



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



***Expresión de adiponectina, leptina y resistina en
tejido adiposo y su relación con la resistencia a la
insulina en mujeres con y sin Ad-36***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Q.B.P. Brianda Noriega Bautista

DIRECTORA DE TESIS: **Dra. Isela Parra Rojas**

CODIRECTOR DE TESIS: **Dr. José Guadalupe Soñanez Organis**



Chilpancingo de los Bravo, Gro., enero de 2020

**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



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

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de octubre de dos mil diecinueve se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Expresión de adiponectina, leptina y resistina en tejido adiposo y su relación con la resistencia a la insulina en mujeres con y sin Ad-36", presentada por la alumna Brianda Noriega Bautista, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dra. Icela Parra Rojas
Dirección de tesis

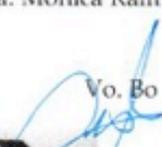

Dra. Natividad Castro Alarcón

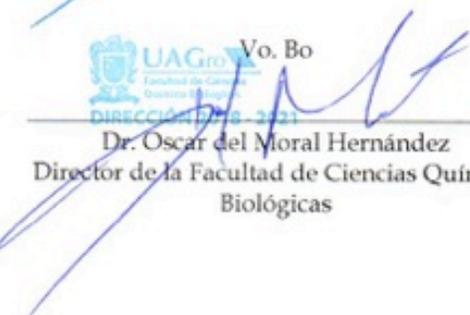

Dr. Lorenzo Salgado Goytia


Dra. Mónica Ramírez Ruano


Dr. José Guadalupe Soñanez Organís




Daniel Hernández Sotelo
Director de la Maestría en Ciencias Biomédicas


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

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo de los Bravo, Guerrero; en colaboración con el Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur de Navojoa, Sonora.

Bajo la dirección de la
Dra. Isela Parra Rojas

La codirección del
Dr. José Guadalupe Soñanez Organis

La asesoría de
Dra. Mónica Ramírez Ruano
Dr. Lorenzo Salgado Goytia
Dra. Natividad Castro Alarcón

Así mismo, durante el periodo en que la C. Brianda Noriega Bautista cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, recibió beca CONACyT con número de becario: 857692.



Índice

	Pág.
Contenido	
Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción	3
Materiales y métodos.....	7
Resultados.....	11
Discusión	16
Conclusión	20
Perspectivas	20
Referencias.....	21

Resumen

Antecedentes: La resistencia a la insulina, es una alteración metabólica que se presenta principalmente en la obesidad, debido a la deficiente señalización de la insulina. Se ha reportado que *Adenovirus 36 (Ad-36)* incrementa la adipogénesis, pero regula positivamente la señalización distal de la insulina en el tejido adiposo, lo que origina una disminución de la resistencia a la insulina. Sin embargo, se desconoce la relación de las adipocinas con la resistencia a la insulina en presencia del *Adenovirus 36*. **Objetivo:** Analizar la relación entre la resistencia a la insulina y la expresión génica y proteica de adiponectina, leptina y resistina en el tejido adiposo de mujeres con y sin el DNA de *Ad-36*. **Materiales y métodos:** Se analizaron 52 muestras de suero y tejido adiposo de mujeres que fueron sometidas a lipectomía o liposucción. La resistencia a la insulina se determinó mediante el índice HOMA. La expresión génica y proteica de adiponectina, leptina y resistina en el tejido adiposo se determinó mediante RT-qPCR y western blot, respectivamente. **Resultados:** Las mujeres resistentes a la insulina mostraron un incremento en el IMC ($p \leq 0.02$), porcentaje de masa grasa ($p \leq 0.03$), la circunferencia de cintura ($p \leq 0.05$), los niveles de glucosa ($p \leq 0.02$) e insulina ($p < 0.001$), y el índice HOMA ($p \leq 0.001$). Las mujeres positivas para el DNA de *Ad-36* mostraron una disminución en el porcentaje de masa grasa ($p \leq 0.04$). No se observaron cambios en los niveles de mRNA de las adipocinas. Las mujeres con el DNA de *Ad-36* en el tejido adiposo mostraron una disminución de 2.06 veces ($p \leq 0.03$) y 3.08 veces ($p \leq 0.01$) en los niveles proteicos de leptina y resistina, respectivamente, comparado con mujeres sin el DNA viral. **Conclusiones:** Las mujeres portadoras del DNA de *Ad-36* en el tejido adiposo, presentaron menor expresión proteica de leptina y resistina, lo que sugiere una relación de las adipocinas con la presencia del virus, pero no con la resistencia a la insulina. **Palabras clave:** Tejido adiposo, adipocinas, resistencia a la insulina, *Ad-36*.

Abstract

Background: Insulin resistance, is a metabolic disorder that occurs primarily in obesity, due to deficient insulin signaling. *Adenovirus 36 (Ad-36)* has been reported to increase adipogenesis, but positively regulates the distal signaling of insulin in adipose tissue, which improves insulin resistance. However, the relationship between adipokines and insulin resistance in the presence of *Adenovirus 36* is unknown. **Objective:** To analyze the relationship between insulin resistance and the gene and protein expression of adiponectin, leptin and resistin in the adipose tissue of women with and without viral DNA. **Materials and methods:** We analyzed 52 serum and adipose tissue samples from women who underwent lipectomy or liposuction. Insulin resistance was determined by the HOMA index. The gene and protein expression of adiponectin, leptin and resistin in the adipose tissue was determined by RT-qPCR and western blot. **Results:** Women resistant to insulin showed an increase in BMI ($p \leq 0.02$), fat mass percentage ($p \leq 0.03$), waist circumference ($p \leq 0.05$), glucose concentration ($p \leq 0.02$) and insulin ($p \leq 0.001$), and the HOMA index ($p \leq 0.001$). Women viral DNA (+) showed a decrease in the percentage of fat mass ($p \leq 0.04$). No changes in adipokine mRNA levels were observed. Women with Ad-36 DNA in adipose tissue showed a decrease of 2.06-fold ($p \leq 0.03$) and 3.08-fold ($p \leq 0.01$) in the protein levels of leptin and resistin, respectively, compared to women viral DNA (-). **Conclusions:** The women carrying *Ad-36* DNA in adipose tissue had a lower protein expression of leptin and resistin, which suggests a relationship of adipokines with the presence of the virus but not with insulin resistance.

Key words: adipose tissue, adipokines, insulin resistance, *Ad-36*.

Introducción

La resistencia a la insulina se caracteriza por una respuesta deficiente de los tejidos a la acción de la insulina (Czech, 2017). Evento que está relacionada con la inhibición de la vía de señalización de la insulina, la cual se caracteriza por una señalización proximal que, involucra la activación del receptor de insulina y del sustrato receptor de insulina (SRI). La señalización distal comprende la activación del fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), la proteína cinasa B (Akt) (Gutiérrez-Rodelo *et al.*, 2017). En donde la señalización proximal, es la más afectada en estados de resistencia a la insulina (Pessin y Saltiel, 2000).

El desarrollo de la obesidad y la inflamación crónica de bajo grado son promovidos por la expansión del tejido adiposo y se encuentran fuertemente asociados con el desarrollo de la resistencia a la insulina (Gustafson *et al.*, 2015; Caputo *et al.*, 2017). Entre los mecanismos que originan el desarrollo de la resistencia a la insulina se encuentra la disfunción mitocondrial, el estrés del retículo endoplásmico, la lipotoxicidad, la inflamación y la liberación anormal de adipocinas producidas por el tejido adiposo (Boucher *et al.*, 2014; Petersen y Shulman, 2018). Las adipocinas señalizan sobre órganos de importancia metabólica y con ello modulan el metabolismo de los lípidos y la glucosa, la inflamación y la sensibilidad a la insulina. La adiponectina, la leptina y la resistina son las principales adipocinas asociados a estos eventos (Chen *et al.*, 2015).

La adiponectina es principalmente sintetizada por el tejido adiposo blanco. Esta adipocina es un modulador clave de la sensibilidad a la insulina que, al interaccionar con sus receptores, el receptor de adiponectina 1 (AdipoR1) y el receptor de adiponectina 2 (AdipoR2) promueve la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), el receptor activado por el proliferador de peroxisomas alfa (PPAR- α) y el sustrato del receptor de insulina (SRI), y con esto el incremento en la oxidación de los ácidos grasos, la tasa de captación de la glucosa y la disminución de la glucogenólisis por el hígado (Cheng *et al.*, 2014).

