explicación respecto a este fenómeno ⁶³.

La preocupación respecto al reporte de falsos positivos en diversas publicaciones en las que se hace referencia a la relación estadística entre la presencia del genoma del Ad36 en tejido adiposo, o bien la asociación de la seropositividad con la presencia de obesidad, ha conllevado a que la Sociedad Internacional de Endocrinología en una toma de postura afirme que en caso de confirmarse la participación de los virus obesogénicos en la génesis de esta patología el peso específico de este factor sería inferior al 3% del riesgo global del individuo ⁸.

Dado que existe una gran semejanza entre los genomas de los adenovirus del grupo D (masta-denovirus) y con el objeto de minimizar la posibilidad de reportar un falso positivo a consecuencia de contaminación ambiental, se decidió el empleo de múltiples parejas de cebadores dirigidos contra las regiones del genoma viral que presentaban mayor especificidad en la diferenciación entre las especies de adenovirus.

El proceso se realizó en 2 pasos (PCR enclavada), la primera amplificación con el objetivo de amplificar fragmentos genómicos de cualquier adenovirus presente en la muestra, en exclusión de amplificaciones de genoma humano (fase de enriquecimiento), la segunda amplificación empleó cebadores diseñados para amplificar exclusivamente regiones genómicas del Ad36 (fase de especificidad). El control positivo del genoma de Ad36 amplificó adecuadamente en ambas condiciones, siendo la identidad viral corroborada mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos de cada una de las amplificaciones. Ninguna de las muestras de ADN procedentes de los participantes resultó positiva a la presencia del genoma de Adenovirus, bajo ninguna de las parejas de cebadores evaluadas.

La ausencia del genoma del Ad36 en el tejido adiposo humano en muestra poblacional ya ha sido reportado previamente en la literatura ^{64,66,77,92,94}. Los resultados del presente estudio coinciden con los reportados por Broderik 2009⁷², Goossens 2011⁶⁴, Berger 2014⁷⁴, Sabin 2015⁷⁵ y Zohu 2018⁷³ quienes por diferentes metodologías (PCR, SNA) no encontraron una asociación estadísticamente significativa entre la infección (evidencia serología o presencia de ácidos nucleicos) y el desarrollo de sobrepeso-obesidad.

Consideramos que el tamaño muestral fue apropiado ya que este supera con creces el requerimiento mínimo previsto por la metodología para la evaluación de población libre de enfermedad (n=32), calculado en base a una prevalencia estimada según literatura del 15%

La aparente discrepancia entre la elevada seroprevalencia del Ad36 reportada en diversos estudios y la falta de resultados en los estudios que analizan la presencia del genoma viral en tejido adiposo es un tema actualmente en controversia en la literatura ^{63,66}.

Tal como informa Goossens en 2012 existe una paradoja entre la aparente distribución cosmopolita del Ad36 evaluada mediante serología y el limitado número de detecciones de este patógeno salvo por serología desde su descubrimiento en 1978⁶⁶. Más aun, en Europa en un estudio colaborativo llevado a cabo en 1999 por los Países Bajos y Reino Unido, se identificaron por

métodos moleculares 2484 aislados clínicos de adenovirus, pudiéndose identificar todas las serovariedades conocidas hasta el momento salvo los serotipos 24, 30 y 36⁹⁵. En este estudio se demuestra la presencia en aislados clínicos de una serovariedad de Mastadenovirus, el adenovirus 47, mismo que presenta una secuencia de nucleótidos prácticamente idéntica al Ad36, es posible que el virus detectado en la mayor parte de los estudios serológicos corresponda a la respuesta inmunológica al adenovirus 47 o al adenovirus 20, con el que se ha determinado la presencia de reacciones de seroinhibitorias cruzadas ^{96,97}.

Una hipótesis alterna que permite explicar esta discrepancia consiste en que, si bien la seropositividad ante el Ad36 presenta una asociación estadísticamente significativa con la presencia de sobrepeso y obesidad, es posible que esta relación no sea del tipo causal, sino que ambas condiciones se encuentren determinadas por uno o más factores externos.

El factor externo que más probablemente se encuentre implicado en esta relación corresponde al estilo de vida de la población, en particular, estatus socioeconómico. La Sociedad Endocrinológica Internacional, en un comunicado en 2017⁸ refiere que el estilo de vida de la población explica un 70% del riesgo para el desarrollo del sobrepeso y la obesidad, siendo un 30% del riesgo explicado por otros factores, mayoritariamente por la herencia. Dentro de los factores que influyen en el estilo de vida de la población destacan los elementos del ámbito socioeconómico, ya que estos determinan en gran medida las capacidades de una persona para acceder a servicios médicos, dietas saludables, oportunidades de recreación y actividad física, etc.

Debido al desarrollo de alimentos industrializados actualmente es posible adquirir alimentos ultraprocesados con un elevado contenido calórico a precios inferiores al de alimentos frescos mínimamente procesados. La correlación entre un menor nivel socioeconómico y educativo, con el consumo de alimentos ultraprocesados ha sido establecida en la literatura ⁹⁸.

Adicionalmente se ha demostrado que las personas en condiciones de vulnerabilidad económica presentan un riesgo incrementado para el contagio y desarrollo de enfermedades infecciosas, en particular de enfermedades respiratorias. Se ha demostrado que el contagio del adenovirus se ve ampliamente favorecido por condiciones de hacinamiento y limitación en los servicios sanitarios ^{99,100}.

Se ha demostrado que personas en condiciones de desfavorecimiento económico tienden a tener prevalencias más elevadas de obesidad que pares en condiciones económicas más favorables ^{101,102}. En México, la prevalencia de obesidad en niños en edad escolar apoyados con programas gubernamentales de alimentación se incrementó en 97% entre 2012 y 2018, mientras que en adolescentes en ausencia de programas de apoyo para la alimentación la prevalencia de obesidad se incrementó en 60% en el mismo periodo ¹⁰³.

Esta hipótesis coincide con lo descrito por Broderik en 2009, al analizar la seroprevalencia de anticuerpos antiAd36 en personal militar en Estados Unidos se documentó una asociación estadísticamente significativa entre la seropositividad al Ad36 y la raza del participante, pero no fue posible determinar una asociación con la presencia de obesidad. Individuos de razas negra, hispana y asiática presentaron una Odds Ratio superior al de individuos de raza caucásica para la seroprevalencia al Ad36 (OR 2.65, 1.89, 2.01 respectivamente)⁷². Vale la pena mencionar que en Estados Unidos se ha establecido que un estatus socioeconómico bajo es uno de los principales factores que influyen a un individuo a integrarse a los servicios militares ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶, a la vez que se ha determinado que la población negra e hispana representa un grupo socioeconómicamente vulnerable al compararlo con la población de ascendencia anglosajona ¹⁰⁷.

Con respecto a los niveles séricos de Proteína C Reactiva, el 79% de los participantes del estudio presentaron niveles superiores al punto de corte considerado como deseable por la Asociación Americana de Cardiología (3.0 mg/l, American Heart Association, AHA) ⁴¹. Lo anterior pudo deberse a la elevada prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas en los participantes del estudio, así como a la elevada prevalencia de obesidad en la muestra (reconocida como una

enfermedad inflamatoria de bajo grado). No se encontró una diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de Proteína C Reactiva en función del sexo del participante. Al no presentarse ningún caso positivo de Ad36 entre los participantes de la muestra no resultó posible la comparación entre los niveles séricos de Proteína C Reactiva entre los participantes con infección persistente respecto a los controles sanos.

Con respecto a la determinación de los niveles séricos de leptina, En nuestra muestra 2 de 5 participantes masculinos y 14 de 67 participantes femeninas se ubicaron por encima del punto de corte propuesto de 3.6 ng/mL para varones adultos y de 11 ng/mL para mujeres adultas. Estos puntos de corte se basan en los estudios realizados por Esteghamati en 2011 en Irán, en donde determinó que un punto de corte de 3.6 ng/mL en varones presentan un valor predictivo positivo (VPP) del 56.5% y Valor Predictivo Negativo (VPN) del 72.7% para el síndrome metabólico, en el caso de las mujeres un punto de corte de 11 ng/mL ofrece un VPP del 53.8% y un VPN del 73% para el síndrome metabólico ⁸⁹.

