



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
LICENCIATURA EN CIENCIAS  
Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular

**Identificación de blancos moleculares regulados  
por SUMO o Ubicuitina durante la infección con  
HAdV5.**

**T E S I S**  
QUE PRESENTA:

**Martha Yesenia Castañeda Mendoza**

**Para obtener el Grado de  
LICENCIADO EN  
CIENCIAS**

**Director de Tesis:  
Dr. Ramón A. González García-Conde**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**8, FEBRERO 2022**

## Tabla de contenido

<b>2. Introducción</b> .....	5
2.1 Generalidades.....	5
2.1.1 Etiología de la obesidad.....	6
2.1.2 Etiología del cáncer.....	7
2.1.3 Asociación de cáncer con obesidad.....	8
2.2 Asociación de infecciones virales con cáncer.....	8
2.3 Asociación de infecciones virales con obesidad.....	11
2.4 Alteraciones metabólicas mediadas por virus.....	13
2.4.1 Alteración viral del metabolismo de la glucosa y la glutamina.....	14
2.4.2 Alteración viral del metabolismo de ácidos grasos.....	17
2.5 Adenovirus.....	19
2.5.1 Clasificación.....	19
2.5.2 Estructura.....	19
2.5.3 Genoma.....	20
2.5.4 Ciclo de replicación.....	23
2.5.5 Ensamblaje y liberación de partículas virales.....	24
2.5.6 Compartimentos de replicación.....	24
2.6 Alteración de modificaciones postraduccionales mediada por adenovirus.....	25
2.6.1 Proceso de ubiquitilación.....	25
2.6.2 Procesos de SUMOilación.....	26
<b>3. Justificación</b> .....	28
<b>4. Hipótesis</b> .....	28
<b>5. Objetivos</b> .....	28
5.1 Objetivo general.....	28
5.2 Objetivos particulares.....	29
<b>6. Materiales y métodos</b> .....	29
6.1 Células y virus.....	29
6.2 Análisis bioinformático.....	30

6.3 Inmunofluorescencia.....	31
6.4 Cuantificación de progenie viral.....	33
<b>7. Resultados.....</b>	<b>34</b>
7.1 La infección por adenovirus modifica el nivel de SUMO/Ub de un gran número de proteínas celulares.....	34
7.2 La asignación de categorías funcionales mostró proteínas involucradas en metabolismo proliferación y muerte.....	35
7.3 Selección de proteínas SUMOiladas y Ubicuitiladas de interés.....	42
7.4 Tanto PCNA como WT1 tienen efectos sobre la producción de progenie viral.....	45
7.5 Localización intracelular de WT1 y PCNA.....	47
<b>8. Discusión.....</b>	<b>50</b>
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>51</b>
<b>10. Perspectivas.....</b>	<b>52</b>
<b>11. Referencias.....</b>	<b>52</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de adenovirus.....	20
Figura 2. Organización del genoma de adenovirus.....	21
Figura 3. Representación del ciclo de replicación de adenovirus.....	23
Figura 4. Representación diagramática del experimento.....	33
Figura 5. Efecto de la inhibición de WT1 sobre la eficiencia de producción de progenie viral.....	46
Figura 6. Efecto de la inhibición de PCNA sobre la eficiencia de producción de progenie viral.....	47
Figura 7. Localización intracelular de PCNA en células infectadas y no infectadas con/sin tratamiento.....	48
Figura 8. Localización intracelular de WT1 en células infectadas y no infectadas con/sin tratamiento.....	49

## Índice de Tablas

Tabla 1. Proteínas celulares con diferencias estadísticamente significativas entre células no infectadas y células infectadas con HAdV5.....	35
Tabla 2. Categorías funcionales del grupo ubiquitina “Down”.....	36
Tabla 3. Categorías funcionales del grupo ubiquitina “Up”.....	37
Tabla 4. Categorías funcionales del grupo SUMO “Down”.....	39
Tabla 5. Categorías funcionales del grupo SUMO “Up”.....	40
Tabla 6. Proteínas modificadas tanto por SUMO como por Ubiquitina “Down”.....	42
Tabla 7. Proteínas modificadas tanto por SUMO como por Ubiquitina “Up”.....	42

## **2. Introducción**

### **2.1 Generalidades.**

El cáncer y obesidad son dos enfermedades de origen multifactorial que representan dos de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Por una parte, cáncer es el nombre que se le da a un grupo de enfermedades que pueden comenzar en casi cualquier órgano o tejido cuando células anormales entran en una proliferación continua y no regulada, debido a la pérdida de la capacidad de responder adecuadamente a las señales que controlan el ciclo celular, ocasionando un crecimiento descontrolado (Cooper, 2000). Estas células cancerosas pueden invadir tejidos adyacentes para diseminarse entre órganos, en un proceso denominado metástasis (OMS 2020).

De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), para 2040, se espera que aumenten tanto los números de casos de cáncer (aproximadamente a 29.5 millones) como el número de muertes relacionadas (16.4 millones). En el año 2020, 1 de cada 5 personas desarrollaron cáncer a lo largo de su vida, y 1 de cada 8 hombres y 1 de cada 11 mujeres murieron a causa de este grupo de enfermedades. En países donde las poblaciones tienen una mayor esperanza de vida, un mayor nivel de educación y un estándar de vida más alto, las tasas de incidencia de cáncer son más altas. Sin embargo, para algunos tipos específicos de cáncer, como el cáncer de cuello uterino, la tasa de incidencia es más alta en países que tienen un lugar más bajo de las medidas antes mencionadas (IARC, 2020).

Por otro lado, la obesidad es una enfermedad crónica, de origen multifactorial, que involucra determinantes genéticos y ambientales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad se caracteriza por una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Ocasiona cambios en la composición y morfología celular en el tejido adiposo y la expansión excesiva de este tejido se acompaña de un mayor peso corporal y un mayor riesgo de morbilidad que afectan la esperanza y calidad de vida, debido a que se asocian con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardíacas como los accidentes cerebrovasculares, presión arterial alta, niveles anormales de colesterol, diabetes (y enfermedades asociadas), problemas digestivos. Además, la obesidad también aumenta el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer.

En 1997, la obesidad fue declarada epidemia mundial (OMS, 1997). Entre 1975 y 2016 la prevalencia a nivel mundial de la obesidad se triplicó, dando como resultado en que al menos

2.8 millones de personas murieron cada año como resultado de estas enfermedades. En 2016, más de 1,900 millones de adultos de 18 años o más, tenían sobrepeso, de los cuales 650 millones eran obesos. En niños, las cifras no eran mejores, más de 340 millones de niños y adolescentes de 5 a 19 años tenían sobrepeso u obesidad (OMS, 2020). En México la obesidad es uno de los principales problemas de salud pública, debido a su alta incidencia en los últimos 30 años. México ocupa el primer lugar mundial en obesidad infantil y el segundo en obesidad en adultos. Un estudio realizado entre los años 2000 a 2018 de adultos de 20 años o más, mostró que la prevalencia de obesidad aumentó 42.2%. Teniendo una prevalencia aún mayor en mujeres (Barquera et al., 2020).

### **2.1.1 Etiología de la obesidad.**

Si bien el tejido adiposo es considerado un órgano capaz de almacenar energía a largo plazo, también funciona como un órgano endócrino capaz de liberar múltiples sustancias conocidas como factores secretados derivados del tejido adiposo o adipocinas que tienen actividades proinflamatorias o antiinflamatorias. El estado secretor del tejido adiposo puede ser modificado mediante cambios en la composición celular que incluyen alteraciones en el número, fenotipo y localización de células inmunes, vasculares y estructurales. Una ingesta calórica excesiva induce una expansión del tejido adiposo mediada por un aumento en el tamaño de los adipocitos conocida como hipertrofia y/o un aumento en el número de adipocitos conocida como hiperplasia (Fuster et al., 2016), lo que a su vez resulta en la producción y/o secreción desregularizada de adipocinas. En la obesidad, el estado de inflamación crónico es asociado con un desequilibrio en la expresión de adipocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Las adipocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-18 (IL-18), leptina, y proteína C reactiva (CRP) son reguladas positivamente, mientras que las adipocinas antiinflamatorias como la interleucina-10 (IL-10) son reguladas negativamente (Wang y He, 2018).

La principal causa de la obesidad es un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las calorías gastadas (OMS, 2021). Sin embargo, existen múltiples etiologías asociadas a la obesidad que van desde factores biológicos, hasta ambientales y de comportamiento. Los factores biológicos incluyen determinantes genéticos, prenatales, embarazos, condiciones neuroendocrinas, microbiota intestinal e infecciones virales. Los factores ambientales

incluyen la abundancia de alimentos, estatus socioeconómico y cultural, mientras que los factores de comportamiento incluyen la ingesta excesiva de calorías, patrones de alimentación, estilo de vida sedentaria, sueño insuficiente, etc. La combinación de estos factores puede aumentar la propensión a desarrollar obesidad (Kadouh y Acosta, 2017).

### **2.1.2 Etiología del cáncer.**

El cáncer es resultado de una proliferación continua y no regulada de células anormales. Estas células no pueden responder apropiadamente a las señales que controlan su ciclo celular, lo que ocasiona su crecimiento y división descontrolada, resultado de anormalidades acumuladas en múltiples reguladores celulares. Estas mutaciones pueden ser heredadas, inducidas por factores ambientales o resultado de errores de replicación del DNA (Cooper, 2000).

El principal factor de riesgo en el desarrollo de cáncer es el envejecimiento. A nivel celular, el envejecimiento está asociado con inestabilidad genómica, desgaste de los telómeros, alteraciones epigenéticas, cambios cualitativos y cuantitativos de los espectros de proteínas, detección de nutrientes desregulada, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de las células madre y comunicaciones intercelulares alteradas, lo que resulta en la acumulación de daño celular con una mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer (Parsa N., 2012).

Algunos otros factores asociados al desarrollo de cáncer incluyen el consumo de tabaco, alcohol, exposición a luz ultravioleta, agentes químicos orgánicos e inorgánicos denominados carcinógenos, e infecciones virales (ver sección 2.5).

### **2.1.3 Asociación de cáncer con obesidad.**

Existe una relación epidemiológica clara entre el cáncer y la obesidad. Diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de esófago (adenocarcinoma), colorrectal, vesícula biliar, páncreas, hígado, mama (posmenopáusica), ovario, endometrio, riñón y próstata (etapa avanzada), están relacionados con un exceso de peso corporal asociado con la obesidad. A nivel mundial, en el año 2012, aproximadamente un 3-6% de los casos de cáncer fueron atribuidos a un exceso de índice de masa corporal en adultos, 1.9% de los casos en hombres y 5.4% en mujeres (Arnold et al., 2014). Varios mecanismos pueden favorecer el desarrollo y progresión del cáncer, que están relacionados con los procesos de inflamación de bajo grado

causados por la obesidad, alteraciones endocrinas, hipoxia-angiogénesis y la resistencia a insulina (Hernández et al., 2014).

Los mecanismos celulares y moleculares que son alterados durante la carcinogénesis y la obesidad están asociados con anomalías metabólicas y endócrinas sustanciales, que incluyen alteraciones en el metabolismo de hormonas sexuales, señalización de insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF, por su siglas en inglés) y las adipocinas (vías inflamatorias) (Renehan et al., 2015), además de alteraciones en las vías de apoptosis, proliferación celular, ciclo celular, metabolismo de los lípidos y glucosa.

## **2.2 Asociación de infecciones virales con cáncer.**

En humanos, la cantidad de casos de cáncer asociados con virus, representa aproximadamente el 20%. Estos incluyen el virus de la hepatitis B (HBV), el virus de la hepatitis C (HCV), el virus del papiloma humano (HPV), el virus de Epstein Barr (EBV), el virus del herpes humano 8 (HHV8), el poliomavirus de células de Merkel (MCPyV) y el virus linfotrópico de células T humanas HTLV-1. Todos alteran vías de señalización conservadas que controlan la progresión del ciclo celular y apoptosis para beneficiar la replicación viral. Las vías de señalización alteradas por virus oncogénicos incluyen las vías de señalización de PI3K-AKT-mTor, MAPK, NF- $\kappa$ B, respuesta al daño en DNA y supresores tumorales (You y Krump, 2018).

La activación de supresores tumorales ocurre cuando las células son infectadas por virus oncogénicos que desencadenan respuestas que incluyen la regulación del ciclo y la muerte celulares para inhibir la replicación viral. Las dos vías principales incluyen a la proteína celular supresora de tumores p53 y a la proteína retinoblastoma (Rb). Ambas están relacionadas con la progresión del ciclo celular y la respuesta a daño al DNA. La mayoría de los virus oncogénicos codifican oncoproteínas que regulan las vías de p53 y pRb mediante diferentes mecanismos que incluyen la inhibición de su función, su inactivación o degradación. Por ejemplo, en virus oncogénicos de DNA la inactivación de pRb y p53 lleva a las células a entrar a fase S mientras se inhibe la capacidad de las célula de morir por apoptosis, lo que conduce a un ambiente proliferativo que favorece la síntesis de macromoléculas virales y la replicación eficiente del virus.