La disminución de los niveles de la adiponectina en sangre periférica y de su mRNA en el tejido adiposo se asocia con trastornos relacionados con la obesidad (Kern *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2012) como la inflamación (Hajri *et al.*,

2010), la resistencia a la insulina (Mojiminiyi *et al.*, 2007; Sirbu *et al.*, 2018) y la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (Horakova *et al.*, 2018; Iwata *et al.*, 2018). En contraste, la disminución del peso corporal se ha relacionado con un incremento en los niveles de adiponectina, evento que es considerado como un factor protector para el desarrollo de resistencia a la insulina (Horakova *et al.*, 2018).

La leptina es sintetizada, principalmente, por el tejido adiposo blanco. La función principal de esta adipocina está relacionada con la inducción de la saciedad y la utilización de la energía (Harris *et al.*, 2014; D'souza *et al.*, 2017). Por otra parte, el receptor de leptina (LepRb), se expresa en el tejido adiposo blanco (Huan *et al.*, 2003; Ramsay *et al.*, 2004), en el que la leptina se ha asociado con la inducción de la inflamación y la lipólisis, así como con la inhibición de la lipogénesis, la adipogénesis, la captación de glucosa y la señalización de la insulina; eventos íntimamente relacionados con la resistencia a la insulina (Harris *et al.*, 2014).

En personas con obesidad y DMT2 los niveles séricos de leptina (Hansen *et al.*, 2010; Leon-Cabrera *et al.*, 2013), así como de su mRNA en el tejido adiposo se encuentran incrementados (Ranganathan *et al.*, 1998; Koudhi *et al.*, 2010). Y este incremento se correlaciona de manera positiva con los niveles de glucosa en ayuno (Samaras *et al.*, 2012) y con la resistencia a la insulina (Osegbe *et al.*, 2016; Moonishaa *et al.*, 2017).

En los humanos, la resistina es principalmente sintetizada por los macrófagos y en menor proporción por los adipocitos (Galic *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2013). Se sugiere que esta adipocina desempeña una importante función en el desarrollo de la resistencia a la insulina. El mecanismo mediante el cual actúa resistina, involucra el incremento de la lipólisis y la inhibición de la diferenciación de los adipocitos (Nogueiras *et al.*, 2010). Además, resistina promueve la activación del factor de la transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) y la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), que culmina en la activación de cinasas de estrés y la regulación positiva del fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN). Estos eventos interfieren con la activación del receptor de

insulina y/o el SRI (Park y Ahima *et al.*, 2013; Codoñer-Franch y Alonso-Iglesias, 2015).

Se ha reportado que tanto los niveles séricos de resistina como los de su mRNA, en el tejido adiposo, se encuentran incrementados en sujetos con obesidad y/o DMT2 en comparación con sujetos control (Sasashiv *et al.*, 2012; Zaidi y Shirwany, 2015; Azab *et al.*, 2016). Este incremento se correlaciona positivamente con la resistencia a la insulina (Heilbromm *et al.*, 2004; Sadashiv *et al.*, 2012; Azab *et al.*, 2016).

El incremento en la prevalencia de resistencia a la insulina a nivel mundial es un problema de gran importancia médica, debido a que es un factor común para el desarrollo de diferentes patologías. El tratamiento para la resistencia a la insulina comprende el uso de agentes antidiabéticos; la mayoría de los cuales son sensibilizadores, miméticos o secretagogos de la insulina que requieren de la señalización proximal de la insulina, señalización que bajo esta condición generalmente se encuentra afectada (Boucher *et al.*, 2014). Por lo tanto, se requiere de nuevos agentes antidiabéticos que mejoren la sensibilidad a la insulina y el control glucémico independientemente de la señalización proximal de la insulina y del exceso de peso presente en la mayoría de estos pacientes (Blaslov *et al.*, 2018).

Recientemente, *Adenovirus 36 (Ad-36)* ha sido considerado como un novedoso candidato para mejorar el control glucémico (Aldhoon-Hainerová *et al.*, 2014; Na *et al.*, 2016) y la sensibilidad a la insulina (Almegrem *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2017), aun cuando se ha reportado que promueve la hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos en diferentes modelos animales. En estudios realizados en niños y adultos los resultados muestran una fuerte asociación entre anticuerpos positivos para *Ad-36* y la obesidad (Ponteiro y Gnessi 2015).

Se ha propuesto que los efectos benéficos de *Ad-36* sobre el control glucémico y la sensibilidad a la insulina están asociados con la regulación positiva de la señalización distal de la insulina. El mecanismo depende de la activación de la proteína G pequeña Ras mediante la proteína codificada por el gen E4ORF1 (gen E4, marco de lectura abierto 1) de *Ad-36*, una vez que Ras es activado este

induce la activación de PI3K-Akt (Wang *et al.*, 2008). En consecuencia, se promueve la translocación de los transportadores de glucosa (GLUT) a la membrana celular facilitando así la internalización de la glucosa (Kusminski *et al.*, 2015). Lo que sugiere una menor necesidad de insulina endógena, efecto denominada “acción ahorradora de insulina” (Dhurandhar 2012).

El efecto de *Ad-36* no se limita a la remodelación de la morfología y la función metabólica del tejido adiposo, también se ha descrito que *Ad-36* modula la función endocrina de este tejido. En explantes de adipocitos, provenientes de personas con DMT2 y en tejido adiposo de ratas, se observó que *Ad-36* induce el incremento en la expresión del mRNA y proteína de adiponectina y la disminución en los niveles de la proteína leptina (Rogers *et al.*, 2008; Krishnapuram *et al.*, 2011). En preadipocitos murinos de la línea celular 3T3-L1 tratada con *Ad-36*, así como con *Ad-9* y *Ad-37*, como controles negativos se observó que las células infectadas con *Ad-36* presentaban una reducción del 52 al 58% en la expresión del mRNA de leptina en comparación con los controles negativos (Vangipuram *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha reportado que, tanto en niños como en adultos con obesidad y positivos para *Ad-36*, los niveles séricos de leptina se encuentran disminuidos comparado con niños y adultos con obesidad, pero negativos para el virus (Karamese *et al.*, 2015; Sapunar *et al.*, 2017).

Dado que el tejido adiposo es un órgano central para la regulación de la sensibilidad a la insulina de manera local y periférica, mediante la liberación de distintas adipocinas como adiponectina, leptina y resistina; además de que en algunos estudios se ha detectado el DNA de *Ad-36* en tejido adiposo; se planteó la hipótesis de que *Ad-36* podría disminuir la resistencia a la insulina al modular la expresión de adiponectina, leptina y resistina en el tejido adiposo. Por lo cual, el objetivo del presente estudio fue analizar la relación entre la resistencia a la insulina y el perfil de expresión génico y proteico de adiponectina, leptina y resistina en el tejido adiposo de mujeres con y sin el DNA del *Ad-36*.

Materiales y métodos

Población

Se analizaron 52 muestras de suero y tejido adiposo obtenidas de mujeres que se presentaron en el Hospital Hispano de Especialidades de la ciudad de Guadalajara, Jalisco para realizarse algún tipo de cirugía estética reductiva (lipectomía o liposucción). Previo a la cirugía, se aplicó una encuesta a todas las participantes para obtener los antecedentes clínicos, hábitos alimenticios, estilo de vida e información sociodemográfica. Posteriormente, se tomó una muestra sanguínea por venopunción para realizar las mediciones de los parámetros bioquímicos. A cada biopsia se le realizó un corte de aproximadamente 1 cm² utilizando un bisturí estéril, el corte se depositó en un tubo de 1.5 mL con solución salina y el resto de la biopsia se almacenó en un tubo cónico de 15 mL con solución salina a -80 °C hasta su uso. Las participantes presentaban un rango de edad de 25 a 39 años, las cuales fueron divididas en dos grupos: 22 mujeres sensibles a la insulina y 30 con resistencia a la hormona. El consentimiento informado fue obtenido de todas las mujeres antes de la inclusión en el estudio de acuerdo a las normas éticas de la Declaración de Helsinki de 2008.

