



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICAS**

FACULTAD DE QUÍMICA



**“Expresión de proteínas virales en cultivos persistentes del
Adenovirus 36 en línea celular”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICAS

PRESENTA:

M. C. y T. F. Patricia Alarcón Valdés

DIRECTORES:

Dr. en C. Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez

Dra. en C. Mirza Gabriela Romero Valdovinos

Dr. en C. Fernando Martínez Hernández



Toluca, Estado de México, 2022

Índice

Índice.....	2
Índice de figuras.....	4
Resumen.....	5
Abstract	8
Introducción	10
Persistencia viral.....	20
Estrategias que comparten algunos virus para establecer la infección persistente <i>in vitro</i>	22
Infección persistente por adenovirus.....	23
HAdV-36	24
Línea celular Vero con potencial para la infección persistente por adenovirus.....	25
Hipótesis.....	27
Materiales y métodos	28
Células	28
Virus	28
Obtención del botón celular o pellet a partir de un cultivo en monocapa. Técnica de tripsinización.....	29
Establecimiento de una infección en fase aguda <i>in vitro</i> por HAdV-36.....	29
Ensayo TCID ₅₀	30
Ensayo de focos de infección	30
Tinciones para revelar aspectos morfológicos de la infección.....	32
Obtención de un suero hiperinmune de conejo anti-HAdV-36.....	33
Establecimiento de la infección persistente por HAdV-36	34
Detección del HAdV-36 en células de cultivo mediante la amplificación génica	35
Inmunodetección del antígeno viral en las células infectadas, crecidas en cultivo	36
Detección cuantitativa del antígeno HAdV-36 por citometría de flujo	37
Expresión de los ARNm de los genes <i>E1a</i> y <i>E4orf1</i> del HAdV-46 por RT-qPCR.....	39
Expresión de proteínas virales por inmunoblot.....	40
Resultados	42
Permisividad de las células Vero a la infección por HAdV-36	42
Establecimiento de la infección persistente por HAdV-36 en cultivo de células Vero	48

HAdV-36 desarrolla una infección persistente productiva	50
El ensayo de focos de infección reveló a los antígenos del HAdV-36 en células infectadas	50
El DNA del HAdV-36 está presente en las células infectadas de manera persistente	51
Antígenos del HAdV-36 se expresan en las células Vero infectadas de manera persistente.....	52
En la infección persistente por HAdV-36 la expresión de los genes <i>E1a</i> y <i>E4orf1</i> muestran una expresión diferencial respecto al estado agudo de infección.....	55
Proteínas de HAdV-36 en células persistentemente infectadas	56
Discusión	57
Conclusiones	62
Perspectivas.....	62
Anexos.....	¡Error! Marcador no definido.
Referencias	63

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de un Adenovirus	10
Figura 2. Mapa genético del adenovirus humano tipo 36, HAdV-36.....	11
Figura 3. Efecto citopático por HAdV-36 en células Vero	43
Figura 4. Detección del DNA y antígeno viral en las células Vero infectadas de manera aguda	44
Figura 5. Efecto citopático por HAdV-36 en células A549 y Hep2	45
Figura 6 . Efecto de la infección por HAdV-36 en células Vero revelada por tinciones	46
Figura 7 . Inclusiones patognomónicas de la infección por adenovirus reveladas por tinción con Hematoxilina-Eosina	47
Figura 8 . Vacuolas en células Vero teñidas por Rojo Oleoso.....	47
Figura 7. Infección por HAdV-36 a baja multiplicidad de infección.....	49
Figura 8. Infección persistente por HAdV-36	49
Figura 9. Persistencia del HAdV-36 en células Vero	50
Figura 10. Ensayo de focos de infección una inmunotinción que apoya en la detección de virus infeccioso y la expresión de los antígenos del HAdV-36 en cultivo de células Vero	51
Figura 11. Expresión del antígeno viral en células Vero	53
Figura 12. Expresión del antígeno viral en células Vero	54
Figura 13. Expresión de los mRNA de <i>E1a</i> y <i>E4orf1</i> en cultivos de células Vero infectadas por HAdV-36.....	55
Figura 14. Detección de las proteínas totales del HAdV-36 por western blot en cultivos de células Vero infectadas por HAdV-36	56

Índice de tablas

Tabla 1. Líneas celulares susceptibles a la infección por HAdV-36, origen, tipo celular y autores.....	25
--	----

Resumen

Introducción. Los adenovirus humanos son virus de doble cadena de DNA que pueden desarrollar infecciones de manera persistente. La persistencia de estos virus se presenta principalmente en las especies B, C, D y E, los cuales pueden afectar el tejido linfoide de las adenoides y del intestino, epitelios como el pulmonar y de la córnea, así como en el tejido adiposo.

La persistencia viral es un fenómeno clave para entender la patogenia de algunas enfermedades virales crónicas. Para que un virus cause una infección persistente, se requiere que restrinja su efecto citolítico y evite alterar las funciones vitales de la célula para favorecer una interacción virus-célula en equilibrio que permita la replicación viral y la supresión o control de la respuesta inmune y/o los mecanismos antivirales sin comprometer la supervivencia y multiplicación celular.

Actualmente, es de interés el estudio del adenovirus humano tipo 36 (HAdV-36) que pertenece a la especie D, en virtud de que su proteína E4orf1 muestra un efecto metabólico positivo al reducir la hiperinsulinemia y mejorar el metabolismo de la glucosa. Además de disminuir los ácidos grasos libres séricos y los triglicéridos hepáticos y tener potencial para atenuar la lipotoxicidad renal a pesar de estimular la adipogénesis. Estos cambios metabólicos pueden estar relacionados con la persistencia del virus; sin embargo, debido a la falta de un modelo, no se ha aclarado el mecanismo y los factores que expliquen cómo los adenovirus pueden inducir una infección persistente.

Objetivo. El objetivo de este estudio fue establecer la infección persistente con el Adenovirus humano tipo 36 *in vitro* en una línea celular y comparar la expresión de *E1a* y *E4orf1* respecto a la infección en estado agudo.

Método. Se infectaron las líneas celulares Vero (células epiteliales de riñón de mono, ATCC CCL-81), A549 (células de adenocarcinoma de pulmón humano, ATCC CCL-185) y Hep2 (células de carcinoma epidermoide humano, ATCC CCL-23) con el adenovirus humano tipo

36 (ATCC VR-1610). Las células se infectaron con el stock de HAdV-36 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.5 para obtener cultivos infectados de manera persistente.

El establecimiento de la infección persistente por HAdV-36 en cultivo se evaluó en los diferentes pases de acuerdo con los siguientes parámetros: 1) Producción de partículas virales infecciosas que fueron determinadas por ensayos de TCID₅₀; 2) Expresión del genoma viral determinado en las células mediante la PCR para un fragmento del gen *E1a*; 3) Detección cualitativa del antígeno viral mediante ensayos de inmunolocalización por inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirecta; 4) Detección cuantitativa del antígeno viral por citometría de flujo. Además, el efecto de la infección sobre la morfología celular se puso de manifiesto utilizando las tinciones de Hematoxilina Eosina, Giemsa y rojo oleoso.

Para analizar cómo se expresan *E1a* y *E4orf1* principales genes virales asociados a la remodelación del metabolismo e involucrados en el establecimiento y mantenimiento de la infección en estado persistente se evaluaron en los pases las expresiones de RNAm por RT-qPCR.

Resultados. En el presente trabajo se estableció la infección persistente por HAdV-36 en cultivo de células Vero que se ha mantenido durante 35 pases en el transcurso de 244 dpi. El análisis de los ensayos TCID₅₀ mostró que en los sobrenadantes de los pases persistentemente infectados el título viral osciló entre 10⁴ y 10⁶ TCID₅₀/mL; la amplificación génica por PCR convencional demostró la presencia del DNA viral en las células de los pases infectados de manera persistente; los ensayos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirectas revelaron la presencia del antígeno viral en las células infectadas de manera persistente y utilizando la citometría de flujo se confirmó que un 50% de las células de los cultivos persistentemente infectados expresaron el antígeno viral; el análisis de la expresión de los RNAm mostraron una baja expresión relativa de *E1a* y una disminución no significativa en la expresión relativa de *E4orf1* después de 53 días posinoculación (dpi), respecto a la infección en estado agudo.

Conclusiones. Este trabajo muestra el establecimiento de un modelo *in vitro* de infección persistente por HAdV-36 en células Vero con las características de un cultivo acarreador y su utilidad para el estudio de la participación de la proteína E4orf1 en el establecimiento de la persistencia viral.

Abstract

Introduction. Human adenoviruses are double-stranded DNA viruses that can develop persistent infections. The persistence of these viruses occurs mainly in species B, C, D, and E, which can affect the lymphoid tissue of the adenoids and the intestine, epithelia such as the lung and cornea, as well as in adipose tissue.

Viral persistence is crucial to understanding the pathogenesis of some chronic viral diseases. For a virus to cause persistent infection, it is required to restrict its cytolytic effect and avoid altering the vital functions of the cell to favor a balanced virus-cell interaction that allows viral replication and the suppression or control of the immune response and/or antiviral mechanisms without compromising cell survival and multiplication.

The study of human adenovirus type 36 (HAdV-36), which belongs to species D, is interesting since its E4orf1 protein shows a positive metabolic effect by reducing hyperinsulinemia and improving glucose metabolism. In addition to reducing serum free fatty acids and hepatic triglycerides and having the potential to attenuate renal lipotoxicity despite stimulating adipogenesis. These metabolic changes may be related to the persistence of the virus; however, due to the lack of a model, the mechanism and factors that explain how adenoviruses can induce persistent infection have not been clarified.

Objective. The objective of this study was to establish persistent infection with human Adenovirus type 36 *in vitro* in a cell line and to compare the expression of *E1a* and *E4orf1* concerning infection in the acute state.

Method. Cell lines Vero (monkey kidney epithelial cells, ATCC CCL-81), A549 (human lung adenocarcinoma cells, ATCC CCL-185), and Hep2 (human epidermoid carcinoma cells, ATCC CCL-23), were infected with human adenovirus type 36 (ATCC VR-1610). In addition, cells were infected with HAdV-36 stock at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 to obtain persistently infected cultures.

We evaluated the establishment of persistent infection by HAdV-36 in culture was assessed in the different passages according to the following parameters: 1) Production of infectious

viral particles that were determined by TCID₅₀ assays; 2) Expression of the viral genome determined in the cells by PCR for a fragment of the *E1α* gene; 3) Qualitative detection of viral antigen by immunofluorescence and indirect immunoperoxidase immunolocalization assays; 4) Quantitative detection of viral antigen by flow cytometry. In addition, the effect of infection on cell morphology was revealed using hematoxylin-eosin, Giemsa, and red oil stains.

To analyze how *E1α* and *E4orf1* are expressed, the leading viral genes associated with metabolic remodeling, and involved in establishing and maintaining infection in a persistent state, the expressions of mRNA were evaluated in passages by RT-qPCR.

Results. In the present work, we established persistent HAdV-36 infection in Vero cell culture that has been maintained for 35 passages throughout 244 dpi. Analysis of the TCID₅₀ assays showed that in persistently infected passage supernatants, the viral titer ranged between 10⁴ and 10⁶ TCID₅₀/mL; gene amplification by conventional PCR demonstrated the presence of viral DNA in cells from persistently infected passages; indirect immunofluorescence and immunoperoxidase assays revealed the presence of viral antigen in persistently infected cells, and flow cytometry confirmed that 50% of cells in persistently infected cultures expressed viral antigen; mRNA expression analysis showed a low relative expression of *E1α* and a non-significant decrease in the relative expression of *E4orf1* after 53 days post-inoculation (dpi), compared to infection in the acute state.

Conclusions. This work shows the establishment of an *in vitro* model of persistent infection by HAdV-36 in Vero cells with the characteristics of a carrier-state culture and its usefulness for the study of the participation of the *E4orf1* protein in the establishment of viral persistence.

Introducción

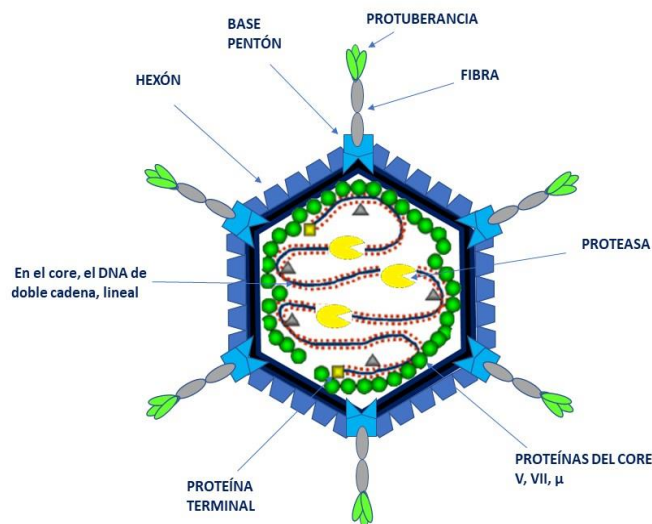
Adenovirus. Descripción general

Los adenovirus humanos (HAdVs) son agentes infecciosos que pertenecen al género *Mastadenovirus* de la familia *Adenoviridae* (Maclachlan et al., 2017). Se clasifican en siete especies (A-G) dentro de las que se agrupan más de 90 tipos, que incluyen 51 serotipos definidos por ensayos de neutralización cruzada, y más de 40 genotipos determinados por análisis filogenético de las secuencias de las proteínas de la cápside (hexon, base pentón y fibra) (Seto et al., 2011; Robinson et al., 2013).

Una partícula de adenovirus (Figura 1) tiene un diámetro aproximado de 90 nm con una cápside icosaédrica desnuda, que en su mayoría está constituida por las proteínas del hexon (63%) y del pentón que está formado por la base y la fibra (Rux y Burnett, 2004). La antigenicidad del virus está conferida por las glicoproteínas de la protuberancia de la fibra la que a su vez funciona como correceptor (Russell, 2009).

La estructura de una partícula de los adenovirus está representada en la figura 1.

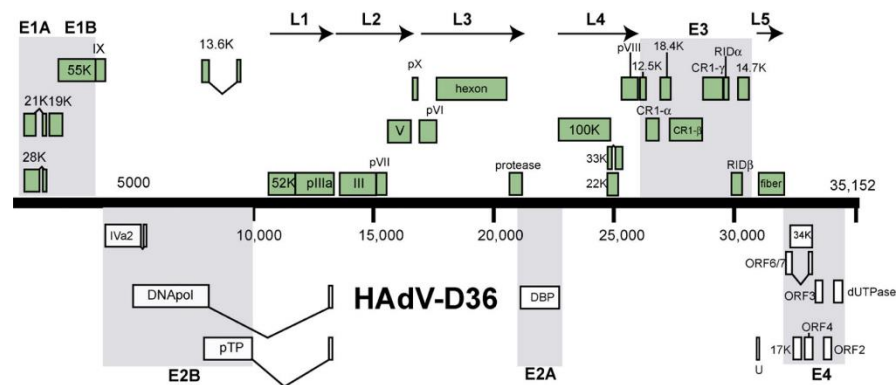
Figura 1. Estructura de un Adenovirus



Representación de la estructura de un Adenovirus. Tomado y modificado de Leppard, 2014

Los HAdVs tienen un genoma lineal (Figura 2) de DNA de doble cadena con longitud entre 36 y 38 kb, dependiendo del tipo. El genoma de los adenovirus se organiza en unidades de transcripción tempranas (E1A, E1B, E2, E3, E4), intermedias (IX, IVa2) y una unidad tardía principal (L1 a L5). Esta organización depende si se expresan antes o después de la replicación del DNA viral. Las dos cadenas de DNA codifican más de 40 proteínas diferentes, 12 de las cuales son parte de la estructura (Smith et al., 2010; Arnold et al., 2010).

Figura 2. Mapa genético del adenovirus humano tipo 36, HAdV-36



Mapa de la transcripción del genoma de un adenovirus humano (HAdV-36). El DNA genómico se representa con la línea en escala en color negro numerada en pares de bases desde el extremo izquierdo en el centro del diagrama. La transcripción en la hebra sentido hacia la derecha (arriba) y en la hebra anti sentido, hacia la izquierda abajo. Los genes (regiones de genes) se indican en sombra gris. Los transcritos tempranos se señalan con la letra E y los tardíos con la L. La caracterización del HAdV-36 indica que posee 39 marcos de lectura abiertos (ORF). Tomado de Arnold et al., 2010.

El genoma viral se divide en dos regiones: la región de transcripción temprana referida con la letra “E”, (del inglés, *Early*), codifica para las proteínas E1A, E1B, E3 y E4 que actúan como transactivadores en la expresión de otras regiones virales y la región de transcripción tardía referida con la letra “L”, (del inglés, *Late*) que codifican principalmente las proteínas de la cápside (Modrow et al., 2013).

Enseguida se describen de manera breve algunos genes adenovirales y ciertas funciones relacionadas a la replicación de los adenovirus:

En el caso de los genes tempranos *E1B* y *E3* se conoce que estimulan la replicación viral y pueden actuar bloqueando la apoptosis. Respecto, a los productos del gen *E2* (como la proteína de unión a DNA de cadena sencilla, el precursor de la proteína terminal del adenovirus y la DNA polimerasa) pueden estimular la replicación del DNA viral y la consiguiente transcripción de los genes tardíos (Russell, 2000).

Las proteínas E3 son conocidas por sus funciones inmunomoduladoras: E3 (de peso 14.7 KDa) puede inhibir la señalización mediada por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) para suprimir la inflamación y la citólisis; el complejo E3 del Receptor de Internalización y Degradación (RID), que está integrado por las proteínas E3/10.4 KDa y E3/14.5 KDa, pueden eliminar de la superficie celular a los receptores 1 y 2 del ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF y al receptor del factor de crecimiento epidérmico para promover su posterior degradación en los lisosomas, bloqueando la apoptosis y protegiendo a las células infectadas contra el TNF (McSharry et al., 2008).

La glicoproteína E3 19KDa se ha documentado que inhibe el reconocimiento por el complejo mayor de histocompatibilidad clase I, que al retenerse en el retículo endoplásmico puede bloquear el transporte del antígeno viral a la superficie celular y evadir la acción citolítica por parte de los linfocitos T citotóxicos (Russell, 2000; Wold y Gooding, 1989).

Una proteína derivada del gen *E3* denominada proteína de muerte de adenovirus (ADP por sus siglas en inglés), facilita la citólisis tardía de la célula infectada y, por lo tanto, los viriones se liberan de manera más eficiente. De forma interesante, se ha documentado que la función del gen *E3* no es necesaria para la replicación viral *in vitro* (Jogler et al., 2006).

Las funciones inmunomoduladoras de las proteínas de la región E4 han sido estudiadas principalmente para los adenovirus de la especie C; esta región codifica proteínas involucradas en la respuesta al daño del DNA y la apoptosis, (Hendrickx et al., 2014). E4orf6 junto con E1B 55KDa (para HAdV-5 o HAdV-2) contrarrestan las defensas de la célula hospedera mediadas por la proteína celular p53 e inducen la exportación selectiva de ARNm

viral tardío desde el núcleo al citoplasma e inhibe la exportación del ARNm celular (Flint y Gonzalez, 2003).

E4orf3 inhibe la producción de IFN y altera la organización de proteínas celulares involucradas en la respuesta antiviral, para formar inclusiones nucleares denominados cuerpos de la proteína de leucemia promielocítica (PML) (también llamado dominio oncogénico de PML o dominio nuclear 10) (Hendrickx et al., 2014). Los cuerpos de PML son montados por las proteínas PML y el factor de defensa asociado al dominio de muerte (Daxx) y se unen a las proteínas E1A dependiendo de la región CR2 de E1A e impiden la respuesta antiviral mediada por IFN (Hendrickx et al., 2014; Vink et al., 2015).

Además, se demostró que E4-ORF3 promueve la formación de heterocromatina, regulando negativamente la expresión génica dependiente de p53 (Vink et al., 2015).

Por otra parte, las proteínas E1A y E4orf1 se han relacionado al establecimiento de la persistencia viral.

E1A

E1A junto con E1B constituyen la región E1 de los adenovirus. Su expresión resulta en por lo menos cinco isoformas o transcritos con diferentes coeficientes de sedimentación (S) (13S, 12S, 11S, 10S, 9S) que surgen del corte y empalme diferencial de un pre-RNAM (Stephens y Harlow, 1987). Las principales variantes 13S y 12S se expresan en la primera hora después de la infección (Singh et al., 2019) para localizarse tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula infectada (Pelka et al., 2008).

Para los HAdV-2 y 5, las isoformas 13S y 12S, constan de 289 y 243 a.a. y difieren solo por la presencia de una secuencia interna de 46 aminoácidos (Pelka et al. 2008); se ha establecido que para HAdV-36, E1A tiene una longitud total de 253 a.a (Avvakumov et al., 2004).

Muchas de las funciones de E1A se conocen a partir de estudios con HAdV-5 y HAdV-2. Sin embargo, se acepta que las funciones de esta proteína se conservan entre las siete especies de HAdVs debido a la alta similitud entre sus secuencias (Avvakumov et al., 2004).

El gen inmediato temprano *E1a* es el primero en ser transcrito y actúa como transactivador celular al inducir la expresión genética temprana junto con E1B, E2, E3 y E4 y regular la expresión de genes celulares que inducen a las células quiescentes a entrar en la fase de síntesis e inducir las condiciones óptimas para la replicación viral (Modrow et al., 2013). Además, puede interferir con los procesos de división celular y con la regulación de NF- κ B y p53, a través de la interacción directa o indirecta con proteínas celulares (Russell, 2000).

Los productos de *E1a* funcionan como “central o punto de conexión” al unirse y modificar las funciones de muchos genes y proteínas celulares que pueden alterar la transcripción, la regulación epigenética, la localización subcelular, el metabolismo, el control del ciclo celular, la modificación postraduccional, la transformación celular y la apoptosis (Singh et al., 2019; Tessier et al., 2021).

E1A se han relacionado al establecimiento de la persistencia por estimular la progresión del ciclo celular al disociar el complejo Rb105/E2F y así permitir la liberación de E2F que estimula la transcripción de genes virales tempranos e induce a las células a entrar en fase de síntesis del ciclo celular, lo que facilita la producción viral (Zheng et al., 2016).