Los virus oncogénicos también modulan las vías de transducción de señales que controlan el crecimiento, proliferación y la supervivencia celular para establecer condiciones que conducen a la replicación viral y la evasión de la muerte celular, aún en ausencia de señales de crecimiento o supervivencia.

Una de ellas es la vía de fosfatidilinositol 3-cinasa-Akt-blanco de rapamicina en mamíferos (PI3K-Akt-mTOR). En la célula la unión de factores de crecimiento a receptores de tirosina cinasa (RTK) regula la activación de Akt. La activación de Akt desencadena la fosforilación de diversos factores, incluidos mTOR. mTOR activado estimula la traducción de proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular al inducir la fosforilación de la proteína de unión 1 (4E-BP1) del factor de inicio de la traducción 4E eucariota (You y Krump, 2018).

Para promover la proliferación celular, los virus pueden modular también la vía de MAPK. Después de la estimulación por señales extracelulares o estímulos de estrés, las cinasas receptoras en la superficie celular activan una cascada de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), que resulta en la regulación de la transcripción de genes implicados en la progresión del ciclo celular, crecimiento, diferenciación, muerte celular y la respuesta inmune antiviral. Las tres subfamilias mejor caracterizadas de MAPK son las cinasas reguladas por señales extracelulares (erK), cinasas N-terminales JUN (JNK) y enzimas p38, cada una de estas MAPK es activada por cinasas afines que responden a diferentes estímulos. Una de las vías centrales de la defensa antiviral de la célula que también es regulada por proteínas virales depende del factor nuclear kB (NF-kB), un factor de transcripción que en respuesta a una infección puede translocarse al núcleo y coordinar la expresión de genes implicados en inflamación, inmunidad, muerte y proliferación celular.

Otra vía alterada durante infecciones virales es la respuesta a daño a DNA. Los componentes principales de esta vía de señalización son ataxia telangiectasia mutada (ATM) y ataxia telangiectasia cinasa relacionada con Rad3 (ATR). La vía ATM es activada principalmente por rupturas en el DNA bicatenario mientras que la vía ATR es activada por rupturas de una sola cadena. Ambas vías activan cinasas para activar los puntos de control que detienen la progresión del ciclo celular mientras son reclutadas las proteínas necesarias para la reparación del daño en DNA.

Los oncogenes de adenovirus E1A, E1B y E4 codifican proteínas que inhiben supresores tumorales (pRb, p53, PML-II, Daxx, sp100, entre otros) alterando vías de regulación de

proliferación y muerte celular. E1A puede interactuar con pRb lo que resulta en la liberación de E2F y activación de sus genes diana. Uno de estos genes activados es p19 (ARF) que inhibe a Mdm2, un importante regulador de p53 que actúa como una ubiquitina ligasa E3. La inhibición de Mdm2 mediada por p19 resulta en la estabilización y acumulación de p53.

La apoptosis dependiente de p53 es inhibida por las oncoproteínas E1B. E1B-19K es un análogo estructural de Bcl-2 que inhibe apoptosis al evitar la heterodimerización de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak (Ip y Dobner, 2019). Mientras, E1B-55K en conjunto con E4 inhiben la actividad de p53 y la maquinaria de reparación de daño al DNA mediante interacción, modificación y relocalización, además de modular las respuestas antivirales que inhiben mecanismos de defensa celular (Hidalgo y González, 2020).

La unidad de transcripción E4 codifica para proteínas que están involucradas en la alteración de proliferación celular, metabolismo, reparación de daño a DNA e inhibición de apoptosis. E4ORF1 puede inducir un metabolismo de tipo adipogénico mediante la interacción con Myc, lo que mejora la unión de Myc a genes diana glucolíticos y promueve una mayor biosíntesis de nucleótidos a partir de intermediarios de glucosa. Por otra parte, E4ORF1 puede activar la vía de señalización de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y posterior activación de Akt, aumentando la translocación de transportadores de glucosa y la expresión de factores adipogénicos, así como el incremento de la sintasa de ácidos grasos que aumenta la conversión de glucosa a ácidos grasos y el aumento de PPAR que resulta en diferenciación de las células en adipocitos (González, 2020).

### **2.3 Asociación de infecciones virales con obesidad.**

En las últimas dos décadas, se han reportado diversos patógenos adipogénicos; entre ellos están incluidos algunos virus humanos, agentes priónicos, bacterias y microbiota intestinal (Dhurandhar, 2001). La evidencia de que algunas infecciones pueden promover el desarrollo de la obesidad se ha acumulado a lo largo de los últimos 25 años (Genoni et al., 2014). El primer patógeno reportado que promueve la obesidad fue el virus del moquillo canino (CDV, Atkinson y L, 2017; Genoni et al., 2014). El CDV es un virus con un genoma de ácido ribonucleico (RNA), posee envoltura y pertenece a la familia *Paramyxoviridae*. Durante la investigación de Lyons et al. (1982) sobre las consecuencias patológicas de la infección por

CDV en el sistema nervioso central del ratón, se encontró el desarrollo de síndrome de obesidad en varios ratones que sobrevivieron a la infección. El CDV aumentaba significativamente el peso corporal y el número de células grasas en ratones infectados (Lyons et al.,1982). Mas tarde, estos resultados fueron confirmados por Bernard et al. (1988) estudiando el metabolismo de lípidos en un modelo de obesidad inducida por CDV en ratones infectados. Se detectó una acumulación de triglicéridos en los adipocitos de los ratones obesos ocasionada por el aumento de lípidos totales en el tejido adiposo. En investigaciones posteriores se demostró que el hipotálamo tenía alteraciones neuroquímicas con daño anatómico, lo que causaba el desarrollo de obesidad con niveles elevados de colesterol y triglicéridos en suero.

El segundo patógeno reportado que promueve la obesidad fue el virus asociado a Rous-7 (RAV-7, por su siglas en inglés). El RAV-7 es un virus con un genoma de RNA, posee una envoltura y pertenece a la familia *Rhabdoviridae*. En el estudio de Carter et al. (1983) se encontró que RAV-7 induce síndromes en pollos infectados que incluyen obesidad, lipemia, retraso en el crecimiento, ataxia, acumulación de grasa en el hígado e infiltrado linfoblastoide del páncreas y la tiroides. En la mayoría de los pollos infectados había un retraso de crecimiento y obesidad, manifestada por una acumulación de grasa alrededor del buche y en la almohadilla de grasa abdominal. Después de varias semanas desde su eclosión, los pollos infectados desarrollaban hígados grasos agrandados de color amarillo, anemia e inmunosupresión, además de un evidente retraso del crecimiento cuatro veces más lento en comparación con los pollos no infectados. Este desarrollo de obesidad es resultado del daño en el sistema nervioso central, consecuencia de la infección (Atkinson y L, 2017; Dhurandhar, 2001).

El virus de la enfermedad de Borna (BDV, por su siglas en inglés) tiene un genoma de RNA segmentado de cadena negativa, posee una envoltura y pertenece a la familia *Bornaviridae*. BDV produce obesidad en ratas, relacionado con un cambio en el balance energético que estimula el apetito en el hipotálamo, lo que resulta en una acumulación excesiva de grasa en ratas obesas (Gosztonyi et al., 2020). El mecanismo molecular de la obesidad producida por BDV es también mediante el daño del sistema nervioso central, al producir una inflamación linfomonocítica del tabique, hipocampo, amígdala e hipotálamo ventromedial y que persiste en el sistema nervioso (Atkinson y L, 2007).

El primer virus asociado a obesidad en humanos fue el adenovirus aviar SMAM-1. Este virus causa adiposidad en pollos y su característica distintiva es el aumento de la adiposidad con aparición de hipolipidemia (Dhurandhar, 2001). El adenovirus aviar SMAM-1 fue identificado por Ajinkya et al., quienes describieron la presencia de adenovirus en pollos cuando se notificaron brotes de esta enfermedad que se extendió por la industria avícola india y mató a miles de pollos en 1985. Estudios realizados en pollos infectados con SMAM-1 lo asociaron con una función inmunológica disminuida y una mayor acumulación de grasa corporal. Dhurandhar et al. (1992) describieron que el virus causaba obesidad sin un aumento en la ingesta de alimentos en pollos en crecimiento. Sin embargo, había una disminución en el colesterol y triglicéridos en suero. La grasa corporal aumentó, pero el peso corporal no todas las veces aumentaba en comparación con los controles, lo que sugirió que la masa se almacena preferentemente. En años posteriores, se realizaron estudios en suero de humanos con obesidad provenientes de India, para buscar anticuerpos contra SMAM-1. Una quinta parte de los sujetos de estudio fueron positivos para la presencia de anticuerpos contra este virus. El peso corporal y los valores de IMC del grupo positivo fueron más altos en comparación con el grupo negativo para anticuerpos contra SMAM-1. Paradójicamente, los niveles de colesterol y triglicéridos en suero eran más bajos en el grupo positivo (Dhurandhar et al., 1997).

La asociación de SMAM-1 (un virus animal) con obesidad en humanos, replanteó la posibilidad de que otros adenovirus pudieran también estar asociados con el desarrollo de obesidad. Hasta la fecha los adenovirus humanos (HAdV) de los tipos HAdV5, HAdV36 y HAdV37 se han relacionado con obesidad en modelos animales.

HAdV36 fue el primer virus humano que se evaluó en relación con el desarrollo de obesidad. Investigaciones realizadas por Dhurandhar et al. (2001) encontraron que en pollos y ratones infectados aumentó la grasa corporal y la grasa visceral aumentó de una manera desproporcionada con respecto a la grasa corporal, mientras que los niveles de colesterol y triglicéridos séricos disminuyeron. Se descartó que la obesidad fuera resultado de daño anatómico en el cerebro al evaluar este órgano en ratones infectados, y se confirmó que el mecanismo del desarrollo de obesidad estaba relacionado con un aumento del número y tamaño de los adipocitos. En células 3T3-L1 en cultivo (preadipocitos humanos), HAdV36 estimuló respuestas de diferenciación rápidas junto con la aparición de enzimas

de almacenamiento de grasa y factores de diferenciación, acumulación de triglicéridos y finalmente la diferenciación a adipocitos maduros. Estudios realizados en pollos infectados con HAdV37 (el cual pertenece a la misma especie que HAdV36) mostraron un aumento en la grasa corporal y visceral en comparación con pollos no infectados, aparentemente debido a cambios en el gasto de energía. A diferencia de HAdV36, el HAdV37 aumentó los niveles de colesterol sérico en pollos. Sin embargo, los dos virus disminuyeron los niveles de triglicéridos séricos. En células 3T3-L1, tanto HAdV36 como HAdV37 suprimieron la expresión del RNA mensajero de leptina a la mitad y aumentaron la sensibilidad a insulina. Por su parte, estudios realizados con HAdV5 en ratones, encontraron que la grasa corporal aumentaba un 300% sin una mayor ingesta de alimentos. Al evaluar el hígado, no mostró depósitos grasos. Se concluyó que la inflamación ocasionada por el virus estimulaba la actividad de la proteína Receptor  $\gamma$  activado por proliferadores de peroxisoma (PPAR-  $\gamma$ ) que está implicada en varias vías metabólicas que controlan la homeostasis de glucosa y de lípidos, así como la proliferación y diferenciación celular. El aumento de PPAR-  $\gamma$  estimula la diferenciación de células grasas, lo que puede conducir al desarrollo de obesidad (Atkinson y L, 2017).

#### **2.4 Alteraciones metabólicas mediadas por virus.**

Un virus es un parásito intracelular obligado que no puede reproducirse por sí solo y no posee su propio metabolismo, por lo que depende de la energía y los sustratos de la célula huésped para su replicación. La infección viral puede dirigir la maquinaria celular mediante la alteración de diversos procesos celulares para promover un entorno que permite su replicación y propagación (Sanchez y Lagunoff, 2015). La reprogramación metabólica de la célula huésped es una característica importante en diferentes infecciones virales, debido que asegura energía y sustratos necesarios para la replicación viral. Diversos estudios en la última década demuestran que los virus que infectan a células eucariotas inducen cambios en el metabolismo celular. Algunos virus inducen un aumento en la glucólisis aeróbica, síntesis de ácidos grasos y glutaminólisis, ya que así se asegura una mayor producción de nucleótidos libres necesarios para la replicación del genoma viral, además de una mayor cantidad de aminoácidos. También se ha observado que en el caso de virus envueltos es necesario un aumento en la producción de lípidos y glicoproteínas que permiten la formación de la

envoltura viral. Para asegurar la energía necesaria para la replicación y empaquetamiento del genoma, es necesaria la alteración en las vías metabólicas que proporcionan ATP (Sanchez y Lagunoff, 2015).