Existen dificultades para establecer puntos de corte precisos para los niveles normales de leptina en poblaciones humanas, debido a la amplia variación que esta presenta debido a factores hereditarios, del sexo del participante, su edad, su grado de adiposidad, su estado hormonal y de la región geográfica de donde proceda la muestra, siendo 1.01–80.8 ng/mL el rango encontrado en la mayor parte de los estudios ³⁹. Se debe hacer énfasis en que los niveles de leptina se ven ampliamente influenciados por el estado hormonal del participante, sufriendo estos cambios significativos durante la pubertad, la menopausia y diversas enfermedades ^{91,106}.

Gran parte de los participantes del presente estudio corresponden a pacientes con patologías crónicas, algunos de ellos pacientes femeninos que se encuentran en menopausia, por lo cual los resultados obtenidos pueden diferir de los esperados para adultos jóvenes sanos. Al no presentarse ningún caso positivo de Ad36 entre los participantes de la muestra no resultó posible la comparación entre los niveles séricos de los niveles séricos de leptina entre los participantes con infección persistente respecto a los controles sanos.

Comentado [DE10]: Si lo consideras conveniente se podría poner en la discusión lo relativo a la edad de los participantes.

Comentado [S11R10]: Se hace referencia a la edad de los participantes un poco antes en el párrafo.

CAPITULO 8

CONCLUSIONES

- La metodología por Biopsia por Aspiración con Aguja Fina (BAAF) constituye un método sencillo, rápido y seguro para obtener muestras de tejido adiposo en condiciones de campo.
- Por punción es posible obtener entre 20 y 60 mg de tejido adiposo, cantidad adecuada para la extracción de material genómico de buena calidad, para su subsecuente empleo en técnicas de biología molecular.
- La metodología de PCR enclavada es un método reproducible, económico y fiable para determinar en forma específica la presencia del genoma del Ad36, combinado con la metodología de la Biopsia por Aspiración con Aguja Fina proporcionan una metodología que permite la investigación de infección persistente por Ad36 en tejido adiposo a escala poblacional.
- No se encontró evidencia del genoma del Ad36 en el tejido adiposo de participantes procedentes de 3 comunidades del Estado de Yucatán con elevada prevalencia de Sobre-peso-Obesidad (72 participantes).
- Dado que el tamaño de muestra excedió el estimado con base en la metodología para la determinación de población libre de enfermedad se acepta que el Adenovirus 36 no se encontraba presente en las poblaciones evaluadas al momento del estudio.
- El 79% de los participantes en el presente estudio presentaron concentraciones séricas de Proteína C Reactiva superiores a los niveles recomendados por la Asociación Americana de Cardiología (AHA, 3 mg/l) ubicándose en niveles correspondientes a un riesgo cardiovascular incrementado. En relación a los niveles séricos de Leptina se encontró una

Comentado [DE12]: Falta la conclusión con respecto al objetivo de la determinación de niveles de leptina y PCR.

media de 4.85 ng/mL en los participantes del sexo masculino respecto a 7.46 ng/mL (± 11.23 ng/mL) en participantes del sexo femenino. Al no disponer de participantes positivos al AD36 no fue posible el comparar las diferencias en los niveles de Leptina y Proteína C Reactiva respecto a participantes de la misma edad y sexo sin presencia del genoma viral.

- Debido a la fisiopatología multifactorial de la obesidad, a los reportes ubicuos de anticuerpos neutralizantes contra el Adenovirus 36 presentes en la literatura y la escasez de reportes en los que este se aisló en forma satisfactoria⁷⁷, se deberán tomar en cuenta posibilidades alternas que expliquen este fenómeno, en particular que la seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes y la presencia de obesidad tengan como vínculo común las variables socioculturales en las que se desenvuelve el individuo.

Comentado [DE13]: No entendí esta parte, en especial; "reportes en los que se aisló en forma satisfactoria"

Comentado [S14R13]: Hace referencia a que el adenovirus 36 no ha sido aislado nuevamente desde su descubrimiento inicial en los años 80, sin embargo se reporta con gran frecuencia un virus con un genoma prácticamente idéntico que es el ad47, incluyo referencia

8.1 PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Si bien en la presente investigación no se detectó la presencia del genoma del Adenovirus 36 en el tejido adiposo de los participantes del estudio, no resulta posible el descartar que diversas enfermedades infecciosas influyan en el desarrollo del sobrepeso y la obesidad en el Estado de Yucatán.

Como direcciones futuras de investigación se recomienda valorar otros mecanismos que pudiesen explicar la asociación observada entre la seroprevalencia de anticuerpos contra el Adenovirus 36 y la presencia de obesidad. En particular se considera relevante el estudiar las interacciones que existen entre los determinantes socioeconómicos y la presencia de inmunidad en contra del Adenovirus 36.

La presente investigación provee de una metodología sencilla para la determinación de la presencia del genoma del Adenovirus 36 en tejido adiposo humano a escala poblacional. Empleando esta metodología es posible plantear un estudio a escala poblacional que contraste la seroprevalencia de anticuerpos anti-Ad36 respecto a la presencia de infección persistente en tejido adiposo determinado por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Otra vertiente de investigación posible consistiría en la realización de un seguimiento serológico de anticuerpos anti-Ad36 en participantes con distinto nivel socioeconómico. Ya se ha descrito en la literatura que la prevalencia de inmunidad al Adenovirus 36 se incrementa en función de la edad de los individuos estudiados ⁷⁵, un estudio de cohorte permitiría conocer la forma en la cual varía la prevalencia de anticuerpos en la población en función del estatus socioeconómico, aportando los datos requeridos para aceptar o rechazar la hipótesis antes planteada.

Como limitantes del presente estudio se debe tomar en cuenta las características de la muestra. Esta fue seleccionada para maximizar la probabilidad de encontrar el genoma del Adenovirus 36 en tejido adiposo humano. Debido a que se ha referido en la literatura que el Adenovirus 36

favorece un incremento en la adiposidad del individuo, se procuró realizar el muestreo en individuos procedentes de comunidades con una elevada prevalencia de sobrepeso y obesidad.

El tamaño muestral fue seleccionado de acuerdo a una metodología para la determinación de población libre de enfermedad, con el objetivo de demostrar la presencia o ausencia del genoma del Adenovirus en la comunidad de interés. La muestra no fue diseñada para ser representativa de la población yucateca en su totalidad, lo cual añadido a que numerosos participantes presentaban una o más enfermedades crónico-degenerativas en tratamiento, genera que los resultados antropométricos de la muestra difieran significativamente de la población yucateca en su conjunto.

En la presente investigación únicamente se evaluó la presencia del genoma del Adenovirus 36 en el tejido adiposo de los participantes, desconociéndose si poseen o no anticuerpos neutralizantes en contra de este virus. Sería de interés el conocer la seroprevalencia del Adenovirus 36 en el Estado de Yucatán, así como determinar si en el Estado se presenta la asociación entre el sobrepeso y la presencia de anticuerpos neutralizantes como se encuentra descrito en otras regiones del mundo.