Otras de las funciones de *E1a*, incluyen la modulación, directa o indirectamente, de la actividad de IFN (Anderson y Fennie, 1987). Además de la activación del gen *hsp70*, que es un factor de crecimiento para células epiteliales y el gen de la tubulina (Modrow et al., 2013).

Cabe resaltar que E1A no tiene capacidad de unión enzimática o específica al DNA por lo que sus funciones las realiza a través de la interacción de sus dominios de las regiones conservadas (CR1 a CR4) con diversas proteínas celulares (Tessier et al., 2021).

A nivel molecular, E1A 13S contiene los cuatro dominios de las regiones conservadas (CRs), por el contrario, 12S carece de CR3 (Gonzalez et al., 2019). Y en particular, en la especie D se encontró que CR3 tiene una longitud de 62 aminoácidos en comparación a otras especies de HAdVs que tienen 46 a.a. (Singh et al., 2019).

El primer blanco celular de E1A que se describió, fue la proteína supresora de tumores de retinoblastoma (pRb), que a través de sus dominios CR1 y CR2, interacciona con el complejo pRb/E2F, liberando E2F, que resulta en la transactivación de genes necesarios para la replicación del DNA viral y la progresión del ciclo celular (Fang et al., 2016; Modrow et al., 2013). Además, se encontró que la acción coordinada de los dominios CR1 y CR2 del E1A, son responsables de la interacción con otras proteínas de la familia de Rb (Rb105 y Rb107) (Modrow et al., 2013).

Por otro lado, E1A (CR1-N terminal) se une al coactivador transcripcional proteína de unión a CREBBP (p300/CBP) (Fang et al., 2016), que es una histona acetiltransferasa (HAT) que regula la expresión de diversos factores de transcripción (Liu et al., 2008) y está relacionada con una mayor expresión de genes que promueven el establecimiento de la respuesta inflamatoria e inmune (Revilla y Granja, 2009), así como, de genes asociados a la supervivencia celular y potencialmente a la persistencia viral (Battagello et al., 2020).

Respecto a lo anterior, se conoce que durante una infección viral se requiere la reprogramación del patrón de expresión génica de la célula para establecer una respuesta antiviral adecuada. Los adenovirus, entre otros, codifican proteínas que pueden influir o interferir con las señales celulares para evadir la inflamación y la respuesta inmunitaria (Revilla y Granja, 2009). Esto último pudiera ser una de las estrategias que algunos virus, como los adenovirus, utilizarían para establecer la persistencia (Kane y Golovkina, 2010).

Incluso, la acción recíproca de E1A con p300/CBP puede llevar a cabo modificaciones postraduccionales, como la acetilación de Lys (H3-K18) (Fonseca et al., 2012; Ip y Dobner, 2020), para modificar la estructura de la cromatina (Revilla y Granja, 2009) y estos cambios pueden ser utilizados por los virus para establecer una infección persistente (Kane y Golovkina, 2010).

Adicionalmente, un estudio filogenético de las secuencias de *E1a* mostró que esta proteína puede ser un buen marcador para asignar en especies a los HAdVs, basado en la concordancia de los análisis de las secuencias de *E1a* con las secuencias del *hexon*, marcador comúnmente empleado (Avvakumov et al., 2014). Este estudio reveló, que motivos de

interacción de proteínas están presentes sin ambigüedades en muchas especies de E1A, lo que sugiere una fuerte presión selectiva para mantener ciertas interacciones proteína-proteína (Avvakumov et al., 2004).

Como se ha mencionado, la infección por HAdVs puede reprogramar el metabolismo. *E1A* y *E4 orf1* son los candidatos para explicar estos cambios al actuar sobre proteínas celulares como p53 e implicar el silenciamiento epigenético de funciones proapoptóticas en la que puede participar la traslocación o desregulación del gen *c-myc* (Kane y Golovkina, 2010; Thorley-Lawson, 2015; Prusinkiewicz et al., 2020). Al respecto, en un estudio realizado en las células A549, que expresan constitutiva la proteína 13S de E1A, se encontró una mayor captación de la glucosa por las células, mediada por una regulación al alza del gen del transportador GLUT3 (Prusinkiewicz et al., 2020).

Además, se ha encontrado que la isoforma 13S de E1A regula positivamente a los genes implicados en la glucólisis y el ciclo de Krebs y al mismo tiempo regula de manera negativa a los genes implicados en la respiración celular, también conocido como efecto Warburg (Tessier et al., 2021; Prusinkiewicz y Mymryk, 2019). De forma interesante, E4orf1 causa un efecto similar sobre la glucólisis aun cuando la célula disponga de las condiciones para realizar un metabolismo oxidativo, que favorece la replicación viral (Thai et al., 2014).

E1A puede regular la expresión de otras proteínas adenovirales, como E4orf1, principal factor viral implicado en la regulación metabólica durante la infección por HAdV-36 Rogers et al., 2008; Dhurandhar, 2013).

E4orf1

La región E4, que por consenso se representa en el mapa genético en su extremo derecho, codifica al menos siete transcritos por empalme alternativo de un pre-RNA, que de acuerdo a la disposición de sus marcos de lectura abiertos (orf) se nombran (E4orf1, E4orf2, E4orf3, E4orf4, E4orf6, E4orf6/ E4orf7 y la proteína putativa E4orf3/E4orf4) (Ip y Dobner, 2020).

El gen *E4* varía en longitud y composición de aminoácidos (diferencias en el contenido de serina y treonina) entre los tipos de virus (Roberts, 2002). Además, en investigaciones con los HAdV-5 y 2, se ha encontrado que esta región es homóloga entre diferentes especies de adenovirus humanos (Tessier et al., 2021).

Las proteínas E4 interactúan con componentes reguladores virales y celulares involucrados en la regulación transcripcional, la exportación de ARNm celulares, la regulación del metabolismo celular, la progresión del ciclo celular, la eficiencia en la síntesis del DNA viral, la transformación oncogénica, la inhibición de mecanismos antivirales como la apoptosis y la reparación del DNA, la señalización celular y las modificaciones postraduccionales (Ip y Dobner, 2020; Prusinkiewicz y Mymryk, 2019). Adicionalmente, se ha encontrado que puede estar relacionada con el tropismo y/o patogenicidad del virus (Roberts, 2002).

E4 es necesaria para la replicación viral. Sin embargo, la expresión de solo una o unas pocas de las proteínas E4 puede compensar la ausencia de las demás. Al respecto, E4orf6 tiene la capacidad de promover la replicación viral sin la participación de las demás proteínas E4 (Weitzman, 2005).

Investigaciones muestran que una de las proteínas E4 inactiva las respuestas de interferón (IFN-I y II) y altera la expresión de muchos genes celulares. Incluso, promueve la formación de heterocromatina, regulando negativamente la expresión génica dependiente de p53 (Vink et al., 2015), ya que como se señaló previamente, los virus utilizan e inducen cambios en la estructura de la cromatina para modular su expresión génica y asegurar la supervivencia de la célula hospedera y evadir el reconocimiento por el sistema inmune para establecer la persistencia (Kane y Golovkina, 2010). Además, las proteínas virales pueden asociarse con la cromatina para controlar la transcripción de sus genes. Es decir, si se asocian con eucromatina la transcripción viral es activa, por el contrario, la transcripción génica viral se reprime cuando se acopla con heterocromatina (Kane y Golovkina, 2010).

Adicionalmente, E4orf1 junto con E4orf4 pueden afectar la entrada a la fase de síntesis del ciclo celular y la producción de viriones (Sangare et al., 2022).

El gen *E4orf1* tiene un papel importante como activador de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) para activar Akt, efecto que estarían involucrado en el bloqueo de la apoptosis y la inducción de la supervivencia celular, estrategia común en la persistencia viral (Mizutani et al., 2005; Linero y Scolaro, 2009; Flint et al., 2015).

Aún más, se ha comprobado su efecto para promover un mejor control de los niveles de glucosa a través de una vía independiente de la insulina; reducir la lipogénesis de *ново*, aumentar la oxidación de los ácidos grasos y potencialmente proteger contra la lipotoxicidad hepática y renal (Afruzza et al., 2020; 2022; Akheruzzaman et al., 2022).

Además, *E4orf1* está presente en el genoma de los tipos de HAdVs de las especies A-E y G, excepto en HAdV-40 y 41 que pertenecen a la especie F (Modrow et al., 2013). Cabe mencionar que, las secuencias de *E4orf1* de los HAdVs muestran una significativa similitud con otras enzimas dUTP pirofosfatasa (dUTPasa) de otros virus y animales (Weitzman, 2005), las cuales tienen actividad de nucleótido hidrolasas que evitan la incorporación errónea del dUTP por parte de la DNA polimerasa durante la replicación y permitir el control del cociente dUTP/dTTP (Chen et al., 2002). Sin embargo, *E4orf1* de adenovirus no poseen actividad enzimática detectable, esta observación sugiere que pudo haber evolucionado a partir de una dUTPasa ancestral, pero indica divergencia funcional (Gutiérrez et al., 2020).

Interesantemente, las dUTPasas se caracterizan por la presencia de dominios PDZ, los cuales son dominios estructurales comunes compartidos por la proteína de densidad postsináptica (PSD-95), el supresor de tumores grandes del disco de *Drosophila* (*Dlg-A*) y la proteína zónula ocludens-1 (ZO-1) (Romero von Zastrow y Friedman, 2011). Algunas dUTPasas funcionan como proteínas de andamiaje citoplasmáticas, facilitadoras de la interacción con proteínas asociadas a la membrana y moléculas de señalización, que a menudo reconocen motivos de aminoácidos cortos en los extremos C-terminal de sus proteínas blanco (Lee y Zheng, 2010).

Las cuatro proteínas PDZ asociadas a *E4orf1* son: multi-PDZ (MUPP1) y tres proteínas de la familia de las guanilato quinasas asociadas a membrana (MAGUK) (Ip y Dobner, 2020).

El estudio de las interacciones del motivo de unión al dominio PDZ (PBM) de las proteínas E4orf1 ha proporcionado importante información que contribuye al esclarecimiento de los blancos celulares de esta proteína y en particular el mecanismo molecular por el cual promueve la proliferación y diferenciación del adipocito (Jiao et al., 2019; Shastri et al., 2018).

En este sentido, el estudio de Gutiérrez y cols. (2020) aportó nueva información sobre la interacción de E4orf1 del HAdV-36 con el dominio PDZ10 de MUPP1, que resultó en la formación de un complejo más estable comparado con los que forma con otras proteínas con dominio PDZ como Dlg-1, MAGI-1, PATJ y ZO-2. Esto, además de ser un blanco para el desarrollo de estrategias farmacológicas contribuye a la comprensión del mecanismo por el cual HAdV-36 promueve la expansión del tejido adiposo (Gutiérrez et al., 2020).

Además, E4orf1 puede regular positivamente la expresión de MYC (oncogén homólogo al de la mielocitomasosis aviar) a través de diversas vías de señalización como la del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la de receptores de insulina (InsR) y factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF1R) o la PI3K y así contribuir al aumento de la glucólisis y la síntesis de ácidos grasos (Prusinkiewicz y Mymryk, 2021).

E4orf1 puede modificar el metabolismo, como se ha mostrado al infectar cultivos de células epiteliales por HAdV-5, que resultó en el aumento de la glucólisis y la glutaminólisis mediada por la activación de *c-Myc* (Thai et al., 2014); en consecuencia, se activaron los genes involucrados en ambas vías metabólicas, en especial los de la vía de las pentosas fosfato que produjo un fenotipo metabólico parecido al efecto Warburg que se observa en el cáncer; este efecto se ha manifestado principalmente para las especies adenovirales C y D.

Sin embargo, en el caso de los adenovirus de la especie F que no contienen E4orf1, podría proponerse que E1A u otras proteínas de los adenovirus, podrían participar en la regulación del metabolismo durante la infección adenoviral (Prusinkiewicz y Mymryk, 2019).

Respecto al HAdV-36, E4orf1 es una proteína de 125 aminoácidos y 17 kDa (Dhurandhar et al., 2011) que muestra una identidad del 92% con las secuencias de aminoácidos de la

proteína E4orf1 del HAdV-9 (ambas ubicadas en la especie D) con una diferencia de solo 10 a.a. (Kumar et al., 2014; Arnold et al., 2010), lo que puede suponer una funcionalidad conservada de esta proteína.

El estudio de la interacción molecular de E4orf1 en los adenovirus humanos tipo 5, reveló su papel como activador constitutivo de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) al interactuar con la subunidad reguladora de PI3K (p85) y activar Akt que a su vez regularía de manera positiva a la proteína serina-treonina-cinasa blanco de la rapamicina (mTOR) para estimular la traducción (Flin et al., 2015), promover la señalización de proliferación (con el HAdV-9) (Frese et al., 2003) y la supervivencia celular al bloquear la apoptosis y además de que pudiera favorecer la supervivencia de la célula (Flint et al., 2015).

Asimismo, E4orf1 del HAdV-36, se ha implicado en la modulación del metabolismo de la glucosa y lípidos *in vivo* e *in vitro* y se le ha relacionado con la obesidad, a través de la acumulación de lípidos en el hepatocito y en la reducción en la producción de glucosa hepática (Mostofinejad et al., 2021; Trovato et al., 2014; Na et al., 2016; Dhurandhar et al., 2011, 2012; Kusminski et al., 2015; Peddibhotla et al., 2019; Shastri et al., 2018; McMurphy et al., 2017; Yoon et al., 2017; Gamage et al., 2019; Akheruzzaman et al., 2020; Afruza et al., 2020); además de que puede reducir la síntesis y acumulación de lípidos en los riñones, a pesar de una dieta alta en grasas (Afruza et al., 2020).

También, se ha encontrado que esta proteína tiene efectos represivos sobre la respuesta inmune (Sangare et al., 2022) y como se ha mencionado, esto podría ser una de las estrategias virales para establecerse de manera persistente (Kane y Golovkina, 2010).

Persistencia viral

La infección persistente permite que los virus se perpetúen en los organismos y en la naturaleza (Nathanson, 2005), esta puede considerarse una relación de ventaja que permite la replicación en un tiempo suficiente para infectar a un mayor número de hospederos y a distintos tipos de células (Oldstone, 2006). Así, un virus puede continuar infectando por meses o años, es decir, más allá del tiempo en el que se esperaría que la acción de la respuesta inmune innata y adaptativa podría eliminar la infección. Por ello, la persistencia

viral es un fenómeno clave para entender la patogenia de algunas enfermedades virales crónicas (Virgin et al., 2009).

Para que un virus cause una infección persistente, se requiere que restrinja su efecto citolítico y evite alterar las funciones vitales de la célula favoreciendo una interacción virus-célula hospedero en equilibrio, que no comprometa la supervivencia y multiplicación celular y que permita la replicación viral a través del control de la respuesta inmune y/o los mecanismos antivirales (Nathanson y Ahmed, 2007; Goic y Saleh, 2012).

Los virus que establecen infecciones persistentes pueden mostrar diferentes patrones que dependen de su ciclo biológico. Algunos virus infectan persistentemente de manera productiva, es decir, producen partículas virales infecciosas, como en el caso del virus de la hepatitis C (Budkowska, 2009) y de los adenovirus (Greber y Flatt, 2019); en cambio otros establecen su persistencia sin liberar viriones, como el virus del herpes simple (Nathanson y Ahmed, 2007).

Habitualmente, los virus citopáticos requieren modular la expresión de sus genes para que la célula blanco sobreviva, además de evitar el reconocimiento inmunológico (Kane y Golovkina, 2010). En cambio, los virus no citopáticos comúnmente, no requieren de modificar la expresión de sus genes, pero atenúan las respuestas antivirales para evitar su eliminación (Nathanson y Ahmed, 2007; Kane y Golovkina, 2010).

Los virus pueden establecer una infección persistente en diferentes tipos de células de uno o más tejidos u órganos (Boldogh et al., 1996), incluso pueden infectar sitios inmunológicamente privilegiados, es decir, donde se evade la vigilancia inmunológica, por ejemplo, los sitios con barreras que limitan el tráfico de linfocitos o donde se expresan pocas o ninguna molécula MHC de clase I (Nathanson y Ahmed, 2007).

Para el caso de los HAdVs las investigaciones muestran que pueden infectar persistentemente las amígdalas, el intestino, el epitelio pulmonar, el tejido linfático, urinario, el SNC (Kosulin et al., 2013) e incluso el tejido adiposo (Ponterio et al., 2015; Dhurandhar et al., 2002).

La prevalencia de las infecciones virales persistentes es un tópico poco estudiado. Se conoce que los virus de DNA muestran una frecuencia alta de infección en poblaciones humanas, cuyo rango puede ir del ~60% (HSV-1), ~80% (CMV, EBV, HAdVs) o >90% (HHV-6, HHV-7, VZV); en contraste, los virus de RNA >1% (HDV, HIV-1 y 2) (Virgin et al., 2009). De forma interesante, algunos análisis muestran que a lo largo de la vida, un individuo puede infectarse persistentemente con 8 a 12 diferentes virus, bajo esta perspectiva y considerando la actual población de ~7500 millones de humanos en el mundo, esto refleja millones de infecciones persistentes, lo que hace reconsiderar, por algunos autores, a éstas infecciones como comunes y parte de nuestro viroma, con la consecuente contribución a nuestro metagenoma y un papel importante en la configuración de la respuesta inmune normal (Virgin et al., 2009; Goic y Saleh, 2012).

Estrategias que comparten algunos virus para establecer la infección persistente *in vitro*
Para que una infección viral se establezca de manera persistente en cultivo, es posible que el virus muestre alguna de las siguientes condiciones: reduzca o no exprese el fenotipo lítico, module o disminuya la transcripción de sus genes, presente variaciones en su genoma, disminuya la producción de partículas virales infecciosas (Nathanson y Ahmed, 2007; Oldstone, 1991), produzca partículas defectuosas o incompletas, las que tienen la capacidad de interferir con la infectividad del virus parental (Mlera et al., 2015; Valdovinos y Gómez, 2003), produzca mutantes termosensibles (Valdovinos y Gómez, 2003; Liu et al., 2008; Stewart y Bach, 2021), o se seleccionen variantes virales con capacidad de replicarse en células que resisten el efecto citopático (Nathanson y Ahmed, 2007).

Además, los virus pueden utilizar mecanismos de represión epigenética, como las modificaciones de la cola de histonas, variantes de histonas alternativas, agregados de proteínas nucleares, para mejorar la replicación viral o la persistencia (Tsai y Cullen, 2020; Virgin et al., 2009; Kane y Golovkina, 2010).

Otras estrategias virales efectivas para la persistencia consisten en infectar células diferenciadas o bien tejidos considerados santuario por su tolerancia inmunológica (Griffin, 2022; Oldstone, 2006).

Ahora bien, por parte de la célula se manifiesta un control de los mecanismos antivirales que inhiben el reconocimiento y eliminación del virus a través de modificar la respuesta al IFN y evitar la actividad de las moléculas de reconocimiento antigénico. Todo esto sin comprometer las funciones vitales de la célula (Oldstone, 2006).

Por otro lado, la infección viral persistente en células de cultivo se puede clasificar en al menos dos tipos: infección en estado acarreador (*carrier-state*) e infección en estado estacionario (*steady-state*) (Ito et al., 2004). En la persistencia en estado estacionario casi todas las células están infectadas y coexiste la replicación viral con la multiplicación celular sin expresar el fenotipo lítico (Frisk, 2001). En la infección viral persistente en estado acarreador, solo una pequeña proporción de células está infectada y produce partículas virales infecciosas extracelulares (infección productiva) que propagan horizontalmente la infección (Ito et al., 2004).

Infección persistente por adenovirus

Los HAdVs tienden a infectar de manera persistente, fenómeno descrito a mediados del siglo XX (Rowe et al., 1953). Entre las especies de los HAdVs, la B (tipos 3 y 7), C (tipos 1, 2 y 5), D (tipos 8, 19 y 37) y E (tipo 4) pueden establecer infecciones persistentes en tejido linfoide de las amígdalas, del intestino (Roy et al., 2011), en el epitelio pulmonar, epitelio de la córnea, tejido cerebral y riñones (Kosulin, 2019; Kosulin et al., 2013; 2016; Kaye et al., 2005; Lion, 2019). Recientemente, el tipo 36 (HAdV-36) se ha propuesto como agente infeccioso potencialmente persistente en el tejido adiposo (Ponterio et al., 2015; Dhurandhar et al., 2002).

La infección persistente por HAdVs por lo común es asintomática (King et al., 2016). Sin embargo, en los últimos años la investigación sobre la persistencia por HAdVs ha cobrado interés debido a su relación con la reactivación viral durante un estado de inmunosupresión severa, como el que acontece durante los trasplantes (Lion, 2019). Aún más, el efecto de ciertos HAdVs sobre la remodelación del tejido adiposo y algunos cambios metabólicos en el hígado y riñón hace suponer que el efecto de la infección viral es a largo plazo. Sin embargo, el mecanismo por el cual los HAdVs pueden establecer una infección persistente no se han aclarado de manera suficiente (King et al., 2016).

Por otro lado, la persistencia del HAdV-36 es factible a partir de los estudios en monos y ratones, que demostraron que durante al menos cuatro meses después de la infección experimental el genoma del virus seguía presente y era posible aislar al virus del hígado, los pulmones, tejido adiposo y los riñones (Dhurandhar et al., 2002; Krishnapuram et al., 2011). Evidencia adicional, son los informes del aislamiento del virus del tejido adiposo de adultos asintomáticos con obesidad (Barrera-Alcocer et al., 2021; Ponterio et al., 2015).

HAdV-36

El adenovirus humano tipo 36, HAdV-36, es un agente infeccioso que se aisló a inicios de los 80's y se clasifica en la especie D de los adenovirus humanos (Wigand et al., 1980). Tres décadas después, se documenta que su genoma tiene una longitud de 35,152 pb, una composición de GC del 57.2% y 39 marcos de lectura abierta. Además, las secuencias de la fibra, el hexon y de E3 (CR1 β , CR1 γ) muestran una divergencia significativa respecto a los demás HAdVs lo que le confiere una baja reactividad cruzada (Arnold et al., 2010).

La seroprevalencia de HAdV-36 se ha investigado en algunos países de América, Europa y Asia oriental en donde se encontró que alrededor del 23% de los adultos y el 29% de los niños y adolescentes mostraron estar infectados de manera natural (da Silva Fernandes et al., 2021).