#### **2.4.1 Alteración viral del metabolismo de la glucosa y la glutamina.**

El proceso de glutaminólisis utiliza la glutamina para generar ATP y lactato mediante la desaminación inicial de la glutamina por una glutaminasa (GLS), para producir glutamato y amoníaco. El amoníaco es convertido en  $\alpha$ -KG (alfa-cetoglutarato, un intermedio del ciclo de ácidos tricarboxílicos) por la glutamato deshidrogenasa (GDH) para producir energía y carbonos necesarios para la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y lípidos. Por otro lado, en el proceso de la glucólisis, se descompone la glucosa en dos compuestos de tres carbonos (piruvato), consumiendo 2 moléculas de ATP mientras se producen 4 moléculas de ATP y 2 moléculas de NADH. Dependiendo de la disponibilidad de oxígeno, la demanda de energía y la presencia o ausencia de mitocondrias, los destinos del piruvato son distintos. Uno, es la fosforilación oxidativa, donde el piruvato entra en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) en la matriz mitocondrial. En ausencia de oxígeno, el piruvato permanece en el citoplasma y es convertido en lactato, mediante un proceso llamado glucólisis anaeróbica. Los metabolitos producidos en la glucólisis y la glutaminólisis son usados en otras vías para generar precursores de macromoléculas necesarias para la replicación viral.

En tumores y otras células en proliferación, existe un proceso denominado efecto Warburg o glucólisis aeróbica, donde aumenta la tasa de absorción de glucosa y se produce lactato incluso en altos niveles de oxígeno y mitocondrias funcionales, donde es favorecida la glucólisis sobre la respiración celular. Además, de una glutaminólisis elevada debido a su alta demanda de precursores biosintéticos utilizados en el ciclo de TCA, esto permite la producción de ATP a través del ciclo de TCA y proporciona esqueletos de nitrógeno, azufre y carbono necesarios para la producción de precursores necesarios para el crecimiento y proliferación de las células (Jin et al., 2016). Diversos virus tumorales, como es el caso de adenovirus, virus del herpes, virus del papiloma y poliomavirus pueden inducir glucólisis aeróbica y glutaminólisis mediante oncoproteínas virales. La alteración metabólica de la célula infectada por medio de oncogenes virales modifica la expresión y actividad de los

transportadores de glucosa, enzimas glucolíticas, así como la señalización de otras moléculas implicadas en el metabolismo de la glucosa y glutamina (Yu et al., 2018).

La primera investigación que relacionó la infección viral con un aumento en la glucólisis y glutaminólisis, fue en el año 1956, cuando Eagle y Habel demostraron la importancia de la glutamina y la glucosa en la infección de poliovirus en células HeLa, al estudiar la producción de progenie viral en medios deficientes de ambas moléculas. En un medio mínimo sin glucosa, se produjeron cantidades menores de virus. A pesar de que las células HeLa estaban en un medio rico en aminoácidos esenciales y no esenciales, purinas, pirimidinas, NB (4+) y proteína sérica, la deficiencia de glucosa y glutamina afectó significativamente la replicación viral. Al agregar glucosa al medio, se recuperaba una parte significativa del título viral (Eagle y Habel, 1956). En el mismo año, Levy y Baron (1956) confirmaron los hallazgos anteriores al investigar el efecto del virus de la poliomielitis en cultivos de tejido renal de mono. Al igual que en la investigación anterior, se mostró un aumento de lactato en el medio durante las primeras horas de la infección, teniendo efectos directos en la glucólisis.

El virus del herpes simple (HSV), virus de DNA bicatenario envuelto, altera el metabolismo de la glucosa. Estudios en el año de 1962, evaluaron la importancia de la glucosa y la glutamina en la producción de progenie de HSV-1 en células HeLa, utilizando medios deficientes de glucosa y/o glutamina. En el medio deficiente de glucosa, se observó que la producción viral se redujo significativamente. Por el contrario, en el medio deficiente de glutamina se obtuvo una replicación viral normal. Cuando el medio carecía tanto de glutamina como glucosa, la producción de progenie fue limitada (Lewis et al., 1962). Estudios similares con el virus de pseudorrabia, demostraron que la producción de progenie viral requiere de glucólisis.

El citomegalovirus humano (HCMV), miembro de la familia de los herpesvirus, es un virus que también altera la vía de la glucólisis y glutaminólisis. Estudios en el año de 1984 en fibroblastos de embriones humanos, mostraron un aumento significativo en la tasa de absorción de glucosa durante las primeras 20 horas después de la infección. La deficiencia de glucosa reduce de manera considerable la replicación viral (Landini, 1984). Estudios posteriores demostraron el aumento de intermediarios glucolíticos durante la infección por HCMV y un aumento en los niveles de transcripción de varias enzimas glucolíticas, como es el caso de PFK-1 (fosfofructocinasa-1). La proteína IE72 (proteína temprana codificada por

HCMV) es responsable de la alteración en la expresión de transportadores de glucosa en las células infectadas, reemplazando a la proteína GLUT1 con GLUT4, que es el principal transportador de glucosa en el tejido adiposo. La regulación positiva de GLUT4 depende de ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos) debido a que regula genes necesarios para la conversión de glucosa en nucleótidos y ácidos grasos (Yu et al., 2014). Por otro lado, estudios de flujo basados en cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem, demostraron un aumento de flujo en el metabolismo de glutamina en células infectadas (Munger et al., 2008). En el año 2009, se comparó la ausencia de glucosa en fibroblastos humanos infectados y no infectados con HCMV. Hubo un aumento en la absorción de glutamina y la producción de amoníaco en células infectadas, al igual que en las actividades de glutaminasa y el glutamato deshidrogenasa. Los fibroblastos infectados eran más viables en comparación con los no infectados, sugiriendo la utilización de glutamina como una fuente de carbono alternativa durante la infección. El metabolismo de la glutamina proporciona el ATP necesario para la replicación y es un componente fundamental en células infectas con HCVM. El cambio de glucosa por glutamina activa los mecanismos necesarios para completar el TCA y permite adaptación a las necesidades biosintéticas y energéticas durante infección viral. Otro virus con un mecanismo similar es el virus del dengue (DENV), un virus de RNA monocatenario que aumenta la glucólisis y altera los niveles de intermediarios glucolíticos en células humanas primarias infectadas. En la infección por DENV existe un aumento en la expresión del transportador de glucosa GLUT1, al igual que de la enzima hexocinasa 2. La importancia de la glucólisis se evaluó mediante la inhibición de la vía glucolítica, ocasionando una síntesis significativamente baja de RNA de DENV, además de una deficiente producción de viriones infecciosos (Fontaine et al., 2015).

El virus vaccinia (VACV) es miembro de la familia *Poxviridae*. Estudios con fibroblastos de prepucio humano (HFF) en ausencia de glucosa y glutamina, mostraron que durante la infección es alterado el metabolismo de la glutamina. La ausencia de glucosa no tuvo efecto significativo en la replicación viral. Al contrario, la ausencia de glutamina disminuyó significativamente la producción viral. El rendimiento viral se recuperó adicionando intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico. Al igual que el HCMV y poliovirus, VACV induce una alteración metabólica para depender completamente de la glutamina para mantener el TCA (Fontaine et al., 2014). Sin embargo, VACV depende únicamente de la

captación de glutamina a diferencia de poliovirus y HCMV que requieren del metabolismo de la glutamina y glucosa.

HAdV también altera la vía glucolítica. Durante la infección, la glucosa es utilizada para generar nucleótidos y compuestos intermediarios en la vía de las pentosa fosfato (PPP) para apoyar la replicación del genoma viral (Thaker et al., 2019). En el año 2014, en células epiteliales pulmonares primarias, se demostró que el producto génico temprano de adenovirus E4ORF1 activa los blancos glucolíticos por la unión a MYC, lo que induce una regulación positiva del metabolismo que resulta en un aumento en la expresión de enzimas glucolíticas, induciendo un efecto tipo Warburg. Por otra parte, la activación de MYC con E4ORF1 aumenta la biosíntesis de nucleótidos a partir de los intermediarios glucolíticos.

Además de los virus mencionados anteriormente, existen algunos otros virus que alteran el metabolismo de la glucosa, ya sea porque codifican sus propias enzimas metabólicas para facilitar la replicación viral en las células huésped o que dependen del secuestro de la maquinaria celular para la reprogramación metabólica (Thaker et al., 2019).

#### **2.4.2 Alteración viral del metabolismo de ácidos grasos.**

Diversos virus inducen cambios en el metabolismo de los ácidos grasos para modular la producción de membranas celulares en alguna etapa de su ciclo replicativo (Sanchez y Lagunoff, 2015). Por ejemplo, los virus animales atraviesan la membrana celular durante el proceso de entrada a la célula y en algunos casos la salida de la misma a través de mecanismos como la fusión con la membrana celular (por virus envueltos), la alteración local transitoria de la integridad de la membrana o por lisis celular. Por otro lado, durante su replicación algunos virus interaccionan con compartimentos de la membrana celular, lo que les permite inducir la formación de estructuras de membrana estableciendo un ambiente óptimo para la replicación y ensamblaje del genoma viral.

La biosíntesis de los ácidos grasos implica la conversión de acetil-CoA en malonil-CoA mediante una carboxilación, para ser convertido en malonil-ACP, en una reacción que requiere NADPH y es catalizada por la sintasa de ácidos grasos (FASN).

Diferentes investigaciones han demostrado que el virus del herpes necesita de la síntesis de ácidos grasos para su replicación. En el caso del herpes virus varicela-zóster (VZV) se examinó la presencia y papel de los ácidos grasos en sus glicoproteínas: gpl, gpII, gpIII y

gpIV. La inhibición de la biosíntesis de ácidos grasos con cerulinina (un inhibidor de FASN) tuvo un efecto significativo en la replicación viral sin afectar la síntesis de proteínas celulares. Además, disminuyó la cantidad de glicoproteínas maduras (Namazue et al., 1989). En el caso del herpesvirus Epstein-Barr (EBV), la proteína inmediata-temprana BRLF1 (R) es necesaria para la activación de la expresión de FASN, siendo la expresión de FASN necesaria para la síntesis de novo del ácido graso palmitato (Li et al., 2004). En el caso del HSV-1 éste desencadena distintos cambios en el metabolismo celular. Un estudio para determinar los efectos de HSV-1 y HCMV sobre el metabolismo, demostró que el HCMV mejora el flujo glucolítico y la biosíntesis de ácidos grasos, mientras que HSV-1 modifica el metabolismo de carbono para la producción de componentes de nucleótidos de pirimidina

Los virus de RNA dirigen la señalización, síntesis y metabolismo de los lípidos para establecer un entorno óptimo para su replicación en la célula huésped. El virus de la hepatitis C (HCV) circula como una partícula enriquecida en apolipoproteínas B y E (apoB, apoE) además de las proteínas estructurales virales E1 y E2. En una célula infectada el complejo de replicación se forma en una red membranosa derivada del retículo endoplasmático y el ensamblaje de HCV es producido en gotas lipídicas. La replicación requiere factores celulares implicados en el metabolismo de los lípidos, como es el caso de fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4KA), FAS y la geranilgeranilación de la proteína FBL2 (FBL-GG). En la infección por el virus de la influenza en líneas celulares A549 y AGS, los metabolitos involucrados en la síntesis de ácidos grasos y el metabolismo del colesterol aumentaron después de la infección (Lin et al., 2010). Además, la inhibición farmacológica de la biosíntesis de ácidos grasos suprimió la replicación viral (Munger et al., 2008).

## **2.5 Adenovirus.**

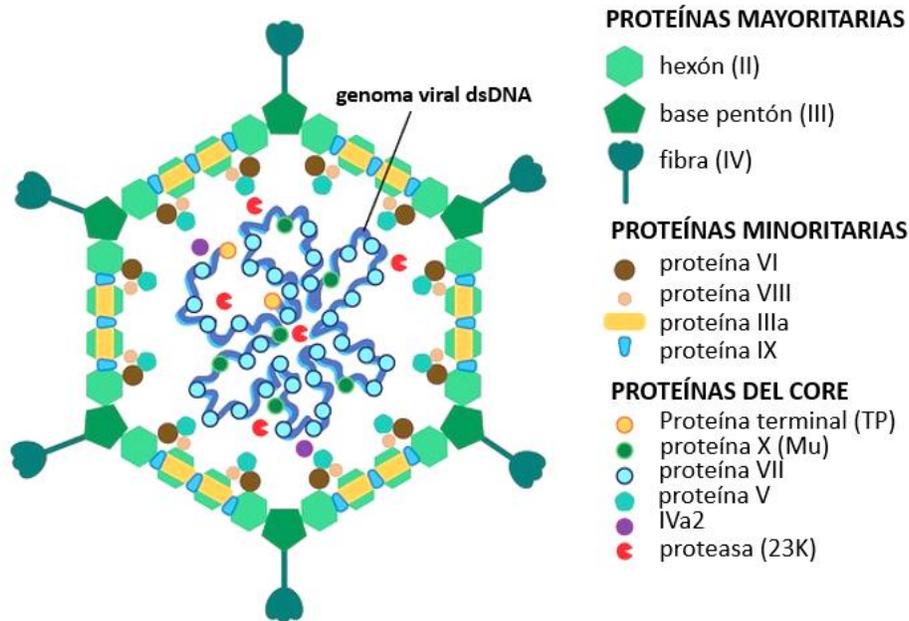
Los adenovirus (AdV) fueron descritos por primera vez por Wallace et al. (1953) mientras experimentaban con cultivos celulares de amígdalas y tejido adenoide. La incapacidad de cultivar el agente descubierto en medios bacteriológicos indicó que posiblemente pertenecía a los virus o rickettsias. Los adenovirus son comunes tanto en animales como en humanos. En estos últimos, la infección puede ocurrir tanto en niños como en adultos. Aunque la mayoría de las infecciones por adenovirus son asintomáticas, el virus puede infectar tracto gastrointestinal, ojos, vías respiratorias, riñones y otros órganos (Knipe et al., 2013).