CAPITULO 9

BIBLIOGRAFÍA

1. Durán-Arenas, L. *et al.* Costos directos de la hemodiálisis en unidades públicas y privadas. *salud pública de méxico* **53**, 516–524 (2011).
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Mujeres y hombres en México 2016. (2016).
3. Kaur, J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice* **2014**, 1–21 (2014).
4. Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P. & Shaw, J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabetic medicine* **23**, 469–480 (2006).
5. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation* **106**, 3143 (2002).
6. *Encuesta nacional de salud y nutrición 2012: resultados nacionales.* (Instituto Nacional de Salud Pública : Secretaría de Salud, 2012).
7. Hruby, A. & Hu, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* **33**, 673–689 (2015).
8. Schwartz, M. W. *et al.* Obesity Pathogenesis: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* **38**, 267–296 (2017).
9. Voss, J. D. & Dhurandhar, N. V. Viral Infections and Obesity. *Curr Obes Rep* **6**, 28–37 (2017).
10. Na, H.-N., Dubuisson, O., Hegde, V., Nam, J.-H. & Dhurandhar, N. V. Human adenovirus Ad36 and its E4orf1 gene enhance cellular glucose uptake even in the presence of inflammatory cytokines. *Biochimie* **124**, 3–10 (2016).

11. Ponterio, E. *et al.* Adenovirus 36 DNA in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* **39**, 1761–1764 (2015).
12. Atkinson, R. L. *et al.* Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *Int J Obes (Lond)* **29**, 281–286 (2005).
13. Parra-Rojas, I. *et al.* Adenovirus-36 Seropositivity and Its Relation with Obesity and Metabolic Profile in Children. *International Journal of Endocrinology* (2013). doi:10.1155/2013/463194
14. Lakka, H.-M. *et al.* The Metabolic Syndrome and Total and Cardiovascular Disease Mortality in Middle-aged Men. *JAMA* **288**, 2709–2716 (2002).
15. Sierra, F. Prevalencia de desnutrición, sobrepeso y obesidad en niños de 1 a 12 años de edad que asisten a los comedores infantiles del DIF municipal (Mérida). (Universidad Autónoma de Yucatán, 2010).
16. Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J. & Paquot, N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **105**, 141–150 (2014).
17. *NORMA Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2017, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad.*
18. Barrera-Cruz, A. *et al.* Guía de práctica clínica. Prevención, diagnóstico y tratamiento del sobrepeso y la obesidad exógena. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **51**, (2013).
19. Torres, F., Rojas, A., Torres, F. & Rojas, A. Obesidad y salud pública en México: transformación del patrón hegemónico de oferta-demanda de alimentos. *Problemas del desarrollo* **49**, 145–169 (2018).
20. Arroyo, P. *et al.* Obesidad, morfología corporal y presión arterial en grupos urbanos y rurales de Yucatán. *Salud Pública de México* **49**, 274–285 (2007).
21. Rtveladze, K. *et al.* Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. *Public Health Nutrition* **17**, 233–239 (2014).

22. Hernandez, M. *et al.* *Encuesta Nacional de Salud y Nutricion de Medio Camino 2016 (Ensanut 2016). Informe final de resultados.* (Instituto Nacional de Salud Pública : Secretaría de Salud, 2016).
23. Rojas, R. *et al.* Metabolic syndrome in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud pública de México* **52**, S11–S18 (2010).
24. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. *Encuesta Nacional de Salud y Nutricion 2018. Presentación de resultados.* (Instituto Nacional de Salud Publica, 2019).
25. Marín Cárdenas, A. D., Sánchez Ramírez, G. & Maza Rodríguez, L. L. Prevalencia de obesidad y hábitos alimentarios desde el enfoque de género: el caso de Dzutóh, Yucatán, México. *Estudios sociales (Hermosillo, Son.)* **22**, 64–90 (2014).
26. Hernandez-Escalante, V. M. *et al.* Replication of obesity and diabetes-related SNP associations in individuals from Yucatán, México. *Front Genet* **5**, (2014).
27. Marchesini, G. *et al.* WHO and ATPIII proposals for the definition of the metabolic syndrome in patients with Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine* **21**, 383–387 (2004).
28. Suárez-Carmona, W. *et al.* Fisiopatología de la obesidad: Perspectiva actual. *Revista chilena de nutrición* **44**, 226–233 (2017).
29. Mantilla Toloza, S. C. & Gómez-Conesa, A. El Cuestionario Internacional de Actividad Física. Un instrumento adecuado en el seguimiento de la actividad física poblacional. *Rev Iberoam Fisioter Kinesiol* 48–52 (2018). doi:10.1016/S1138-6045(07)73665-1
30. Buyse, J., Decuyper, E., Huyghebaert, G. & Herremans, M. The effect of clenbuterol supplementation on growth performance and on plasma hormone and metabolite levels of broilers. *Poult. Sci.* **70**, 993–1002 (1991).
31. Dm, S., Tg, M. & Lm, M. Changes in Skeletal Muscle Gene Expression Following Clenbuterol Administration. *BMC genomics* **7**, (2006).

32. Umeki, D. *et al.* Protective Effects of Clenbuterol against Dexamethasone-Induced Masseter Muscle Atrophy and Myosin Heavy Chain Transition. *PLoS ONE* **10**, e0128263 (2015).
33. O'Neill, S. & O'Driscoll, L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies: Metabolic syndrome. *Obesity Reviews* **16**, 1–12 (2015).
34. Considine, R. V. *et al.* Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* **334**, 292–295 (1996).
35. Ponterio, E. & Gnessi, L. Adenovirus 36 and Obesity: An Overview. *Viruses* **7**, 3719–3740 (2015).
36. Adipogenic human adenovirus-36 reduces leptin expression and secretion and increases glucose uptake by fat cells. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16703005>. (Accessed: 5th March 2018)
37. Hruby, A. & Hu, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* **33**, 673–689 (2015).
38. Sapunar, J. *et al.* Adenovirus 36 seropositivity is related to obesity risk, glycemic control, and leptin levels in Chilean subjects. *Int J Obes* **44**, 159–166 (2020).
39. Zhou, X., Chai, Y., Chen, K., Yang, Y. & Liu, Z. A Meta-Analysis of Reference Values of Leptin Concentration in Healthy Postmenopausal Women. *PLoS One* **8**, (2013).
40. Gijón-Conde, T. *et al.* Leptin Reference Values and Cutoffs for Identifying Cardiometabolic Abnormalities in the Spanish Population. *Rev Esp Cardiol* **68**, 672–679 (2015).
41. Salazar, J. *et al.* C-Reactive Protein: Clinical and Epidemiological Perspectives. *Cardiol Res Pract* **2014**, (2014).
42. Cozlea, D. L. *et al.* The Impact of C Reactive Protein on Global Cardiovascular Risk on Patients with Coronary Artery Disease. *Curr Health Sci J* **39**, 225–231 (2013).
43. Giordano, A. *et al.* Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *J. Lipid Res.* **54**, 2423–2436 (2013).

44. Alkhoury, N. *et al.* Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *J. Biol. Chem.* **285**, 3428–3438 (2010).
45. Kamath, D. Y., Xavier, D., Sigamani, A. & Pais, P. High sensitivity C-reactive protein (hsCRP) & cardiovascular disease: An Indian perspective. *Indian J Med Res* **142**, 261–268 (2015).
46. Aronson, D. *et al.* Obesity is the major determinant of elevated C-reactive protein in subjects with the metabolic syndrome. *International Journal of Obesity* **28**, 674–679 (2004).
47. The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics* **114**, 555 (2004).
48. Singh, Y., Garg, M. K., Tandon, N. & Marwaha, R. K. A study of insulin resistance by HOMA-IR and its cut-off value to identify metabolic syndrome in urban Indian adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* **5**, 245–251 (2013).
49. Sah, S. K. *et al.* Association of high-sensitivity C-reactive protein and uric acid with the metabolic syndrome components. *Springerplus* **5**, (2016).
50. Voils, S. A. & Cooper-DeHoff, R. M. Association between high sensitivity C-reactive protein and metabolic syndrome in subjects completing the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2009-10. *Diabetes Metab Syndr* **8**, 88–90 (2014).
51. Lee, C. J. *et al.* Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance do not predict hypertension: a community cohort study. *Am. J. Hypertens.* **28**, 493–500 (2015).
52. Pasarica, M. & Dhurandhar, N. V. Infectoobesity: Obesity of Infectious Origin. in *Advances in Food and Nutrition Research* **52**, 61–102 (Academic Press, 2007).
53. van Ginneken, V., Sitnyakowsky, L. & Jeffery, J. E. "Infectoobesity: viral infections (especially with human adenovirus-36: Ad-36) may be a cause of obesity. *Med. Hypotheses* **72**, 383–388 (2009).