Asimismo, se ha encontrado que niveles positivos de anticuerpos contra HAdV-36 están presentes en aproximadamente el 30% de los adultos con obesidad y en cerca del 28% de los niños con obesidad (Dhurandhar et al., 2013). Sin embargo, existen investigaciones que muestran muy altas prevalencias de HAdV-36 en individuos con obesidad, como el trabajo realizado en EUA por Laing y cols. (2013) que encontraron seropositividad en el 64% de los adultos estudiados, también está el trabajo de Parra-Rojas y cols. (2013) que reportaron un 73.9% de anticuerpos positivos para HAdV-36 en niños mexicanos con obesidad.

Líneas celulares que se han utilizado para la propagación del HAdV-36

Al momento, se ha reportado que la infección por HAdV-36 puede llevarse a cabo en algunas líneas celulares, como se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Líneas celulares susceptibles a la infección por HAdV-36, origen, tipo celular y autores.

Línea celular	Origen	Tipo de línea	Autor (es)
A549	Humano	Adenocarcinoma de pulmón	Vangipuram et al., 2004; Dhurandhar et al., 2001;2000
Hep2	Humano	Carcinoma epidermoide; tracto respiratorio superior humano	Bouwman et al., 2008; 2009
3T3	Murino	Fibroblastos murinos preadipocitos	Dhurandhar et al., 2000-2004; Atkinson et al., 2005; Vangipuram et al., 2007; Krishnapuram et al., 2013
hMSCs	Humano	células madre o mesenquimales de tejido adiposo humano	Na et al., 2012; Rogers et al., 2008
HeLa	humano	adenocarcinoma	Wigand et al., 1980
HEK 293	humano	Embrionarias de riñón humano	Dhurandhar et al., 2011

Línea celular Vero con potencial para la infección persistente por adenovirus

La línea celular Vero proviene del epitelio renal normal de un mono verde africano adulto de la especie *Chlorocebus sabaues* (Osada et al., 2014). Fue establecida por Yasumura y Kawakita (1962) y está disponible de manera comercial en por lo menos dos colecciones internacionales, la ATCC (del inglés, *American Type Culture Collection*) y la ECACC (del inglés, *European Collection of Authenticated Cell Cultures*) (Genzel y Reichl, 2009; Ammerman et al., 2008).

La línea celular Vero, es de origen epitelial, adherente, continua, que tiene una morfología semejante a fibroblasto (Freshney, 2010). Muestra alta susceptibilidad a la infección por adenovirus debido a que expresa receptores como Coxsackie and Adenovirus Receptor (CAR) (Farkas et al., 2019), CD46 (Gokumakulapalle y Mei, 2016) y ácido siálico (Govorkova et al., 1996; Winter et al., 2006) y co-receptores (integrinas $\alpha\beta3/5$) (Guo et al., 2014).

Además, carece de capacidad para producir IFN-I por tener una delección de genes α y $\beta1$ -IFN (Osada et al., 2014), pero puede responder a muchos genes estimulados por interferón (ISG), que inhiben la replicación viral y promueven la persistencia (Murira y Lamarre, 2016; Hernández et al., 2015).

Hasta lo que conocemos, la replicación de diferentes tipos de adenovirus (1, 2, 5, 11, 12,16, 18) pero no del HAdV-36 se ha probado en cultivos de células Vero (Gokumakulapalle y Mei, 2016; Hasler y Wigand, 1978).

Con el empleo de técnicas de secuenciación masiva paralela del DNA y al análisis del transcriptoma (RNAm-seq), se han identificado 25,877 posibles genes codificantes en estas células (Osada et al., 2014), lo que las convierte en una importante herramienta para obtener un modelo de infección persistente por HAdV-36 que ayude al estudio de los mecanismos moleculares, bioquímicos y genéticos a través de los cuales este adenovirus ejerce su efecto.

Hipótesis

Debido a que el fenómeno de persistencia viral ha sido descrito en varios virus tanto de RNA como de DNA, incluyendo algunas especies de adenovirus (HAdVs) y que durante este proceso ocurren cambios en la producción de proteínas virales claves; entonces, es probable que se presente una expresión diferencial de las proteínas relevantes *E1a* y *E4orf1* del HAdV-36, respecto a un estado agudo de infección viral *in vitro*.

Objetivo

Establecer la infección aguda y persistente con HAdV-36 *in vitro* en una línea celular y comparar la expresión viral de *E1a* y *E4orf1* en ambas etapas.

Objetivos particulares

- 1) Establecer una infección persistente por HAdV-36 en la línea celular Vero.
- 2) Realizar el seguimiento de la infección por HAdV-36 en cultivo celular evaluando la infectividad y la presencia del DNA viral.
- 3) Determinar la localización del antígeno del HAdV-36 en las células infectadas de manera aguda y persistente.
- 4) Evaluar la expresión de mensajeros de *E1a* y *E4orf1* durante la infección persistente y la infección aguda.
- 5) Inmunodetección de proteínas del HAdV-36 utilizando un anticuerpo policlonal anti-HAdV-36.

Materiales y métodos

Células

Se obtuvo la línea celular Vero (ATCC, CCL-81) por donación de la Dra. Rocío Tirado Mendoza, Facultad de Medicina, UNAM. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 6% de suero fetal bovino (SFB) a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂. En adelante, estas condiciones de cultivo se refieren como condiciones estándar. Asimismo, se trabajó con la línea celular A549 (ATCC CCL-185) y la línea celular Hep2 (ATCC CCL-23), que se trabajan comúnmente en el laboratorio; estas células se cultivaron en DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) suplementado con 5% de SFB en las condiciones estándar.

Virus

Una alícuota del virus HAdV-36 (ATCC, VR-1610) el cual se adquirió comercialmente por medio de un proveedor comercial del ATCC (Manassas, VA, USA). El stock viral se obtuvo al crecer el virus en células A549 con DMEM suplementado con 5% de SFB en las condiciones estándar. Posteriormente, el virus se purificó por placa en tres pases consecutivos. A partir de células crecidas en pozos de 9.5 cm² de área (placa para cultivo celular de seis pozos (Corning®, Costar®6) hasta alcanzar una confluencia del 70%, se infectaron con 200 µL de una dilución de virus (1:10,000), por duplicado y usando monocapas sin infectar como control negativo.

Se permitió la adsorción viral por una hora a 37°C con rotación de placa cada 15 min. Al término del tiempo se retiró el inóculo y se cubrieron las monocapas con dos mL de DMEM suplementado con 2% de SFB y 0.5% de agar. Los cultivos se incubaron en condiciones estándar hasta la visualización de las placas. La aparición de las placas se monitoreó cada 24 a 48 h usando un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE300, Japón). Una placa aislada se homogeneizó en DMEM con 2% SFB para preparar 200 µL de suspensión viral con dilución 1:100. A partir de esta suspensión se realizó en dos ocasiones más la purificación del virus siguiendo el mismo procedimiento. El virus purificado se inoculó en células Vero que fueron crecidas en frascos para cultivo T25 (Sarstedt®, Alemania). El cultivo para obtener el stock

viral se incubó durante 11 días. En el sobrenadante (SN) se cuantificó el virus infeccioso extracelular mediante el ensayo de la dosis infectiva al 50% del cultivo celular (TCID₅₀) y se obtuvo un stock con concentración de 10¹² TCID₅₀/mL que se usó en los experimentos.

Obtención del botón celular o pellet a partir de un cultivo en monocapa. Técnica de tripsinización

Las monocapas de células se lavaron dos veces con PBS, enseguida se les adicionó una solución de PBS-EDTA 0.02% que después de un minuto en constante movimiento de vaivén se retiró para adicionar una solución de tripsina 0.025% en PBS-EDTA 0.02% durante un minuto rotando suavemente para facilitar el desprendimiento y disgregación de la monocapa. El redondeamiento celular se confirmó mediante la visualización al microscopio con el objetivo 40X. Inmediatamente, se adicionó tres mL de DMEM, esta suspensión se transfirió a un tubo cónico estéril de polipropileno de 15 mL de capacidad. Para obtener un botón celular se centrifugó a 362 x g/10 min/4°C. Se descartó el SN. El botón celular pudo ser conservado, almacenado o estudiado según los procedimientos que se indican en cada experimento.

Establecimiento de una infección en fase aguda *in vitro* por HAdV-36

Las células Vero (7x10⁵ células) se sembraron en frascos para cultivo T25, por duplicado, y se cultivaron en DMEM suplementado con 6% SFB, en las condiciones estándar hasta alcanzar una confluencia del 70%; luego, el medio de crecimiento se descartó y la monocapa se lavó con tres mL de solución salina amortiguada por fosfatos 1X (PBS) (NaCl 0.14 M, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.46 mM, pH 7.4). Las células se infectaron con el stock de HAdV-36 a una relación de un virus por célula definida como multiplicidad de infección (MOI)=1. El cultivo se incubó a 37°C durante una hora con rotación suave cada 15 min para facilitar la adsorción viral. Transcurrido ese tiempo, se retiró el sobrenadante y se reemplazó con cinco mL de DMEM suplementado con 2% de SFB. Cultivos sin infectar se procesaron de manera paralela como control. Los cultivos se revisaron bajo el microscopio cada 24 a 48 horas para el registro del efecto del virus sobre la morfología celular, es decir, la aparición del efecto citopático (ECP).

Enseguida, se reservó el sobrenadante en el que se cuantificó el virus infeccioso extracelular por ensayo TCID₅₀ (Bullen, Davis, y Looney 2022). Y el botón celular, que se obtuvo por tripsinización, se fraccionó en tres partes, que se utilizaron para comprobar la infección viral mediante la amplificación de un fragmento del gen *E1a* del HAdV-36 empleando la PCR convencional (Strober 2015), realizar ensayos de inmunodetección y el subsecuente pase.

Ensayo TCID₅₀.

La infectividad o infección productiva se analizó mediante un ensayo de punto final para determinar la dosis infectiva al 50% del cultivo celular (TCID₅₀) por dilución seriada. En este trabajo se determinó el virus infeccioso extracelular liberado en los sobrenadantes de los cultivos (Bullen et al., 2022; Sarmiento et al., 1997). Células Vero (1.5 x 10⁴ células/pozo) se sembraron en placas para cultivo de 96 pozos (Corning®, Costar®96) y se crecieron con DMEM con 6% de SFB en condiciones estándar hasta alcanzar el 70% de confluencia; las monocapas se inocularon con el sobrenadante de los cultivos persistentemente infectados, que se clarificó por centrifugación a 1930 x g/10 min/4°C (Sorvall, ST 8R, Thermo Scientific) y fue diluido en serie decimal utilizando DMEM con 2% de SFB, (50 µL/pozo, cuatro réplicas por dilución). Monocapas de células no infectadas se emplearon como control. La placa de cultivo se incubó durante 1h/37°C, con rotación suave cada 15 min. Al término de este tiempo, se retiró el inóculo para reemplazarse por DMEM con 2% de SFB (100 µL/pozo). Los cultivos se incubaron hasta ocho días posinoculación (dpi) en condiciones estándar. Durante este tiempo los cultivos se visualizaron bajo el microscopio invertido (Nikon Eclipse TE300, Japón) cada 24 a 48 h hasta detectar la aparición del efecto citopático (ECP). Entonces, las células se fijaron con formalina tamponada al 10% durante 15 min a temperatura ambiente y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1% durante cinco min. El título viral se determinó por TCID₅₀ utilizando la fórmula de Kärber modificada por Ramakrishnan (2016).

Ensayo de focos de infección

El ensayo de focos de infección es una técnica de inmunotinción con utilidad tanto para la detección de antígenos virales como para la titulación de partículas virales infecciosas antes de que formen placas (Cruz y Shin, 2007). Para ello, células Vero (6 x 10⁴ células) se sembraron en placas de 24 pozos y se incubaron con DMEM 6% SFB, hasta tener el 70% de

confluencia. Se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS. Las células se inocularon por duplicado, con 50 μ L de cada una de las diluciones de los SNs de los países preparadas en DMEM (1:3 a 1:243). Dos pozos se inocularon con 50 μ L de suspensión viral concentrada, como control positivo. Las placas se incubaron a 37°C durante 1.5 h, con movimientos de vaivén cada 15 min. Enseguida, se retiró la suspensión viral diluida (inóculo) y se adicionó 500 μ L de DMEM 5% ASB a cada pozo. Las placas se incubaron durante 48 h. Concluida la incubación se retiró el medio de cultivo, se secaron las monocapas dentro de la cabina de bioseguridad y se procedió a fijar las células con metanol, previamente enfriado a -20°C, durante 15 min, seguido de acetona fría, durante 30 s. Después de dos lavados con PBST_w, se realizó la permeabilización de las células con PBST_T durante 15 min a temperatura ambiente. Luego, las células se bloquearon con 100 μ L de una solución PBST_w-suero de cabra al 10 % durante dos h, a 37 °C. Después de tres lavados con PBST_w, durante 5 min cada lavado, las células se incubaron con 100 μ L de suero hiperinmune de conejo anti-HAdV-36 (pAb) (1:300 en la solución de bloqueo) durante dos horas a 37 °C, rotando continuamente. Enseguida, las células se lavaron tres veces con PBST_w, a intervalos de cinco min cada uno, y se incubaron con 100 μ L de un anticuerpo secundario, anti-IgG (H+L) de conejo producido en cabra conjugado con el cromógeno, peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch, W. Baltimore Pike, EE. UU.), durante dos horas en cámara oscura, a 37°C. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBST_w. La reacción se reveló con 200 μ L de 3', 3'diaminobencidina (DAB), que es el sustrato de la HRP (0.5 mg/mL en buffer Tris 0.05 M, pH 7.6 con 0.3 % de H₂O₂), en la oscuridad a temperatura ambiente, durante 15 min, enseguida se retiró la solución DAB y se adicionó un mL de PBS a cada pozo. Las células se analizaron utilizando un microscopio invertido, con el objetivo 20X (Nikon, Eclipse E600, Japón). Los focos infecciosos se distinguen por el color café marrón que adquirieron por la tinción. Para el cálculo del título se consideró el pozo con la última dilución donde se observaron al menos 100 focos. Para obtener el promedio a un aumento de 20X. Se contaron mínimo 20 campos. Para determinar las unidades formadoras de focos (UFF)/mL se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{UFF/mL} = \frac{(\text{media del número de focos/campo}) (\text{campos/pozo})}{\text{Volumen inóculo (mL)} (\text{factor de dilución})}$$

Dónde, el número de campos por pozo se conoce a partir de área del campo donde contamos las células, para el caso se usó el objetivo de 20X que tiene un área de células contadas por campo de $6.4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ y el área de un pozo de la placa de 24 es $\sim 2 \text{ cm}^2$. Por lo tanto, campos/pozo=313

Visualización de los cambios morfológicos causados por la infección mediante tinciones

Para el seguimiento de la infección se realizaron las tinciones de Giemsa, Hematoxilina-Eosina y rojo oleoso que revelaron cambios morfológicos y depósito de lípidos.

Tinciones para revelar aspectos morfológicos de la infección

Tinción de Giemsa. Células infectadas (6×10^4), sembradas en un portaobjeto previamente sensibilizado con Poli-D-lisina (Chemicon® International, cat. A003E) se incubaron en cámara húmeda por 24 horas. Enseguida, se fijaron con formalina neutra al 10% (Na_2HPO_4 1.3 g, NaH_2PO_4 0.8 g, H_2O 180 mL, formaldehído 37% 20 mL) por 15 min a temperatura ambiente y se tiñeron con una solución Giemsa 1:10 en PBS (solución madre Giemsa: colorante 3.8 g pulverizado, glicerina 250 mL calentar a $62^\circ\text{C}/2\text{h}$, reposar una semana/oscuridad, adicional metanol puro 250 mL, filtrar), durante 20 min. Enjuagar con agua corriente. Montar con gelatina glicerinada (gelatina 10 g, H_2O 60 mL, calentada hasta disolución. Luego se añadió glicerina 70 mL y fenol 1 mL). Bajo el microscopio el citoplasma se visualizó de color rosa y el núcleo de color azul.

Hematoxilina Eosina. Se utilizaron células infectadas (6×10^4) sembradas en un portaobjeto previamente sensibilizado con Poli-D-lisina, las cuales se incubaron en cámara húmeda por 24 horas. Enseguida, se fijaron con formalina neutra al 10% por 15 min a temperatura ambiente. Se retiró el fijador y se tiñeron con solución Hematoxilina-Eosina de Harris por 2 minutos; seguido de un enjuague con agua corriente tibia, un pase por agua amoniacal al 1% y un enjuague con agua corriente. Para el contraste se utilizó eosina la cual se dejó actuar por un minuto. El montaje de la preparación se realizó con gelatina glicerinada. Bajo

el microscopio el núcleo se tiñó de color violeta-azul y el citoplasma en color rosado. Las inclusiones patognomónicas de los adenovirus se distinguieron por ser intranucleares difusas y basofílicas.

Rojo oleoso. Se preparó un stock del colorante Rojo Oleoso (Hycel, México, cat.3225) con 0.2 g de colorante Rojo O que se trituró y se mezcló con 40 mL de propilenglicol y se calentó a 95°C en agitación constante; la mezcla se filtró y se dejó reposar por una noche a temperatura ambiente. Para la solución de trabajo se realizó una dilución del stock en una relación 2:3 con H₂O_d que se filtró inmediatamente antes de usar. Para esta tinción se ocuparon células infectadas (6×10^4) sembradas en un área aprox. de dos cm² del portaobjeto que fue previamente sensibilizado con Poli-D-lisina, las células se incubaron en cámara húmeda por 24 horas. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS (se disolvió a 60°C en agitación y se aclaró con gotas de NaOH 1 M hasta ajustar a pH 7.4) durante 15 min a temperatura ambiente; se retiró el fijador y se tiñeron con una solución de Rojo O/propilenglicol a una concentración final de 0.5% w/v (125 µL/cm² de monocapa) durante 30 min a temperatura ambiente.

Al término de la incubación se realizaron cinco lavados con H₂O_d. Y se contrastó con Hematoxilina de Mayer durante 5 min. Enseguida se montó con gelatina glicerizada (Hope y McLauchlan, 2000). Al microscopio los depósitos de triglicéridos se revelaron por la coloración roja.

Obtención de un suero hiperinmune de conejo anti-HAdV-36

Dos conejos blancos de Nueva Zelanda, machos de 4 meses de edad, se inmunizaron vía subcutánea en el pliegue del cuello, tres veces a intervalos de 21 días con 100 µL de HAdV-36 con un título de 1.5×10^{10} TCID₅₀/mL. La inoculación contenía 400 mg/µL de proteína total. La primera aplicación fue con adyuvante completo de Freund, las dos siguientes con adyuvante incompleto. El suero de conejo se recolectó 14 días después de la última inmunización (Sarmiento et al., 2007). El anticuerpo policlonal (pAb) que se obtuvo en el suero de los conejos se usó para los ensayos de inmunodetección.

Establecimiento de la infección persistente por HAdV-36

Se cultivaron células en frascos para cultivo T25 a una confluencia del 70%, por triplicado y se infectaron a una MOI de 0.5, se incubaron por una hora a 37°C rotando cada 15 min. Transcurrido ese tiempo se retiró el inóculo y se adicionó DMEM con 2% de SFB. Al mismo tiempo se incubaron células sin infectar como control negativo.

Los cultivos infectados se incubaron durante ocho días, a ese tiempo, únicamente se retiró y se conservaron en congelación los sobrenadantes, para posteriormente titular el virus infeccioso, y se reemplazó con medio de cultivo fresco. Entonces, la incubación se continuó durante otros siete días, para así realizar el primer subcultivo, al que nos referimos como pase. Las células del primer pase (a los ~14 dpi), se cultivaron por seis a siete días más, hasta obtener una monocapa confluyente.

El cultivo así obtenido se consideró infectado de manera persistente y fue subcultivado (pases) generalmente cada semana. En cada pase se conservaron en congelación los sobrenadantes y el botón celular que se obtuvo por la técnica de tripsinización. Dos tercios del botón se utilizaron para confirmar qué las células estaban infectadas de manera persistente por HAdV-36 y el último tercio se utilizó para el subsecuente pase.

Los pases sucesivos se mantuvieron con DMEM con 4% de SFB y así se obtuvieron 35 pases de células persistentemente infectadas por HAdV-36, equivalentes a ocho meses posinoculación.

La persistencia del HAdV-36 en cultivo celular se confirmó mediante:

- a) La producción de partículas virales infecciosas liberadas en el sobrenadante mediante la titulación por ensayos TCID₅₀
- b) La presencia del DNA del HAdV-36 en las células de los pases a través de la amplificación de un fragmento del gen *E1a* del HAdV-36, utilizando la PCR convencional
- c) La inmunodetección cualitativa del antígeno viral mediante ensayos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirectas

d) La inmunodetección cuantitativa del antígeno viral por ensayos de citometría de flujo

Además, se determinó la expresión de los ARNm de los genes *E1a* y *E4orf1* mediante RT-qPCR y se reveló la expresión de las proteínas virales mediante inmunoblot.

Detección del HAdV-36 en células de cultivo mediante la amplificación génica

La infección por HAdV-36 en las células de los cultivos se comprobó por PCR. En las células de cultivos se realizó la extracción del DNA total mediante el método de fenol-cloroformo utilizando proteinasa K (Sambrook y Russell, 2001). La concentración del DNA total extraído se determinó por espectrofotometría a una λ (260/280) (NanoDrop One, Thermo Scientific, Madison, WI USA). Y se almacenó a -20°C .

El DNA del HAdV-36 se identificó mediante la PCR convencional utilizando los oligonucleótidos sentido (5'TGAGCAGCAGATGGCTCTAATCTC3') y antisentido (5'GGTCTTCTTCTGAGGGTGATGACTC3'), diseñados por Rathod y cols. para amplificar un fragmento de aproximadamente 320 pb del gen *E1a* (Rathod et al. 2007).

La mezcla de PCR contenía 0.5 μM de cada oligonucleótido, 200 ng/ μL de DNA genómico, MgCl_2 2,5 mM, solución amortiguadora de PCR 1x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4 y KCl 500 mM), dNTPs 0.2 mM y 1.5 U de DNA *Taq* polimerasa (Promega, Madison, WI, EE. UU.).