### **2.5.1 Clasificación.**

La familia *Adenoviridae* está compuesta de 5 géneros; *Mastadenovirus* que infectan mamíferos, incluidos los humanos; *Aviadenovirus* que infectan aves; *Atadenovirus* nombrados por su alto contenido de A+T en su genoma, e infectan aves, reptiles, un marsupial y mamíferos; *Siadenovirus* que infecta principalmente a aves y una especie de rana, e; *Ichtadenovirus* que fue aislado de esturión. En humanos, se han aislado 104 tipos de adenovirus y son clasificados en siete especies de la A a la G dependiendo de serología, hemaglutinación, capacidad oncogénica en modelos animales, transformación in vitro y secuencia del genoma (Knipe et al., 2013).

### **2.5.2 Estructura.**

Las partículas de AdV poseen una capa de proteínas de simetría icosaédrica que rodean al core que contiene el genoma de DNA bicatenario. La capa de proteína externa llamada cápside tiene un diámetro aproximado de 70 a 100 nm y está compuesta por 252 capsómeros estructurales que consisten de 720 subunidades de hexones organizados en 240 trímeros y 12 vértices del icosaedro conformados por unidades llamadas pentones unidos a una proteína trimérica llamada fibra que se proyecta de la superficie. Además de estas proteínas mayoritarias la cápside tiene varias proteínas minoritarias. El polipéptido IX y las proteínas IIIa, VI, VIII que estabilizan la cápside o interaccionan con el core del virión (San Martín, 2012). El core del virión contiene el genoma viral y las proteínas V y VII, ambas proteínas básicas ricas en arginina que son encargadas de condensar el DNA viral dentro del core. El virión posee una proteína terminal presente en solo dos copias por virión, que se une covalentemente a los extremos 5' del DNA viral (Knipe et al., 2013). Esta proteína sirve como iniciador para la replicación del genoma. Finalmente, la partícula contiene una cisteína proteasa viral p23, su función principal es cortar los precursores de proteínas del virión durante el ensamblaje, desensamblaje, maduración y escape de los endosomas durante el ciclo de infección (Figura 1).



**Figura 1. Estructura de adenovirus.** Esquema de la composición y organización de la cápside viral (Modificado de Adenoviruses in Encyclopedia of Infection and Immunity. Hidalgo P, and Gonzalez R. A., 2020).

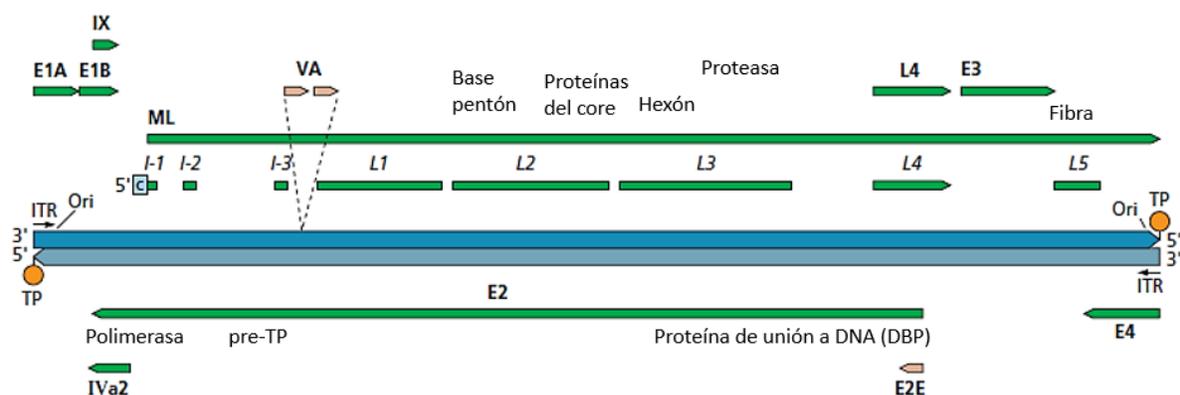
### 2.5.3 Genoma.

El genoma de AdV está compuesto de una única molécula de DNA lineal bicatenario. En cada extremo posee repeticiones terminales invertidas de aproximadamente 100 pb que contienen los orígenes de replicación del DNA viral. Seguida de una de estas secuencias en uno de los extremos, se encuentra la secuencia de empaquetamiento viral encargada de la encapsidación del DNA viral. La proteína necesaria para el inicio de la replicación del DNA viral (pTP) se encuentra unida covalentemente a los extremos 5' del genoma.

El genoma viral está organizado en grupos de unidades de transcripción cuya expresión está regulada cronológicamente. Las unidades de transcripción temprana incluyen la E1A, E1B, E2, E3 y E4, las de transcripción intermedias, IVa2 y IX, y la unidad de transcripción tardía denominada Major Late que genera cinco familias de RNAs denominados de L1-L5 definidos por selección de sitios de poliadenilación. La mayoría de las unidades de transcripción son transcritas por la RNA polimerasa II, dando lugar a múltiples RNAs que sufren poliadenilación y splicing alternativos (Hidalgo y González, 2021). En la mayoría de los casos estas unidades codifican más de una proteína con funciones relacionadas. Además,

el genoma codifica para dos RNA que son transcritos por la RNA polimerasa III, llamados RNA asociados a virus (VA).

Por convención, el genoma se representa con la unidad de transcripción E1A del lado izquierdo. Las unidades de transcripción E1A, E1B, IX, ML, VA RNA y E3 están codificadas en la hebra que se lee de izquierda a derecha, mientras que las unidades de transcripción E4, E2 y IVa2 están codificadas en la hebra complementaria y se leen de derecha a izquierda (Figura 2). Las proteínas codificadas en E1A activan la transcripción e inducen a la célula huésped a entrar en la fase S del ciclo celular. Las unidades de transcripción E1B y E3 codifican proteínas que contrarrestan la respuesta inmune del huésped, además de evitar el reconocimiento y eliminación de la célula infectada. La unidad E2 codifica para tres proteínas que funcionan directamente en la replicación del DNA viral. La unidad de transcripción E4 posee 7 marcos de lectura abiertos (ORF, por su siglas en inglés) que codifican para proteínas que están involucradas en la regulación transcripcional, splicing, exportación nuclear y traducción del RNA, además de modular la replicación del DNA e inhibir apoptosis. La unidad de transcripción Major Late produce cinco familias de RNA que codifican para proteínas estructurales virales. La proteína IVa2 participa en la encapsidación del genoma viral y activación de la transcripción de los promotores tardíos. Además, es una proteína estructural que estabiliza la interacción entre el pentámero y hexón (Hidalgo y González, 2021).



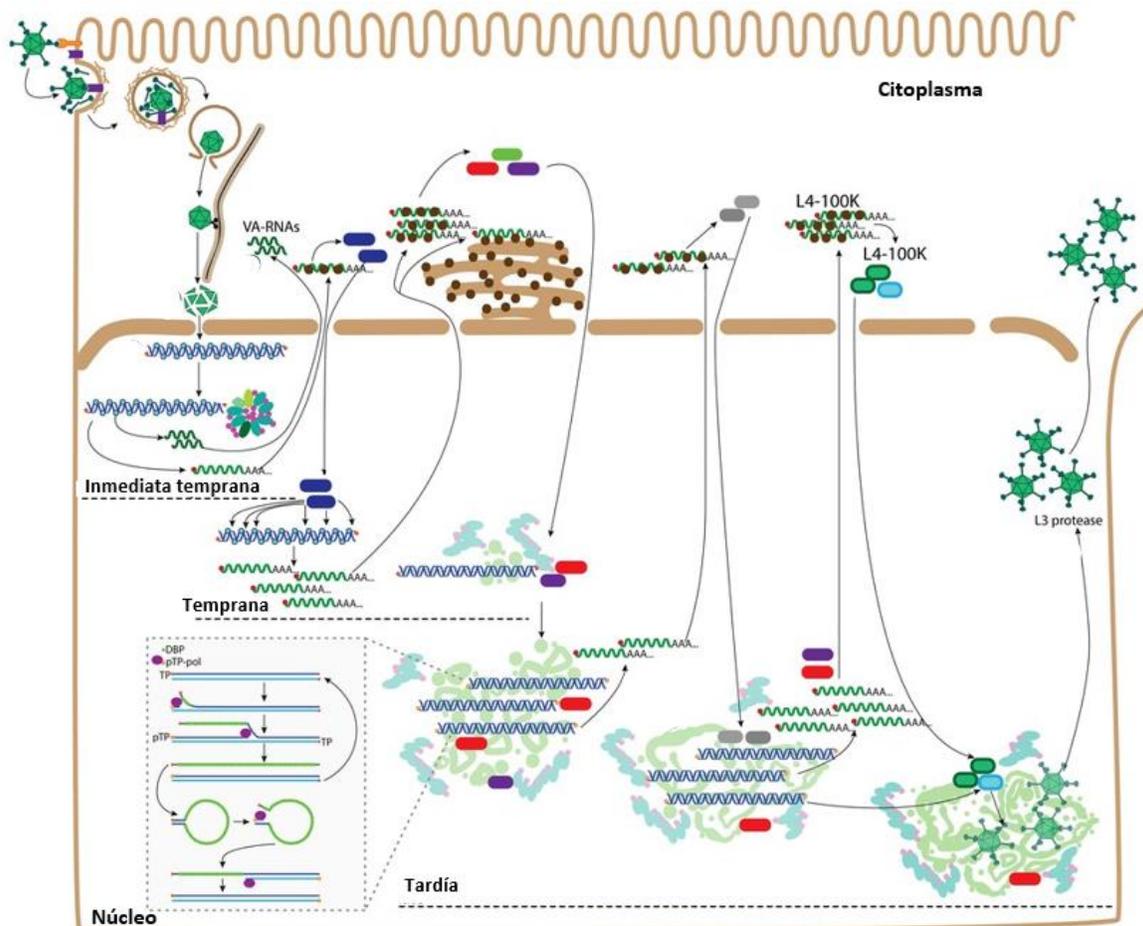
**Figura 2. Organización del genoma de adenovirus.** El DNA viral está representado en color azul mientras que las flechas verdes y amarillas representan productos de la transcripción de la RNA polimerasa II y III, respectivamente (Modificado de Principles of Virology S. J. Flint 2010).

Algunas de las proteínas virales son oncoproteínas que pueden inducir la transformación oncogénica de la célula. La oncoproteína E1A es un activador de la transcripción por diferentes mecanismos. En una infección por adenovirus, la unión de E1A con Rb separa a E2F del complejo, lo que da como resultado la activación de E2F y de sus genes diana, lo que ocasiona una pérdida de control en el crecimiento celular. E1A regula la actividad del proteasoma y se asocia a UBC9, única E2 SUMO ligasa identificada hasta ahora. La pérdida del control del crecimiento celular resulta en una señal genotóxica que induce la estabilización y activación de p53, lo que resulta en la activación de apoptosis. Sin embargo, E1B-55K en conjunto con E4ORF6 forman un complejo E3 ubiquitina ligasa que induce la degradación de p53, lo que resulta en la alteración de la proliferación y muerte celular. Adicionalmente, E1B-55K puede funcionar como una E3 SUMO ligasa independiente de E4ORF6, que puede inducir la SUMOilación de p53, lo que resulta en su relocalización a compartimentos de replicación donde funciona como activador de la transcripción de un promotor viral (Hidalgo y González, 2020). Además, durante la infección viral E4ORF3 funciona como una E3 SUMO ligasa que se dirige específicamente a componentes de la vía de reparación de daño a DNA (lo que evita la concatamerización del genoma viral) mediante la interacción, modificación, relocalización y posterior degradación dependiente del complejo de E3 ligasa de ubiquitina formado por E1B-55K y E4-ORF6.