Mediciones clínicas y antropométricas

El peso corporal fue determinado con ropa ligera y sin zapatos, utilizando un monitor de composición corporal (Tanita BC-553, Arlington, VA). La altura se midió utilizando un estadiómetro (Seca, Hamburg, Germany). De estas mediciones se calculó el índice de masa corporal (IMC) ($IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$, kg/m²). La circunferencia corporal se midió utilizando una cinta métrica (Seca 201, Hamburg, Germany). La presión sanguínea se determinó utilizando un esfigmomanómetro aneroide (Riester CE 0124, Jungingen, Germany).

Mediciones de laboratorio

Los parámetros bioquímicos: colesterol total, el colesterol LDL, el colesterol HDL, triglicéridos, los niveles de glucosa en ayuno, fueron analizados con un equipo semiautomatizado (COBAS MIRA). Los niveles de insulina fueron medidos utilizando un ensayo comercial inmunoabsorbente ligado a enzima (GenWay INS-ELISIA kit). La resistencia a la insulina se determinó mediante la evaluación del

modelo homeostático (HOMA), mediante la fórmula: insulina en suero en ayunas ($\mu\text{U/mL}$) x glucosa en plasma en ayunas (mg/dL)/405. La resistencia a la insulina fue definida como un HOMA-IR en o por encima del percentil 75th, el cual fue ≥ 3.2 .

Identificación del DNA de *Ad-36* en muestras de tejido adiposo

El DNA total fue extraído de todas las muestras de tejido adiposo, de acuerdo con el método modificado de Miller *at al.*, 1988. La identificación del DNA viral fue realizado mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los siguientes iniciadores: 5'AGTCAGTGGACTGACAAAGAACG3' (sentido) y 5'GTCTGCATATATCTCTTCTTCACC3' (antisentido). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 12 μL , adicionando buffer 1X a 0.125 mM de MgCl_2 , 0.075 mM de DNTP's, 0.2 mM de cada iniciador, 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies) y 20 ng de DNA genómico. La PCR fue realizada con un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido del alineamiento de los iniciadores a 69 °C y la extensión a 72 °C. En cada reacción se utilizó un control positivo del DNA de *Ad-36*, el cual fue proporcionado por el Dr. Ramón A. González, del centro de investigación en Dinámica Celular, del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. El producto de amplificación fue de 171 pb para las muestras positivas, el cual se visualizó mediante PAGE al 6% y una tinción con nitrato de plata al 2%.

Expresión del mRNA de adiponectina, leptina y resistina

El RNA total fue extraído de el tejido adiposo con el reactivo TRIzol (Reagent[®] Invitrogen[™] Life Technologies, Carlsbad, EUA) (Chomczynski y Sacchi, 1987). La concentración y pureza se determinó mediante un espectrofotómetro (Nanodrop 2000C, Thermo Scientific Massachusetts, EUA). Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA) se partió de 1 μg de RNA total. Para la reacción de transcripción reversa, se usaron 0.5 μg del Oligo dT 15 (Promega Corporation, Wisconsin, EUA) y se llevó a un volumen final de 15 μL con agua tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC) (Sigma-Aldrich, Misuri,

EUA). La mezcla se incubó a 70°C por 5 min en un termociclador SelectCycler (Applied Biosystems, Foster City, EUA), seguido de una incubación en hielo por 1 min. Se adicionaron 5 µL del buffer de reacción M-MLV 5X (Promega Corporation), 1.25 µL de una solución 10 mM de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) (Promega Corporation), 0.25 µL (10 U) de inhibidor de RNAsas (Promega Corporation), 1 µL (200 U) de la enzima transcriptasa (RT) reversa M-MLV (Promega Corporation). La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 25 µL con agua tratada con DEPC y se incubó a 42°C por 1 h. Se adicionaron 0.5 µL (1.5 U/µL) de ribonucleasa H a la mezcla y se incubó a 37°C por 20 min. Por último, la muestra se almacenó a -80°C hasta su uso.

La expresión del mRNA se cuantificó mediante PCR cuantitativo (qPCR) utilizando un sistema de tiempo real CFX96 Touch™ (BioRad Laboratories, Hercules, EUA), con sondas TaqMan para los genes *adiponectina* (Hs00605917_M1), *leptina* (Hs00174877_M1) y *resistina* (Hs00220767_M1), todas las sondas se obtuvieron de Applied Biosystems (Foster City, EUA). Las reacciones de qPCR se realizaron por separado para cada gen y se normalizaron con la expresión del mRNA de *β-actina* (Hs99999903_M1). Los ensayos de PCR se realizaron por duplicado. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL que contiene 0.2 µL de sonda (Applied Biosystems), 5 µL de Master Mix (Applied Biosystems) y 1 µL de cDNA (equivalente a 100 ng de RNA total). Después de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 10 min, se realizaron amplificaciones durante 40 ciclos a 94 °C durante 15 s y 63 °C durante 1 min. Los cambios en la expresión génica relativa se determinaron utilizando el método $2^{-\Delta CT}$.

Expresión proteica de adiponectina, leptina y resistina

Las proteínas citoplasmáticas fueron obtenidas usando el kit NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce, Rockford, Illinois, EUA) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración total de proteínas se determinó por

el método de Bradford (BioRad Laboratories) y el uso de una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA).

La cuantificación proteica de cada una de las adipocinas se realizó mediante Western Blot. 30 μg de proteínas se mezclaron con el buffer de carga Lamelil β -mercaptoetanol, en condiciones desnaturalizantes (Shaking Drybath, Thermo Cientific Massachusetts, EUA). Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE utilizando geles TGX-Stain-Free al 10% (BioRad Laboratories) y transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (BioRad Laboratories), utilizando el Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron bloqueadas con 5% de Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad Laboratories) en TBS-T (50 mM Tris-Cl, pH 7.6; 150 mM NaCl; 0.1% Tween 20) durante 1 h 30 min. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios dirigidos contra: adiponectina (PA1-054, Invitrogen, California, EUA), leptina (ab3583, Abcam, Massachusetts, EUA) y resistina (PA1-1049, Invitrogen) diluidos 1:1,000 en TBS-T toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas e incubadas con anticuerpo secundario conjugado a HRP (anti-conejo; ab6721, Abcam) diluido 1:20,000 en TBS-T con 1% de caseína durante 1 h a temperatura ambiente. Las proteínas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia con el kit Clarity™ Western ECL Substrate, siguiendo las instrucciones del fabricante (BioRad Laboratories) y se visualizaron utilizando el ChemiDoc™ Touch (Bio-Rad laboratories). Finalmente, los datos se analizaron de acuerdo con la guía de normalización de Western Blot con el software Image Lab (Bio-Rad), y el rango lineal de la señal se evaluó siguiendo el método previamente reportado por Gürtler *et al.*, 2013.

Resultados

Para analizar la relación entre la resistencia a la insulina y la positividad para el DNA de *Ad-36*, se analizaron 52 muestras de suero y tejido adiposo de mujeres que se sometieron a cirugía reductiva. De acuerdo con el índice HOMA, el 42% de las mujeres presentaron resistencia a la insulina y el 58% fueron sensibles a la hormona (Tabla 1).

Las mujeres con resistencia a la insulina mostraron un incremento significativo en el IMC, el porcentaje de masa grasa y la circunferencia de cintura. En cuanto a los parámetros bioquímicos, las mujeres con resistencia a la insulina presentaron un incremento significativo en los niveles de glucosa, insulina e índice HOMA, así como una tendencia al incremento en los niveles de colesterol total y colesterol LDL (Tabla 1).