Las concentraciones de los reactivos se calcularon y ajustaron a un volumen de reacción de 25 μL . La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera: 95°C durante 10 min para la desnaturalización del DNA y la activación de la polimerasa, 40 ciclos a 95°C por 30 seg, 62°C por 20 seg, y 72°C por 30 seg; y un paso final de extensión de 72°C por 10 min. Se utilizó un termociclador Veriti™ de Applied Biosystems™. En cada ensayo se utilizó como control positivo DNA de HAdV-36 concentrado con polietilenglicol (PEG) (112.5 ng/ μL). Como control negativo se utilizaron células no infectadas. Además, se utilizó una mezcla de reacción que no contenía templado como control negativo de la PCR.

Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % para visualizarse mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se analizaron con

un sistema de documentación fotográfica 212 PRO Carestream (Carestream 212 PRO, Gel Logic, Rochester, EE. UU.). Los productos de amplificación de PCR se purificaron con un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Alemania) y secuenciados por un proveedor comercial para confirmar la identidad genética del virus.

Inmunodetección del antígeno viral en las células infectadas, crecidas en cultivo

Detección del antígeno viral por inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Las células de los pases infectados se lavaron con PBS y se desprendieron por tripsinización. Un botón celular se obtuvo tras la centrifugación a $362 \times g/10 \text{ min}/4^\circ\text{C}$ y se descartó el sobrenadante. Las células se sembraron (1×10^4 células en 500 μL de DMEM/pozo) y cultivaron hasta alcanzar la confluencia en portaobjetos de cámara Nunc™ Lab II™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El mismo proceso se siguió para las células no infectadas y células infectadas de manera aguda que se utilizaron como controles. Cuando los cultivos alcanzaron la confluencia, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS frío. En seguida, las células se fijaron con metanol a -20°C durante 5 min y sin dejar secar, se adicionó acetona a -20°C , durante 30 s. Enseguida, las células se lavaron con PBS, se permeabilizaron con PBS-ASB 0.25%/Triton X-100 al 0.2% (PBST_T) durante 10 min, seguido de un lavado con PBS-ASB 0.25% + Tween 20 al 0,2 % (PBST_w) y se bloquearon con PBST_w-suero de cabra al 10 % durante una noche, a cuatro °C. Después de tres lavados con PBST_w, durante 5 min cada lavado, las células se incubaron con 500 μL de suero hiperinmune de conejo anti-HAdV-36 (pAb) (1:300 en la solución de bloqueo) durante la noche en una cámara húmeda oscura, a cuatro °C. Al día siguiente, las células se lavaron tres veces con PBST_w, a intervalos de cinco min cada uno, y se incubaron con 500 μL de un anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado al fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch, W. Baltimore Pike, EE. UU.), en una dilución 1:500 en PBST_w, a temperatura ambiente en cámara húmeda oscura, durante dos horas. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBST_w. Los núcleos se contrastaron con DAPI (4'6-diamidino-2-fenil-indol), para lo cual se utilizó el medio de montaje UltraCruz™ Mounting Medium (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa

Cruz, CA). Las células se analizaron utilizando un microscopio de fluorescencia, con el objetivo 40X (Nikon, Eclipse E600, Japón).

Detección del antígeno viral por inmunoperoxidasa indirecta (IPI)

Las células de cultivos infectados y no infectados se prepararon, propagaron y fijaron como se describió arriba para la detección del antígeno viral. Al término del proceso de fijación se lavó con PBST_w en tres ocasiones y se realizó la inactivación de las peroxidases endógenas, con 200 µL/pozo, de una solución de metanol-H₂O₂ al 3% y se incubó a temperatura ambiente durante 45 min. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de inactivación y se hizo un enjuague rápido con etanol 96°. Luego de tres lavados con PBST_w, a intervalos de cinco min cada uno, las células se permeabilizaron con PBST_T a temperatura ambiente, durante 10 min, seguido de un lavado con PBST_w. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, se realizó el bloqueo con PBST_w-suero de cabra al 10 % durante una noche, a cuatro °C. Se continuó, con tres lavados con PBST_w, durante 5 min cada lavado. Después, las células se incubaron con 500 µL de suero hiperinmune de conejo anti-HAdV-36 (pAb) (1:300 en la solución de bloqueo) durante la noche en una cámara húmeda oscura, a cuatro °C. Se continuó, con tres enjuagues empleando PBST_w (cada uno durante cinco min). Enseguida, las células se incubaron con 500 µL de una dilución 1:500 en PBST_w de un anticuerpo secundario, anti-IgG (H+L) de conejo producido en cabra conjugado con el cromógeno, peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch, W. Baltimore Pike, EE. UU.), durante dos horas en cámara oscura, a 37°C. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBST_w. La reacción se reveló con 3', 3'diaminobencidina (DAB), que es el sustrato de la HRP (0.5 mg/mL en buffer Tris 0.05 M, pH 7.6 con 0.3 % de H₂O₂), en la oscuridad a temperatura ambiente, durante 15 min, seguida de la contratinción con hematoxilina de Mayer. Las células se analizaron utilizando un microscopio invertido, con el objetivo 40X (Nikon, Eclipse E600, Japón).

Detección cuantitativa del antígeno HAdV-36 por citometría de flujo

Suspensiones celulares con una concentración de 10⁶ células en 200 µL de PBSA se prepararon a partir de botones celulares de los pases infectados de manera persistente,

cultivos infectados en fase aguda y cultivos no infectados en microtubos cónicos, previamente tratados con PBSA.

Las células se fijaron con 800 μ L de metanol, previamente enfriado a -70°C , gota a gota, cuidando de observar la formación de dos fases. Luego, se homogeneizó con movimientos circulares suaves. Y, se incubaron en agitación por balanceo durante 15 min, a cuatro $^{\circ}\text{C}$. Después, se centrifugaron a 1 200 x g durante cinco minutos, a cuatro $^{\circ}\text{C}$ y cuidadosamente, se aspiró el SN. Las células se re-suspendieron y lavaron, por una sola vez, con 500 μ L de PBSA frío y se centrifugaron a 1,200 x g durante cinco min, a cuatro $^{\circ}\text{C}$. Después de retirar el sobrenadante se permeabilizaron con 350 μ L de una solución PBS/Tritón X100 al 0.2% para mantenerlas en incubación a temperatura ambiente, durante 15 min. Luego, se centrifugaron a 1200 x g durante cinco min, a cuatro $^{\circ}\text{C}$ para retirar el SN. Para el bloqueo se adicionó 500 μ L de una solución hecha con suero de cabra inactivado diluido en PBS/Tritón X100 al 0.002%, en una relación 1:2 y se mantuvieron en agitación, protegidas de la luz, toda la noche, a cuatro $^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, se adicionó el anticuerpo primario (suero hiperinmune de conejo anti-HAdV-36) en una relación 1:300 respecto a la solución de bloqueo y se incubaron durante la noche protegidos de la luz, a cuatro $^{\circ}\text{C}$. Después de centrifugarlas y se realizar tres enjuagues empleando PBST_w se incubaron con 600 μ L de una dilución 1:500 en PBST_w de un anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado al fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch, W. Baltimore Pike, EE. UU.), a 37°C , protegidos de la luz, en agitación por vaivén, durante dos horas. Finalmente, las células se re-suspendieron en 1,000 μ L de PBSA y se adquirieron usando un citómetro FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE. UU.) y se analizaron con el software FACSDIVA 6.1.3 (Becton Dickinson). Para cada muestra, se adquirieron al menos 10,000 eventos. Se usó pAb de control emparejado con isotipo marcado con fluorocromo para determinar la tinción de fondo. Células Vero infectadas a los 14 dpi se usaron como control positivo.

Expresión de los ARNm de los genes *E1a* y *E4orf1* del HAdV-46 por RT-qPCR

Con las células obtenidas de los pasajes y de cultivos infectados de manera aguda se preparó para cada una de las muestras un lisado para la extracción de RNA total (ARN_T) empleando el método por isotiocianato de guanidina con el reactivo Trizol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). El RNA_T se cuantificó y se analizó en su calidad mediante mediciones espectrofotométricas (NanoDrop One, Thermo Scientific, Madison, WI USA). El DNA complementario se sintetizó a partir de 2 µg de RNA_T usando Oligo dT y la enzima transcriptasa inversa recombinante del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV RT) (Promega, Madison, WI, EE. UU.). La amplificación se realizó mediante SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y el sistema QIAquant 96 (Qiagen Ca, USA). Se utilizaron los siguientes pares de oligonucleótidos:

Para *E1a* Fw 5' AGATGCCCATGATGACGACC-3 y Rv 5' GCCTTGACTGGCTCGGTAG3', los cuales generan un producto de 320 pb, mientras que para *E4orf1*, Fw 5' CCAGGAAGGGGCTAGCAATA3' y Rv 5' AAT CAC TCT CTC CAG CAG CAG G3', el amplicón obtenido tuvo una longitud de 138 pb; como control de expresión se amplificó un segmento de 420 pb del gen de la α -tubulina, utilizando los oligonucleótidos Fw 5'-CAGATGCCAAGTGACAAGAC-3' y Rv 5'-ACTCCAGCTTGGACTTCTTG-3'.

Los protocolos de amplificación que se estandarizaron para los genes virales *E1a*, *E4orf1* y del control del gen celular endógeno de la α -tubulina fueron 95°C por 10 min de desnaturalización inicial, por un ciclo, seguido de 45 ciclos de 95°C por 30 s, después 60°C por 30 s y termina a 72°C por 30 s. Además, un ciclo de 72°C por 7 min y un ciclo de enfriamiento durante 5 min a 40°C.

La expresión génica relativa se calculó mediante el método comparativo $\Delta\Delta C_t$ (donde C_T es el ciclo de umbral) para determinar el aumento de veces en la expresión de los genes de las células infectadas de manera persistente y las células infectadas en la fase aguda, normalizadas a la expresión de α -tubulina. Los resultados se graficaron como el promedio de tres experimentos independientes (Livak y Schmittgen, 2001).

Expresión de proteínas virales por inmunoblot

A partir de botones celulares de los cultivos se realizó la inmunodetección de proteínas por los métodos de SDS-PAGE y *Western blot*. Los extractos de proteína se prepararon a partir de 3×10^6 células/mL en 160 μ L de amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 140 mM, Tritón X100 1%, deoxicolato de sodio 0.5 %) que contenía el inhibidor de proteasas (1X) (Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche) en una relación 1:10. Se homogeneizó (Vortex Genie 2, Scientific Industries) y se incubó sobre hielo durante 10 min. Se centrifugó a $14\ 000 \times g/5$ min/ 4°C . Las proteínas contenidas en el SN se cuantificaron por el método de Bradford (BioRad).

Para desnaturalizar las proteínas se adicionó tres μ L de buffer de carga (6X) (Tris-HCl 0.375 M pH 6.8, glicerol 60%, azul de bromofenol 0.03%, SDS 10%, ajustar con H_2O a un volumen final de 25 mL; 91 μ L de buffer + 9 μ L de β -mercaptoetanol) para obtener un volumen final de 18 μ L, que se calentó a $90^{\circ}\text{C}/5$ min. La separación por electroforesis se realizó en geles SDS-poliacrilamida en condiciones reductoras cargando 40 μ g de proteína en 15 μ L/carril de cada muestra y 10 μ L del marcador de PM. Utilizamos el sistema Mini-Protean[®]TGX[®] Precast Gels 4-20% con el buffer de corrida (Tris-Glicina, pH 8.4, frío). El corrimiento electroforético a 80V, se realizó por tres h. Enseguida, se realizó la transferencia a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Immun-Blot[™] PVDF Membrane, BioRad) en una cámara de transferencia húmeda (buffer transferencia Tris-Glicina-metanol, pH 8.3) que se colocó en el refrigerador durante una noche con una corriente de 20 V

Al día siguiente, se verificó la transferencia de proteínas a la membrana mediante la tinción con Rojo Ponceau S. La membrana se lavó con buffer TBST (10 mM Tris base pH 7.6; 0.15 M NaCl, 0.05% Tween20) y se bloqueó con leche baja en grasa al 5% en buffer TBST, en agitación durante dos h a temperatura ambiente.

Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con TBST y se incubó con el anticuerpo policlonal que se produjo en el laboratorio (1:100 en la solución de bloqueo) durante una noche, a 4°C . Al día siguiente, se le realizaron tres lavados, durante 5 min cada uno, con TBST. Para incubar con el anticuerpo secundario anti-IgG (H+L) de conejo producido en

cabra acoplado a HRP (1:500 en TBST). Al término de la incubación, se realizaron tres lavados, durante 5 min cada uno, con TBST. La reacción de inmunodetección se reveló con DAB. Las imágenes se analizaron con el software GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com).

Resultados

Permisividad de las células Vero a la infección por HAdV-36

La infección por HAdV-36 con MOI=1 en las células Vero se monitoreó cada 24 a 48 horas para registrar el efecto citopático, que se visualizó en inicio a los ocho dpi y llegó a la destrucción celular a los 14 dpi (Figura 3). Una infección aguda productiva se detectó por la presencia de virus infeccioso en el sobrenadante de los cultivos infectados de manera persistente. El título viral fue de 10^{12} TCID₅₀/mL a los 14 dpi. Además, en las células del cultivo persistentemente infectado se confirmó la presencia del DNA viral por el producto de amplificación de 320 pb que corresponde a un fragmento del gen *E1a*, y de que la inmunodetección por IFI e IPI resultó positiva para el antígeno viral expresado en las células persistentemente infectadas (Figura 4).

La infección de cultivos de células A549 y Hep2 que se utilizaron como control positivo de la infección aguda reveló que el HAdV-36 desarrolla un franco ECP con destrucción celular (con una MOI de uno) ~5 dpi (Figura 5), esto es cerca de tres veces más rápido que el tiempo en el que aparece la destrucción celular en las células Vero. Los títulos virales en A549 y Hep2 a los 5 dpi fueron de $10^{15.5}$ TCID₅₀/mL y 10^{13} TCID₅₀/mL, respectivamente.

Figura 3. Efecto citopático por HAdV-36 en células Vero

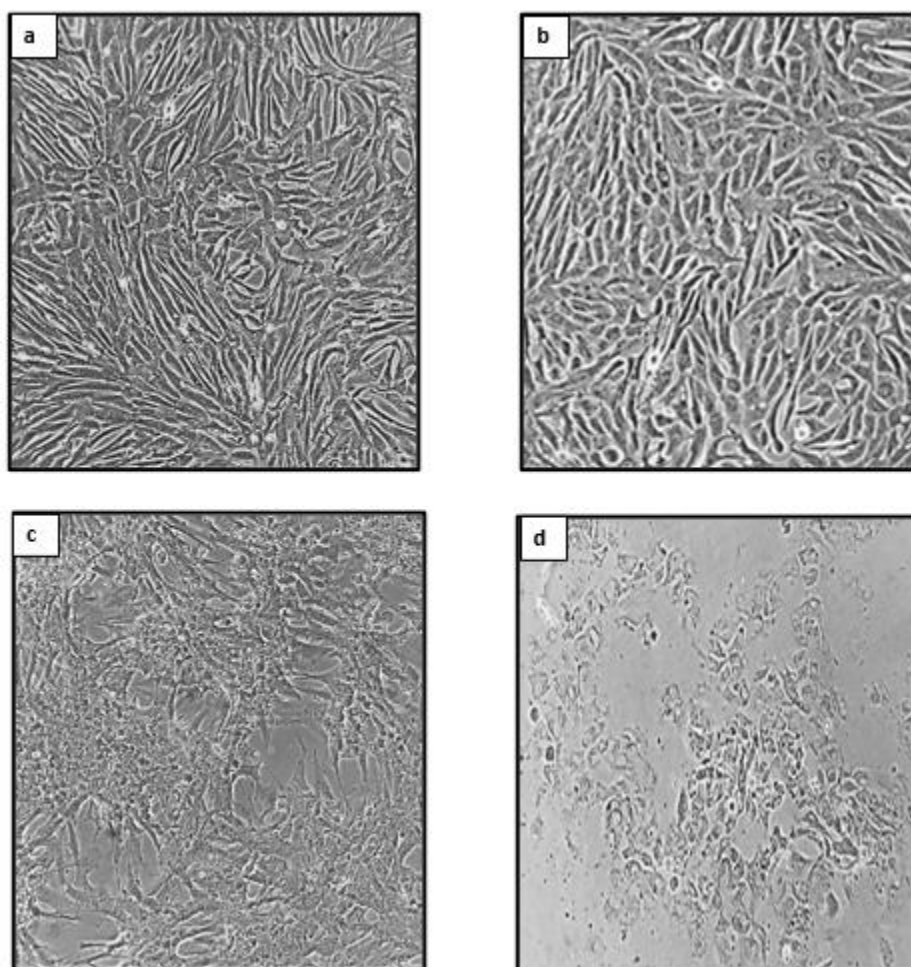


Figura 3. Infección en fase aguda (MOI=1) por HAdV-36 en cultivo de células Vero. a) Células sin infectar; b) ECP a 5 dpi; c) ECP a 8 dpi; d) ECP 14 dpi. Imágenes adquiridas por microscopía invertida, objetivo 10X. ECP: efecto citopático; dpi: días posinoculación; MOI: multiplicidad de infección.

Figura 4. Detección del DNA y antígeno viral en las células Vero infectadas de manera aguda

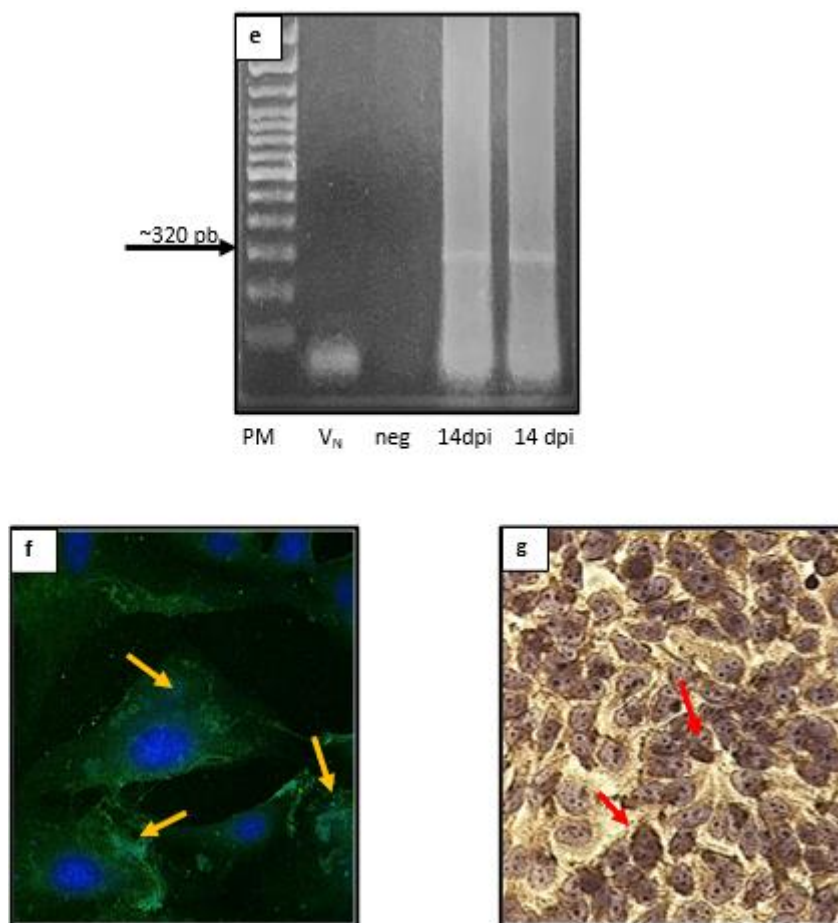


Figura 4. Panel superior: **Células Vero en cultivo portan el DNA**. La electroforesis de los productos de amplificación de un fragmento del gen *E1a* por PCR muestra un producto de ~320 pb de longitud que confirma la infección por HAdV-36. e) carril 1 PM; carril 2 células sin infectar (V_N); carril 3 control negativo de la PCR; carril 4 y 5 células de cultivos a los 14 dpi.

Panel inferior: **Células Vero infectadas de manera aguda mostraron un patrón positivo para el antígeno del HAdV-36 utilizando inmunoensayos**. f) La inmunofluorescencia indirecta reveló al antígeno viral con la marca verde fluorescente (FITC) que está señalada por las flechas. La contratinción con DAPI permitió visualizar a los núcleos (azul). Imágenes adquiridas por microscopía confocal a 400X; g) Las flechas indican algunas células positivas a la inmunoperoxidasa (café-marrón, revelado por DAB) que detecta al antígeno viral. Se utilizó hematoxilina de Mayer para contrastar a los núcleos (azul-gris). Imagen adquirida con microscopio invertido, objetivo 20X.