#### **2.5.4 Ciclo de replicación.**

El ciclo de replicación de adenovirus consta de dos fases que están separadas por el inicio de la replicación del DNA viral. La primera fase comienza cuando el virus se asocia y entra a la célula por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor. El virión parcialmente desensamblado escapa del endosoma y es transportado por microtúbulos al complejo del poro nuclear (NPC), en donde el genoma viral entra al núcleo e inicia la expresión de los genes virales tempranos. Como se describió antes los productos de los genes tempranos se encargan de controlar la transcripción de los demás genes virales y se encargan de modificar múltiples actividades celulares propiciando un ambiente que conduce a la producción de progenie viral. Después del inicio de la replicación del DNA viral, inicia la fase tardía del ciclo de

replicación y la expresión de los genes virales tardíos y el ensamblaje de la progenie viral (Figura 3) (Knipe et al., 2013).



**Figura 3. Representación del ciclo de replicación de adenovirus.** Modificado de Adenoviruses in Encyclopedia of infection and Immunity. Hidalgo P, and Gonzalez R. A., 2020.

### 2.5.5 Ensamblaje y liberación de partículas virales.

El ensamblaje de partículas virales requiere la secuencia de empaquetamiento que se encuentra en el extremo izquierdo del genoma en conjunto con las proteínas tardías IVa2 y L4 22K (Ewing et al., 2007). Se cree que este ensamblaje avanza mediante una ruta secuencial que incluye los siguientes pasos: (1) el ensamblaje de los capsómeros de hexón y pentón seguidos por el ensamblaje de cápsides vacías que involucran proteínas minoritarias de la cápside; (2) reconocimiento específico del genoma viral empaquetando proteínas; (3) inserción del genoma viral en cápsides vacías y liberación del andamiaje de algunas proteínas de empaquetamiento; y (4) procesamiento de las proteínas precursoras proteínas IIIa, VI, VII,

VIII,  $\mu$ , y TP, por la proteasa viral p23 para la maduración de las partículas virales (Ahi y Mittal, 2016).

### **2.5.6 Compartimentos de replicación.**

Durante el ciclo de replicación se induce la reorganización del núcleo de la célula infectada, lo que resulta en la reorganización de dominios nucleares y la formación de subcompartimentos nucleares denominados compartimentos de replicación de adenovirus (AdRC). En estos sitios se localiza el genoma del virus y es reclutada la maquinaria viral y celular necesaria para la expresión de los genes virales y la replicación del DNA viral (Hidalgo y González, 2019).

Los AdRC inicialmente fueron observados mediante microscopía electrónica de transmisión y se describieron como inclusiones o agregados virales electrodensos. Estas estructuras contienen proteínas involucradas en la replicación del genoma, factores de transcripción, factores de splicing, y componentes de la respuesta al daño en el DNA (como ATR, el complejo MRN, RPA32, ATRIP, TopBP1 y Spoc1, entre otros). Además, regulan mecanismos antivirales de la célula al reclutar factores que restringen la replicación viral como supresores de tumores (p53, BRCA1, PML) y proteínas celulares de la respuesta inmune innata (STAT-1, PKR, IRF3, IFI16) (Hidalgo y González, 2019).

Las oncoproteínas E1A, E1B y E4 son necesarias para la formación de los AdRC y participan en las actividades que son reguladas en estos sitios. Por ejemplo, la proteína E1B-55K de adenovirus induce la SUMOilación de p53, lo que resulta en su relocalización a los AdRC y en estas estructuras p53 actúa como un activador de la transcripción del promotor viral L4. El genoma de Adv se localiza en el núcleo, adyacente a los cuerpos nucleares de PML (PML NB) mediante un mecanismo aún desconocido. Los PML NB son compartimentos nucleares compuestos por factores que participan en la replicación y transcripción del DNA, reparación del DNA, apoptosis y la regulación de la respuesta antiviral inducida por interferón. Las proteínas E1A, E1B y E4ORF3 inducen la redistribución de los PML NB, gránulos de intercromatina (IG), paraspeckles, cuerpos de Cajal (CB) y nucleolos (Hidalgo y González, 2021).

## **2.6 Alteración de modificaciones postraduccionales mediada por adenovirus.**

Las modificaciones postraduccionales (PTM) tienen un papel importante en la regulación de proteínas. Este proceso ocurre mediante la adición covalente de grupos funcionales o proteínas, escisión proteolítica de subunidades reguladoras o degradación de proteínas. Se han identificado más de 40 PTMs que tienen un papel importante en la localización celular, la estabilidad de las proteínas, las interacciones proteína-proteína y la unión al DNA.

La ubiquitilación y la SUMOilación juegan papeles importantes en la regulación de las actividades y degradación de proteínas. Cualquiera de estos procesos pueden ser alterados por la maquinaria viral para regular proteínas celulares o virales por ubiquitilación o SUMOilación. En diversos virus durante su evolución se han establecido estrategias que intervienen en algunos de los pasos de la cascada enzimática de cualquiera de los procesos. En una infección por AdV, el sistema ubiquitina/SUMO es alterado por los oncogenes E1A, E1B y E4, que como se ha descrito antes están implicados tanto en procesos de adipogénesis como oncogénesis debido a su participación en diferentes vías del metabolismo, diferenciación y proliferación celular.

### **2.6.1 Proceso de ubiquitilación.**

La ubiquitilación es una modificación postraducciona de proteínas, que desempeña un papel importante en la homeostasis de proteínas debido a su participación en procesos de degradación y renovación de proteínas que son clave en vías reguladoras como la reparación del DNA, progresión del ciclo celular, apoptosis, endocitosis mediada por receptores o la transducción de señales (Kona et al., 2013).

La ubiquitina es una proteína conservada de aproximadamente 76 aminoácidos que se une a las proteínas mediante un enlace isopéptido entre el carboxilo terminal de la ubiquitina y el grupo amino de las cadenas laterales de lisina de las proteínas diana. Esto ocurre en un proceso enzimático de tres pasos que involucra su activación mediada por enzimas activadoras de ubiquitina denominadas E1, enzimas conjugadoras denominadas E2 y enzimas ligasas o E3. El proceso comienza por la activación de la ubiquitina por la enzima activadora de Ub (E1) mediante la adenilación del extremo C-terminal de la ubiquitina, en una reacción que requiere de la hidrólisis de ATP y resulta en la formación de un enlace tioéster entre el carboxilo terminal de Ub y un residuo de cisteína interno de la E1. La enzima E1 no puede

llevar a Ub directamente a la proteína diana, por lo que necesita de una segunda enzima con una actividad conjugadora de Ub denominada E2. La ubiquitina es transferida de E1 a un residuo de cisteína interno de E2. Entonces, E2 puede transferir la ubiquitina a una ligasa de Ub denominada E3 para transferir la ubiquitina a la proteína diana mediante la formación de un enlace isopéptido. El proceso de ubiquitilación puede resultar en la desestabilización, cambio de la localización celular y actividades de las proteínas, mediante la adición de una sola molécula de ubiquitina (mono-ubiquitilación) o mediante la conjugación de múltiples subunidades de ubiquitina (poli-ubiquitilación).

El proceso inverso de la ubiquitilación es la desubiquitilación. Las desubiquitilasas (DUB) son enzimas que eliminan la monoubiquitina o poliubiquitina de proteínas diana, lo que conduce a un reciclaje de las moléculas de ubiquitina. Las DUB tienen un papel importante en diferentes procesos biológicos como respuesta inmune e inflamatoria, remodelación de cromatina y señalización antiviral de la célula (Wimmer y Schreiner, 2015).

Como se describió antes, las proteínas E4ORF6 y E1B55K de adenovirus se ensamblan en un complejo tipo ubiquitina ligasa formado por Cullin 5, elonginas B/C y la proteína RING Rbx1 que induce la degradación proteosomal de diferentes sustratos celulares que incluyen a p53, Mre11, DNA ligasa IV y otros más involucrados en reparación de daño de DNA. En el complejo E3 ligasa, E1B-55K desempeña un papel importante como unidad de reconocimiento de sustrato al unir e introducir sustratos para la ubiquitilación, mientras que E4ORF6 ensambla los componentes celulares (Wimmer y Schreiner, 2015).

### **2.6.2 Procesos de SUMOilación.**

La SUMOilación es otra modificación postraducciona de proteínas involucrada en diversos procesos celulares como el transporte núcleo-citoplásmico, regulación transcripcional, apoptosis, estabilidad de proteínas, respuesta a estrés y la progresión del ciclo celular.

La proteína SUMO es una pequeña proteína modificadora de tipo ubiquitina de aproximadamente 100 aminoácidos que se une covalentemente a proteínas diana a través de una cascada enzimática análoga, pero distinta del proceso de ubiquitilación. En mamíferos, existen cuatro isoformas de SUMO denominadas de SUMO1-SUMO4 que modifican covalentemente diversas proteínas diana. SUMO2 y SUMO3 poseen una estructura muy similar (aproximadamente del 97% de identidad de secuencia) por lo cual, comúnmente son

denominados SUMO2/3 y participan en respuesta a diferentes agresiones celulares. A diferencia de SUMO1 que tiene funciones relacionadas con la expresión génica e importación nuclear.

La SUMOilación involucra tres pasos enzimáticos donde participa una enzima activadora (denominada E1, SAE1/SAE2), una enzima conjugadora (denominada E2, Ubc9) y una enzima ligasa de SUMO (E3). El proceso comienza por la activación de la proteína SUMO mediante la formación de un enlace tioéster con el sitio activo de la enzima E1 en una reacción que requiere de hidrólisis de ATP. La proteína SUMO-activada pasa a la cisteína del sitio activo de una segunda enzima que funciona como conjugadora de SUMO, E2 (Ubc9). Luego la E2 puede transferir a SUMO a la proteína diana mediante una tercera enzima denominada E3, que se encarga de la formación del enlace isopéptido entre SUMO y la proteína diana. Ubc9 es la única enzima conjugadora de SUMO conocida y se une directamente al motivo consenso de SUMOilación de proteínas diana,  $\psi$ KxD / E (donde  $\psi$  es un residuo hidrofóbico grande).

El proceso inverso de la SUMOilación es la desSUMOilación. Las Ulp/SENPs son necesarias para la maduración y procesamiento de precursores de SUMO y para revertir el proceso de la SUMOilación. En mamíferos existen seis clases de SENP: SENP1, SENP2, SENP3, SENP5, SENP6 y SENP7. Los SENPs 1 y 2 se localizan en la envoltura nuclear, tienen actividad de procesamiento y desconjugación para SUMO1. Los demás SENPs tienen funciones de procesamiento y desconjugación preferente de SUMO2/3. SENP3 y SENP5 tienen funciones importantes en la biogénesis de ribosomas. SENP6 y SENP7 se localizan en el nucleoplasma y están implicados en la edición de cadenas poli-SUMO (Wang y Dasso, 2009).

Como se mencionó antes, se sabe que la E1A se asocia a Ubc9 y que E1B-55K puede funcionar como una E3 ligasa de SUMO, dirigiendo la relocalización de p53. Además, la proteína E4ORF3 puede también funcionar como una E3 ligasa de SUMO, siendo p53, Mre11 y Nbs1 blancos moleculares comunes que son degradados después por medio del complejo de E3 ligasa de ubiquitina formado por E1B-55K y E4ORF6 (Wimmer y Schreiner, 2015).

La proteasa de adenovirus tiene una estructura muy similar a los SENPS celulares. La estructura de esta proteasa posee cuatro residuos del sitio activo conservados en las proteasas celulares de SUMO. Teniendo un mecanismo catalítico similar (Wimmer y Schreiner, 2015).

### **3. Justificación.**

Las modificaciones postraduccionales que incluyen el sistema ubiquitina/SUMO, son uno de los mecanismos alterados por oncogenes de adenovirus, que están implicados tanto en adipogénesis como en la transformación oncogénica. Tanto la ubiquitilación como la SUMOilación desempeñan un papel importante en la homeostasis de proteínas debido a su participación en procesos de degradación y renovación de proteínas que son clave en vías reguladoras como la reparación del DNA, progresión del ciclo celular, apoptosis, endocitosis mediada por receptores o la transducción de señales, lo que a su vez resulta en la alteración de diferentes vías del metabolismo, diferenciación y proliferación celular. Por lo tanto, la modulación del sistema Ub/SUMO por oncoproteínas de adenovirus tiene un impacto en la regulación de las actividades celulares que benefician la replicación viral. Encontrar los determinantes moleculares que son regulados por este sistema nos brindará información de procesos tanto oncogénicos como adipogénicos.

### **4. Hipótesis.**

Los oncogenes de adenovirus están implicados tanto en procesos de transformación oncogénica como en adipogénesis mediante la alteración de modificaciones por Ub/SUMO sobre proteínas celulares.

### **5. Objetivos:**

#### **5.1 Objetivo general:**

Identificación y validación de blancos moleculares regulados por Ub/SUMO en células infectadas con adenovirus 5.