54. Adipogenic human adenovirus Ad-36 induces commitment, differentiation, and lipid accumulation in human adipose-derived stem cells. - PubMed - NCBI. (2018). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18203674>. (Accessed: 7th March 2018)
55. Glaunsinger, B. A., Weiss, R. S., Lee, S. S. & Javier, R. Link of the unique oncogenic properties of adenovirus type 9 E4-ORF1 to a select interaction with the candidate tumor suppressor protein ZO-2. *EMBO J.* **20**, 5578–5586 (2001).
56. Insulin receptor-independent upregulation of cellular glucose uptake | International Journal of Obesity. (2018). Available at: <https://www.nature.com/articles/ijo20126>. (Accessed: 7th March 2018)
57. Dhurandhar, E. J. *et al.* E4orf1 improves lipid and glucose metabolism in hepatocytes: a template to improve steatosis & hyperglycemia. *PLoS ONE* **7**, e47813 (2012).
58. Dhurandhar, N. Adenovirus ad36 e4orf1 protein for prevention and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. (2015).
59. Adipogenic human adenovirus-36 reduces leptin expression and secretion and increases glucose uptake by fat cells. - PubMed - NCBI. (2018). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16703005>. (Accessed: 5th March 2018)
60. Gauger, P. C. & Vincent, A. L. Serum virus neutralization assay for detection and quantitation of serum-neutralizing antibodies to influenza A virus in swine. *Methods Mol. Biol.* **1161**, 313–324 (2014).
61. Almgren, M. *et al.* Adenovirus-36 Is Associated with Obesity in Children and Adults in Sweden as Determined by Rapid ELISA. *PLoS One* **7**, (2012).
62. Adenovirus 36 DNA in adipose tissue of patient with unusual visceral obesity. - PubMed - NCBI. (2018). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20409382>. (Accessed: 7th March 2018)
63. Ponterio, E. *et al.* Adenovirus 36 DNA in human adipose tissue. *International Journal of Obesity* **39**, 1761–1764 (2015).

64. Goossens, V. J. *et al.* Lack of Evidence for the Role of Human Adenovirus-36 in Obesity in a European Cohort. *Obesity* **19**, 220–221 (2011).
65. Dhurandhar, N. V. Prevalence of Ad36 infection in humans. *Journal of Clinical Virology* **57**, 261–262 (2013).
66. Goossens, V. J. Adenovirus-36 prevalence paradox in development. *Journal of Clinical Virology* **56**, 5–6 (2013).
67. Trovato, G. M. *et al.* Human obesity relationship with Ad36 adenovirus and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* **33**, 1402–1409 (2009).
68. Atkinson, R. L., Lee, I., Shin, H.-J. & He, J. Human adenovirus-36 antibody status is associated with obesity in children. *International journal of pediatric obesity* **5**, 157–160 (2010).
69. Gabbert, C., Donohue, M., Arnold, J. & Schwimmer, J. B. Adenovirus 36 and obesity in children and adolescents. *Pediatrics* **126**, 721–726 (2010).
70. Trovato, G. M. *et al.* Ad36 adipogenic adenovirus in human non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International* **30**, 184–190 (2010).
71. Laing, E. M. *et al.* Adenovirus 36, Adiposity, and Bone Strength in Late-Adolescent Females. *Journal of bone and mineral research* **28**, 489–496 (2013).
72. Broderick, M. P. *et al.* Adenovirus 36 seropositivity is strongly associated with race and gender, but not obesity, among US military personnel. *International journal of obesity (2005)* **34**, 302–8 (2009).
73. Zhou, Y. *et al.* The relationship between human adenovirus 36 and obesity in Chinese Han population. *Biosci Rep* **38**, (2018).
74. Berger, P. K. *et al.* Association of Adenovirus 36 Infection With Adiposity and Inflammatory-Related Markers in Children. *J Clin Endocrinol Metab* **99**, 3240–3246 (2014).
75. Sabin, M. A. *et al.* Longitudinal investigation of adenovirus 36 seropositivity and human obesity: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Int J Obes (Lond)* **39**, 1644–1650 (2015).

76. Akheruzzaman, M., Hegde, V. & Dhurandhar, N. V. Twenty-five years of research about adipogenic adenoviruses: A systematic review. *Obesity Reviews* **20**, 499–509 (2019).
77. Goossens, V. J. Ad36: skip serology, NAT we need. *Journal of Diabetes and its Complications* **29**, 970 (2015).
78. Martin, S. W., Shoukri, M. & Thorburn, M. A. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. *Preventive Veterinary Medicine* **14**, 33–43 (1992).
79. Branscum, A. J., Johnson, W. O. & Gardner, I. A. Sample size calculations for disease freedom and prevalence estimation surveys. *Statistics in Medicine* **25**, 2658–2674 (2006).
80. Javadi, A. *et al.* Qualification Study of Two Genomic DNA Extraction Methods in Different Clinical Samples. *Tanaffos* **13**, 41–47 (2014).
81. Chiang, Y. J., Kim, S.-H., Tessarollo, L., Campisi, J. & Hodes, R. J. Telomere-Associated Protein TIN2 Is Essential for Early Embryonic Development through a Telomerase-Independent Pathway. *Mol Cell Biol* **24**, 6631–6634 (2004).
82. Pasarica, M., Loiler, S. & Dhurandhar, N. V. Acute effect of infection by adipogenic human adenovirus Ad36. *Arch Virol* **153**, 2097–2102 (2008).
83. Ansari-Lari, M. A. & Ali, S. Z. Fine-needle aspiration of abdominal fat pad for amyloid detection: a clinically useful test? *Diagn. Cytopathol.* **30**, 178–181 (2004).
84. Espy, M. J. *et al.* Detection of Vaccinia Virus, Herpes Simplex Virus, Varicella-Zoster Virus, and Bacillus anthracis DNA by LightCycler Polymerase Chain Reaction After Autoclaving: Implications for Biosafety of Bioterrorism Agents. *Mayo Clinic Proceedings* **77**, 624–628 (2002).
85. Yap, J. M., Goldsmith, C. E. & Moore, J. E. Integrity of bacterial genomic DNA after autoclaving: possible implications for horizontal gene transfer and clinical waste management. *J. Hosp. Infect.* **83**, 247–249 (2013).

86. Porter-Jordan, K. *et al.* Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA. *J. Med. Virol.* **30**, 85–91 (1990).
87. Choi, W. S., Rodríguez, R. A. & Sobsey, M. D. Persistence of viral genomes after autoclaving. *J. Virol. Methods* **198**, 37–40 (2014).
88. Gefrides, L. A., Powell, M. C., Donley, M. A. & Kahn, R. UV irradiation and autoclave treatment for elimination of contaminating DNA from laboratory consumables. *Forensic Science International* **4**, 89–94 (2010).
89. Esteghamati, A. *et al.* Leptin cut-off values for determination of metabolic syndrome: third national surveillance of risk factors of non-communicable diseases in Iran (SuRFNCD-2007). *Endocrine* **40**, 117–123 (2011).
90. Chooi, Y. C., Ding, C. & Magkos, F. The epidemiology of obesity. *Metabolism* **92**, 6–10 (2019).
91. Dubuisson, O., Day, R. S. & Dhurandhar, N. V. Accurate identification of neutralizing antibodies to adenovirus Ad36, -a putative contributor of obesity in humans. *Journal of Diabetes and its Complications* **29**, 83–87 (2015).
92. Ergin, S. *et al.* The role of adenovirus 36 as a risk factor in obesity: the first clinical study made in the fatty tissues of adults in Turkey. *Microb. Pathog.* **80**, 57–62 (2015).
93. Pasarica, M. *et al.* Adipogenic human adenovirus Ad-36 induces commitment, differentiation, and lipid accumulation in human adipose-derived stem cells. *Stem Cells* **26**, 969–978 (2008).
94. Ergin, S. *et al.* Evaluation of the possible involvement of Ad-36-induced adipogenesis and coronary artery disease development in mediastinal adipose tissue samples. *Infez Med* **27**, 290–298 (2019).
95. De Jong, J. C. *et al.* Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3940–3945 (1999).