Figura 5. Efecto citopático por HAdV-36 en células A549 y Hep2

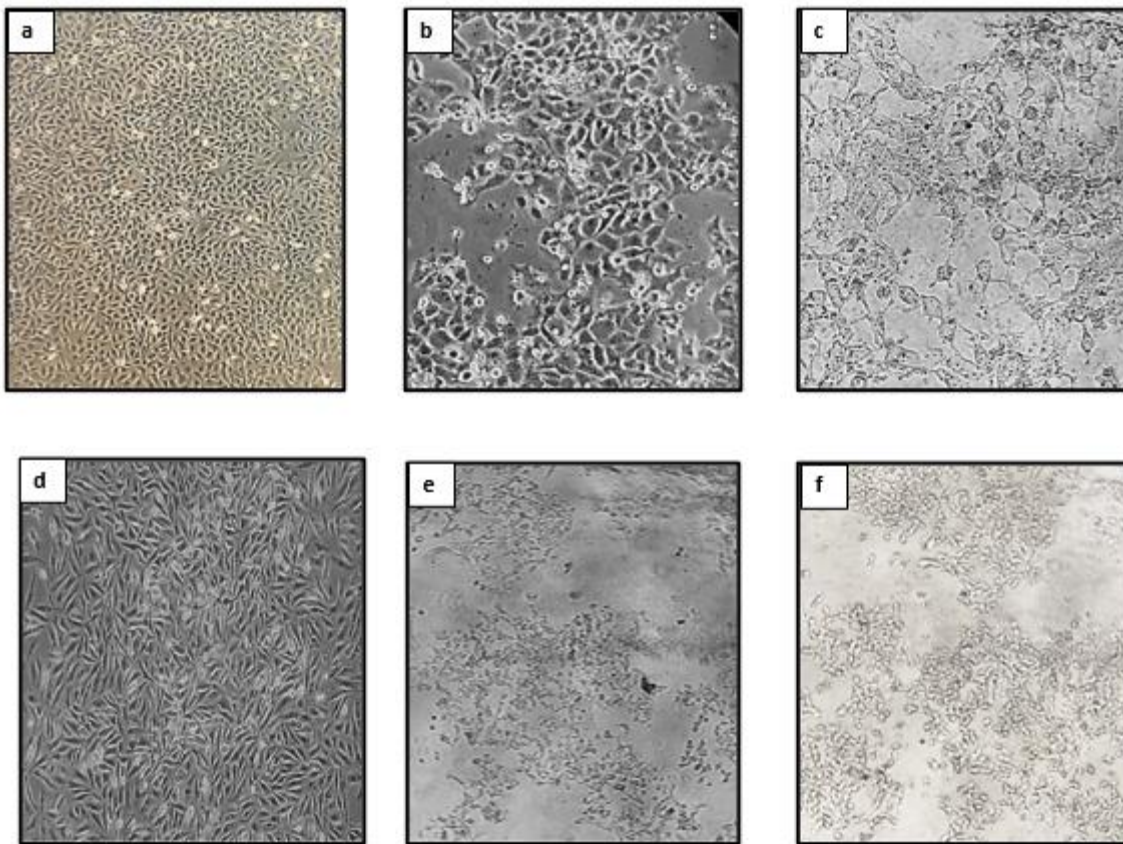


Figura 5. **Infección en fase aguda (MOI=1) por HAdV-36 en células de cultivo.** a) A549 células sin infectar (4X); b) A549 ECP a 3 dpi (10X); c) A549 ECP a 5 dpi (20X); d) Hep2 células sin infectar (20X); Hep2 ECP a 4 dpi (4X); Hep2 ECP a 5 dpi (4X). Imágenes adquiridas por microscopía invertida. ECP: efecto citopático; dpi: días posinoculación; MOI: multiplicidad de infección

**Figura 6 . Efecto de la infección por HAdV-36 en células Vero
revelada por tinciones**

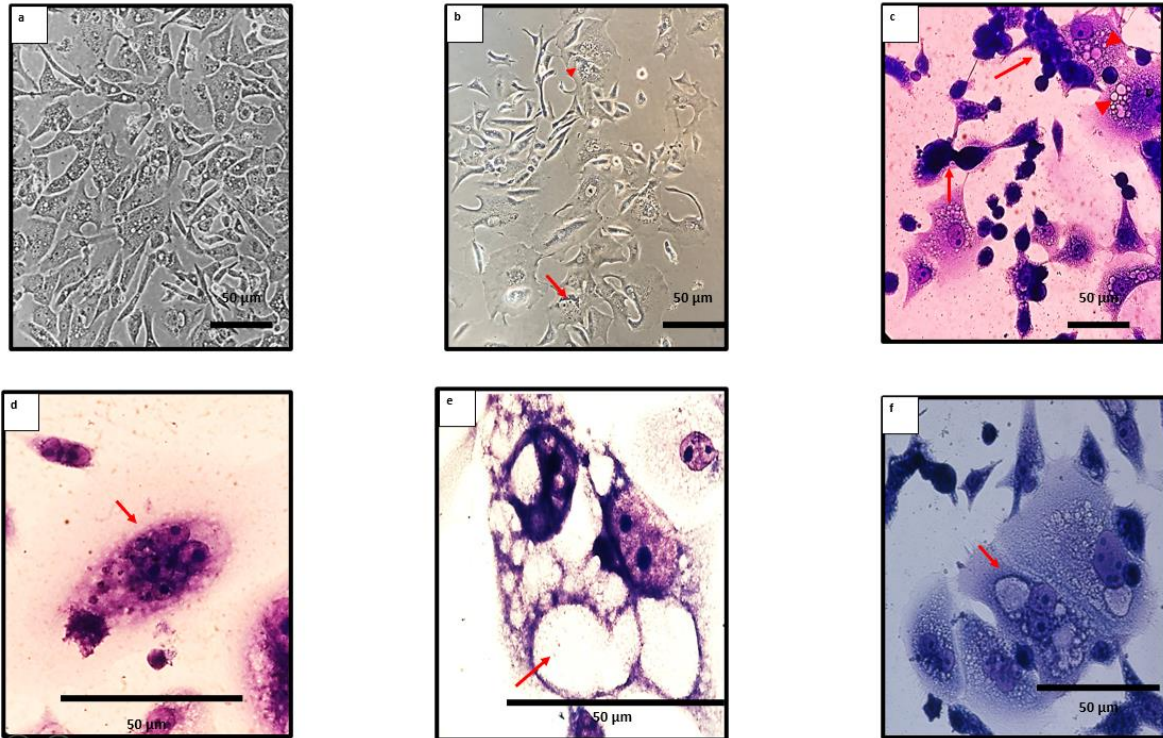


Figura 6. Células Vero infectadas de manera aguda por HAdV-36 (14 dpi). a) Algunas alteraciones morfológicas que incluyen hinchazón nuclear, fusión celular y vacuolas (objetivo 20X); b) granulaciones perinucleares indicadas por la flecha y un pequeño sincitio señalado por cabeza de flecha (objetivo 20X); c) ECP revelado por tinción Giemsa, flechas señalan grupos de células redondeadas, cabeza de flecha indica vacuolización en el citoplasma (objetivo 40X); d) detalle magnificado de imagen (40X) que muestra una discreta sincitio indicado por flecha; e) flecha señala vacuola en un detalle magnificado de imagen 40X; f) célula central muestra vacuolas (flecha) y cariorexis. Imágenes adquiridas por microscopía invertida. ECP: efecto citopático; dpi: días posinoculación

Figura 7 . Inclusiones patognomónicas de la infección por adenovirus reveladas por tinción con Hematoxilina-Eosina

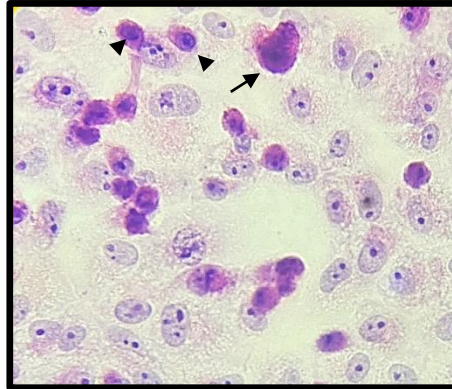


Figura 7. **Células Vero infectadas de manera aguda por HAdV-36 (14 dpi)**. Algunas células Vero teñidas por HE muestran inclusiones intranucleares basófilas (cabeza de flecha), que también pueden presentarse como cúmulos difusos (flecha). Las inclusiones de este tipo son compatibles con la infección por adenovirus. Imágenes adquiridas por microscopía de campo claro (objetivo 40X). HE: hematoxilina-eosina; ECP: efecto citopático; dpi: días posinoculación

Figura 8 . Vacuolas en células Vero teñidas por Rojo Oleoso

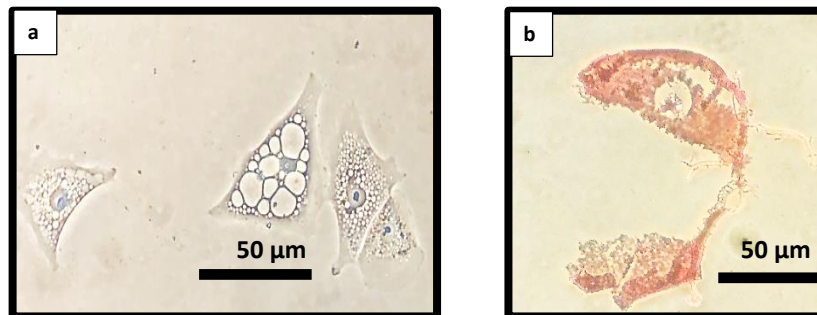


Figura 8. **Algunas células de un cultivo de células Vero infectado de manera aguda (14 dpi) muestra reacción positiva a la tinción de Rojo Oleoso.** a) Células sin teñir; b) Células Vero teñidas por Rojo Oleoso. Sugiere la detección de gotas de lípidos en las células. Imágenes adquiridas por microscopía invertida, detalles de las imágenes adquiridas con el objetivo 40X.

Establecimiento de la infección persistente por HAdV-36 en cultivo de células Vero

La infección con MOI de 0.1, 0.3 y 0.5 fueron probadas, con los dos primeros índices no se obtuvo evidencia de infección, utilizando los ensayos TCID₅₀ y por PCR, y solo un cultivo de células Vero, infectadas de manera persistente por HAdV-36 se obtuvo al inocular con MOI de 0.5.

El control de la infección al retirar el sobrenadante a los ocho dpi (título viral 10^{9.2} TCID₅₀/mL) permitió la supervivencia de una parte de la población celular y la replicación viral (Figura 7) y así se obtuvo un cultivo 14 días después de la inoculación. A este tiempo, se realizó el primer subcultivo o pase y se encontró que las células supervivientes continuaron su multiplicación para formar una monocapa confluyente a los ~20 dpi, es decir, entre seis y siete días después del pase.

A partir de entonces, se realizaron pases semanales y se han obtenido 35 subcultivos infectados de manera persistente por HAdV-36, que corresponde a mantener a la infección durante casi ocho meses.

También, encontramos que las células de los cultivos persistentes requirieron de 72h de incubación para alcanzar la confluencia, mientras que, los cultivos de células sin infectar alcanzaron una densidad celular del 100% entre las 24 y 48 h. La morfología de las células infectadas de manera persistente, a más de 50 dpi, fue casi idéntica a la de las células no infectadas. Pero, ocasionalmente mostrando la formación de pequeños sincitios y granulaciones perinucleares (Figura 8).

Figura 7. Infección por HAdV-36 a baja multiplicidad de infección

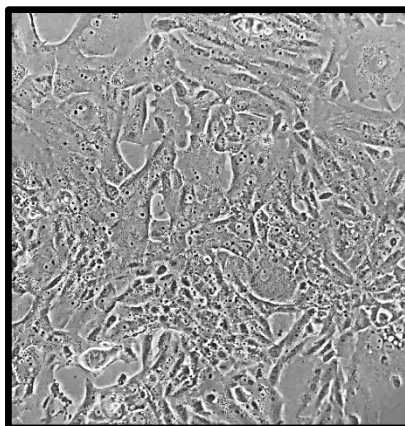


Figura 7. Una baja MOI permitió la presencia del virus y la supervivencia celular. Células que portaban el virus mantuvieron la infección a largo plazo. Imagen muestra células Vero infectadas a una MOI de 0.5 por HAdV-36 a los 14 dpi. Imagen adquirida por microscopía invertida objetivo 10X. dpi: días posinoculación.

Figura 8. Infección persistente por HAdV-36

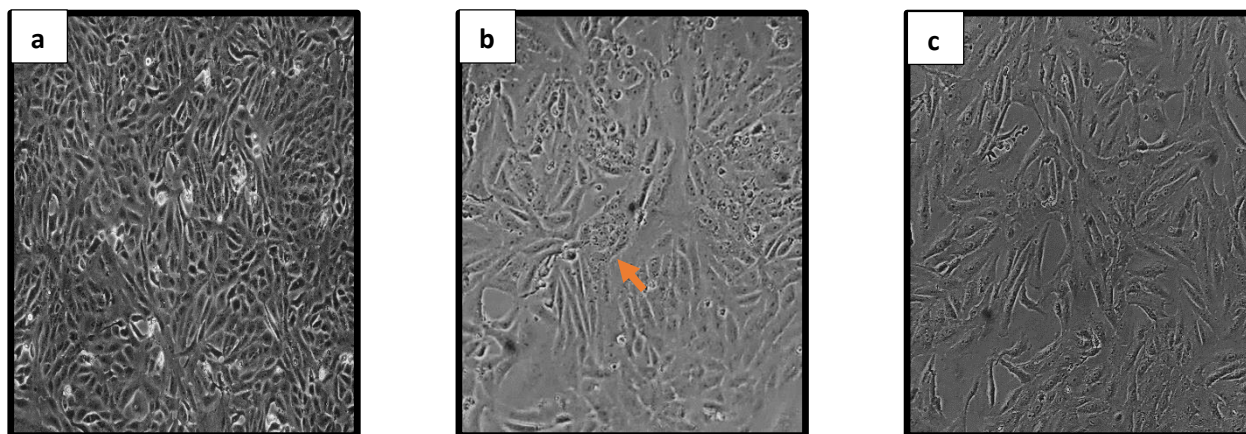


Figura 8. El HAdV-36 al infectar de manera persistente no causa la destrucción destrucción celular. a) Células sin infectar; b) Células infectadas a los 55 dpi, pase 8, flecha indica una discreta fusión de células; c) Células a los 191 dpi, pase 28. Imagen adquirida por microscopía invertida; dpi: días posinoculación.

HAdV-36 desarrolla una infección persistente productiva

Se estableció un cultivo de células Vero persistentemente infectadas por HAdV-36 utilizando una MOI de 0.5. La infección persistente se ha mantenido con producción de virus infeccioso en el sobrenadante celular. Los pases infectados a largo plazo tuvieron títulos virales que oscilaban entre 1×10^4 y 1×10^6 TCID₅₀/mL, esto fue aproximadamente la mitad del título que se encontró en la infección a 14 dpi ($10^{10,5}$ TCID₅₀/ml) (Figura 9a).

Asimismo, la infección persistente produjo un título viral a los 14 dpi 10X menor ($10^{10,5}$ TCID₅₀/mL) que el título que se produjo a una MOI de uno (10^{12} TCID₅₀/mL). Lo que permitió una viabilidad celular 24% mayor en los cultivos infectados a una MOI de 0.5 (66%) que los infectados a una MOI de uno (50%).

Figura 9. Persistencia del HAdV-36 en células Vero

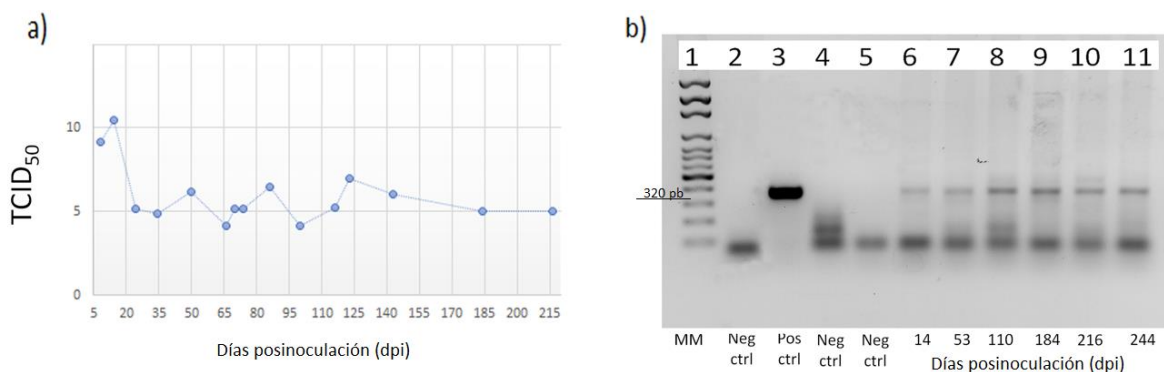


Figura 9. **Cultivos persistentemente infectados por HAdV-36.** a) La infectividad del virus se comprobó mediante la titulación de partículas infecciosas extracelulares en diferentes pases. b) Las células de los cultivos infectados de manera persistente portaron el DNA viral. Electroforesis de los productos de la PCR. Longitud de 320 pb. Carril 1: marcador peso molecular; carril 2: reacción sin templado; carril 3: control positivo de DNA concentrado con PEG; carriles 4 y 5: productos de amplificación de cultivos sin infectar; carriles 6 al 11 productos de amplificación de diferentes pases del cultivo persistentemente infectado.

El ensayo de focos de infección reveló a los antígenos del HAdV-36 en células infectadas

Con el ensayo de focos de infección fue posible tanto revelar la presencia de los antígenos virales como confirmar la producción de virus infeccioso en los diferentes pases. La

especificidad de la prueba se apoyó en la utilización del anticuerpo policlonal producido en nuestro laboratorio. Las células infectadas se visualizaron un segundo anticuerpo acoplado a la peroxidasa de rábano que se oxidó con la diaminobencidina produciendo precipitados insolubles de color café/marrón. Las unidades formadoras de focos de infección en los cultivos infectados de manera persistente en los que se probó tuvieron un título que osciló entre 10^4 a 10^6 UFF/mL.

Figura 10. Ensayo de focos de infección una inmunotinción que apoya en la detección de virus infeccioso y la expresión de los antígenos del HAdV-36 en cultivo de células Vero

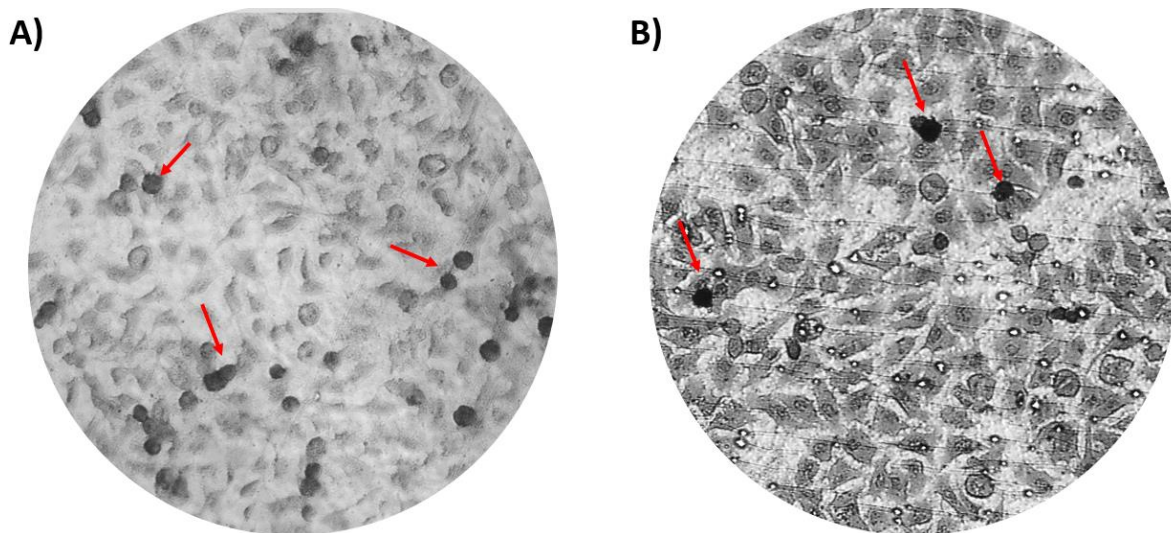


Figura 10. Ensayos de focos de infección realizados en sobrenadantes de los cultivos infectados por HAdV-36 muestran la presencia de virus infeccioso basados en la reacción positiva a la inmunoperoxidasa. A) Células infectadas a los 14 dpi, flechas indican algunas células con inmunodetección positiva; B) Células a los 237 dpi. Imagen adquirida con un microscopio invertido objetivo 20X. dpi: días posinoculación.

El DNA del HAdV-36 está presente en las células infectadas de manera persistente

Mediante la amplificación de un fragmento del gen *E1a* del HAdV-36 por la PCR punto final se confirmó que células de cultivo infectado persistentemente portaban el ácido nucleico viral. La electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mostró un producto de la amplificación de un tamaño aproximado a los 320 pb que corresponde al producto del gen *E1a*, que se

investigó en los lisados de los pases de ≥ 20 dpi a 200 dpi o más. Resultados representativos de la PCR en los pases infectados de manera persistente a 53-, 110-, 184-, 216- y 244 dpi se muestran en la Figura 9b.

Antígenos del HAdV-36 se expresan en las células Vero infectadas de manera persistente

A lo largo del estudio, las células de los pases de cultivos infectados de manera persistente mostraron un patrón positivo heterogéneo para la inmunodetección del antígeno del HAdV-36 por inmunofluorescencia (Figura 11) e inmunoperoxidasa indirectas (Figura 12). Por lo tanto, se determinó la expresión del antígeno viral por citometría de flujo utilizando un anticuerpo policlonal (suero hiperinmune de conejo anti-HAdV-36 producido en nuestro laboratorio) y un anticuerpo secundario conjugado con FITC, como se indica en métodos. El porcentaje de células que expresaron el antígeno viral fue 38% más bajo en las células infectadas de manera persistente (50.5%) que en las células infectadas de manera aguda (81.9%) como se muestra con los histogramas que representan algunos de los experimentos del pase con infección persistente a los 216 dpi, comparado con la expresión en células con infección aguda (14 dpi) Figura 11.