#### **5.2 Objetivos particulares:**

1. Análisis de una base de datos de proteínas modificadas por SUMO o Ubiquitina en células infectadas con adenovirus.

2. Selección de proteínas de interés modificadas por SUMO o Ubiquitina en células infectadas con adenovirus implicadas en procesos de adipogénesis y oncogénesis.
3. Validación de las proteínas seleccionadas.
  - a. Determinación de la localización intracelular de las proteínas seleccionadas en células infectadas con adenovirus.
  - b. Efecto de la inhibición de las proteínas seleccionadas sobre la producción de progenie viral.

## **6. Materiales y métodos.**

### **6.1 Células y virus.**

- **Células.** Los fibroblastos derivados de prepucio humano (HFF) se crecieron como cultivos en monocapa en medio Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF). Las células HeLa, derivadas de cáncer cérvico uterino, se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de suero bovino (SB). Ambos cultivos de células se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.
- **Virus.** En todos los experimentos se utilizó adenovirus 5 (HAdV-C5) y fue amplificado en células HeLa utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 unidades formadoras de focos por célula (UFF/célula). La adsorción del virus se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C, moviendo cuidadosamente las células cada 15 minutos para poder asegurar una distribución homogénea del inóculo del virus sobre las células. Después de este tiempo, se retiró el inóculo y se agregó DMEM suplementado con 10% de SB y las células se dejaron incubando a 37°C. Posteriormente se cosecharon con un gendarme, se recuperaron las células y el medio en un tubo Falcon, y se centrifugaron a 3,500 rpm durante 5 minutos a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 1 ml de buffer IV USB (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, KCl 5mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y dextrosa 0.1% w/v). Las partículas virales se recuperaron al lisar la células mediante congelamiento en nitrógeno líquido por 5 minutos y descongelando por completo a 37°C por 10 minutos, este proceso se repitió 3 veces (3 ciclos). Se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante en un criotubo y se almacenó a -20°C. El virus se tituló por focos fluorescentes en células HeLa.

### **6.2 Análisis bioinformático**

El análisis de datos del proteoma total del ubicuitoma y sumoiloma se llevó a cabo en MaxQuant y MSstats utilizando como entrada picos espectrales identificados y cuantificados

de una lista de proteínas diferencialmente redundantes, logrando la identificación y cuantificación de proteínas en los diferentes grupos que incluían células HFF infectadas con adenovirus 5 (Ad5.WT) y células no infectadas (Mock). Posteriormente, estos dos grupos se compararon y se aplicaron puntos de corte de un Fold change mayor a 1.5 ( $|FC| > 1.5$ ) y un  $p$ -value menor a 0.05 ( $p\text{-value} < 0.05$ ). Las proteínas obtenidas se dividieron en dos grupos dependiendo de su nivel de abundancia relativa comparando a células infectadas con Ad5 vs células no infectadas (Mock). El primer grupo denominado “up-proteins” son proteínas SUMOiladas o ubicuitiladas que tienen abundancia relativa mayor en células infectadas respecto a Mock, mientras que el segundo grupo denominado “down-proteins” son proteínas SUMOiladas o ubicuitiladas que tienen abundancia relativa menor en células infectadas respecto a Mock. Los análisis posteriores fueron realizados tomando en cuenta estos dos grupos.

La agrupación funcional de los genes obtenidos se realizó en la base de datos DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>, The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discover). DAVID utiliza un método de identificación de genes relacionados al medir la similitud de sus perfiles de anotación basados con la hipótesis de que si dos genes se relacionan funcionalmente deberían tener perfiles de anotación similares. Para la obtención de los perfiles se genera una matriz de anotación de termino genético binaria que utiliza términos de anotación en 14 categorías (incluida la ontología genética (GO), el proceso biológico, la función molecular de GO, el componente celular de GO, las vías de KEGG, las vías de BioCarta, las palabras clave de Swiss-Prot, las vías de BBID, SMART Dominios, base de datos de la Asociación Genética del NIH, características de la secuencia UniProt, ontología COG / KOG, OMIM NCBI, dominios InterPro y nombres de superfamilia PIR) recopilados en la base de datos DAVID, que aglomera diversos identificadores de genes/proteínas y anotaciones asociadas a bases de datos biológicas conocidas. Después de la generación de la matriz, se usa la estadística kappa, para medir estadísticamente co-ocurrencia de anotación entre dos conjuntos de datos categorizados.

Se utilizaron los valores estadísticos por defecto, sin embargo, los valores de astringencia de agrupación fueron modificados. La astringencia o valor de agrupación es un control necesario para establecer un conjunto de parámetros detallados involucrados en los algoritmos de clasificación funcional, que va desde “más bajo” hasta “más alto”. La configuración de mayor

astringencia genera menos grupos funcionales con genes estrechamente asociados en cada grupo, lo que a su vez ocasiona que más genes no estén agrupados. Y, al contrario, la configuración con menor astringencia genera más grupos funcionales con genes menos asociados en cada grupo, lo que resulta en menos genes no agrupados. Para este trabajo se usaron valores de astringencia altos.

Una vez llevados a cabo los análisis bioinformáticos se seleccionaron blancos moleculares modificados por SUMO/Ubiquitina que pudieran ser relocalizados a los compartimentos de replicación durante la infección con adenovirus, y se observó su efecto en la replicación viral y la producción de progenie al agregar inhibidores de las proteínas seleccionadas.

### **6.3 Inmunofluorescencia**

Los ensayos de inmunofluorescencia fueron utilizados para la titulación del stock de virus Ad5 por conteo de focos fluorescentes en células HeLa, así como para determinar la localización intracelular de las proteínas WT1 y PCNA en células HFF infectadas. Se sembraron células en cajas de 12 pozos que contenían en el fondo cubreobjetos (previamente esterilizados) y fueron infectadas cuando estaban al 80% de confluencia con Ad5. Se adicionó la cantidad necesaria de virus en 300  $\mu$ l de DMEM sin suero para infectar las células con una multiplicidad de infección (MOI) de 30 unidades formadoras de focos (UFF)/célula. Para las células sin infectar se usó solo DMEM sin suero. La adsorción del virus se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C, moviendo cuidadosamente las células cada 15 minutos para asegurar una distribución homogénea del inóculo del virus sobre la célula. Después de este tiempo se retiró el inóculo y se agregó 1 ml por pozo de DMEM suplementado con 10% suero, las células se dejaron incubando a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo postinfección se retiró el medio y se lavaron las células con 1 ml de PBS (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 8 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) frío por pozo. Las células se fijaron con 1 ml por pozo de formaldehído al 3.7% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con 1 ml por pozo de PBS frío en agitación por 10 minutos y se permeabilizaron con 500  $\mu$ l por pozo de Triton X-100 al 0.5% en PBS, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con 1 ml por pozo de PBS frío, se adicionó 300  $\mu$ l por pozo del anticuerpo primario a la dilución indicada para cada anticuerpo y se incubó toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-WT1 (ab89901

Abcam), anti-PCNA (ab92552 Abcam) utilizados a una concentración 1:300 y anti-DBP (monoclonal B6) en una concentración 1:500. Después de incubar con el anticuerpo primario, se lavó 3 veces con 1 ml por pozo de PBS frío en agitación por 5 minutos. Se adicionó 300 µl por pozo del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 488 en una dilución 1:1,500 y se incubó 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente se lavó 3 veces con 1 ml de PBS frío en agitación por 5 minutos y se agregó 1 ml por pozo de DAPI en una concentración 1:20,000. Se hicieron 3 lavados con 1 ml por pozo de PBS frío en agitación por 5 minutos y después se montaron los cubreobjetos en portaobjetos, invirtiendo cada cubreobjetos sobre 1.8 µl de glicerol al 10% en PBS en un portaobjetos, sellando con barniz. Las muestras se mantuvieron a -20°C y se analizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia.

La titulación del virus por conteo de focos fluorescentes se llevó a cabo en células HeLa, que se infectaron al 80% de confluencia con diferentes diluciones seriadas del stock de virus que fueron desde  $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^{-6}$ . Las células se fijaron a las 24 horas post infección y se prepararon para inmunofluorescencia como se describió anteriormente, usando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal B6 dirigido contra la proteína de adenovirus DBP en una dilución 1:1,500 en PBS y para el anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 488 en una dilución 1:1,500 en PBS. Cada una de las muestras se analizó por microscopía de epifluorescencia utilizando objetivos 20X y 63X, en un microscopio Axiovert Zeiss. Se tomaron 6 fotos aleatorias de diferentes campos para cada dilución. El título se obtuvo siguiendo la siguiente formula:

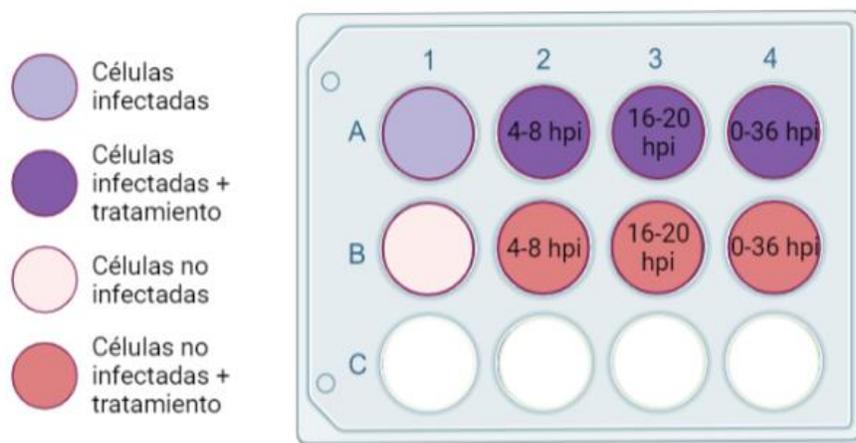
$$\frac{UFF}{ml} = (No. \text{ células infectadas}) \times (\text{inverso de la dilución}) \times \left( \frac{1 \text{ ml}}{\text{Volumen inicial del lisado}} \right)$$

Donde UFF/ml son unidades formadoras de foco por mililitro.

#### **6.4 Cuantificación de progenie viral.**

Para determinar el efecto de la inhibición de WT1 o PCNA sobre la replicación de adenovirus, se determinó la producción de progenie viral en células tratadas con los

inhibidores curcumina y T2AA, respectivamente. Se diseñó el experimento de tal manera que se tuvieran 4 pozos de células infectadas (A1, A2, A3 y A4) y 4 pozos de células no infectadas (B1, B2, B3 y B4). Como se muestra a continuación:



**Figura 4. Representación diagramática del experimento.** Las células en los pozos A fueron infectadas con adenovirus mientras que en los pozos B no fueron infectadas (Mock). Se escogieron 3 diferentes tiempos en la infección para el tratamiento con los inhibidores: 4 hpi retirando la droga a las 8 hpi (un intervalo que corresponde a la fase temprana); 16 hpi retirando el tratamiento a las 20 hpi (un intervalo que corresponde a la transición de la fase temprana a la tardía); 0 hpi retirando el tratamiento a las 36 hpi (a lo largo de todo el ciclo de replicación viral). Los horarios de adición de droga se muestran arriba de cada pozo.

Las células al 80% de confluencia fueron infectadas con Ad5 utilizando una MOI de 30 UFF/célula, o solo se les adicionó DMEM sin suero a las células Mock. La adsorción del virus se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C, moviendo cuidadosamente las células cada 15 minutos para asegurar una distribución homogénea del inóculo del virus sobre la célula. Después de este tiempo (que se considera el tiempo 0 hpi), se retiraron los inóculos y se añadieron los inhibidores a los pozos correspondientes. A las 4 hpi se retiró el medio de los pozos A2 y B2 para añadir 1 ml del inhibidor correspondiente, posteriormente se retiró el inhibidor a las 8 hpi y se añadió medio fresco. A las 16 hpi se retiró el medio de los pozos A3 y B3 para añadir 1 ml del inhibidor correspondiente y se retiró a las 20 hpi cambiándolo por medio fresco. Posteriormente las células se cosecharon a las 36 hpi utilizando un

gendarme, se recuperaron las células en el medio en tubos eppendorf, y se centrifugaron a 2,000 g durante 5 minutos a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 50 µl de buffer IV USB (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, KCl 5mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y dextrosa 0.1% w/v). Las partículas virales se recuperaron al lisar la células mediante congelamiento y descongelamiento, congelando en nitrógeno líquido por 5 minutos y descongelando por completo a 37°C por 10 minutos, este proceso se repitió 3 veces (3 ciclos). Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante en tubos eppendorf y se almacenaron a -20°C. Los lisados se utilizaron para determinar la eficiencia de producción de progenie por focos fluorescentes. Se sembraron células HFF en cajas de 12 pozos sobre cubreobjetos y se infectaron con diluciones de  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-3}$  de cada virus; las células se fijaron con Formaldehído al 3.7% en PBS a las 24 hpi y se prepararon para inmunofluorescencia como se describió antes para posteriormente cuantificar la progenie por conteo de focos fluorescentes.

Inhibidores: Curcumina (C1386-Sigma-Aldrich) 15 µM en medio DMEM suplementado con 10% de SFB (para inhibir a WT1). T2AA (ab146970 Abcam) 1 µM en medio DMEM suplementado con 10% de SFB (para inhibir a PCNA).