96. Hierholzer, J. C., Stone, Y. O. & Broderson, J. R. Antigenic relationships among the 47 human adenoviruses determined in reference horse antisera. *Arch. Virol.* **121**, 179–197 (1991).
97. Hierholzer, J. C., Wigand, R., Anderson, L. J., Adrian, T. & Gold, J. W. Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43-47). *J. Infect. Dis.* **158**, 804–813 (1988).
98. Appelhans, B. M. *et al.* Socioeconomic Status, Energy Cost, and Nutrient Content of Supermarket Food Purchases. *Am J Prev Med* **42**, (2012).
99. Qurei, L., Seto, D., Salah, Z. & Azzeh, M. A Molecular Epidemiology Survey of Respiratory Adenoviruses Circulating in Children Residing in Southern Palestine. *PLOS ONE* **7**, e42732 (2012).
100. Cohen, S. Social status and susceptibility to respiratory infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **896**, 246–253 (1999).
101. Pavea, G., Lewis, D. W., Locher, J. & Allison, D. B. Socioeconomic Status, Risk of Obesity, and the Importance of Albert J. Stunkard. *Curr Obes Rep* **5**, 132–139 (2016).
102. Volaco, A., Cavalcanti, A. M., Filho, R. P. & Précoma, D. B. Socioeconomic Status: The Missing Link Between Obesity and Diabetes Mellitus? *Curr Diabetes Rev* **14**, 321–326 (2018).
103. Shamah-Levy, T. *et al.* [Overweight and obesity in Mexican vulnerable population. Results of Ensanut 100k]. *Salud Publica Mex* **61**, 852–865 (2019).
104. Clark, J. Y. & Thompson, I. M. Military rank as a measure of socioeconomic status and survival from prostate cancer. *South. Med. J.* **87**, 1141–1144 (1994).
105. Hosek, J. & Wadsworth, S. M. Economic conditions of military families. *Future Child* **23**, 41–59 (2013).
106. Tsai, J., Desai, M. U., Cheng, A. W. & Chang, J. The effects of race and other socioeconomic factors on health service use among American military veterans. *Psychiatr Q* **85**, 35–47 (2014).

107. Sautter, J. M., Thomas, P. A., Dupre, M. E. & George, L. K. Socioeconomic Status and the Black–White Mortality Crossover. *Am J Public Health* **102**, 1566–1571 (2012).
108. Blum, W. F. *et al.* Plasma Leptin Levels in Healthy Children and Adolescents: Dependence on Body Mass Index, Body Fat Mass, Gender, Pubertal Stage, and Testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 2904–2910 (1997).
109. Kocazeybek, B. *et al.* Evaluation of Adenovirus-36 (Ad-36) antibody seropositivity and adipokine levels in obese children. *Microb. Pathog.* **108**, 27–31 (2017).
110. Tosh, A. K., Wasserman, M. G., McLeay li, M. T. & Tepe, S. K. Human adenovirus-36 seropositivity and obesity among Midwestern US adolescents. *Int J Adolesc Med Health* (2017). doi:10.1515/ijamh-2017-0126
111. LaVoy, E. C. *et al.* High adenovirus 36 seroprevalence among a population of Hispanic American youth. *Int J Adolesc Med Health* (2018). doi:10.1515/ijamh-2018-0110

CAPITULO 10

ANEXOS

ANEXO I

CARTA DE APROBACIÓN DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN POR COMITÉ DE BIOÉTICA



Universidad Marista de Mérida

Folio: CE_067_2019

DICTAMEN

Mérida, Yucatán a 12 de Julio de 2019

MC. Enrique Eduardo Peraza López
Investigador Responsable
Universidad Marista de Mérida
Presente

En representación del Comité de Ética, le notifico con respecto al proyecto de investigación con número de registro: CE_067_2019, titulado: "Detección por métodos moleculares del Adenovirus 36 relacionado con obesidad en una población del Estado de Yucatán" fue puesta a consideración de del comité de ética de la Universidad Marista y que con base en las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, y en apego a la normatividad tanto nacional como internacional vigente en materia de Investigación en Salud regulada en México por la Secretaría de Salud, se ha decidido emitir el siguiente dictamen:

APROBADA SIN RESTRICCIONES

ATENTAMENTE:

Dr. Marco Antonio Escalante Rodríguez
Presidente del Comité de ética de la Universidad Marista de Mérida

Ccp: Minutario del Comité de Ética, Universidad Marista de Mérida

ANEXO II

FIGURAS COMPLEMENTARIAS

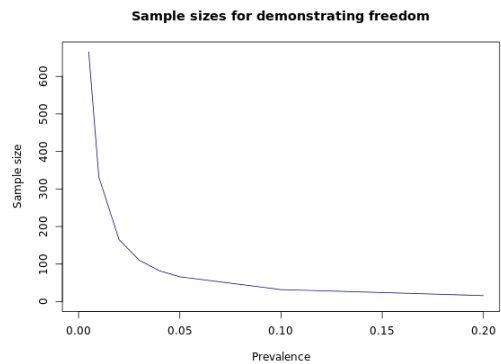


Figura 5-1 – Grafica complementaria para ilustrar el cálculo del tamaño muestral según la metodología de población libre de enfermedad según Martín et al^{78,79}. Para una enfermedad con una prevalencia estimada del 15% se requieren 32 individuos negativos, sin casos positivos, para poseer un 99% de certeza que la enfermedad no se encuentra presente en esa población.

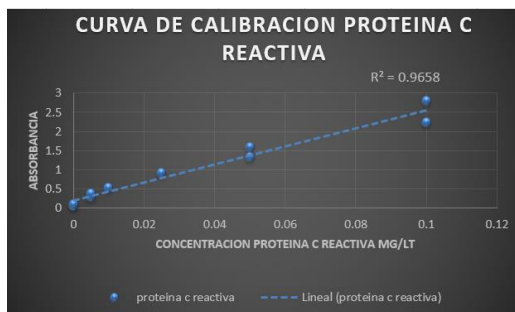


Figura 6-6.1- Curva de calibración para la determinación de Proteína C Reactiva Sérica mediante ensayo ELISA. Kit marca DRG, lector marca PKL

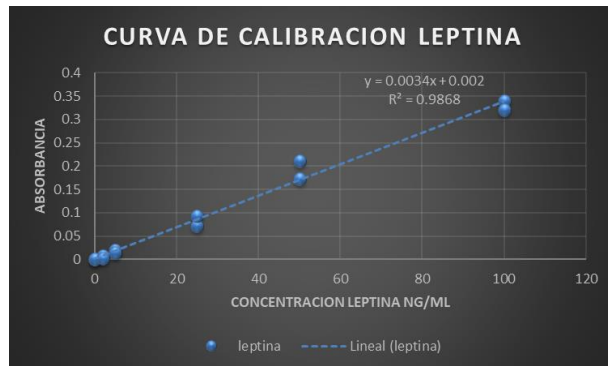


Figura 6.6.2- Curva de calibración para la determinación de leptina sérica mediante ensayo ELISA. Kit marca DRG, lector marca PKL

ANEXO III

TABLAS DE APOYO COMPLEMENTARIO A MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1-1: Comparación de los criterios diagnósticos para el diagnóstico de síndrome metabólico según las guías Adult Treatment Panel III (ATP III), la Asociación Americana De Cardiología (AHA), y la Federación Internacional De La Diabetes (IDF).