Figura 11. Expresión del antígeno viral en células Vero

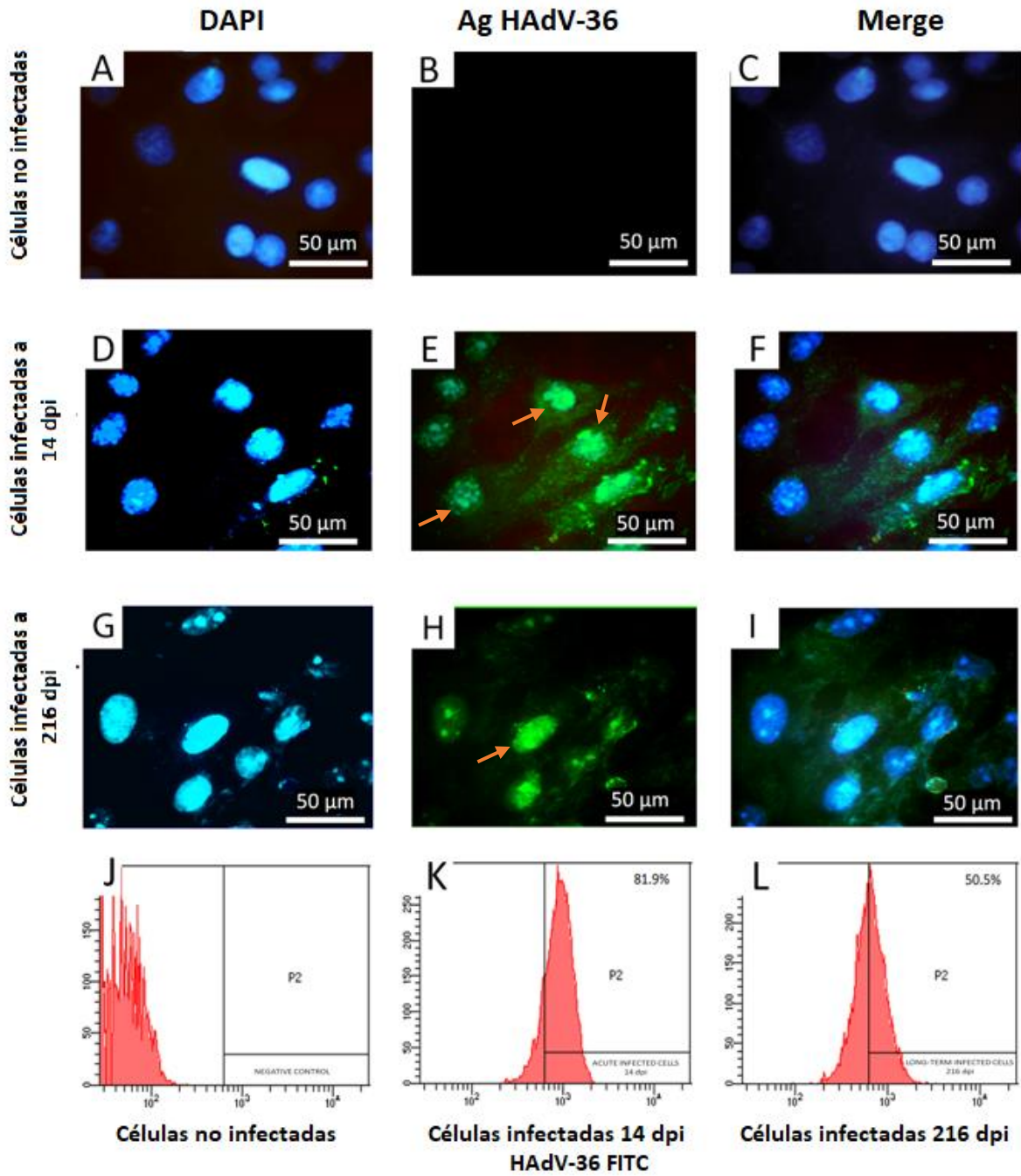


Figura 11. **Cultivos persistentemente infectados por HAdV-36 expresan el antígeno viral.** Panel 1: Análisis representativo de la inmunofluorescencia de células Vero utilizando el anticuerpo policlonal anti-HAdV-36 producido en nuestro laboratorio a una dilución 1:300 combinado con conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-IgG de conejo producido en cabra (marca verde fluorescente). Los núcleos en color azul por contraste con DAPI. Las flechas indican la presencia de gránulos gruesos en las células infectadas. Imágenes adquiridas por microscopía confocal 40X.

Panel 2: El análisis cuantitativo de la expresión del Ag viral mediante citometría de flujo reveló que cultivos infectados de manera persistente por HAdV-36 muestran un patrón de expresión heterogéneo. Lo que es compatible con la infección persistente en estado de portador. Ensayos representativos a 216 dpi expresaron 38% menos el Ag viral en comparación con células infectadas de manera aguda (14 dpi).

Figura 12. Expresión del antígeno viral en células Vero

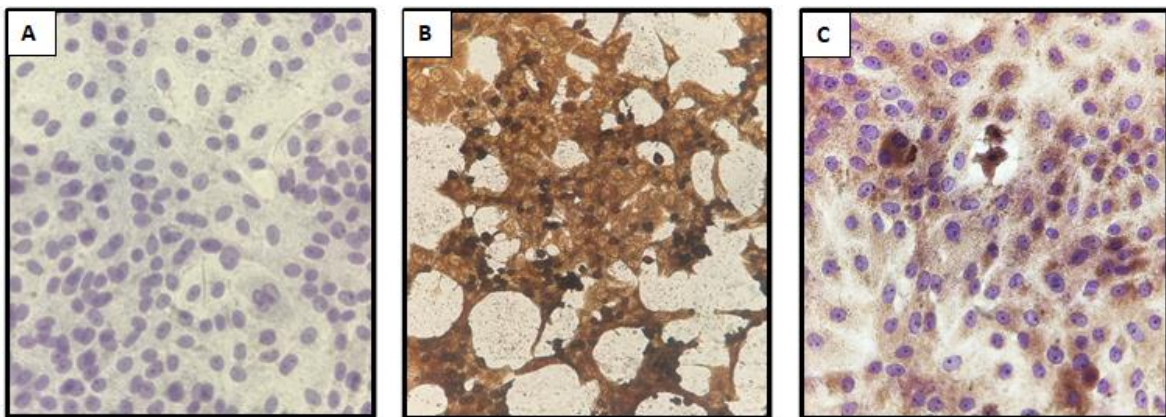


Figura 12. **La inmunodetección utilizando la reacción de inmunoperoxidasa indirecta (IPI) revela la expresión del antígeno del HAdV-36 en células Vero.** A) Células Vero sin infectar; B) Células de un cultivo infectado de manera aguda, 14 dpi; C) Células persistentemente infectadas a 100 dpi. Imágenes adquiridas por microscopía invertida objetivo 20X, dpi: días posinoculación.

En la infección persistente por HAdV-36 la expresión de los genes *E1a* y *E4orf1* muestran una expresión diferencial respecto al estado agudo de infección

En células infectadas de manera persistente, se encontró una baja expresión relativa de *E1a* (Figura 13a), en contraste para *E4orf1*, se observó una expresión hasta 10 veces mayor, respecto a la infección aguda, con una disminución de la expresión después de 53 dpi (Figura 13b). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las proporciones de los ARNm en pases de células infectadas persistentemente más allá de 53 dpi.

Figura 13. Expresión de los mRNA de *E1a* y *E4orf1* en cultivos de células Vero infectadas por HAdV-36

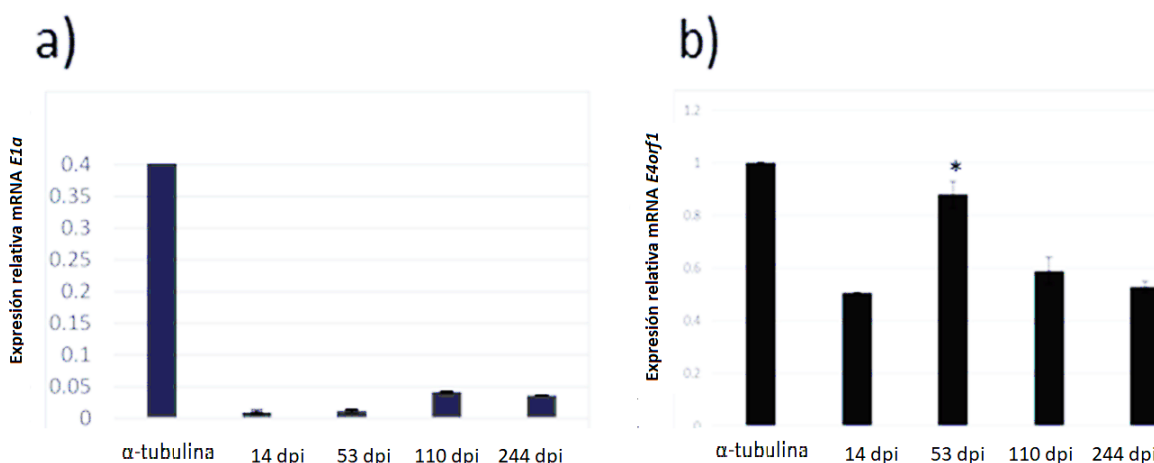


Figura 13. En la infección persistente por HAdV-36 se encontró una expresión diferencial de los mRNA de *E1a* y *E4orf1*. La expresión relativa de los genes virales tempranos fue más baja respecto al gen constitutivo de la α -tubulina. a) Células infectadas de manera aguda y persistente muestran una disminución en la expresión de *E1a*. Aunque, la expresión de *E1a* después de los 110 dpi mostró una tendencia al alza, el incremento no fue significativo a lo largo de los pases infectados de manera persistente. Por el contrario, *E4orf1* disminuyó su expresión en la infección persistente respecto a la α -tubulina. Y únicamente alrededor de los 53 dpi el gen disminuyó su expresión de manera significativa. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes y las diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al gen constitutivo se indican con (*)

Proteínas de HAdV-36 en células persistentemente infectadas

El suero hiperinmune de conejo anti-HAdV-36 producido en nuestro laboratorio fue evaluado de manera preliminar por *Westernblot* con el propósito de comprobar el reconocimiento de proteínas del HAdV-36 (proteínas totales) para su caracterización en un estudio posterior.

En las muestras de los cultivos infectados de manera persistente y aguda se lograron detectar bandas que fueron analizadas con el software GelAnalyzer 19.1 y por su peso molecular aparente corresponden a las proteínas tempranas y estructurales del HAdV-36.

Figura 14. Detección de las proteínas totales del HAdV-36 por western blot en cultivos de células Vero infectadas por HAdV-36

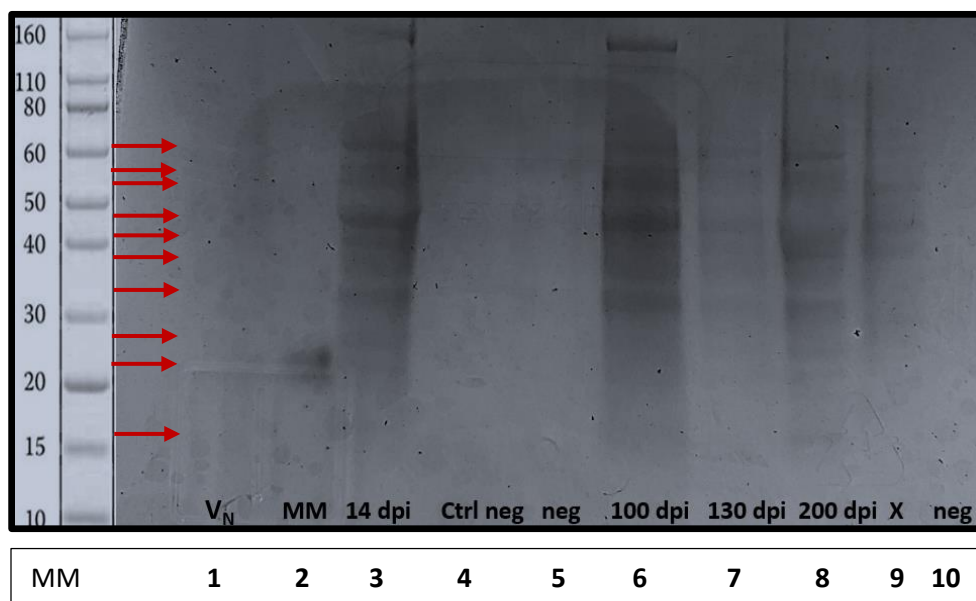


Figura 14. En células de cultivos infectados por HAdV-36 se detectaron bandas que en apariencia corresponden a las proteínas (totales) del HAdV-36. En la parte inferior de los carriles se indican las muestras que corresponden a células Vero sin infectar (V_N); marcador de peso molecular (MM); células infectadas de manera aguda (14 dpi); células infectadas a los -100 dpi; -130 dpi y -200 dpi. Días posinoculación (dpi).

Discusión

A la fecha, no encontramos algún informe relacionado al modelo de infección persistente por HAdV-36 *in vitro*. Sin embargo, la persistencia de este virus es plausible teniendo como antecedentes las investigaciones que demuestran que la inoculación del HAdV-36 en animales desarrolla una infección asintomática y mantiene el DNA viral en diferentes tejidos, como el hígado, tejido adiposo, músculo, cerebro y riñón, por un periodo posinoculación, de más de seis meses en monos (Dhurandhar et al., 2002), 12 semanas en ratones (Krishnapuram et al., 2011) y 16 semanas en pollos (Dhurandhar et al., 2000). Elegimos a las células Vero por ser células epiteliales, que se conoce son blanco de los adenovirus. Además de que esta línea expresa receptores y correceptores para los adenovirus de la especie D (ácido siálico, CAR, CD46, integrinas) en donde está clasificado el HAdV-36 (Govorkova et al., 1996; Desai y Goldfarb, 1996; Guo et al., 2014).

Entre las ventajas que brindan las células Vero para establecer un modelo de infección *in vitro* se tiene su estabilidad biológica (no oncogénica), su fácil adaptación a diferentes condiciones de crecimiento (Maharjan et al., 2021; Govorkova et al., 1996) y su incapacidad para producir IFN-I por tener una delección de los genes del α -IFN y β -IFN (Osada et al., 2014). Sin embargo, pueden expresar genes estimulados por el IFN (ISGs) los cuales se relacionan con la inhibición de la replicación viral y la promoción de la persistencia viral (Murira y Lamarre, 2016; Hernández et al., 2015). Además, estudios de proteómica cuantitativa que analizaron la expresión diferencial de proteínas en respuesta de una infección viral en células Vero utilizando espectrometría de masas por cromatografía líquida identificaron proteínas relacionadas con la apoptosis, transducción de señales y las respuestas al estrés (Zeng et al., 2015). Con el mismo método Guo y cols. identificaron más de 600 proteínas asociadas a componentes celulares, factores de crecimiento y procesos biológicos, que pueden ayudar a la comprensión de la infección por virus de las células Vero (Guo et al., 2014). Recientemente, un estudio que utilizó un algoritmo para el análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA) encontró que en las células Vero se regulan al alza genes relacionados al metabolismo de lípidos, principalmente los de la vía de la beta

oxidación de los ácidos grasos (Logan et al., 2022). Y esto nos llama la atención por su aplicación para futuros estudios sobre el metabolismo de los ácidos grasos en las células renales.

En este trabajo se estandarizó un sistema en el que se lleva a cabo la replicación del HAdV-36 en células Vero, de manera similar a Lee y cols. (2020) con el HAdV-5 que pertenece a la especie C de los adenovirus humanos. Adicionalmente, se logró establecer y mantener una infección persistente por HAdV-36 en cultivo de células Vero utilizando una baja multiplicidad de infección (MOI=0.5). Cabe mencionar que, a una baja MOI se ha conseguido que el HAdV-36 desarrolle una infección productiva en células epiteliales del tracto respiratorio (Yang et al., 2019). Incluso, con esta condición se estableció la infección persistente en cultivo por un virus de RNA (VSR) en células epiteliales (Tirado et al., 2005).

Asimismo, nuestros resultados muestran que el control de la fase aguda de la infección, al retirar el virus producido y liberado en el sobrenadante celular a los ocho dpi, permitió que el cultivo se mantuviera y llegara a los 14 dpi. Esto es, que las células que sobrevivieron aun cuando el título viral era de $10^{10.5}$ TCID₅₀/mL siguieran creciendo hasta formar monocapas confluentes a los 20 dpi. Con esta estrategia del control de la infección, investigaciones independientes, lograron establecer cultivos infectados de manera persistente por virus Coxsackie del grupo B en células epiteliales del páncreas (Alidjinou et al., 2017) y con FMDV (del inglés: *Foot-and-Mouth Disease Virus*) en células epiteliales de riñón bovino (Kopliku et al., 2015).

En los pases infectados de manera persistente, (20 dpi hasta después de 200 dpi), se mostró que el virus tuvo una replicación activa, puesta de manifiesto a través de la producción de virus infeccioso extracelular (título entre 10^4 a 10^6 TCID₅₀/mL) que fue analizada mediante ensayos de punto final para determinar la dosis infectiva al 50% del cultivo celular (TCID₅₀) por el método de Kärber. La producción de virus infeccioso en los sobrenadantes es requerida para establecer el estado de persistencia viral y es posible que la continua presencia de virus infeccioso permita la coadaptación (Martín-Acebes et al., 2010), como se

ha estudiado en otros modelos de persistencia *in vitro* para el virus Junín (González et al., 1982) y Coxsackievirus B (Muhsen et al., 2013; Desailoud et al., 2009).

Con el propósito de probar un método adicional que detecte HAdV-36 infeccioso en los sobrenadantes de los pases en un menor tiempo, se realizaron ensayos de focos de infección. Este método es una de las variantes para la titulación de virus infeccioso que se ha probado recientemente para cuantificar la infectividad en vectores de adenovirus (Elahi et al., 2021) y del SARS-CoV-2 (Hiroi et al., 2021). Hasta el momento no encontramos algún informe en el que se haya probado este método para HAdV-36. El ensayo requiere un menor tiempo de incubación (18 a 48 h) comparado con el ensayo TCID₅₀, que dependiendo del tipo de célula y virus necesita de tres a más de 10 días de incubación (Jureka et al., 2020; Elahi et al., 2021). Adicionalmente, entre el ensayo de focos de infección y de placa se ha encontrado que los resultados muestran una correlación significativa (Cruz y Shin, 2007). Asimismo, el ensayo de focos de infección al ser un método de inmunotinción ofrece la ventaja de detectar la presencia de antígenos virales. En este trabajo infectamos a baja MOI y se controló la infección en su fase aguda como estrategias para establecer la persistencia del HAdV-36 en cultivo. Asimismo, en los diferentes pases se demostró la replicación activa del virus y la multiplicación o crecimiento celular para alcanzar la confluencia del cultivo. Potencialmente, se estableció una interacción virus-célula en equilibrio, que como se ha mencionado previamente es una de las características de la infección persistente (Kane y Golovkina, 2010).

En este estudio, como indicador de la infección por HAdV-36, se amplificó un fragmento del gen *E1a* (~320 pb) por PCR en punto final. Amplificamos *E1a* debido a que es el principal transactivador de los adenovirus y ejerce control sobre la expresión de genes virales y celulares que pueden modular el metabolismo y el ciclo celular, entre otras muchas funciones que se han mencionado en la introducción (King et al., 2016). Estos experimentos mostraron que el virus es detectable consistentemente en los pases persistentemente infectados.

Para comprobar la presencia del antígeno del HAdV-36 en las células infectadas se realizaron ensayos de inmunolocalización analizados por inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirectas, los resultados de ambos ensayos inmunocitoquímicos (IFI e IPI) optimizaron la interpretación de los resultados de tinción. En este trabajo, utilizamos el anticuerpo policlonal que se produjo en nuestro laboratorio (suero hiperinmune de conejo anti-HAdV-36), encontrando un patrón positivo heterogéneo de la expresión del antígeno viral. La expresión heterogénea en las células de un mismo cultivo podría estar relacionado con la presencia de epítomos fuertes y débiles (Ramos-Vara et al., 2016).

No obstante, los ensayos IFI e IPI aportan datos cualitativos, por lo tanto, cuantificamos la expresión del antígeno viral mediante citometría de flujo, que reveló que en las células persistentemente infectadas la expresión del antígeno viral se redujo (38%) respecto a la expresión en células con infección aguda.

En el presente estudio el análisis de las inmunotinciones fluorescentes también revelaron que las células persistentemente infectadas mostraron gránulos intranucleares gruesos (Figura 10, E y H) que podrían estar relacionados a centros de replicación viral (Hidalgo et al., 2021).

Respecto a este tema, virus de DNA incluidos el virus simiano 40, el adenovirus tipo 5, el virus del herpes simple 1 (HSV-1) y el citomegalovirus humano (HCMV) se localizan y establecen sitios de replicación viral adyacentes a los cuerpos nucleares pro-leucemia mielocítica (PML-NB), lo que sugiere que esta estructura es al menos espacialmente, si no funcionalmente, relacionado con la replicación viral. Los PML-NB consisten en estructuras en forma de jaula construidas con proteínas de PML, que contienen otras proteínas efectoras que juntas aparecen como focos punteados cuando se visualizan mediante microscopía de inmunofluorescencia (Tsai y Cullen, 2020). También, se ha propuesto que la represión epigenética puede favorecer el establecimiento de la persistencia viral (Tsai y Cullen 2020).

La determinación de la expresión de ARNm de *E1a* y *E4orf1* en pases persistentemente infectados indicó que el virus es transcripcionalmente activo. Sin embargo, la expresión se

encontró en niveles muy bajos, estos resultados tienen cierta concordancia con los hallazgos de Zheng y cols. (2016) que indican que en la infección persistente decrece la expresión de *E1a* y por consiguiente de otros genes virales para mantener la persistencia de adenovirus.

Por otro lado, la expresión de *E1a* en la fase aguda de la infección (14 dpi) se encontró disminuida. Aunque es de esperar lo contrario, está documentado en un modelo en cultivo de la infección aguda por HAdV-36, que la expresión de los genes E1A, E1B, E3 y E4orf1 alcanza su punto máximo de 2 a 4 días después de la inoculación y los niveles se mantienen muy bajos después de los 7 dpi (Rathod et al., 2007). Nuestros hallazgos concuerdan con las características de la persistencia en el estado de portador en el que solo una parte de la población celular (en nuestros cultivos ~50% de las células) resulta estar infectada y hay producción de virus infeccioso extracelular que infecta a algunas de las células normales que resultan de la continua multiplicación celular (Nathanson y Ahmed, 2007). Este mismo tipo de persistencia se obtuvo en un modelo de células Vero persistentemente infectadas con el virus Junín (Ellenberg et al., 2002).

Además, es importante comentar que es común que los virus líticos establezcan de inicio una infección persistente en el estado de portador en cultivo antes de que se establezca la persistencia viral en estado estable o estacionario. Así, se ha propuesto que después de una fase dinámica inestable se establece un proceso de selección para aquellas partículas virales con capacidad de establecer una infección persistente (Ito et al., 2004).

Finalmente, la baja expresión de *E1a* y *E4orf1* podría ser parte de alguna estrategia del virus para persistir. Estos resultados tienen cierta concordancia con los hallazgos de Dickherber y Garnett (2019), quienes encontraron en su modelo de persistencia de adenovirus en linfocitos que la transcripción de genes virales puede estar disminuida.

Conclusiones

En el presente estudio, se demostró por primera vez que las células Vero (ATCC, CCL-81) son permisivas a la infección por HAdV-36 y llegan a desarrollar una infección de tipo persistente, inhibiéndose la expresión del fenotipo lítico del virus. La persistencia viral se mantuvo en los cultivos celulares por cerca de 8 meses (> 200 dpi), a través de 35 pares.