Tabla 1. Características clínicas y metabólicas de la población de acuerdo con la resistencia a la insulina

Variable	Total (n=52)	Sin RI (n=30)	Con RI (n=22)	p
Edad (años) ^a	39.17 ± 11.06	39.2 ± 11.38	39.14 ± 10.89	0.98
Talla (cm) ^a	158.92 ± 0.05	159.77 ± 0.05	157.77 ± 0.05	0.18
Peso (kg) ^a	67.37 ± 8.75	65.85 ± 9.70	69.45 ± 6.93	0.14
IMC (kg/m ²) ^a	26.68 ± 3.61	25.74 ± 3.48	27.97 ± 3.46	0.02
Porcentaje de masa grasa ^a	34.36 ± 6.95	32.57 ± 7.78	36.57 ± 4.88	0.03
Circunferencia de cintura (cm) ^a	90.46 ± 10.76	88 ± 9.78	93.82 ± 11.33	≤0.05
Circunferencia de cadera (cm) ^b	102 (97.5 - 107)	101 (95 - 105)	102.5 (102 - 107.5)	0.22
ICC	0.87 ± 0.07	0.86 ± 0.06	0.89 ± 0.07	0.15
PAS (mmHg) ^a	116.29 ± 16.77	114.4 ± 18.78	118.86 ± 13.55	0.34
PAD (mmHg) ^a	76.94 ± 13.99	75.1 ± 13.90	79.45 ± 14.02	0.27
Glucosa (mg/dL) ^b	86 (81.15 - 94.5)	83.5(79 - 92)	90.85 (84 - 99)	0.02
Triglicéridos (mg/dL) ^b	76.5 (61 - 100)	74.5 (56 - 92)	78.5 (67 - 102)	0.18
Colesterol total (mg/dL) ^a	156.74 ± 46.37	149.72 ± 44.37	166.30 ± 48.33	0.20
Colesterol LDL (mg/dL) ^a	98.14 ± 32.49	89.73 ± 29.43	113.9 ± 33.93	0.09
Colesterol HDL (mg/dL) ^b	40 (37 - 46)	39.5 (37 - 46)	40 (37 - 44)	0.85
Insulina (μU/mL) ^b	11.8 (7.55 - 20.55)	7.8 (6.46 - 11.1)	22.2 (17.1 - 35.4)	≤0.001
Índice HOMA ^b	2.44 (1.51 - 4.65)	1.61 (1.3 - 2.34)	5.18 (3.97 - 7.4)	≤0.001

Los datos indican: mediana (percentil 25 y 75), o media ± desviación estándar. IMC: índice de masa corporal, ICC: índice cintura cadera, PAS: presión arterial sistólica, PAD, presión arterial diastólica, LDL: lipoproteína de baja densidad, HDL: lipoproteína de alta densidad. ^aPrueba t de Student, ^bMann Witney.

De acuerdo con la presencia del DNA de *Ad-36* en el tejido adiposo las mujeres se clasificaron en dos grupos, un grupo de mujeres positivas que incluyó a 13 pacientes (25%) y el otro grupo con 39 mujeres negativas (75%). El grupo de mujeres positivas mostró un menor porcentaje de masa grasa (30.87 ± 7.82 vs. 35.39 ± 6.34 ; $p=0.04$) con respecto a las mujeres sin el DNA de *Ad-36*. Por otra

parte, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros bioquímicos entre los grupos, sin embargo, las mujeres con el DNA de *Ad-36* mostraron una tendencia a la disminución en los niveles de colesterol total (144.36 vs. 160.86 mg/dL; $p \geq 0.27$) y colesterol LDL (92.13 vs. 101.35 mg/dL; $p \geq 0.53$) (Tabla 2).

Tabla 2. Características clínicas y metabólicas de la población de acuerdo con la positividad para el DNA de *Ad-36* en el tejido adiposo

Variable	Total (n=52)	<i>Ad-36</i> (-) (n=39)	<i>Ad-36</i> (+) (n=13)	<i>p</i>
Edad (años) ^a	39.17 ± 11.06	39.36 ± 10.83	38.62 ± 12.18	0.83
Talla (cm) ^a	1.59 ± 0.05	159.28 ± 0.06	157.84 ± 0.04	0.40
Peso (kg) ^a	67.37 ± 8.75	67.73 ± 8.25	66.30 ± 10.38	0.62
IMC (kg/m ²) ^a	26.68 ± 3.61	26.68 ± 3.27	26.68 ± 4.63	0.99
Porcentaje de masa grasa ^a	43.26 ± 6.95	35.39 ± 6.34	30.87 ± 7.82	0.04
Circunferencia de cintura (cm) ^a	90.46 ± 10.76	90.68 ± 9.50	89.81 ± 14.34	0.80
Circunferencia de cadera (cm) ^b	102 (97.5 - 107)	103 (100 - 107)	97 (94 - 103)	0.16
ICC ^a	0.87 ± 0.07	0.87 ± 0.06	0.87 ± 0.07	0.74
PAS (mmHg) ^a	116.29 ± 16.77	115.74 ± 16.69	117.92 ± 17.57	0.69
PAD (mmHg) ^a	76.94 ± 13.99	76.10 ± 14.45	79.46 ± 12.70	0.46
Glucosa (mg/dL) ^b	86 (81.15 - 94.5)	86 (81 - 95)	86 (84 - 90.7)	0.99
Triglicéridos (mg/dL) ^b	76.5 (60.5 - 100)	75 (60 - 100)	77 (71 - 81.3)	0.70
Colesterol total (mg/dL) ^a	156.74 ± 46.37	160.86 ± 43.85	144.36 ± 53.18	0.27
Colesterol LDL (mg/dL) ^a	98.14 ± 32.50	101.35 ± 32.50	92.13 ± 33.82	0.53
Colesterol HDL (mg/dL) ^b	40 (37 - 46)	39 (37 - 43)	40 (36.5 - 52.5)	0.75
Insulina (μU/mL) ^b	11.8 (7.55 - 20.55)	11.6 (7.5 - 21.8)	14.1 (8 - 17.5)	0.70
Índice HOMA ^b	2.44 (1.51 - 4.65)	2.35 (1.5 - 4.69)	2.99 (1.82 - 4.2)	0.76

Los datos indican: mediana (percentil 25 y 75), o media ± desviación estándar. IMC: índice de masa corporal, ICC: índice cintura cadera, PAS: presión arterial sistólica, PAD, presión arterial diastólica, LDL: lipoproteína de baja densidad, HDL: lipoproteína de alta densidad. ^aPrueba t de Student, ^bMann Whitney.

Para analizar la relación entre la expresión de las adipocinas con la resistencia a la insulina en función de la positividad para el DNA de *Ad-36*, se determinó el nivel de expresión del mRNA de la adiponectina ($p \geq 0.22$; Figura 1A), leptina ($p \geq 0.80$; Figura 1C) y resistina ($p \geq 0.61$; Figura 1E) en las muestras de tejido adiposo, en donde no se observaron cambios estadísticamente significativos en función de la resistencia a la insulina. Al evaluar la expresión de acuerdo con la positividad para el DNA de *Ad-36*, se observó una tendencia al incremento en el mRNA de adiponectina ($p \geq 0.58$; Figura 1B), así como una tendencia a la disminución del mRNA de leptina ($p \geq 0.26$; Figura 1D) y de resistina ($p \geq 0.24$; Figura 1F) en las muestras de mujeres con el DNA viral.