Factor de riesgo	NCEP ATP III (2001) ⁵	AHA 2005 ³	IDF (2006) ⁴
	Síndrome metabólico si se presentan tres o más de los siguientes	Síndrome metabólico si se presentan tres o más de los siguientes	Obesidad abdominal en adición a dos de los siguientes:
Perímetro abdominal (hombres)	>102 cm	>102 cm	Tablas de acuerdo a origen étnico
Perímetro abdominal (mujeres)	>88cm	>88 cm	
Hipertensión	Ta >130/85 mmHg o medicación antihipertensiva	Ta >130/85 mmHg o medicación antihipertensiva	Ta >130/85 mmHg o medicación antihipertensiva
Triglicéridos	>150 mg/dl o medicación	>150 mg/dl o medicación	>150 mg/dl o medicación
Colesterol de alta densidad (HDL)	Hombres:<40 mg/dl Mujeres:<50 mg/dl O medicación en ambos casos	Hombres:<40 mg/dl Mujeres:<50 mg/dl O medicación en ambos casos	Hombres:<40 mg/dl Mujeres:<50 mg/dl O medicación en ambos casos
Glucosa sérica en ayunas	<110 mg/dl o medicación	>100 mg/dl o medicación	>100 mg/dl o medicación

Tabla 2-1.- Comparación de los resultados de algunos de los estudios realizados acerca de la prevalencia del Adenovirus 36 en poblaciones humanas (adaptado de Ponteiro 2015³⁵).

Referencia*	País	VARIABLES	IMC	Participantes	Prevalencia
Atkinson (2005)	EU	Obesidad, IMC, TG, CT	>30	360 adultos obesos y 142 no obesos	30% en obesos y 11 % en no obesos
Trovato (2009)	Italia	Obesidad, IMC, TG, CT, LDL, HDL, SBP	>30	68 adultos obesos y 142 no obesos	65% en obesos, 33% en no obesos
Atkinson (2010)	Corea	CT, PA, SBP, glucosa	Na	83 niños con sobrepeso u obesidad	30% de los participantes
Broderick (2010)	EU	Obesidad	≥29	146 adultos obesos, 147 adultos no obesos	34% en obesos, 39% en no obesos
Gabbert (2010)	Eu	Obesidad, IMC, PA	≥ 25	67 niños con obesidad, 57 niños sin obesidad	Obeso 22%, no obeso 7%
Na (2010)	Corea del sur	Obesidad, IMC, CT, TG, PA, LDL, HDL, SBP, glucosa	IMC ≥ 30	259 niños obesos, 59 niños no obesos	Obesos 29%, no obeso 14%
Trovato (2010)	Italia	IMC, TG, CT, LDL, HDL, glucosa	Na	65 adultos con hígado graso no alcohólico, 114 adultos sin hígado graso	32% con hígado graso, y 46% sin hígado graso

Krishnapuram (2011)	EU	Insulina en ayuno, glucosa en ayuno, sensibilidad a la insulina	Na	Participantes de los estudios heritage (n=671), pbrc (n=206), met(n=45), viva la familia(n=585)	Heritage =13% Pbrc= 18% Met =22% Viva la familia 7.1%
Goossens (2011)	Noruega	Obesidad, IMC	Na	136 adultos obesos, 281 adultos no obesos, 92 adultos con IMC desconocido	5.5% de prevalencia global
Na (2012)	Corea	Obesidad, IMC, TG, CT, PA, HDL, glucosa	≥ 25	180 adultos obesos y 360 adultos no obesos	Obesos 30%, no obesos 36%
Trovato (2012)	Italia	IMC, TG, CT, LDL, HDL, glucosa	Na	62 adultos con hígado /graso no alcohólico	40% de prevalencia
Almgren (2012)	Suiza	Obesidad, IMC, TG, CT, LDL, HDL, glucosa	≥ 35	424 niños, 1522 adultos no diabéticos, 89 donadores de sangre anónimos	7% en 1992-1998, 15%-20% 2002-2009
Aldhoon- hainerova	Rep. checa	IMC, PA, masa grasa, TA, TC, CT, glucosa, insulina, enzimas hepáticas, adiponectina	Na	1179 adolescentes (85 con infrapeso, 506 peso normal, 160 con sobrepeso, 428 obesos)	26.5% de prevalencia global 22.3% infrapeso, 21.5% peso normal, 40% sobrepeso, 28% obesidad

Vander wal (2013)	Eu	IMC, CT, HDL, LDL, TG	me- dio 33.7 7	73 participantes (edad 10-17 años)	23.3% de preva- lencia
Lin (2013)	México	Edad, sexo, IMC, grasa corporal, glu- cosa en ayuno, insu- lina en ayuno	me- dio 29.1 5	1400 adultos	14.5% positivos que presentaron mayor adiposidad que seronegati- vos.
Laing (2013)	EU	Grasa corporal por ab- sorción dual de rayos x	21≤ IMC ≤ 24	115 mujeres con edad entre 18 y 19 años	52% en partici- pantes con adi- posidad normal 64% en sujetos con elevada adi- posidad
Vander wal (2013)	Eu	CT, HDL, LDL, TG	me- dio 37.7 7	73 sujetos con edad entre 10 y 17 años	23.3% de preva- lencia
Parra-Rojas (2013)	México	LDL, HDL, TG, insu- lina, glucosa en ayu- nas	Na	75 niños con normo- peso, 82 niños con obesidad	41.4% en normo- peso 58.6% en obesi- dad
Berger (2014)	EU	TNF-A, IL- , VEGF, MCP-1, grasa corporal	Na	291 niños con edad entre 9 y 13 años	42% de prevalen- cia
Voss (2014)	Estados unidos	Na	20≤I MC ≥ 30	500 participantes (18-22 años)	20.8% prevalen- cia

Karamese (2015)	Turquía	TG, CT, LDL, TNF-A, il-6, leptina	Na	146 niños y 130 adultos	27.1% en niños obesos y 6% en no obesos. 17.5% en adultos obesos y 4% en no obesos.
Ergin (2015) ⁹²	Turquía	IMC ≥ 30	Na	49 adultos obesos y 49 adultos no obesos	Prevalencia del 12.2 %
Kocazeybek (2017) ¹⁰⁹	Turquía	Seroprevalencia por ELISA	Na	71 niños con obesidad por IMC, 62 niños no obesos	12.7% en participantes obesos, 1.6% en participantes no obesos (1 participante).
Tosh (2017) ¹¹⁰	Estados Unidos	Seroprevalencia por ELISA	NA	Estudio en 41 adolescentes con obesidad, 37 sujetos en normopeso.	Prevalencia del 43.9% en participantes con obesidad, 21.6% en participantes con normopeso.
LaVoy (2018) ¹¹¹	Estado Unidos	Seroprevalencia por ELISA	NA	40 participantes entre 10 y 16 años. 12 participantes con obesidad, 28 en normopeso.	Prevalencia del 32% en participantes obesos, 25% participantes en normopeso

Sapunar (2019) ³⁸	Chile	Seroprevalencia por ELISA	NA	99 adultos en normopeso, 151 adultos con obesidad.	Seroprevalencia de 58% en adultos obesos, 34% en normopeso.
---------------------------------	-------	------------------------------	----	--	---

IMC: índice de masa corporal, TG: triglicéridos séricos; CT: colesterol total, LDL lipoproteínas de baja densidad, HDL: lipoproteínas de alta densidad, SBP: presión arterial sistólica, PA: perímetro abdominal, TNF- α : factor de necrosis tumoral α , Il-6: interleucina 6, VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1, ELISA; ensayo de inmunoadsorción acoplada a enzima.