El patrón de expresión del antígeno viral en la población celular de los pares infectados de manera persistente fue heterogéneo y se encontró una producción de partículas virales infecciosas extracelulares, esto se relaciona al establecimiento de una infección persistente en estado de acarreador.

Molecularmente, se identificó una expresión transcripcional diferencial entre *E1a* y *E4orf1* en el estado persistente, que indujo una disminución en la expresión de *E1A* y un aumento, aunque no significativo, de *E4orf1* después de los 53 dpi, respecto al estado agudo de infección.

Perspectivas

Investigar la activación de la vía PI3K por el HAdV-36 a través de evaluar los niveles de fosforilación de Akt en las células Vero infectadas de manera persistente. Con el propósito de indagar si esta vía inhibe la apoptosis como un posible mecanismo para establecer la persistencia del HAdV-36 en células Vero, como se ha propuesto para el SARS-CoV (Mizutani et al., 2004; 2005) y con el virus Junín (Linero et al., 2015).

Estudiar la expresión de la Acetil-CoA acetiltransferasa para evaluar el efecto de la infección por HAdV-36 sobre la vía de la beta-oxidación mitocondrial.

Evaluar el efecto de la infección por HAdV-36 sobre la expresión de los transportadores de ácidos grasos de cadena larga (FATP4/CD36) moléculas relacionadas al depósito de lípidos en los riñones.

Cuantificar la expresión de las proteínas tempranas del HAdV-36.

Referencias

- Afruza, Rowan, Md Akheruzzaman, Nikhil V. Dhurandhar, y Vijay Hegde. 2020. "E4orf1, an Adeno-Viral Protein, Attenuates Renal Lipid Accumulation in High Fat Fed Mice: A Novel Approach to Reduce a Key Risk Factor for Chronic Kidney Disease". *Heliyon* 6 (10): e05261. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05261>.
- Akheruzzaman, Md, Vijay Hegde, Andrew C. Shin, y Nikhil V. Dhurandhar. 2020. "Reducing endogenous insulin is linked with protection against hepatic steatosis in mice". *Nutrition & Diabetes* 10 (abril): 11. <https://doi.org/10.1038/s41387-020-0114-9>.
- Alidjinou, E. K., I. Engelmann, J. Bossu, C. Villenet, M. Figeac, M.-B. Romond, F. Sané, y D. Hober. 2017. "Persistence of Coxsackievirus B4 in Pancreatic Ductal-like Cells Results in Cellular and Viral Changes". *Virulence* 8 (7): 1229–44. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1284735>.
- Ammerman, Nicole C., Magda Beier-Sexton, y Abdu F. Azad. 2008. "Growth and Maintenance of Vero Cell Lines". *Current Protocols in Microbiology* 11 (1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca04es11>.
- Anderson, K P, y E H Fennie. 1987. "Adenovirus early region 1A modulation of interferon antiviral activity". *Journal of Virology* 61 (3): 787–95. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.3.787-795.1987>.
- Arnold, John, Máté Jánoska, Adriana E. Kajon, David Metzgar, Nolan Ryan Hudson, Sarah Torres, Balázs Harrach, Donald Seto, James Chodosh, y Morris S. Jones. 2010. "Genomic Characterization of Human Adenovirus 36, a Putative Obesity Agent". *Virus Research* 149 (2): 152–61. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.01.011>.
- Avvakumov, N., A. E. Kajon, R. C. Hoeben, y J. S. Mymryk. 2004. "Comprehensive Sequence Analysis of the E1A Proteins of Human and Simian Adenoviruses". *Virology* 329 (2): 477–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.007>.
- Barrera-Alcocer, Jorge, Leonel García-Benavides, José F Muñoz-Valle, Ulises de la Cruz-Mosso, Ramón A González, Sonia Luquín, Luz del C Alarcón-Romero, Linda A Marino-Ortega, Ines Matia-Garcia, y Isela Parra-Rojas. 2021. "Presence of Adenovirus-36 DNA in Adipose Tissue of Women: Relationship with Adipocyte Morphology and the Expression of C/EBP β and HIF-1 α ". *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* Volume 14 (febrero): 477–86. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S285341>.
- Battagello, Daniella S., Guilherme Dragunas, Marianne O. Klein, Ana L.P. Ayub, Fernando J. Velloso, y Ricardo G. Correa. 2020. "Unpuzzling COVID-19: tissue-related signaling pathways associated with SARS-CoV-2 infection and transmission". *Clinical Science (London, England : 1979)* 134 (16): 2137–60. <https://doi.org/10.1042/CS20200904>.
- Boldogh, Istvan, Thomas Albrecht, y David D. Porter. 1996. "Persistent Viral Infections". En *Medical Microbiology*, editado por Samuel Baron, 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8538/>.
- Bouwman, J. J. M., R. J. A. Diepersloot, y F. L. J. Visseren. 2009. "Intracellular Infections Enhance Interleukin-6 and Plasminogen Activator Inhibitor 1 Production by Cocultivated Human Adipocytes and THP-1 Monocytes". *Clinical and Vaccine Immunology : CVI* 16 (8): 1222–27. <https://doi.org/10.1128/VI.00166-09>.
- Bouwman, J J M, F L J Visseren, K P Bouter, y R J A Diepersloot. 2008. "Infection-Induced Inflammatory Response of Adipocytes in Vitro". *International Journal of Obesity* 32 (6): 892–901. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.36>.

- Bullen, C. Korin, Stephanie L. Davis, y Monika M. Looney. 2022. "Quantification of Infectious SARS-CoV-2 by the 50% Tissue Culture Infectious Dose Endpoint Dilution Assay". En *SARS-CoV-2*, editado por Justin Jang Hann Chu, Bintou Ahmadou Ahidjo, y Chee Keng Mok, 2452:131–46. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2111-0_9.
- Budkowska, Agata. 2009. "Mechanism of Cell Infection with Hepatitis C Virus (HCV)--a New Paradigm in Virus-Cell Interaction". *Polish Journal of Microbiology* 58 (2): 93–98.
- Cruz, Deu John M., y Hyun-Jin Shin. 2007. "Application of a focus formation assay for detection and titration of porcine epidemic diarrhea virus". *Journal of Virological Methods* 145 (1): 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.05.012>.
- Desai, N. N., y J. M. Goldfarb. 1996. "Growth Factor/Cytokine Secretion by a Permanent Human Endometrial Cell Line with Embryotrophic Properties". *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 13 (7): 546–50. <https://doi.org/10.1007/BF02066606>.
- Desaillood, Rachel, Famara Sané, Delphine Caloone, y Didier Hober. 2009. "Persistent Infection of a Carcinoma Thyroid Cell Line with Coxsackievirus B". *Thyroid* 19 (4): 369–74.
<https://doi.org/10.1089/thy.2008.0309>.
- Dhurandhar, Emily J., Olga Dubuisson, Nazar Mashtalir, Rashmi Krishnapuram, Vijay Hegde, y Nikhil V. Dhurandhar. 2011. "E4orf1: A Novel Ligand That Improves Glucose Disposal in Cell Culture". *PLoS One* 6 (8): e23394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023394>.
- Dhurandhar, Emily J., Rashmi Krishnapuram, Vijay Hegde, Olga Dubuisson, Rongya Tao, X. Charlie Dong, Jianping Ye, y Nikhil V. Dhurandhar. 2012. "E4orf1 Improves Lipid and Glucose Metabolism in Hepatocytes: A Template to Improve Steatosis & Hyperglycemia". Editado por Richard H. Barton. *PLoS ONE* 7 (10): e47813.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047813>.
- Dhurandhar, N. V., L. Geurts, R. L. Atkinson, L. Casteilla, K. Clement, P. Gerard, M. Vijay-Kumar, et al. 2013. "Harnessing the Beneficial Properties of Adipogenic Microbes for Improving Human Health: Adipogenic Microbes & Human Health". *Obesity Reviews* 14 (9): 721–35.
<https://doi.org/10.1111/obr.12045>.
- Dhurandhar, N. V., B. A. Israel, J. M. Kolesar, G. F. Mayhew, M. E. Cook, y R. L. Atkinson. 2000. "Increased Adiposity in Animals Due to a Human Virus". *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 24 (8): 989–96.
- Dhurandhar, Nikhil V. 2013. "Insulin Sparing Action of Adenovirus 36 and Its E4orf1 Protein". *Journal of Diabetes and Its Complications* 27 (2): 191–99.
<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2012.09.006>.
- Dhurandhar, Nikhil V., Leah D. Whigham, David H. Abbott, Nancy J. Schultz-Darken, Barbara A. Israel, Steven M. Bradley, Joseph W. Kernitz, David B. Allison, y Richard L. Atkinson. 2002. "Human Adenovirus Ad-36 Promotes Weight Gain in Male Rhesus and Marmoset Monkeys". *The Journal of Nutrition* 132 (10): 3155–60.
<https://doi.org/10.1093/jn/131.10.3155>.
- Dickherber, Megan L., y Charlie Garnett-Benson. 2019. "NAD-Linked Mechanisms of Gene de-Repression and a Novel Role for CtBP in Persistent Adenovirus Infection of Lymphocytes". *Virology Journal* 16 (1): 161. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1265-y>.
- Elahi, Seyyed Mehdy, Nazila Nazemi-Moghaddam, Christine Gadoury, Julie Lippens, Stevo Radinovic, Marie-Hélène Venne, Anne Marcil, y Régnald Gilbert. 2021. "A Rapid Focus-

- Forming Assay for Quantification of Infectious Adenoviral Vectors". *Journal of Virological Methods* 297 (noviembre): 114267. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114267>.
- Ellenberg, P., M. Edreira, M. Lozano, y L. Scolaro. 2002. "Synthesis and Expression of Viral Antigens in Vero Cells Persistently Infected with Junin Virus". *Archives of Virology* 147 (8): 1543–57. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0823-5>.
- Fang, Lin, Qian Cheng, Jingjing Zhao, Yan Ge, Qi Zhu, Min Zhao, Jie Zhang, et al. 2016. "A P53-Independent Apoptotic Mechanism of Adenoviral Mutant E1A Was Involved in Its Selective Antitumor Activity for Human Cancer". *Oncotarget* 7 (30): 48309–20. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10221>.
- Farkas, Tibor, Kui Yang, Jacques Le Pendu, Joel D. Baines, y Rhonda D. Cardin. 2019. "The Coxsackievirus and Adenovirus Receptor, a Required Host Factor for Recovirus Infection, Is a Putative Enteric Calicivirus Receptor". *Journal of Virology* 93 (22): e00869-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00869-19>.
- Flint, S. J., y R. A. Gonzalez. 2003. "Regulation of mRNA Production by the Adenoviral E1B 55-kDa and E4 Orf6 Proteins". En *Adenoviruses: Model and Vectors in Virus-Host Interactions*, editado por Walter Doerfler y Petra Böhm, 272:287–330. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-05597-7_10.
- Flint, S. Jane, Vincent R. Racaniello, Glenn F. Rall, Anna Marie Skalka, y Lynn W. Enquist. 2015. *Principles of Virology*. 4th ed. Vol. II. Mechanisms of pathogenesis. ASM Press.
- Fonseca, G.J., G. Thillainadesan, A.F. Yousef, J.N. Ablack, K.L. Mossman, J. Torchia, y J.S. Mymryk. 2012. "Adenovirus Evasion of Interferon-Mediated Innate Immunity by Direct Antagonism of a Cellular Histone Posttranslational Modification". *Cell Host & Microbe* 11 (6): 597–606. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.005>.
- Frese, Kristopher K, Siu Sylvia Lee, Darby L Thomas, Isabel J Latorre, Robert S Weiss, Britt A Glaunsinger, y Ronald T Javier. 2003. "Selective PDZ Protein-Dependent Stimulation of Phosphatidylinositol 3-Kinase by the Adenovirus E4-ORF1 Oncoprotein". *Oncogene* 22 (5): 710–21. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206151>.
- Freshney, R. Ian. 2010. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470649367>.
- Frisk, Gun. 2001. "Mechanisms of Chronic Enteroviral Persistence in Tissue": *Current Opinion in Infectious Diseases* 14 (3): 251–56. <https://doi.org/10.1097/00001432-200106000-00002>.
- Gamage, Suhadinie, P. Hemachandra Reddy, Nikhil V. Dhurandhar, y Vijay Hegde. 2019. "Potential Role of E4orf1 Protein in Aging-Associated Impairment in Glycemic Control". *Journal of Diabetes and Its Complications* 33 (3): 261–65. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2018.11.006>.
- Genzel, Yvonne, y Udo Reichl. 2009. "Continuous Cell Lines as a Production System for Influenza Vaccines". *Expert Review of Vaccines* 8 (12): 1681–92. <https://doi.org/10.1586/erv.09.128>.
- Goic, Bertsy, y Maria-Carla Saleh. 2012. "Living with the Enemy: Viral Persistent Infections from a Friendly Viewpoint". *Current Opinion in Microbiology*, Host--microbe interactions: fungi/parasites/viruses, 15 (4): 531–37. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.06.002>.
- Gokumakulapalle, Madhuri, y Ya-Fang Mei. 2016. "Replication-Competent Human Adenovirus 11p Vectors Can Propagate in Vero Cells". *Virology* 495 (agosto): 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.04.029>.
- Gonzalez, Gabriel, Camden R. Bair, Daryl M. Lamson, Hidemi Watanabe, Laura Panto, Michael J. Carr, y Adriana E. Kajon. 2019. "Genomic characterization of human adenovirus type 4

- strains isolated worldwide since 1953 identifies two separable phylogroups evolving at different rates from their most recent common ancestor". *Virology* 538 (diciembre): 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.08.028>.
- González, P. H., J. S. Lampuri, C. E. Coto, y R. P. Laguens. 1982. "In Vitro Infection of Murine Macrophages with Junin Virus". *Infection and Immunity* 35 (1): 356–58. <https://doi.org/10.1128/iai.35.1.356-358.1982>.
- Govorkova, E A, G Murti, B Meignier, C de Taisne, y R G Webster. 1996. "African Green Monkey Kidney (Vero) Cells Provide an Alternative Host Cell System for Influenza A and B Viruses". *Journal of Virology* 70 (8): 5519–24. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.8.5519-5524.1996>.
- Greber, Urs F., y Justin W. Flatt. 2019. "Adenovirus Entry: From Infection to Immunity". *Annual Review of Virology* 6 (1): 177–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015550>.
- Griffin, Diane E. 2022. "Why Does Viral RNA Sometimes Persist after Recovery from Acute Infections?" *PLOS Biology* 20 (6): e3001687. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001687>.
- Guo, Donghua, Qinghe Zhu, Hong Zhang, y Dongbo Sun. 2014. "Proteomic Analysis of Membrane Proteins of Vero Cells: Exploration of Potential Proteins Responsible for Virus Entry". *DNA and Cell Biology* 33 (1): 20–28. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2193>.
- Gutiérrez, Alvaro, Glaucio Monteiro Ferreira, Juan Machuca, Herbert Venthur, Fausto Feres, Mario Hirouyki Hirata, Rosario Dominguez Crespo Hirata, y Alvaro Cerda. 2020. "Characterization of the Adipogenic Protein E4orf1 from Adenovirus 36 through an in Silico Approach". *Journal of Molecular Modeling* 26 (10). <https://doi.org/10.1007/s00894-020-04531-0>.
- Gutiérrez-Escolano, Ana Lorena. 2006. "Inicio de la traducción dependiente de IRES: Un mecanismo alternativo para la síntesis de proteínas". *Revista de Educación Bioquímica* 25 (1): 12–19.
- Hasler, P., y R. Wigand. 1978. "The Susceptibility of Vero Cell Cultures for Human Adenoviruses". *Medical Microbiology and Immunology* 164 (4): 267–75. <https://doi.org/10.1007/BF02125495>.
- Hernández, Pedro P., Tanel Mahlakoiv, Ines Yang, Vera Schwierzeck, Nam Nguyen, Fabian Guendel, Konrad Gronke, et al. 2015. "Interferon- λ and interleukin-22 cooperate for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection". *Nature immunology* 16 (7): 698–707. <https://doi.org/10.1038/ni.3180>.
- Hidalgo, Paloma, Arturo Pimentel, Diana Mojica-Santamaría, Konstantin von Stromberg, Helga Hofmann-Sieber, Christian Lona-Arrona, Thomas Dobner, y Ramón A. González. 2021. "Evidence That the Adenovirus Single-Stranded DNA Binding Protein Mediates the Assembly of Biomolecular Condensates to Form Viral Replication Compartments". *Viruses* 13 (9): 1778. <https://doi.org/10.3390/v13091778>.
- Hiroi, Satoshi, Ritsuko Kubota-Koketsu, Tadahiro Sasaki, Saeko Morikawa, Kazushi Motomura, Emi E. Nakayama, Yoshinobu Okuno, y Tatsuo Shioda. 2021. "Infectivity assay for detection of SARS-CoV-2 in samples from patients with COVID-19". *Journal of Medical Virology* 93 (10): 5917–23. <https://doi.org/10.1002/jmv.27145>.
- Ip, Wing Hang, y Thomas Dobner. 2020. "Cell Transformation by the Adenovirus Oncogenes E1 and E4". *FEBS Letters* 594 (12): 1848–60. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13717>.
- Ito, Morihiro, Taijiro Takeuchi, Machiko Nishio, Mitsuo Kawano, Hiroshi Komada, Masato Tsurudome, y Yasuhiko Ito. 2004. "Early Stage of Establishment of Persistent Sendai Virus Infection: Unstable Dynamic Phase and Then Selection of Viruses Which Are Tightly Cell Associated, Temperature Sensitive, and Capable of Establishing Persistent Infection".

- Journal of Virology* 78 (21): 11939–51. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11939-11951.2004>.
- Jiao, Yi, Xiaodi Liang, Jianfei Hou, Yiliyasi Aisa, Han Wu, Zhilu Zhang, Nuerbiye Nuermaimaiti, Yang Zhao, Sheng Jiang, y Yaqun Guan. 2019. “Adenovirus type 36 regulates adipose stem cell differentiation and glucolipid metabolism through the PI3K/Akt/FoxO1/PPAR γ signaling pathway”. *Lipids in Health and Disease* 18 (marzo). <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1004-9>.
- Jogler, Christian, Dennis Hoffmann, Dirk Theegarten, Thomas Grunwald, Klaus Überla, y Oliver Wildner. 2006. “Replication Properties of Human Adenovirus In Vivo and in Cultures of Primary Cells from Different Animal Species”. *Journal of Virology* 80 (7): 3549–58. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3549-3558.2006>.
- Jureka, Alexander S., Jesus A. Silvas, y Christopher F. Basler. 2020. “Propagation, Inactivation, and Safety Testing of SARS-CoV-2”. *Viruses* 12 (6): 622. <https://doi.org/10.3390/v12060622>.
- Kane, M., y T. Golovkina. 2010. “Common Threads in Persistent Viral Infections”. *Journal of Virology* 84 (9): 4116–23. <https://doi.org/10.1128/JVI.01905-09>.
- Kaye, Stephen B., Marianne Lloyd, Helen Williams, Conrad Yuen, James A. Scott, Niall O’Donnell, Mark Batterbury, Paul Hiscott, y Charles A. Hart. 2005. “Evidence for Persistence of Adenovirus in the Tear Film a Decade Following Conjunctivitis”. *Journal of Medical Virology* 77 (2): 227–31. <https://doi.org/10.1002/jmv.20440>.
- King, Cason R., Ali Zhang, y Joe S. Mymryk. 2016. “The Persistent Mystery of Adenovirus Persistence”. *Trends in Microbiology* 24 (5): 323–24. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.007>.
- Kong, Kathleen, Manish Kumar, Midori Taruishi, y Ronald T. Javier. 2014. “The Human Adenovirus E4-ORF1 Protein Subverts Discs Large 1 to Mediate Membrane Recruitment and Dysregulation of Phosphatidylinositol 3-Kinase”. *PLoS Pathogens* 10 (5): e1004102. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004102>.
- Kopliku, Lela, Anthony Relmy, Aurore Romey, Kamila Gorna, Stephan Zientara, Labib Bakkali-Kassimi, y Sandra Blaise-Boisseau. 2015. “Establishment of Persistent Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) Infection in MDBK Cells”. *Archives of Virology* 160 (10): 2503–16. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2526-8>.
- Kosulin, K., E. Geiger, A. Vécsei, W.-D. Huber, M. Rauch, E. Brenner, F. Wrba, et al. 2016. “Persistence and Reactivation of Human Adenoviruses in the Gastrointestinal Tract”. *Clinical Microbiology and Infection* 22 (4): 381.e1-381.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.013>.
- Kosulin, Karin. 2019. “Intestinal HAdV Infection: Tissue Specificity, Persistence, and Implications for Antiviral Therapy”. *Viruses* 11 (9): 804. <https://doi.org/10.3390/v11090804>.
- Kosulin, Karin, Franziska Hoffmann, Till Sebastian Clauditz, Waldemar Wilczak, y Thomas Dobner. 2013. “Presence of Adenovirus Species C in Infiltrating Lymphocytes of Human Sarcoma”. Editado por Irina V. Lebedeva. *PLoS ONE* 8 (5): e63646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063646>.
- Krishnapuram, R., H. Kirk-Ballard, E. J. Dhurandhar, O. Dubuisson, V. Messier, R. Rabasa-Lhoret, V. Hegde, S. Aggarwal, y N. V. Dhurandhar. 2013. “Insulin Receptor-Independent Upregulation of Cellular Glucose Uptake”. *International Journal of Obesity (2005)* 37 (1): 146–53. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.6>.
- Krishnapuram, Rashmi, Heather Kirk-Ballard, Aamri Zuberi, y Nikhil V Dhurandhar. 2011. “Infectivity Period of Mice Inoculated with Human Adenoviruses”. *Laboratory Animals* 45 (2): 103–8. <https://doi.org/10.1258/la.2010.010084>.