## **7. Resultados.**

### **7.1 La infección por adenovirus modifica el nivel de SUMO/Ub de un gran número de proteínas celulares.**

La base de datos de proteínas modificadas por SUMO y/o ubiquitina, se obtuvo anteriormente en nuestro laboratorio; mediante métodos de sedimentación de proteínas utilizando trampas con afinidad por SUMO o ubiquitina en células infectadas con HAdV5 cosechadas a las 24 hpi. Posteriormente, mediante espectrometría de masas se determinaron las diferencias en la abundancia relativa de proteínas SUMOiladas o ubicuítidas en células infectadas contra no infectadas.

La base de datos incluye 1,522 proteínas ubicuítidas y 1,228 proteínas SUMOiladas cuya abundancia relativa cambió cuando se comparan las proteínas obtenidas de células infectadas con HAdV5 y células no infectadas. Para el análisis se consideraron solo proteínas que tuvieran una diferencia mayor a 1.5 veces (Fold-change > 1.5) y un valor de  $p < 0.05$ . Los grupos de proteínas modificadas por SUMO o ubiquitina que fueron más abundantes en las células infectadas que en las no infectadas se denominaron “up” y aquellas que fueron menos

abundantes en las células infectadas que en las no infectadas se denominaron “down”. La Tabla 1 muestra los números de cada uno de estos grupos de proteínas y, como se anticipaba para este trabajo, indica que la infección con adenovirus induce cambios muy significativos en proteínas modificadas por SUMO o ubiquitina.

<b>Comparación HAdV5 vs Mock</b>		
<b>Muestras</b>	<b>Ubiquitina</b>	<b>SUMO</b>
<b>Up</b>	385	205
<b>Down</b>	103	66
	488	271

**Tabla 1. Proteínas celulares con diferencias estadísticamente significativas entre células no infectadas y células infectadas con HAdV5.**

## **7.2 La asignación de categorías funcionales mostró proteínas involucradas en metabolismo proliferación y muerte**

Con el objetivo de analizar las categorías funcionales de las proteínas presentes en la base de datos que son modificadas por SUMO o ubiquitina, “Up” o “Down”, se realizó la asignación de categorías funcionales en DAVID, utilizando una astringencia alta como se describió en materiales y métodos.

En el grupo ubiquitina “Down” se obtuvieron 23 grupos funcionales (Tabla 2), mientras que para el grupo “Up” se obtuvieron 57 grupos (Tabla 3). Mientras que en SUMO “Down” se obtuvieron 13 grupos funciones (Tabla 4) y 37 grupos en el caso “Up” (Tabla 5). En cada grupo se muestra el score de enriquecimiento; este score muestra diferencias entre los grupos de proteínas relacionadas con una función biológica específica.

En los cuatro conjuntos de agrupaciones SUMO y ubiquitina, “Up” o “Down”, encontramos vías directamente implicadas en el metabolismo como la vía de TCA, glucólisis y el metabolismo de ácidos grasos, entre otras (encontradas en los grupos SUMO/Ubiquitina “Up”). Además de actividades de unión a DNA, regulación de la transcripción, vía de señalización de RAS, ciclo celular y división celular, relacionadas con las vías de proliferación y muerte.

<b>Ubiquitina “Down”</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Score enriquecimiento</b>	<b>Termino GO</b>
1	8.49	Traducción, proteína ribosomal, procesamiento mRNA
2	8.01	Unión adherente célula-célula
3	5.8	Unión al DNA
4	5.27	Histona H3, ensamblaje del nucleosoma
5	3.01	Histona H2A, silenciamiento de la cromatina
6	2.83	Unión de glutatión, glutatión S-transferasa, proceso metabólico
7	2.22	Complejo de miosina, proteína motora
8	2.03	Colágeno fibrilar, proceso catabólico del colágeno
9	1.5	Actividad del transportador de proteínas mediado por vesículas
10	1.41	Región de unión de fosfato de nucleótido: NADP
11	1.37	Interacción ECM-receptor, organización de la matriz extracelular
12	1.29	Regulación de la expresión génica, silenciamiento por RNA
13	0.78	División nuclear mitótica, división celular, mitosis
14	0.75	Unión de tropomiosina, miofibrilla, ensamblaje de miofibrillas
15	0.7	Dominio PDZ
16	0.67	Dominio similar a la homología de Pleckstrin
17	0.6	Superfamilia de pequeñas GTPasas, unión a GTP, lipoproteína
18	0.39	Dominio que contiene repeticiones similares a WD40/YVTN

19	0.38	Dominio que contiene repeticiones de anquirina
20	0.35	Splicing de mRNA
21	0.21	Inmunidad innata, respuesta inmune innata
22	0.001	Transcripción, regulación de la transcripción
23	4.18E-07	Componente integral de membrana

**Tabla 2. Categorías funcionales del grupo ubiquitina “Down”.** La asignación fue realizada en DAVID utilizando una astringencia alta.

<b>Ubiquitina “Up”</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Score enriquecimiento</b>	<b>Termino GO</b>
1	17.05	Unión de cadherina implicada en la adhesión célula-célula
2	15.68	Enlace GTP, unión a GTP, actividad GTPasa
3	10.43	Ciclo de citrato (ciclo TCA)
4	10.35	Prenilación, superfamilia de pequeñas GTPasas
5	6.71	Glucólisis
6	5.57	Chaperonina Cpn60/TCP-1, regulación positiva de la localización de proteínas en cuerpos de Cajal
7	5.05	Anexina, unión de fosfolípidos dependientes de calcio
8	4.55	Vía de señalización del receptor de células T
9	4.21	Aminoacilación de tRNA para la traducción de proteínas
10	4.1	S15/NS1, unión a RNA
11	3.42	Dominio de tiorredoxina, homeostasis redox celular
12	3.3	Actividad ATPasa transportadora de protones
13	3.1	Lactato deshidrogenasa/glucósido hidrolasa
14	2.89	Proteína disulfuro isomerasa
15	2.86	Transporte de protones acoplado a la síntesis de ATP
16	2.81	Proceso catabólico de S-adenosilhomocisteína
17	2.44	Complejo ATP sintasa transportador de protones
18	2.33	Actividad de aldehído deshidrogenasa

19	2.18	Porina/Tom40
20	1.92	Treonina proteasa, proteasoma, subunidad alfa/beta
21	1.89	Metabolismo de D-Glutamina y D-glutamato
22	1.79	Metabolismo de ácidos grasos, acetyl-CoA acetiltransferasa
23	1.79	Proteína de choque térmico Hsp90
24	1.69	Peptidasa M1, alanina aminopeptidasa de membrana N-terminal
25	1.66	Dominio: EF-hand
26	1.65	Dominio: ATP-Grasp
27	1.62	Proceso biosintético de acetyl-CoA a partir de piruvato
28	1.54	Dominio similar a EF-hand, EF-hand 1, sitio de unión al calcio
29	1.54	SUMOilación y ubiquitilación de proteínas
30	1.5	Actividad de la fosfoproteína fosfatasa
31	1.45	Procesamiento del extremo 3' del mRNA, exportación de mRNA
32	1.43	DNA/RNA helicasa tipo de caja DEAD/DEAH N-terminal
33	1.31	Regulación del ensamblaje de organelos
34	1.27	Formación del complejo de pre-iniciación de traducción
35	1.25	Actividad del transportador transmembrana de aminoácidos
36	1.19	Dominio: EF-hand 5, región de unión al calcio:4
37	1.17	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados
38	1.04	Dominio de unión al RNA componente de proteasoma (PCI)
39	1.02	Complejo de proteína fosfatasa tipo 2A
40	1.01	Receptor de la célula huésped para la entrada de virus, entrada viral en la célula huésped
41	0.86	Dominio: EF-hand 2, dominio: EF-hand1
42	0.83	Dominio de homología de calponina
43	0.8	Repeat: HEAT 1
44	0.76	Helicoidal tipo tetratricopéptido, repetición TPR

45	0.73	Transferasa dependiente de piridoxal fosfato
46	0.69	Splicing de mRNA
47	0.63	Isomerización de proteínas peptidil-prolilo
48	0.51	Proteína asociada al receptor de serina-treonina cinasa
49	0.45	Repeat: TPR 1
50	0.31	Direccionamiento a membrana dependiente de calcio C2
51	0.19	Dominio de reconocimiento de RNA
52	0.14	Proteína cinasa sitio de unión de ATP
53	0.13	Proteína co-traducciona dependiente de SRP dirigida a la membrana
54	0.13	Vía de señalización de TGF-beta
55	0.06	Repeat
56	6.74E-08	Transmembrana, componente integral de la membrana
57	4.09E-13	Regulación de la transcripción

**Tabla 3. Categorías funcionales del grupo ubiquitina “Up”.** La asignación fue realizada en DAVID utilizando una astringencia alta.

<b>SUMO “Down”</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Score enriquecimiento</b>	<b>Termino GO</b>
1	6.28	Histona H2B, núcleo de histonas, ensamblaje del nucleosoma
2	5.69	Unión de cadherina implicada en la adhesión célula-célula
3	3.55	Proceso catabólico del colágeno, interacción ECM-receptor
4	2.81	Factor de von Willebrand tipo A, dominio: VWFA 1
5	2.05	Actividad de heterodimerización de proteínas
6	1.86	Respuesta inmune innata en la mucosa
7	1.7	Actividad motora de microfilamentos, unión a calmodulina
8	1.69	Proteína co-traducciona dependiente de SRP dirigida a la membrana, procesamiento de rRNA, proteína ribosomal

9	0.92	Procesamiento de mRNA, splicing de mRNA
10	0.89	Organización de la matriz extracelular, región extracelular
11	0.22	Unión ATP, unión de nucleótidos
12	0.004337823	Transcripción, regulación de la transcripción
13	8.61E-05	Componente integral de la membrana, hélice transmembrana

**Tabla 4. Categorías funcionales del grupo SUMO “Down”.** La asignación fue realizada en DAVID utilizando una astringencia alta.

<b>SUMO “Up”</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Score enriquecimiento</b>	<b>Termino GO</b>
1	8.57	Unión de cadherina implicada en la adhesión célula-célula
2	7.29	Ciclo de citrato (ciclo TCA)
3	6.4	Enlace GTP, unión a GTP, actividad GTPasa
4	5.06	Transducción de señal mediada por pequeñas GTPasas
5	4.66	Anexina, unión de fosfolípidos dependientes de calcio
6	4.19	Señalización NIK/NF-kappa B, proteasoma, regulación negativa de la vía de señalización canónica de Wnt
7	3.4	Proteólisis implicada en el proceso catabólico de proteínas
8	2.92	Aminoacilación de tRNA para la traducción de proteínas
9	2.71	Metabolismo del ácido 2-oxocarboxílico
10	2.64	Dominio de tiorredoxina, actividad disulfuro oxidoreductasa
11	2.41	Vía de la glucólisis
12	1.95	Chaperonina Cpn60/TCP-1
13	1.83	Flavoproteína, unión de dinucleótido de flavina y adenina
14	1.64	Transporte de protones acoplado a la síntesis de ATP
15	1.59	DNA/RNA helicasa tipo de caja DEAD/DEAH N-terminal dependiente de ATP

16	1.54	Beta-oxidación de ácidos grasos usando acil-CoA deshidrogenasa
17	1.52	Metabolismo de los esfingolípidos
18	1.42	ATPasa de tipo P transportadora de cationes N-terminal/C-terminal
19	1.18	Ensamblaje del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial
20	1.16	Periferia celular, parte apical de la célula
21	1.09	Dominio similar a una hand EF, EF-hand 1 sitio de unión al calcio
22	1.08	Regulación de la conducción cardíaca
23	1.08	Actividad de proteína motora de los microtúbulos
24	1.04	Región de unión al calcio
25	0.91	Transporte de mRNA, translocación
26	0.8	Metabolismo del colesterol y esteroides
27	0.78	Vía de señalización Ras, vía de señalización de Rap1
28	0.75	Respuesta inmune
29	0.71	Vía de señalización Erk1/Erk2 Mapk
30	0.7	Metiltransferasa, S-adenosil-L-metionina
31	0.63	Vía de señalización de integrinas
32	0.4	Vía de señalización de GnRH
33	0.25	Componente integral de la membrana
34	0.24	Transcripción, unión a DNA
35	0.18	División celular, ciclo celular
36	0.18	Moléculas de adhesión celular (CAM)
37	0.13	Activación de la actividad MAPK, sitio de unión de ATP

**Tabla 5. Categorías funcionales del grupo SUMO “Up”.** La asignación fue realizada en DAVID utilizando una astringencia alta.