TABLA 5-1.- Composición del buffer de lisis tisular Para la lisis tisular se empleó el buffer de lisis para cola de ratón (MIT, USA), con las siguientes condiciones:

Componente	Concentración final	Marca
TRIS HCL	10 mm	Sigma-Aldrich
EDTA	10 mm, pH 8	Sigma-Aldrich
NACL	100 mm	Merck
SDS	0.5% w/v	Sigma-Aldrich
Proteinasa k* *se añade después de homogenización inicial	20 mg/mL	Thermo scientific
El pH final se ajustó a 7.5		

Tabla 5-2 – Reactivos empleados para la realización de una Reacción en Cadena de la Polimerasa empleando como enzima Taq Polimerasa marca Invitrogen

Componente (en orden de adición).	Cantidad por reacción de 25 μ L
Agua- grado biología molecular	Cantidad necesaria para completar volumen (μ L)
Buffer para Highfidelity para taq polimerasa 10x.	2.5
MgCl ₂ 25 mM	2.5
dNTP 10 μ M de cada uno	0.4
Cebador forward 10 μ M	1
Cebador reverse 10 μ M	1
Muestra de ADN genómico	1
Taq Polimerasa (500 ui/mL)	0.2

Tabla 5-3.- Condiciones del termociclador empleadas para la amplificación del gen de β -actina humana por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa

Acción	Temperatura	Tiempo
Pre calentamiento de la tapa	105°C	Todo el proceso
Desnaturalización inicial	94°C	1 ciclo de 3 minutos
40 ciclos		
Desnaturalización	94°C	30 segundos
Alineamiento	55°C	30 Segundos
Extensión	72°C	1.5 minutos
Extensión final	72°C	10 min
Mantenimiento	4°C	Indefinido

Tabla 5-4 – Reactivos empleados para efectuar una Reacción en Cadena de la Polimerasa empleando la enzima Phusion High-Fidelity de acuerdo a las condiciones del fabricante.

Componente (en orden de adición).	Cantidad por reacción de 20 μL
Agua- grado biología molecular	Cantidad necesaria para completar volumen (μ L)
Buffer para polimerasa Phusion 5x. Incluye $MgCl_2$ para concentración final 1.5 mM	4
dNTP 10 μ M de cada uno	1
Cebador forward 10 μ M	1
Cebador reverse 10 μ M	1
ADN genómico	Menos de 250 ng
Polimerasa Phusion	0.2

La mezcla de los componentes se realizó sobre hielo, en un ambiente libre de contaminantes ambientales. Las puntas para la micropipeta y los tubos de reacción de 200 μ L fueron esterilizados previamente por autoclavado (120°C 2 atm, 20 min). La campana de flujo laminar vertical (clase II) fue descontaminada mediante la aplicación de hipoclorito de sodio comercial (2% v/v) y etanol al 70% en toda la superficie. Después la campana es descontaminada mediante UV de banda estrecha por 30 min. Las micropipetas fueron descontaminadas superficialmente mediante hipoclorito 2% v/v y etanol 70%.

Tabla 5-5 .- Condiciones de amplificación por medio de PCR gradiente evaluando los cebadores descritos por Pasarica 2008.

Acción	Temperatura (°C)	Tiempo
Pre calentamiento de la tapa	105	Todo el proceso
Desnaturalización inicial	98°	1 ciclo de 30s
Desnaturalización	98°	35 ciclos de 10s
Hibridación	Gradiente 45°, 49.8,54.6,59.4,6 4.2,69	35 ciclos de 15s
Extensión	72	35 ciclos de 30s
Extensión final	72	10 min
Mantenimiento	4	Indefinido

Tabla 5-6 .- Secuencia de los cebadores diseñados para la determinación específica del genoma del Adenovirus 36 por medio de PCR enclavada. Los cebadores externos tienen como finalidad amplificar cualquier adenovirus presente en la muestra, en exclusión de alineamientos inespecíficos con genoma humano (fase de enriquecimiento), posteriormente se emplearon los cebadores internos que tienen como finalidad amplificar selectivamente fragmentos del genoma del Adenovirus 36 en exclusión de otros adenovirus emparentados. Por cada pareja de cebadores se especifica la posición inicial y final de amplificación, contada en pares de bases desde el extremo 5' del genoma del Adenovirus 36.

Cebador	Fw	Rv	AE	Inicio	Tér-min	Ali-n	Especi-fico
1 Externo	Gccgcatgcttttag-gag	Ctccgggagtactggaa-gga	980	5978	6938	54.1	Humano
Interno	Gtcaagcttggtggcaagg	Ccactacatcgcatcctc	545	6037	6562	53.9	Adenovirus
2 Externo	Agtcctcgccactacagat	Acaacgaggaa-gtgtttcg	879	34001	34860	52.9	Humano
Interno	Gagctccataat-tagcccca	Ggtagtcagtcgctgctgtt	682	34076	34738	53.6	Adenovirus
3 Externo	Agacgtagctgtgca-ggtg	Gttttcgccgctttcaagt	520	9929	10429	53.5	Humano

Interno	Tggtagccgtaga-ggtagcg	Gggagtgccaatac-cacgta	300	10057	10057	53.8	Adenovirus
4 Externo	Gctgata-cttcggcgcttg	Cctgacgaaac-cgtgtctga	1184	22608	23772	53.7	Humano
Interno	Gacttaaccacc-cacgagca	Gatggcctcgtatgggg	747	22808	23537		Adenovirus
5 Externo	Agca-gacttctcgtttcgg	Ctcctaaaagcatcgcg	985	5013	5978	54	Humano
Interno	Atgagctcgtagtt-gagggc	Atcaagtccgtctacgggga	323	5255	5558	53.6	Adenovirus
6 (SE) externo	Ctctccca-gctctgttact	Actgtgacctggactgtga	1506	30852	32338	51.8	Humano
6 (SE) interno	Ctctccca-gctctgttact	Accatggccagctt-taattcc	456	30852	31287	52.3	Adenovirus
7 (SE) interno	Cagcacagatccgga-taaaa	Actgtgacctggactgtga	514	31844	32338	48.7	Adenovirus

Simbología Fw: cebador forward; rv: cebador reverse. SE: semienclavado AE: tamaño esperado de la amplificación (en pares de bases). Alin: temperatura de alineamiento predicha (Taq polimerasa)

Tabla 5-7.- Condiciones de amplificación por medio de PCR enclavada para los cebadores para Adenovirus 36. Empleando Taq polimerasa.

Acción	Temperatura	Tiempo
Pre calentamiento de la tapa	105°C	Todo el proceso
Desnaturalización inicial	94°C	1 ciclo de 3 minutos
40 ciclos Desnaturalización	94°C	30 segundos
Alineamiento	De acuerdo al cebador	1 minuto
Extensión	72°C	1.5 minutos
Extensión final	72°C	10 min
Mantenimiento	4°C	Indefinido

Tabla 6-1.- Comparación entre el resultado de las secuencias de los fragmentos amplificadas del genoma del Adenovirus 36 empleando los cebadores descritos en TABLA 6-6 y control positivo. Alineamiento realizado en el programa informático MUSCLE respecto al genoma de referencia del Adenovirus 36 presente en GeneBank (GQ384080.1) y comparando los resultados con el genoma de referencia mediante BLAST. Nótese el porcentaje de identidad para el Adenovirus 36 (99.44%), a la vez que un valor de E tendiente a 0