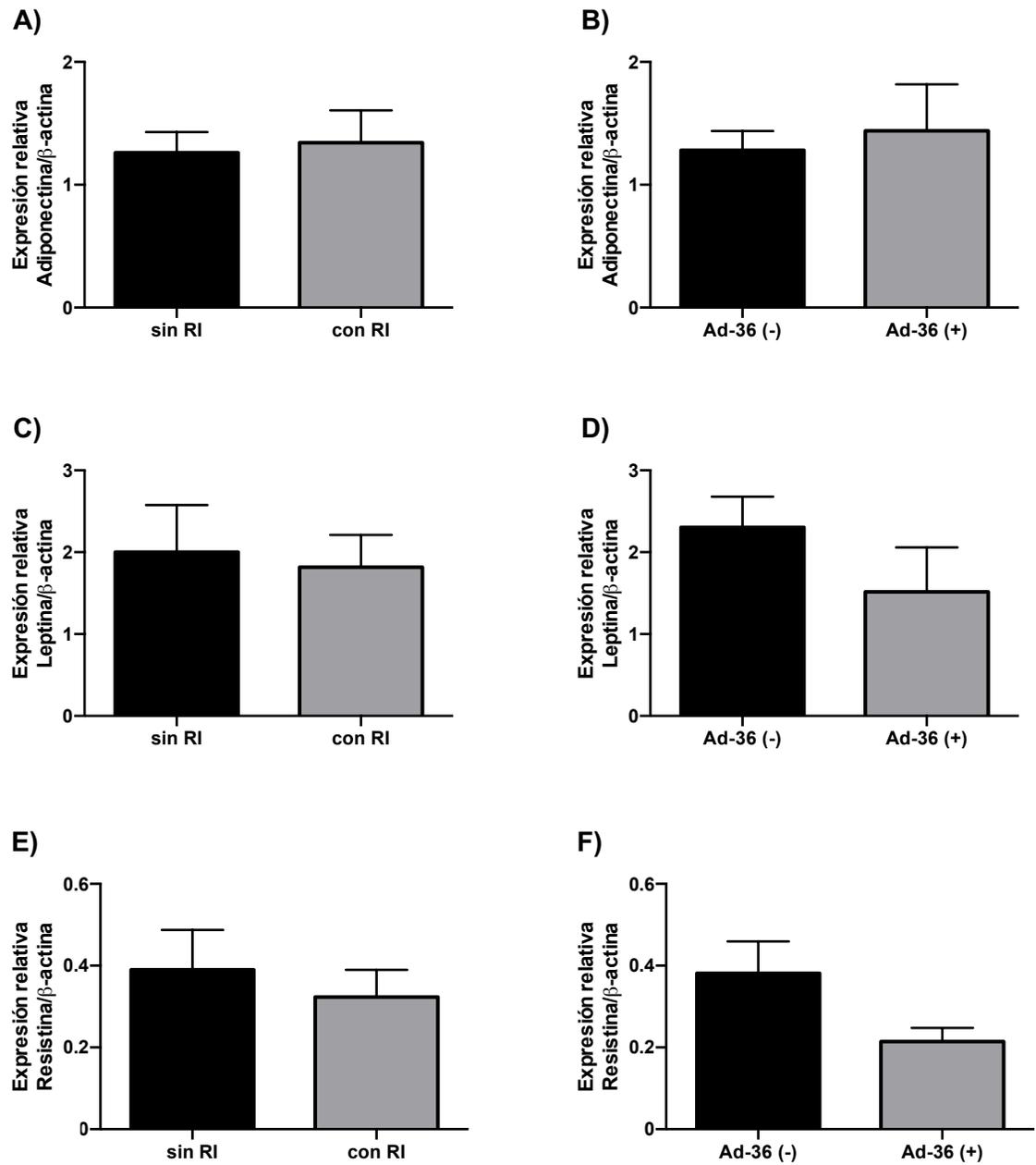


Figura 1. Expresión génica de adiponectina, leptina y resistina en tejido adiposo. La expresión relativa de adiponectina, leptina y resistina en función de la presencia de resistencia a la insulina (RI) (A, C y E) y en función de la positividad para *Ad-36* (B, D y F) se determinó mediante RT-qPCR y fue normalizada a β -actina. Los datos de expresión fueron obtenidos por el método $2^{-\Delta C}$. Los datos representan media \pm error estándar. La significancia estadística se determinó con la prueba t-Student y un valor de $p \leq 0.05$ (*).

A su vez, se determinó el nivel de expresión proteica de cada una de las adipocinas en las muestras de tejido adiposo, para evaluar la relación entre los niveles de proteína con la resistencia a la insulina y la positividad para el DNA de *Ad-36*. La expresión proteica de la adiponectina ($p \geq 0.22$; Figura 2A) leptina ($p \geq 0.79$; Figura 2C) y resistina ($p \geq 0.60$; Figura 2E) presentaron una tendencia a la disminución en las muestras de tejido adiposo de mujeres con resistencia a la insulina. En función de la positividad para el DNA de *Ad-36*, no se observaron cambios significativos en los niveles de proteína de la adiponectina ($p \geq 0.91$; Figura 2B), pero si una disminución de 2.06 veces en los niveles de leptina ($p \leq 0.03$; Figura 2D) y de 3.08 veces en los niveles de resistina ($p \leq 0.01$; Figura 2F) en las muestras de tejido adiposo con el DNA de *Ad-36* con respecto a las muestras de mujeres sin el DNA viral.

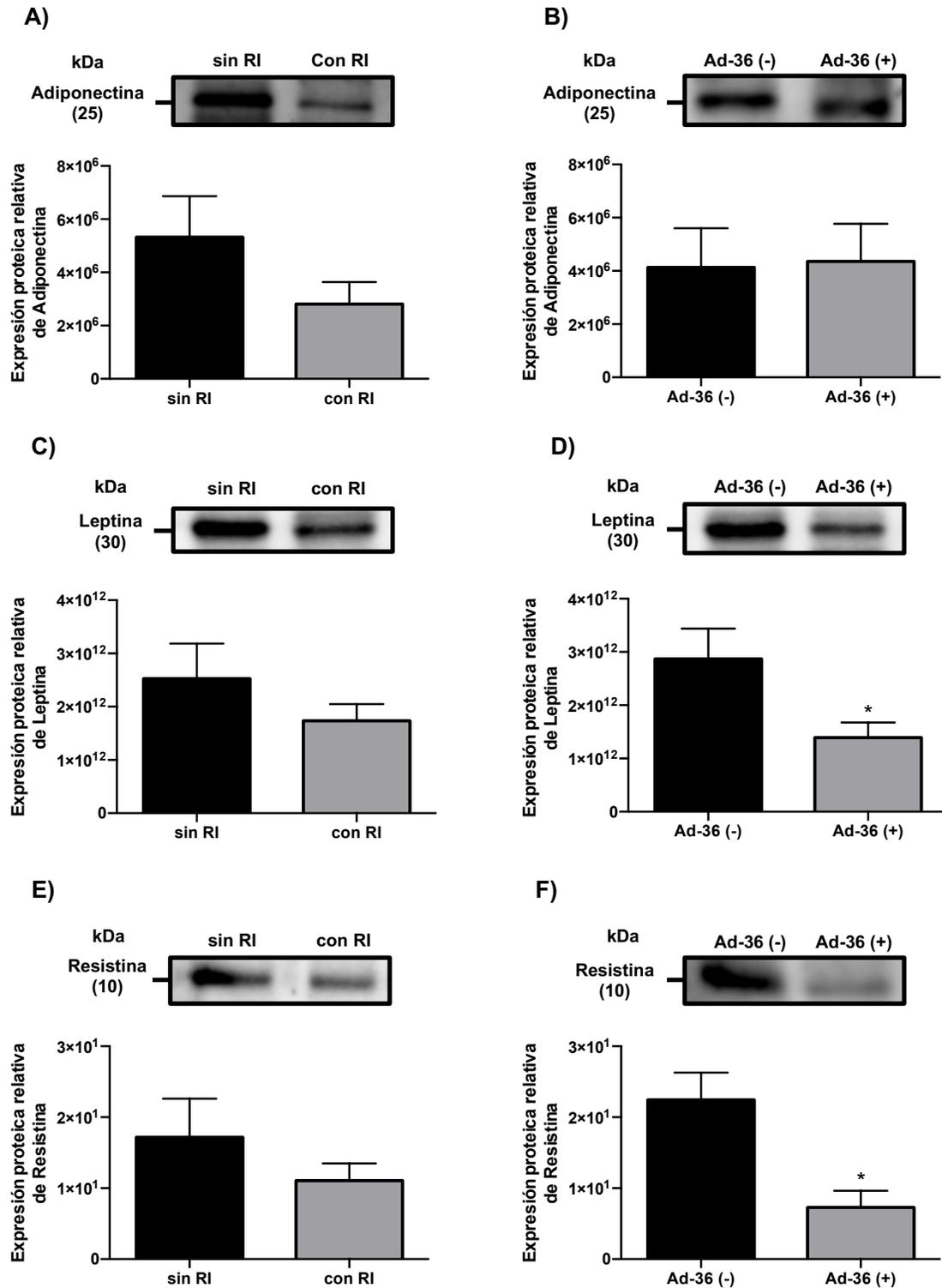


Figura 2. Expresión proteica de adiponectina, leptina y resistina en tejido adiposo. El nivel de proteína de adiponectina, leptina y resistina en función de la resistencia a la insulina (A, C y E) y en función de la positividad para *Ad-36* (B, D y F) se determinó mediante Western Blot y análisis densitométrico. La normalización se llevó a cabo mediante la carga total de proteína con el uso de la tecnología Stain-Free. Los datos representan media \pm error estándar. La significancia estadística se determinó con la prueba t-Student y un valor de $p \leq 0.05$ (*).