- Kumar, Manish, Kathleen Kong, y Ronald T. Javier. 2014. "Hijacking Dlg1 for Oncogenic Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation in Human Epithelial Cells Is a Conserved Mechanism of Human Adenovirus E4-ORF1 Proteins". Editado por M. J. Imperiale. *Journal of Virology* 88 (24): 14268–77. <https://doi.org/10.1128/JVI.02324-14>.
- Kusminski, Christine M., Violeta I. Gallardo-Montejano, Zhao V. Wang, Vijay Hegde, Perry E. Bickel, Nikhil V. Dhurandhar, y Philipp E. Scherer. 2015. "E4orf1 Induction in Adipose Tissue Promotes Insulin-Independent Signaling in the Adipocyte". *Molecular Metabolism* 4 (10): 653. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.07.004>.
- Lachiewicz, A. M., R. Cianciolo, M. B. Miller, y V. K. Derebail. 2014. "Adenovirus Causing Fever, Upper Respiratory Infection, and Allograft Nephritis Complicated by Persistent Asymptomatic Viremia". *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society* 16 (4): 648–52. <https://doi.org/10.1111/tid.12248>.
- Laing, Emma M, Ralph A Tripp, Norman K Pollock, Clifton A Baile, Mary Anne Della-Fera, Srujana Rayalam, Stephen M Tompkins, Deborah A Keys, y Richard D Lewis. 2013. "Adenovirus 36, Adiposity, and Bone Strength in Late-Adolescent Females". *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 28 (3): 489–96. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1776>.
- Lazar I Jr., PhD y Istvan Lazar Sr., PhD, CSc. s/f. "GelAnalyzer". GelAnalyzer.Com. Consultado el 12 de agosto de 2022. <http://www.gelalyzer.com/>.
- Lee, Deuk-Ki, Jihye Park, y Dong-Won Seo. 2020. "Suspension culture of Vero cells for the production of adenovirus type 5". *Clinical and Experimental Vaccine Research* 9 (1): 48–55. <https://doi.org/10.7774/cevr.2020.9.1.48>.
- Lee, Ho-Jin, y Jie J. Zheng. 2010. "PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification". *Cell Communication and Signaling* 8 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-8>.
- Leppard, K.N. 2014. "Adenoviruses: Molecular Biology☆". En *Reference Module in Biomedical Sciences*, B9780128012383025000. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02525-3>.
- Linero, Florencia N., Pablo M. Fernández Bell-Fano, Eugenia Cuervo, Viviana Castilla, y Luis A. Scolaro. 2015. "Inhibition of the PI3K/Akt Pathway by Ly294002 Does Not Prevent Establishment of Persistent Junín Virus Infection in Vero Cells". *Archives of Virology* 160 (2): 469–75. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2298-6>.
- Linzer, Niko, Alexis Trumbull, Rukiye Nar, Matthew D. Gibbons, David T. Yu, John Strouboulis, y Jörg Bungert. 2021. "Regulation of RNA Polymerase II Transcription Initiation and Elongation by Transcription Factor TFII-I". *Frontiers in Molecular Biosciences* 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2021.681550>.
- Lion, Thomas. 2019. "Adenovirus Persistence, Reactivation, and Clinical Management". *FEBS Letters* 593 (24): 3571–82. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13576>.
- Liu, Beixing, Md Jaber Hossain, Isamu Mori, y Yoshinobu Kimura. 2008. "Evaluation of a Virus Derived from MDCK Cells Infected Persistently with Influenza A Virus as a Potential Live-Attenuated Vaccine Candidate in the Mouse Model". *Journal of Medical Virology* 80 (5): 888–94. <https://doi.org/10.1002/jmv.21148>.
- Liu, Xin, Ling Wang, Kehao Zhao, Paul R. Thompson, Yousang Hwang, Ronen Marmorstein, y Philip A. Cole. 2008. "The Structural Basis of Protein Acetylation by the P300/CBP Transcriptional Coactivator". *Nature* 451 (7180): 846–50. <https://doi.org/10.1038/nature06546>.

- Livak, Kenneth J., y Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method". *Methods* 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Logan, Megan, Karsten Rinas, Brendan McConkey, y Marc G. Aucoin. 2022. "Vero cells gain renal tubule markers in low-calcium and magnesium chemically defined media". *Scientific Reports* 12 (abril): 6180. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10221-z>.
- Maclachlan, Nigel James, Edward J. Dubovi, Stephen W. Barthold, David E. Swayne, y James R. Winton, eds. 2017. *Fenner's veterinary virology*. Fifth edition. Amsterdam: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Maharjan, Sony, Mijeong Kang, Jinsoo Kim, Dongbum Kim, Sangkyu Park, Minyoung Kim, Kyeongbin Baek, Younghee Lee, y Hyung-Joo Kwon. 2021. "Apoptosis Enhances the Replication of Human Coronavirus OC43". *Viruses* 13 (11): 2199. <https://doi.org/10.3390/v13112199>.
- Martín-Acebes, Miguel A., Mónica Herrera, Rosario Armas-Portela, Esteban Domingo, y Francisco Sobrino. 2010. "Cell Density-Dependent Expression of Viral Antigens during Persistence of Foot-and-Mouth Disease Virus in Cell Culture". *Virology* 403 (1): 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.04.005>.
- McMurphy, Travis B., Wei Huang, Run Xiao, Xianglan Liu, Nikhil V. Dhurandhar, y Lei Cao. 2017. "Hepatic Expression of Adenovirus 36 E4ORF1 Improves Glycemic Control and Promotes Glucose Metabolism Through AKT Activation". *Diabetes* 66 (2): 358–71. <https://doi.org/10.2337/db16-0876>.
- Mizutani, Tetsuya, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, y Shigeru Morikawa. 2004. "Importance of Akt Signaling Pathway for Apoptosis in SARS-CoV-Infected Vero E6 Cells". *Virology* 327 (2): 169. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.005>.
- . 2005. "JNK and PI3k/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells". *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1741 (1): 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.04.004>.
- Mlera, Luwanika, Danielle K. Offerdahl, Craig Martens, Stephen F. Porcella, Wessam Melik, y Marshall E. Bloom. 2015. "Development of a Model System for Tick-Borne Flavivirus Persistence in HEK 293T Cells". *mBio* 6 (3): e00614-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00614-15>.
- Modrow, Susanne, Dietrich Falke, Uwe Truyen, y Hermann Schätzl. 2013. *Molecular Virology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20718-1>.
- Mostofinejad, Zahra, Md Akheruzzaman, Md Abu Bakkar Siddik, Presheet Patkar, Nikhil V Dhurandhar, y Vijay Hegde. 2021. "Antidiabetic E4orf1 protein prevents hepatic steatosis and reduces markers of aging-related cellular damage in high fat fed older mice". *BMJ Open Diabetes Research & Care* 9 (1): e002096. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2020-002096>.
- Muhsen, Mahmud, Hiroshi Aoki, Hidetoshi Ikeda, y Akio Fukusho. 2013. "Biological Properties of Bovine Viral Diarrhea Virus Quasispecies Detected in the RK13 Cell Line". *Archives of Virology* 158 (4): 753–63. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1538-x>.
- Murira, Armstrong, y Alain Lamarre. 2016. "Type-I Interferon Responses: From Friend to Foe in the Battle against Chronic Viral Infection". *Frontiers in Immunology* 7: 609. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00609>.
- Na, Ha-Na, Olga Dubuisson, Vijay Hegde, Jae-Hwan Nam, y Nikhil V. Dhurandhar. 2016. "Human Adenovirus Ad36 and Its E4orf1 Gene Enhance Cellular Glucose Uptake Even in the

- Presence of Inflammatory Cytokines". *Biochimie*, Mechanisms of metabolism, aging and obesity, 124 (mayo): 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.11.005>.
- Na, Ha-Na, Vijay Hegde, Olga Dubuisson, y Nikhil V. Dhurandhar. 2016. "E4orf1 Enhances Glucose Uptake Independent of Proximal Insulin Signaling". *PLoS ONE* 11 (8): e0161275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161275>.
- Na, H.-N., H. Kim, y J.-H. Nam. 2012. "Novel Genes and Cellular Pathways Related to Infection with Adenovirus-36 as an Obesity Agent in Human Mesenchymal Stem Cells". *International Journal of Obesity (2005)* 36 (2): 195–200. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.89>.
- Nathanson, N. 2005. "Virus perpetuation in populations: biological variables that determine persistence or eradication". *Infectious Diseases from Nature: Mechanisms of Viral Emergence and Persistence*, 3–15. https://doi.org/10.1007/3-211-29981-5_2.
- Nathanson, Neal, y Rafi Ahmed, eds. 2007. *Viral pathogenesis and immunity*. 2nd ed. Amsterdam ; Boston: Academic Press/Elsevier.
- Oldstone, M B. 1991. "Molecular anatomy of viral persistence." *Journal of Virology* 65 (12): 6381–86.
- Oldstone, Michael B.A. 2006. "Viral Persistence: Parameters, Mechanisms and Future Predictions". *Virology* 344 (1): 111–18. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.028>.
- Osada, Naoki, Arihiro Kohara, Toshiyuki Yamaji, Noriko Hirayama, Fumio Kasai, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, y Kentaro Hanada. 2014. "The Genome Landscape of the African Green Monkey Kidney-Derived Vero Cell Line". *DNA Research* 21 (6): 673–83. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu029>.
- Parra-Rojas, Isela, Oscar Del Moral-Hernández, Aralia B. Salgado-Bernabé, Iris P. Guzmán-Guzmán, Lorenzo Salgado-Goytia, y José F. Muñoz-Valle. 2013. "Adenovirus-36 Seropositivity and Its Relation with Obesity and Metabolic Profile in Children". *International Journal of Endocrinology* 2013: 463194. <https://doi.org/10.1155/2013/463194>.
- Peddibhotla, Swetha, Vijay Hegde, Md Akheruzzaman, y Nikhil V. Dhurandhar. 2019. "E4orf1 Protein Reduces the Need for Endogenous Insulin". *Nutrition & Diabetes* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41387-019-0085-x>.
- Pelka, Peter, Jialal N. G. Ablack, Gregory J. Fonseca, Ahmed F. Yousef, y Joe S. Mymryk. 2008. "Intrinsic Structural Disorder in Adenovirus E1A: A Viral Molecular Hub Linking Multiple Diverse Processes". *Journal of Virology* 82 (15): 7252–63. <https://doi.org/10.1128/JVI.00104-08>.
- Ponterio, E., R. Cangemi, S. Mariani, G. Casella, A. De Cesare, F. M. Trovato, A. Garozzo, y L. Gnessi. 2015. "Adenovirus 36 DNA in Human Adipose Tissue". *International Journal of Obesity (2005)* 39 (12): 1761–64. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.163>.
- Prusinkiewicz, Martin A., y Joe S. Mymryk. 2019. "Metabolic Reprogramming of the Host Cell by Human Adenovirus Infection". *Viruses* 11 (2): 141. <https://doi.org/10.3390/v11020141>.
- . 2021. "Metabolic Control by DNA Tumor Virus-Encoded Proteins". *Pathogens* 10 (5): 560. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050560>.
- Prusinkiewicz, Martin A., Jessie Tu, Mackenzie J. Dodge, Katelyn M. MacNeil, Sandi Radko-Juettner, Gregory J. Fonseca, Peter Pelka, y Joe S. Mymryk. 2020. "Differential Effects of Human Adenovirus E1A Protein Isoforms on Aerobic Glycolysis in A549 Human Lung Epithelial Cells". *Viruses* 12 (6): 610. <https://doi.org/10.3390/v12060610>.
- Ramakrishnan, Muthannan Andavar. 2016. "Determination of 50% Endpoint Titer Using a Simple Formula". *World Journal of Virology* 5 (2): 85. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>.

- Ramos-Vara, José A., Paul R. Avery, y Anne C. Avery. 2016. "Advanced Diagnostic Techniques". En *Canine and Feline Cytology*, 453–94. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4083-3.00017-6>.
- Rathod, M, S D Vangipuram, B Krishnan, A R Heydari, T C Holland, y N V Dhurandhar. 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): 78–86. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803358>.
- Revilla, Yolanda, y Aitor G. Granja. 2009. "Viral Mechanisms Involved in the Transcriptional CBP/P300 Regulation of Inflammatory and Immune Responses". *Critical Reviews™ in Immunology* 29 (2): 131–54. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v29.i2.30>.
- Roberts, Sally. 2002. "Biology of the E4 Protein". En *Perspectives in Medical Virology*, 8:119–42. Human Papilloma Viruses. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(02\)08019-9](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(02)08019-9).
- Rogers, Pamela M., Nazar Mashtalir, Miloni A. Rathod, Olga Dubuisson, Zhong Wang, Kumar Dasuri, Scott Babin, et al. 2008. "Metabolically Favorable Remodeling of Human Adipose Tissue by Human Adenovirus Type 36". *Diabetes* 57 (9): 2321–31. <https://doi.org/10.2337/db07-1311>.
- Romero, Guillermo, Mark von Zastrow, y Peter A. Friedman. 2011. "Role of PDZ Proteins in Regulating Trafficking, Signaling, and Function of GPCRs: Means, Motif, and Opportunity". *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* 62: 279–314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385952-5.00003-8>.
- Rowe, W. P., R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott, y T. G. Ward. 1953. "Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 84 (3): 570–73. <https://doi.org/10.3181/00379727-84-20714>.
- Roy, Soumitra, Roberto Calcedo, Angelica Medina-Jaszek, Martin Keough, Hui Peng, y James M. Wilson. 2011. "Adenoviruses in Lymphocytes of the Human Gastro-Intestinal Tract". *PLoS ONE* 6 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024859>.
- Russell, W. C. 2000. "Update on Adenovirus and Its Vectors". *Journal of General Virology* 81 (11): 2573–2604. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-11-2573>.
- . 2009. "Adenoviruses: update on structure and function". *Journal of General Virology* 90 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1099/vir.0.003087-0>.
- Rux, John J., y Roger M. Burnett. 2004. "Adenovirus Structure". *Human Gene Therapy* 15 (12): 1167–76. <https://doi.org/10.1089/hum.2004.15.1167>.
- Sambrook, Joseph, y David W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sangare, Kotou, Sabrina Helmold Hait, Madison Moore, Christopher Hogge, Tanya Hoang, Mohammad Arif Rahman, David J. Venzon, et al. 2022. "E4orf1 Suppresses E1B-Deleted Adenovirus Vaccine-Induced Immune Responses". *Vaccines* 10 (2): 295. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020295>.
- Sarmiento, R. E., R. Tirado, y B. Gómez. 1997. "Reinfection-Induced Increase of Rubella Persistently Infected Cells in a Macrophage-like Cell Line". *Virus Research* 50 (1): 15–22. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(97\)00048-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(97)00048-8).
- Sarmiento, Rosa E, Rocio G Tirado, Laura E Valverde, y Beatriz Gómez-García. 2007. "Kinetics of antibody-induced modulation of respiratory syncytial virus antigens in a human epithelial cell line". *Virology Journal* 4 (julio): 68. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-68>.

- Seto, Donald, James Chodosh, J. Rodney Brister, y Morris S. Jones. 2011. "Using the Whole-Genome Sequence To Characterize and Name Human Adenoviruses". *Journal of Virology* 85 (11): 5701–2. <https://doi.org/10.1128/JVI.00354-11>.
- Shastri, Anuradha A., Vijay Hegde, Swetha Peddibhotla, Zahra Feizy, y Nikhil V. Dhurandhar. 2018. "E4orf1: A protein for enhancing glucose uptake despite impaired proximal insulin signaling". *PLoS ONE* 13 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208427>.
- Shaw Stewart, Patrick D., y Julia L. Bach. 2021. "Temperature dependent viral tropism: understanding viral seasonality and pathogenicity as applied to the avoidance and treatment of endemic viral respiratory illnesses". *Reviews in Medical Virology*, mayo, e2241. <https://doi.org/10.1002/rmv.2241>.
- Silva Fernandes, Jaime da, Fabiana Schuelter-Trevisol, Ana Carolina Lobor Cancelier, Helena Caetano Gonçalves e Silva, Daiana Gomes de Sousa, Richard L. Atkinson, y Daisson José Trevisol. 2021. "Adenovirus 36 Prevalence and Association with Human Obesity: A Systematic Review". *International Journal of Obesity* 45 (6): 1342–56. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00805-6>.
- Singh, Gurdeep, Ashrafali M. Ismail, Jeong Yoon Lee, Mirja Ramke, Ji Sun Lee, David W. Dyer, Donald Seto, Jaya Rajaiya, y James Chodosh. 2019. "Divergent Evolution of E1A CR3 in Human Adenovirus Species D". *Viruses* 11 (2): 143. <https://doi.org/10.3390/v11020143>.
- Singhal, Ghata, Elisabetta Leo, Saayi Krushna Gadham Setty, Yves Pommier, y Bayar Thimmapaya. 2013. "Adenovirus E1A Oncogene Induces Rereplication of Cellular DNA and Alters DNA Replication Dynamics". *Journal of Virology* 87 (15): 8767–78. <https://doi.org/10.1128/JVI.00879-13>.
- Smith, Jason G., Christopher M. Wiethoff, Phoebe L. Stewart, y Glen R. Nemerow. 2010. "Adenovirus". *Current topics in microbiology and immunology* 343: 195–224. https://doi.org/10.1007/82_2010_16.
- Stephens, C., y E. Harlow. 1987. "Differential Splicing Yields Novel Adenovirus 5 E1A MRNAs That Encode 30 Kd and 35 Kd Proteins." *The EMBO Journal* 6 (7): 2027–35. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02467.x>.
- Strober, Warren. 2015. "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability". *Current protocols in immunology* 111 (noviembre): A3.B.1-A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>.
- Tessier, Tanner M., Mackenzie J. Dodge, Katelyn M. MacNeil, Andris M. Evans, Martin A. Prusinkiewicz, y Joe S. Mymryk. 2021. "Almost Famous: Human Adenoviruses (and What They Have Taught Us about Cancer)". *Tumour Virus Research* 12 (diciembre): 200225. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2021.200225>.
- Thai, Minh, Nicholas A. Graham, Daniel Braas, Michael Nehil, Evangelia Komisopoulou, Siavash K. Kurdistani, Frank McCormick, Thomas G. Graeber, y Heather R. Christofk. 2014. "Adenovirus E4ORF1-Induced MYC Activation Promotes Host Cell Anabolic Glucose Metabolism and Virus Replication". *Cell Metabolism* 19 (4): 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.009>.
- Thorley-Lawson, David A. 2015. "EBV Persistence—Introducing the Virus". *Current topics in microbiology and immunology* 390 (Pt 1): 151–209. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_8.
- Tirado, Rocio, Arturo Ortega, Rosa Elena Sarmiento, y Beatriz Gómez. 2005. "Interleukin-8 mRNA Synthesis and Protein Secretion Are Continuously up-Regulated by Respiratory Syncytial Virus Persistently Infected Cells". *Cellular Immunology* 233 (1): 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.04.003>.

- Trovato, Francesca M, Daniela Catalano, Adriana Garozzo, G Fabio Martines, Clara Pirri, y Guglielmo M Trovato. 2014. "ADV36 adipogenic adenovirus in human liver disease". *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20 (40): 14706–16. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14706>.
- Tsai, Kevin, y Bryan R. Cullen. 2020. "Epigenetic and Epitranscriptomic Regulation of Viral Replication". *Nature Reviews Microbiology* 18 (10): 559–70. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0382-3>.
- Valdovinos, Mirza Romero, y Beatríz Gómez. 2003. "Establishment of Respiratory Syncytial Virus Persistence in Cell Lines: Association with Defective Interfering Particles". *Intervirolgy* 46 (3): 190–98. <https://doi.org/10.1159/000071461>.
- Vangipuram, S. D., M. Yu, J. Tian, K. L. Stanhope, M. Pasarica, P. J. Havel, A. R. Heydari, y N. V. Dhurandhar. 2007. "Adipogenic Human Adenovirus-36 Reduces Leptin Expression and Secretion and Increases Glucose Uptake by Fat Cells". *International Journal of Obesity (2005)* 31 (1): 87–96. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803366>.
- Vangipuram, Sharada D., Jonathan Sheele, Richard L. Atkinson, Thomas C. Holland, y Nikhil V. Dhurandhar. 2004. "A Human Adenovirus Enhances Preadipocyte Differentiation". *Obesity Research* 12 (5): 770–77. <https://doi.org/10.1038/oby.2004.93>.
- Vink, Elizabeth I., Yueting Zheng, Rukhsana Yeasmin, Thomas Stamminger, Laurie T. Krug, y Patrick Hearing. 2015. "Impact of Adenovirus E4-ORF3 Oligomerization and Protein Localization on Cellular Gene Expression". *Viruses* 7 (5): 2428–49. <https://doi.org/10.3390/v7052428>.
- Virgin, Herbert W., E. John Wherry, y Rafi Ahmed. 2009. "Redefining Chronic Viral Infection". *Cell* 138 (1): 30–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>.
- Weitzman, Matthew, D. 2005. "Functions of the Adenovirus E4 Proteins and Their Impact on Viral Vectors". *Frontiers in Bioscience* 10 (1–3): 1106. <https://doi.org/10.2741/1604>.
- Wigand, R., H. Gelderblom, y G. Wadell. 1980. "New Human Adenovirus (Candidate Adenovirus 36), a Novel Member of Subgroup D". *Archives of Virology* 64 (3): 225–33.
- Winter, Christine, Christel Schwegmann-Weßels, Dave Cavanagh, Ulrich Neumann, y Georg Herrler. 2006. "Sialic Acid Is a Receptor Determinant for Infection of Cells by Avian Infectious Bronchitis Virus". *Journal of General Virology* 87 (5): 1209–16. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81651-0>.
- Yang, Tzu-I, Wan-Ling Li, Tu-Hsuan Chang, Chun-Yi Lu, Jong-Min Chen, Ping-Ing Lee, Li-Min Huang, y Luan-Yin Chang. 2019. "Adenovirus Replication and Host Innate Response in Primary Human Airway Epithelial Cells". *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 52 (2): 207–14. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.08.010>.
- Yoon, I.-S., S. Park, R.-H. Kim, H. L. Ko, y J.-H. Nam. 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 (2005)* 41 (10): 1601–5. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.142>.
- Zeng, Songlin, Huan Zhang, Zhen Ding, Rui Luo, Kang An, Lianzeng Liu, Jing Bi, Huanchun Chen, Shaobo Xiao, y Liurong Fang. 2015. "Proteome Analysis of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV)-Infected Vero Cells". *PROTEOMICS* 15 (11): 1819–28. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400458>.