Alineamiento Global																																											
<p>Human adenovirus 36 from USA, complete genome Sequence ID: GQ384080.1 Length: 35152 Number of Matches: 5</p>																																											
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Max Score</th> <th>Total Score</th> <th>Query Cover</th> <th>E value</th> <th>Per. Ident</th> <th>Accession</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Human adenovirus 36 from USA, complete genome</td> <td>974</td> <td>3325</td> <td>99%</td> <td>0.0</td> <td>99.44%</td> <td>GQ384080.1</td> </tr> <tr> <td>Human adenovirus 47, complete genome</td> <td>941</td> <td>3000</td> <td>98%</td> <td>0.0</td> <td>98.32%</td> <td>JN226757.1</td> </tr> <tr> <td>Human mastadenovirus D strain HuPAN/FP309886/2011/04 (F43H17F3d), complete genome</td> <td>891</td> <td>2993</td> <td>97%</td> <td>0.0</td> <td>96.64%</td> <td>MF418150.1</td> </tr> <tr> <td>Human adenovirus D strain human/DEU/HEIM_00090/1967/NEU/PRH46F3P, complete genome</td> <td>880</td> <td>3004</td> <td>98%</td> <td>0.0</td> <td>96.26%</td> <td>KF268211.1</td> </tr> <tr> <td>Human adenovirus 62 isolate A4625Manchester1993, complete genome</td> <td>869</td> <td>2923</td> <td>97%</td> <td>0.0</td> <td>95.89%</td> <td>JN162671.1</td> </tr> </tbody> </table>		Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession	Human adenovirus 36 from USA, complete genome	974	3325	99%	0.0	99.44%	GQ384080.1	Human adenovirus 47, complete genome	941	3000	98%	0.0	98.32%	JN226757.1	Human mastadenovirus D strain HuPAN/FP309886/2011/04 (F43H17F3d), complete genome	891	2993	97%	0.0	96.64%	MF418150.1	Human adenovirus D strain human/DEU/HEIM_00090/1967/NEU/PRH46F3P, complete genome	880	3004	98%	0.0	96.26%	KF268211.1	Human adenovirus 62 isolate A4625Manchester1993, complete genome	869	2923	97%	0.0	95.89%	JN162671.1
	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession																																					
Human adenovirus 36 from USA, complete genome	974	3325	99%	0.0	99.44%	GQ384080.1																																					
Human adenovirus 47, complete genome	941	3000	98%	0.0	98.32%	JN226757.1																																					
Human mastadenovirus D strain HuPAN/FP309886/2011/04 (F43H17F3d), complete genome	891	2993	97%	0.0	96.64%	MF418150.1																																					
Human adenovirus D strain human/DEU/HEIM_00090/1967/NEU/PRH46F3P, complete genome	880	3004	98%	0.0	96.26%	KF268211.1																																					
Human adenovirus 62 isolate A4625Manchester1993, complete genome	869	2923	97%	0.0	95.89%	JN162671.1																																					
Cebador 1																																											
	<p>Range 1: 6072 to 6532 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Mal</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>773 bits(418)</td> <td>0.0</td> <td>444/461(96%)</td> <td>4/461(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> <pre> Query 19 TGGAT -G -AGCTTSGMGAT -GATC -KATGGYCTGATTTTTGYGACGGTCGGGGCGCTCCT 74 Sbjct 6072 TGGATAGAAGCTTGGCGATGGATCTCATGGTCTGATTTTTGTACGGTCGGCGCGCTCCT 6131 Query 75 TGGCCGCGATGKTARCTGGACATACTGGCGCGCAGCGCACTTCCATTGGGGGAAGACGG 134 Sbjct 6132 TGGCCGCGATGTTAGCTGGACATACTGGCGCGCAGCGCACTTCCATTGGGGGAAGACGG 6191 Query 135 TGGTGGCTCGTCGGGCACGATCCTGACGGCCAGCCGCGTTATGCAGGGTGACCAGGT 194 Sbjct 6192 TGGTGGCTCGTCGGGCACGATCCTGACGGCCAGCCGCGTTATGCAGGGTGACCAGGT 6251 Query 195 CCACGCTGGTGGCCACCTCGCCGGCAG6GGGCTCGTTGGTCCAGCAGAGTCTGCCGCCCT 254 Sbjct 6252 CCACGCTGGTGGCCACCTCGCCGGCAG6GGGCTCGTTGGTCCAGCAGAGTCTGCCGCCCT 6311 Query 255 TGC CGAGCAGAACGGGGGACAGC ATCAAGCAGATGCTCGTCAGGGGGTCCGCATCGA 314 Sbjct 6312 TGC CGAGCAGAACGGGGGACAGC ATCAAGCAGATGCTCGTCAGGGGGTCCGCATCGA 6371 Query 315 TGGTGAAGATGCCCGGACAGAGTTCTTGTCAAATAATCGATTTTTGAGGATGCATCAT 374 Sbjct 6372 TGGTGAAGATGCCCGGACAGAGTTCTTGTCAAATAATCGATTTTTGAGGATGCATCAT 6431 Query 375 CCAAGGCCATCTGCCACTCGCGGGCGGMCAGMGCTCGCTCGTAGGGGTTGAGGGCGGAC 434 Sbjct 6432 CCAAGGCCATCTGCCACTCGCGGGCGGCGAGCGCTCGCTCGTAGGGGTTGAGGGCGGAC 6491 Query 435 CCCARGGCATGGGATGCGTGAGGGCGGAGGCGWACATGCCG 475 Sbjct 6492 CCCARGGCATGGGATGCGTGAGGGCGGAGGCGTACATGCCG 6532 </pre>	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	773 bits(418)	0.0	444/461(96%)	4/461(0%)	Plus/Plus																																
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand																																							
773 bits(418)	0.0	444/461(96%)	4/461(0%)	Plus/Plus																																							

Cebador 6

Range 5: 34057 to 34591 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [⚡ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
974 bits(527)	0.0	532/535(99%)	0/535(0%)	Plus/Plus
Query 1351	AGAGTGAGGGAGTATCTTAGAGCTCCATAATTAGCCCCAAAAACTGCAAGCTGGAATAA			1410
Sbjct 34057	AGCGTGAGGGAGTATCTTAGAGCTCCATAATTAGCCCCAAAAACTGCAATGCGAATAA			34116
Query 1411	GCTCTCTTTGTGCACCGGTGATTCCTTCCAAGAGGTGAGTGATAAAGCGAGGTAGGTGC			1470
Sbjct 34117	GCTCTCTTTGTGCACCGGTGATTCCTTCCAAGAGGTGAGTGATAAAGCGAGGTAGGTGC			34176
Query 1471	TCTTTAATCATAGCAGTAATGGAAAAGTCTCTAAATAAGTCACTAGGGCCCAGGGACC			1530
Sbjct 34177	TCTTTAATCATAGCAGTAATGGAAAAGTCTCTAAATAAGTCACTAGGGCCCAGGGACC			34236
Query 1531	ACAATGTGGTAGCTGACACCGCGCCGCTCAAGCATGGTTAGTAGAGATGAGAGTCTGAAA			1590
Sbjct 34237	ACAATGTGGTAGCTGACACCGCGCCGCTCAAGCATGGTTAGTAGAGATGAGAGTCTGAAA			34296
Query 1591	AACAGAAAGCATGCACAAACCAGGGTGGCTATTCTCACTGAAGGAAAAATCACTCTCTC			1650
Sbjct 34297	AACAGAAAGCATGCACAAACCAGGGTGGCTATTCTCACTGAAGGAAAAATCACTCTCTC			34356
Query 1651	CAGCAGCAGGGTCCCCTGGGTGGCCCTCGCGACATACAAAAATCGTCCGTGGTT			1710
Sbjct 34357	CAGCAGCAGGGTCCCCTGGGTGGCCCTCGCGACATACAAAAATCGTCCGTGGTT			34416
Query 1711	AAAGAGCAGCACAGAGAGATCATGTCTTCTCCCGCAAATATCACATCGGACTGGGTAG			1770
Sbjct 34417	AAAGAGCAGCACAGAGAGATCATGTCTTCTCCCGCAAATATCACATCGGACTGGGTAG			34476
Query 1771	TATGCCCTGGCATGGTAGTCATTCAAGGCCATAAATCTGCCCTGATATCCAGTAGGAAC			1830
Sbjct 34477	TATGCCCTGGCATGGTAGTCATTCAAGGCCATAAATCTGCCCTGATATCCAGTAGGAAC			34536
Query 1831	CAGCAGCTCACTCTGAKGTGAAGCAATATCACCCATCGGGAGGAATGTGGAAA			1885
Sbjct 34537	CAGCAGCTCACTCTGAGGTGAAGCAATATCACCCATCGGGAGGAATGTGGAAA			34591