Discusión

La obesidad se asocia frecuentemente con un perfil metabólico adverso en el tejido adiposo, que origina una disminución en la captación y utilización de la glucosa y el desarrollo de la resistencia a la insulina (Smith y Kahn 2016). En población juvenil de la India se encontró que jóvenes con resistencia a la insulina presentaban una circunferencia de cintura mayor y niveles de glucosa comparado con jóvenes sensibles a la insulina (Singh *et al.*, 2013). Por otra parte, Gobato y colaboradores reportaron que, en población juvenil brasileña los indicadores de adiposidad se correlacionan con la resistencia a la insulina ($p \leq 0.001$) (Gobato *et al.*, 2014). Consistente con estos reportes, en este estudio se observó que las mujeres con resistencia a la insulina presentaron un incremento en las medidas de composición corporal, la glucosa, la insulina y el índice HOMA. El mecanismo molecular propuesto para explicar estas observaciones está dado por el incremento en el IMC, el cual se ha asociado de manera negativa con la captación y la utilización de la glucosa (Campbell y Carlson, 1993). Este incremento excesivo en los niveles de glucosa sanguínea continuamente estimula a las células β del páncreas para incrementar la liberación de insulina, lo que produce un hiperinsulinismo compensatorio para mantener la tolerancia normal a la glucosa (Oliveira *et al.*, 2004).

La resistencia a la insulina es una alteración metabólica estrechamente relacionada con la obesidad, que se caracteriza por la deficiente respuesta de las células a las acciones de la insulina, esto debido a una baja concentración o función de la insulina. De manera interesante, en las últimas décadas se ha asociado en diferentes modelos animales y en humanos la presencia de anticuerpos para Ad-36 con la obesidad, un mejor control glucémico y una mayor sensibilidad a la insulina (Ginneken, Sitnyakowsky y Jeffery 2009). En pacientes italianos con obesidad y enfermedad de hígado graso que son positivos para Ad-36, se observó una mayor sensibilidad a la insulina comparado con los controles negativos (Trovato *et al.*, 2012). Almegrem y colaboradores al comparar pacientes de origen sueco con diagnóstico de diabetes, pre-diabetes y pacientes con

tolerancia normal a la glucosa, positivos y negativos para *Ad-36*, observaron que había una seroprevalencia mayor en pacientes sanos con tolerancia normal a la glucosa y que estos presentaban mayor sensibilidad a la insulina, en comparación con los pacientes negativos para *Ad-36* (Almegrem *et al.*, 2014). Sin embargo, en la presente investigación no se encontró alguna relación entre la positividad para el DNA de *Ad-36* en el tejido adiposo con la resistencia a la insulina, hallazgos que concuerdan con lo reportado por Trovato *et al.*, 2009, Trovato *et al.*, 2010 y Almegrem *et al.*, 2012. La discordancia de nuestros hallazgos en cuanto a la disminución en la resistencia a la insulina y el control glucémico, con la literatura publicada podría estar relacionado con factores como carga viral, y el tiempo de infección, ya que se ha observado que los efectos de *Ad-36* son dependientes de estos factores (Krishnapuram *et al.*, 2011). Por otra parte, se observó una disminución significativa en el porcentaje de masa grasa de las mujeres positivas para DNA de *Ad-36* en comparación con las negativas. Estos hallazgos podrían no tener relevancia biológica, debido a que no coincide con lo que se ha reporta en la mayoría de los estudios en modelos animales y en humanos, donde la infección por *Ad-36* se asocia con el aumento de las medidas de adiposidad (Park *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2013).

La expansión e inflamación crónica de bajo grado del tejido adiposo promueve un incremento en la expresión de adipocinas proinflamatorias y la disminución en las adipocinas antiinflamatorias (Feng 2013). Este cambio en la expresión de adipocinas desempeña un importante papel en el desarrollo de la resistencia a la insulina. En distintos modelos de estudios se han determinado los niveles de algunas adipocinas en función de la seropositividad para *Ad-36*. En modelos experimentales *in vivo* se ha observado que después de la infección con *Ad-36*, hay un incremento en la expresión génica de adiponectina (Dubuisson *et al.*, 2011; Jiao *et al.*, 2014; Jiao *et al.*, 2019), y este incremento se asocia con una mayor sensibilidad a la insulina en mujeres (Lin *et al.*, 2013). Sin embargo, como en otros reportes, en el presente estudio no se encontró ninguna asociación entre la positividad para el DNA de *Ad-36* en el tejido adiposo y la variación en la

expresión génica y proteica de adiponectina (Aldhoon-Hainerova *et al.*, 2013; Kocazeybek *et al.*, 2017). Esta falta de asociación, podría estar relacionada con que la infección por *Ad-36* también se ha relacionado con un incremento en la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, lo que contribuye a un continuo estado proinflamatorio (Jiao *et al.*, 2014). El cual ha sido asociado con la inhibición de la expresión de adiponectina, este evento es mediado principalmente por TNF- α e IL-6 (Berger *et al.*, 2014; Kocazeybek *et al.*, 2017), dos reguladores negativos de adiponectina (Fang y Judd, 2018).

Por otra parte, en este estudio no se observaron cambios estadísticamente significativos en la expresión génica de leptina en función de la resistencia a la insulina, pero si una tendencia a la disminución al evaluar la expresión en función de la positividad al DNA de *Ad-36*. A su vez, se observó que la expresión proteica de leptina disminuye 2.06 veces ($p \leq 0.03$) en las muestras de mujeres con el DNA de *Ad-36*, en comparación con las mujeres sin el DNA viral. Estos resultados son consistentes con lo reportado en niños y adultos con obesidad y seropositivos para *Ad-36* (Karamese *et al.*, 2015; Sapunar *et al.*, 2017). Este hallazgo apoya la hipótesis de que los efectos de *Ad-36* son independientes del sexo o la edad. El mecanismo molecular mediante el cual *Ad-36* ejerce este efecto sobre los niveles de leptina no está completamente dilucidado. Sin embargo, está bien descrito que la expresión de leptina es en parte regulada por el metabolismo aerobio de la glucosa (Szkudelski, 2007). Además, se ha reportado que, *Ad-36* incrementa la proporción de glucosa metabolizada por la vía anaerobia con el aumento en la producción de lactato (Vangipuram *et al.*, 2007). Por lo tanto, se podría sugerir que este es uno de los mecanismos mediante el cual *Ad-36* regula los niveles de leptina en el tejido adiposo.

Por último, se evaluó la expresión génica y proteica de resistina en función de la resistencia a la insulina y la positividad para el DNA de *Ad-36*. En este estudio no se encontraron cambios estadísticamente significativos en los niveles de expresión génica de resistina. Sin embargo, se observó una tendencia a la disminución en la

expresión proteica de resistina en función de la presencia de resistencia a la insulina y una disminución significativa de 3.08 veces ($p \leq 0.01$) en las muestras con el DNA de *Ad-36*. Cabe destacar que este es el primer estudio en el que se evalúa el cambio en la expresión de resistina en función de la positividad para *Ad-36*. Debido a esto no existe un mecanismo descrito para explicar estos resultados. Sin embargo, se ha demostrado que después de tratar adipocitos de la línea celular 3T3-L1 con rosiglitazona, un agonista de PPAR γ , disminuye tanto la expresión de resistina como la acetilación de la lisina 9 en la histona H3 y la lisina 8 en la histona H4 del promotor de resistina, marca epigenética asociada con represión transcripcional (Hartman *et al.*, 2002); aunado a esto, en diferentes modelos experimentales se ha demostrado que, *Ad-36* incrementa la expresión génica, proteica, así como la actividad de PPAR γ (Pasarica *et al.*, 2008; Dubuisson *et al.*, 2011; Jiao *et al.*, 2019). Por otra parte, mediante ensayos de luciferasa se ha determinado que el factor de la transcripción FOXO1 se une al promotor de resistina, donde actúa como un regulador positivo de la expresión de esta adipocina (Liu *et al.*, 2013). En relación con esto, Jiao y colaboradores reportaron que después de tratar células hADSCs con *Ad-36* disminuye el nivel de mRNA de FOXO1 e incrementa la proporción de FOXO1 fosforilado en residuos de Ser256, misma fosforilación que se asocia con la inactivación de FOXO1 y su exportación fuera del núcleo para ser degradado vía proteasoma (Jiao *et al.*, 2019). Por lo tanto, se sugiere que *Ad-36* podría estar actuando mediante alguno de estos mecanismos para ejercer sus efectos sobre los niveles de resistina.

Conclusión

Las mujeres portadoras del DNA de *Ad-36* en el tejido adiposo, presentaron un porcentaje de masa grasa menor y una expresión proteica menor de leptina y resistina, pero no se observaron cambios en los niveles de la adiponectina. Estos resultados sugieren una relación de las adipocinas con la presencia del virus en el tejido adiposo, lo que deberá confirmarse en estudios posteriores.

Perspectivas

- Analizar la expresión génica y proteica de adiponectina, leptina y resistina en un mayor número de muestras, así como otras adipocinas relacionadas con la sensibilidad a la insulina.
- Analizar la expresión de los receptores AdipoR1 y LepRb en cada una de las muestras.
- Determinar la carga viral en cada una de las muestras y la expresión del producto del gen E4ORF1 de *Ad-36*.

Referencias

- Aldhoon-Hainerova, I., Zamrazilová, H., Atkinson, R. L., Dusatkova, L., Sedláčková, B., Hlavaty, P., *et al.* (2014). Clinical and laboratory characteristics of 1179 Czech adolescents evaluated for antibodies to human adenovirus 36. *International journal of obesity*, 38(2), 285-291.
- Aprath-Husmann, I., Röhrig, K., Gottschling-Zeller, H., Skurk, T., Scriba, D., Birgel, M., & Hauner, H. (2001). Effects of leptin on the differentiation and metabolism of human adipocytes. *International journal of obesity*, 25(10), 1465.
- Azab, N., Abdel-Aziz, T., Ahmed, A., & El-deen, I. M. (2016). Correlation of serum resistin level with insulin resistance and severity of retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Saudi Chemical Society*, 20(3), 272-277.
- Barnes, K. M., & Miner, J. L. (2009). Role of resistin in insulin sensitivity in rodents and humans. *Current Protein and Peptide Science*, 10(1), 96-107.
- Bauer, S., Weigert, J., Neumeier, M., Wanninger, J., Schäffler, A., Luchner, A., ... & Buechler, C. (2010). Low-abundant adiponectin receptors in visceral adipose tissue of humans and rats are further reduced in diabetic animals. *Archives of medical research*, 41(2), 75-82.
- Blaslov, K., Narańda, F. S., Kruljac, I., & Renar, I. P. (2018). Treatment approach to type 2 diabetes: Past, present and future. *World journal of diabetes*, 9(12), 209.
- Blüher, M., Williams, C. J., Klötting, N., Hsi, A., Ruschke, K., Oberbach, A., ... & Stumvoll, M. (2007). Gene expression of adiponectin receptors in human visceral and subcutaneous adipose tissue is related to insulin resistance and metabolic parameters and is altered in response to physical training. *Diabetes care*, 30(12), 3110-3115.
- Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(1), a009191.
- Caputo, T., Gilardi, F., & Desvergne, B. (2017). From chronic overnutrition to metaflammation and insulin resistance: adipose tissue and liver contributions. *FEBS letters*, 591(19), 3061-3088.
- Chen, J., Spagnoli, A., & Torquati, A. (2012). Omental gene expression of adiponectin correlates with degree of insulin sensitivity before and after gastric bypass surgery. *Obesity surgery*, 22(3), 472-477.
- Cheng, K. K., Lam, K. S., Wang, B., & Xu, A. (2014). Signaling mechanisms underlying the insulin-sensitizing effects of adiponectin. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 28(1), 3-13.
- Civitarese, A. E., Jenkinson, C. P., Richardson, D., Bajaj, M., Cusi, K., Kashyap, S., ... & Ravussin, E. (2004). Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, 47(5), 816-820.
- Codoñer-Franch, P., & Alonso-Iglesias, E. (2015). Resistin: insulin resistance to malignancy. *Clinica chimica acta*, 438, 46-54.
- Czech, M. P. (2017). Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature medicine*, 23(7), 804.
- D'souza, A. M., Neumann, U. H., Glavas, M. M., & Kieffer, T. J. (2017). The glucoregulatory actions of leptin. *Molecular Metabolism*, 6(9), 1052-1065.
- Esposito, S., Preti, V., Consolo, S., Nazzari, E., & Principi, N. (2012). Adenovirus 36 infection and obesity. *Journal of clinical virology*, 55(2), 95-100.
- Galic, S., Oakhill, J. S., & Steinberg, G. R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and cellular endocrinology*, 316(2), 129-139.
- Goto, M., Goto, A., Morita, A., Deura, K., Sasaki, S., Aiba, N., ... & Watanabe, S. (2014). Low-molecular-weight adiponectin and high-molecular-weight adiponectin levels in relation to diabetes. *Obesity*, 22(2), 401-407.
- Gustafson, B., Hedjazifar, S., Gogg, S., Hammarstedt, A., & Smith, U. (2015). Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(4), 193-200.
- Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., & Olivares-Reyes, J. A. (2017). Molecular mechanisms of insulin resistance: An update. *Gaceta medica de Mexico*, 153(2), 214-228.
- Hajri, T., Tao, H., Wattacheril, J., Marks-Shulman, P., & Abumrad, N. N. (2010). Regulation of adiponectin production by insulin: interactions with tumor necrosis factor- α and interleukin-6. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300(2), E350-E360.
- Hansen, D., Dendale, P., Beelen, M., Jonkers, R. A., Mullens, A., Corluy, L., *et al.* (2010). Plasma adipokine and inflammatory marker concentrations are altered in obese, as opposed to non-obese, type 2 diabetes patients. *European journal of applied physiology*, 109(3), 397-404.
- Harris, R. B. (2014). Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 414-423.
- Heilbronn, L. K., Rood, J., Janderova, L., Albu, J. B., Kelley, D. E., Ravussin, E., & Smith, S. R. (2004). Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(4), 1844-1848.
- Horakova, D., Stepanek, L., Nagelova, R., Pastucha, D., Azeem, K., & Kollarova, H. (2018). Total and high-molecular-weight adiponectin levels and prediction of insulin resistance. *Endokrynologia Polska*, 69(4), 375-380.

- Huan, J. N., Li, J., Han, Y., Chen, K., Wu, N., & Zhao, A. Z. (2003). Adipocyte-selective reduction of the leptin receptors induced by antisense RNA leads to increased adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 45638-45650.
- Iwata, M., Hara, K., Kamura, Y., Honoki, H., Fujisaka, S., Ishiki, M., ... & Kato, H. (2018). Ratio of low molecular weight serum adiponectin to the total adiponectin value is associated with type 2 diabetes through its relation to increasing insulin resistance. *PLoS one*, 13(3), e0192609.
- Karamese, M., Altoparlak, U., Turgut, A., Aydogdu, S., & Karamese, S. A. (2015). The relationship between adenovirus-36 seropositivity, obesity and metabolic profile in Turkish children and adults. *Epidemiology & Infection*, 143(16), 3550-3556.
- Kern, P. A., Di Gregorio, G. B., Lu, T., Rassouli, N., & Ranganathan, G. (2003). Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- α expression. *Diabetes*, 52(7), 1779-1785.
- Krishnapuram, R., Dhurandhar, E. J., Dubuisson, O., Kirk-Ballard, H., Bajpeyi, S., Butte, N., et al. (2011). Template to improve glycemic control without reducing adiposity or dietary fat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300(5), 779-789.
- Kusminski, C. M., Gallardo-Montejano, V. I., Wang, Z. V., Hegde, V., Bickel, P. E., Dhurandhar, N. V., et al. (2015). E4orf1 induction in adipose tissue promotes insulin-independent signaling in the adipocyte. *Molecular metabolism*, 4(10), 653-664.
- Leon-Cabrera, S., Solís-Lozano, L., Suárez-Álvarez, K., González-Chávez, A., Béjar, Y. L., Robles-Díaz, G., et al. (2013). Hyperleptinemia is associated with parameters of low-grade systemic inflammation and metabolic dysfunction in obese human beings. *Frontiers in integrative neuroscience*, 7, 1-7.
- Mojiminiyi, O. A., Abdella, N. A., Al Arouj, M., & Nakhi, A. B. (2007). Adiponectin, insulin resistance and clinical expression of the metabolic syndrome in patients with Type 2 diabetes. *International journal of obesity*, 31(2), 213.
- Moonishaa, T. M., Nanda, S. K., Shamraj, M., Sivaa, R., Sivakumar, P., & Ravichandran, K. (2017). Evaluation of leptin as a marker of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 7(3), 176.
- Na, H. N., Dubuisson, O., Hegde, V., Nam, J. H., & Dhurandhar, N. V. (2016). Human adenovirus Ad36 and its E4orf1 gene enhance cellular glucose uptake even in the presence of inflammatory cytokines. *Biochimie*, 124, 3-10.
- Nogueiras, R., Novelle, M. G., Vazquez, M. J., Lopez, M., y Dieguez, C. (2010). Resistin: regulation of food intake, glucose homeostasis and lipid metabolism. In *Pediatric Neuroendocrinology* (Vol. 17, pp. 175-184). Karger Publishers.
- Osegbe, I., Okpara, H., & Azinge, E. (2016). Relationship between serum leptin and insulin resistance among obese Nigerian women. *Annals of African medicine*, 15(1), 14.
- Park, H. K., & Ahima, R. S. (2013). Resistin in rodents and humans. *Diabetes & metabolism journal*, 37(6), 404-414.
- Patel, L., Buckels, A. C., Kinghorn, I. J., Murdock, P. R., Holbrook, J. D., Plumpton, C., et al. (2003). Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR γ activators. *Biochemical and biophysical research communications*, 300(2), 472-476.
- Pessin, J. E., & Saltiel, A. R. (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 106(2), 165-169.
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological reviews*, 98(4), 2133-2223.
- Ramsay, T. G., & Richards, M. P. (2004). Hormonal regulation of leptin and leptin receptor expression in porcine subcutaneous adipose tissue. *Journal of animal science*, 82(12), 3486-3492.
- Ranganathan, S., Maffei, M., & Kern, P. A. (1998). Adipose tissue ob mRNA expression in humans: discordance with plasma leptin and relationship with adipose TNF α expression. *Journal of lipid research*, 39(4), 724-730.
- Rasmussen, M. S., Lihn, A. S., Pedersen, S. B., Bruun, J. M., Rasmussen, M., & Richelsen, B. (2006). Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots. *Obesity*, 14(1), 28-35.
- Rogers, P. M., Mashtalir, N., Rathod, M. A., Dubuisson, O., Wang, Z., Dasuri, K., et al. (2008). Metabolically favorable remodeling of human adipose tissue by human adenovirus type 36. *Diabetes*, 57(9), 2321-2331.
- Sadashiv, S. T., Paul, B. N., Kumar, S., Chandra, A., Dhananjai, S., & Negi, M. P. (2012). Over expression of resistin in adipose tissue of the obese induces insulin resistance. *World journal of diabetes*, 3(7), 135.
- Samaras, K., Botelho, N. K., Chisholm, D. J., & Lord, R. V. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Obesity*, 18(5), 884-889.
- Séron, K., Corset, L., Vasseur, F., Boutin, P., Gómez-Ambrosi, J., Salvador, J., ... & Froguel, P. (2006). Distinct impaired regulation of SOCS3 and long and short isoforms of the leptin receptor in visceral and subcutaneous fat of lean and obese women. *Biochemical and biophysical research communications*, 348(4), 1232-1238.
- Vangipuram, S. D., Yu, M., Tian, J., Stanhope, K. L., Pasarica, M., Havel, P. J., et al. (2007). Adipogenic human adenovirus-36 reduces leptin expression and secretion and increases glucose uptake by fat cells. *International journal of obesity*, 31(1), 87-96.
- Wang, M. Y., Orci, L., Ravazzola, M., & Unger, R. H. (2005). Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(50), 18011-18016.

- Yoon, I. S., Park, S., Kim, R. H., Ko, H. L., & Nam, J. H. (2017). Insulin-sparing and fungible effects of E4orf1 combined with an adipocyte-targeting sequence in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *International Journal of Obesity*, 41(10), 1601-1605.
- Zaidi, S. I. Z., & Shirwany, T. A. K. (2015). Relationship of serum resistin with insulin resistance and obesity. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, 27(3), 552-555.
- Sapunar, J., Fonseca, L., Molina, V., Ortiz, E., Barra, M. I., Reimer, C., *et al.*, (2019). Adenovirus 36 seropositivity is related to obesity risk, glycemic control, and leptin levels in Chilean subjects. *International Journal of Obesity*, 1.
- Smith, U., & Kahn, B. B. (2016). Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *Journal of internal medicine*, 280(5), 465-475.
- Singh, Y., Garg, M., Tandon, N., y Marwaha, R. K. (2013). A Study of Insulin Resistance by HOMA-IR and its Cut-off Value to Identify Metabolic Syndrome in Urban Indian Adolescents. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 5(4), 245–251.
- Gobato, A. O., Vásquez, A. C. J., Zambon, M. P., Barros, A. de A., y Hessel, G. (2014). Metabolic syndrome and insulin resistance in obese adolescents. *Revista Paulista de Pediatria*, 32(1), 55–62.
- Romualdo, M. C. D. S., Nóbrega, F. J. D., y Escrivão, M. A. M. S. (2014). Insulin resistance in obese children and adolescents. *Jornal de pediatria*, 90(6), 600-607.
- Campbell, P. J., & Carlson, M. G. (1993). Impact of obesity on insulin action in NIDDM. *Diabetes*, 42(3), 405-410.
- Oliveira, C. L. D., Mello, M. T. D., Cintra, I. D. P., & Fisberg, M. (2004). Obesity and metabolic syndrome in infancy and adolescence. *Revista de Nutrição*, 17(2), 237-245.
- Dhurandhar, N. V., Whigham, L. D., Abbott, D. H., Schultz-Darken, N. J., Israel, B. A., Bradley, S. M., *et al.* (2002). Human adenovirus Ad-36 promotes weight gain in male rhesus and marmoset monkeys. *The Journal of Nutrition*, 132(10), 3155-3160
- Atkinson, R. L., Dhurandhar, N. V., Allison, D. B., Bowen, R. L., Israel, B. A., Albu, J. B., y Augustus, A. S. (2005). Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *International journal of obesity*, 29(3), 281.
- Pasarica, M., Shin, A. C., Yu, M., Yang, H. M. O., Rathod, M., Jen, K. L. C., *et al.* (2006). Human adenovirus 36 induces adiposity, increases insulin sensitivity, and alters hypothalamic monoamines in rats. *Obesity*, 14(11), 1905-1913.
- Rathod, M., Vangipuram, S. D., Krishnan, B., Heydari, A. R., Holland, T. C., & Dhurandhar, N. V. (2007). Viral mRNA expression but not DNA replication is required for lipogenic effect of human adenovirus Ad-36 in preadipocytes. *International journal of obesity*, 31(1), 78.
- Almgren, M., Atkinson, R. L., Hilding, A., He, J., Brismar, K., Schalling, M., *et al.* (2014). Human adenovirus-36 is uncommon in type 2 diabetes and is associated with increased insulin sensitivity in adults in Sweden. *Annals of medicine*, 46(7), 539-546.
- Berger, P. K., Pollock, N. K., Laing, E. M., Warden, S. J., Hill Gallant, K. M., Hausman, D. B., *et al.* (2014). Association of adenovirus 36 infection with adiposity and inflammatory-related markers in children. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(9), 3240-3246.
- Szkudelski, T. (2007). Intracellular mediators in regulation of leptin secretion from adipocytes. *Physiological research*, 56(5).