### 7.3 Selección de proteínas SUMOiladas y Ubicuitiladas de interés.

La comparación entre proteínas modificadas por SUMO o ubiquitina que tienen abundancias relativas significativamente diferentes en células infectadas con HAdV5 nos llevó a seleccionar entre aquellas que son modificadas tanto por SUMO como por ubiquitina, ya que se sabe que es común que las proteínas que son modificadas por SUMO sean también modificadas por ubiquitina en un proceso regulatorio al que se le ha llamado "interruptor" o "switch" de SUMO/Ub. En esta búsqueda se encontraron las 10 proteínas "Down" y 65 proteínas "Up" que se muestran en las tablas 6 y 7, respectivamente.

SUMO/Ubicuitina "Down"			
Proteína	Descripción	Proteína	Descripción
MYO1B	miosina IB (MYO1B)	GJA1	proteína de unión gap $\alpha$ 1
MYO1D	miosina ID (MYO1D)	LMOD1	leiomodina 1
COL5A1	cadena de colágeno tipo V $\alpha$ 1	PALLD	paladina, proteína asociada al citoesqueleto
COL1A1	cadena de colágeno tipo I $\alpha$ 1	<b>PAWR</b>	<b>regulador proapoptótico WT1</b>
FN1	fibronectina 1	VIM	Vimentina

**Tabla 6. Proteínas modificadas tanto por SUMO como por Ubicuitina "Down".** Marcada en rojo se encuentra PAWR como blanco seleccionado para validación

SUMO/Ubicuitina "Up"			
Proteína	Descripción	Proteína	Descripción
NDUFV1	NADH: subunidad central V1 de la ubiquinona oxidoreductasa	DDX39A	DExD-box helicasa 39 <sup>a</sup>
ANXA4	anexina A4	PDIA3	proteína disulfuro isomerasa familia A miembro 3
ANXA11	anexina A11	TMED10	proteína 10 de tráfico P24 transmembrana
ANXA7	anexina A7	LMAN2	lectina, unión a manosa 2
ANXA6	anexina A6	ERGIC1	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment 1
PSME1	activador de proteasoma, subunidad 1	ATP1A1	ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> subunidad transportadora $\alpha$ 1
PSMD5	subunidad 26S del proteasoma, no-ATPasa 5	ATP1B3	ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> subunidad transportadora $\beta$ 3

SAR1A	secreción asociada a Ras relacionada con GTPasa 1 <sup>a</sup>	ATP2B1	Membrana plasmática ATPasa transportadora de calcio 1
RAB5A	RAB5A, miembro de la familia de oncogenes RAS	EHD4	EH domino containing 4
RAB2A	RAB2A, miembro de la familia de oncogenes RAS	ETHE1	ETHE1, persulfuro dioxigenasa
RAP1B	RAP1B, miembro de la familia de oncogenes RAS	MX1	Proteína de unión a GTP inducida por interferón
RAP1A	RAP1A, miembro de la familia de oncogenes RAS	NAGLU	N-acetil-alfa-glucosaminidasa
RAB11A	RAB11A, miembro de la familia de oncogenes RAS	RAN	RAN, miembro de la familia de oncogenes RAS
RAB11B	RAB11B, miembro de la familia de oncogenes RAS	UGP2	UDP-glucosa pirofosforilasa 2
RAB2B	RAB2B, miembro de la familia de oncogenes RAS	NPEPPS	aminopeptidasa sensible a puromicina
DDX39B	DExD-box helicasa 39B	ANXA1	anexina A1
APOL2	apolipoproteína L2	ICAM1	molécula de adhesión intercelular 1
CANX	Calnexina	LAP3	leucina aminopeptidasa 3
CALR	Calreticulina	HLA-B	complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, B
C12orf10	cromosoma 12 ORF 10	MAPRE1	proteína asociada a microtúbulos miembro de la familia RP/EB 1
CYB5R3	citocromo b5 reductasa 3	MAP2K2	proteína cinasa 2 activada por mitógeno
DCTN2	subunidad 2 de dinactina	MSN	Moesina
ETFA	Subunidad $\alpha$ de la flavoproteína de transferencia de electrones	NNMT	nicotinamida N-metiltransferasa
EEF1D	factor delta 1 de elongación de la traducción	<b>PCNA</b>	<b>antígeno nuclear de células en proliferación</b>
EIF3L	subunidad L del factor 3 de iniciación de la traducción	PPM1F	proteína fosfatasa, 1F dependiente de Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup>
EZR	Ezrina	RDH11	retinol deshidrogenasa 11
GANAB	subunidad alfa de la glucosidasa II	RNH1	inhibidor de ribonucleasa/angiogenina 1
GLS	Glutaminasa	STAT1	transductor de señal y activador de la transcripción 1
GSTO1	glutatió S-transferasa omega 1	SLC3A2	transportadores de soluto familia 3 miembros 2
HSP90AA1	proteína de choque térmico 90 familia $\alpha$ clase A miembro 1	SLC7A5	transportadores de soluto familia 7 miembros 5

HSP90B1	proteína de choque térmico 90 miembro de la familia $\beta$ 1	TXNL1	tiorredoxina 1
HSPD1	familia de proteínas de choque térmico D	TAP1	transportador 1, miembro de la subfamilia B del casete de unión a ATP

. **Tabla 7. Proteínas modificadas tanto por SUMO como por Ubiquitina “Up”.** Marcada en rojo se encuentra WT1 como blanco seleccionado para validación

Entre las proteínas “Down” se encuentran proteínas de citoesqueleto, proteínas de superficie celular y el supresor tumoral PAWR. Éste último induce apoptosis en células cancerosas Par-4 (proteína de respuesta de apoptosis prostática 4) e interacciona con la proteína codificada por el gen de tumor de Wilms WT1, un activador y represor de la transcripción, mediante un dominio de zipper de leucinas que interacciona con el dominio de unión al DNA del dedo de zinc de WT1.

WT1 es un factor de transcripción involucrado en el crecimiento y supervivencia celular. El dominio N-terminal de WT1 está compuesto por secuencias ricas en prolina-glutamina, involucradas en interacciones con RNA y proteínas. El dominio C-terminal tiene cuatro dedos de zinc que permiten su unión con secuencias de DNA diana. Entre los blancos de WT1 se encuentran genes implicados en el crecimiento, metabolismo celular, componentes de matriz extracelular, factores de crecimiento y otros factores de transcripción (Yang et al., 2007). El promotor de WT1 se autorregula por el factor de transcripción WT1 y por otros factores como GATA1 y Sp1. En investigaciones anteriores en nuestro laboratorio se encontró que WT1 puede interaccionar con la proteína E1B-55K, que como se ha descrito es una proteína viral que regula la expresión de los genes virales y que participa en la formación y actividades de los compartimentos de replicación de adenovirus y que está involucrada en la SUMOilación y ubiquitilación de proteínas en la célula infectada.

En el caso de las proteínas “Up” se encuentra una mayor diversidad de proteínas que participan en traducción, tránsito vesicular, señalización a nivel de membrana, transducción de señales y metabolismo. Destaca la proteína PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación), una proteína bien caracterizada que participa en la replicación y reparación del DNA. La proteína se carga sobre el DNA resultando en la formación de un anillo homotrimérico que actúa como una abrazadera que se desliza sobre el DNA. PCNA puede ser modificada por ubiquitina o SUMO para coordinar respuestas al daño en el DNA. Se

conoce que el oncogén E1A de adenovirus es capaz de activar la expresión de PCNA en células HeLa y 293 (Morris & Mathews, 1990).

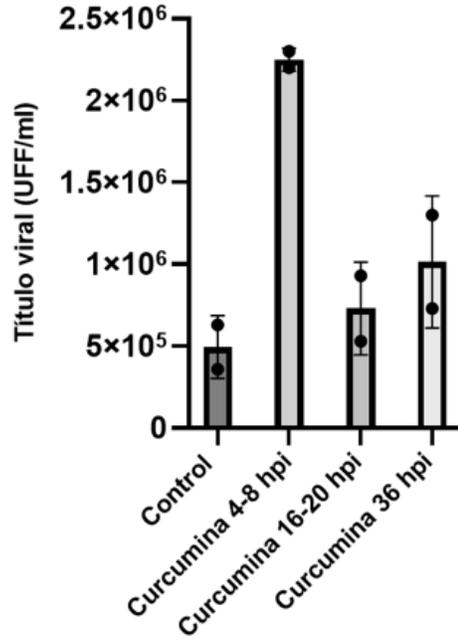
#### **7.4 Tanto PCNA como WT1 tienen efectos sobre la producción de progenie viral.**

Como se describió antes tanto WT1 como PCNA podrían ser blanco de las oncoproteínas de adenovirus y se sabe que ambos son relocalizados a los compartimentos de replicación durante la infección con adenovirus, por lo que decidimos analizar el efecto de inhibidores de estas dos proteínas sobre la eficiencia de producción de progenie viral. Para la inhibición de WT1 se usó la droga curcumina, la cual bloquea a WT1, lo que provoca que WT1 no pueda unirse a su promotor y ocasione la pérdida de transcripción. En el caso de PCNA se usó la droga T2AA, que inhibe el motivo PIP que permite la interacción de PCNA con la polimerasa y demás proteínas de unión a DNA.

Se infectaron células HFF con HAdV5 y se añadieron los inhibidores por intervalos de 4 h en diferentes tiempos post-infección que representan la fase temprana, la transición de la fase temprana a la tardía y durante todo el ciclo de replicación del virus (4, 16, 36 hpi, respectivamente). Las células infectadas se cosecharon a las 36 hpi y se cuantificó la progenie viral por focos fluorescentes como se describe en materiales y métodos.

La Figura 4 muestra los resultados del efecto de la inhibición de la proteína WT1 durante la infección. Cuando se añadió curcumina en la etapa temprana de la infección (4-8 hpi) la producción de progenie aumentó 4.6 veces en comparación con el control sin inhibidor. Cuando se añadió curcumina en la transición de la etapa temprana a la tardía la progenie aumentó 1.4 veces, mientras que cuando se añadió durante las 36 hpi el aumento fue de 2 veces comparado con el control. Estos datos sugieren que la inhibición de WT1 favorece la eficiencia con la que se produce progenie viral en cualquiera de los tiempos post-infección en el que se adiciona el inhibidor. Sin embargo, el efecto más claro se observó cuando WT1 se inhibió entre las 4 y 8 hpi, lo que sugiere que este efecto positivo de WT1 en el ciclo de replicación viral es más claro en el intervalo de tiempo que coincide con el inicio de la expresión de los genes virales tempranos, incluyendo los oncogenes E1A, E1B y E4.

a)



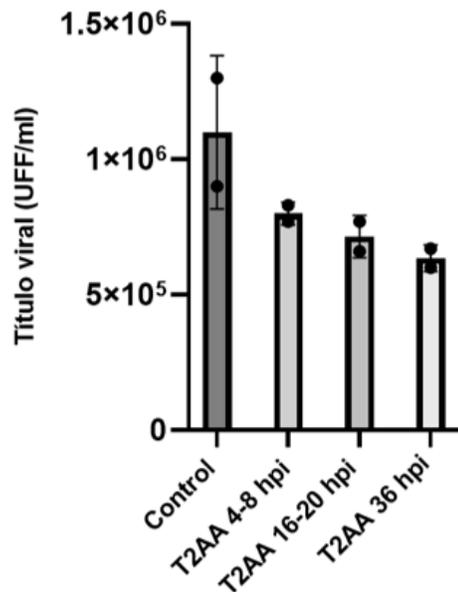
b)

Muestra	Título viral
Control	$5.0 \times 10^5$
Curcumina 4-8 hpi	$2.3 \times 10^6$
Curcumina 16-20 hpi	$7.3 \times 10^5$
Curcumina 36 hpi	$1.0 \times 10^6$

**Figura 5. Efecto de la inhibición de WT1 sobre la eficiencia de producción de progenie viral.** a) Células HFF se infectaron con HAdV5 con una MOI de 30 FFU/célula, se añadió curcumina (inhibidor de WT1) en la etapa temprana de la infección (4-8 hpi), temprana-tardía (16-20 hpi) y durante todo el ciclo de replicación del virus (36 hpi), posteriormente las células se cosecharon a las 36 hpi y se cuantificó la progenie viral por conteo de focos fluorescentes. b) Tabla de títulos virales.

En el caso de la inhibición de la proteína PCNA durante la infección (Figura 5), cuando se añadió T2AA (inhibidor de PCNA) en la fase temprana (4-8 hpi), temprana-tardía (16-20) y todo el ciclo de replicación del virus (36 h) la producción de progenie disminuyó en todos los casos. La disminución fue mayor cuando la droga estuvo presente a lo largo del ciclo de replicación viral, pero el efecto fue similar cuando la droga se añadió en los intervalos de tiempo más cortos. Estos datos sugieren que PCNA favorece la producción eficiente de progenie a lo largo del ciclo de replicación viral.

a)



b)

Muestra	Título viral
Control	$1.1 \times 10^6$
T2AA 4-8 hpi	$8.0 \times 10^5$
T2AA 16-20 hpi	$7.2 \times 10^5$
T2AA 36 hpi	$6.4 \times 10^5$

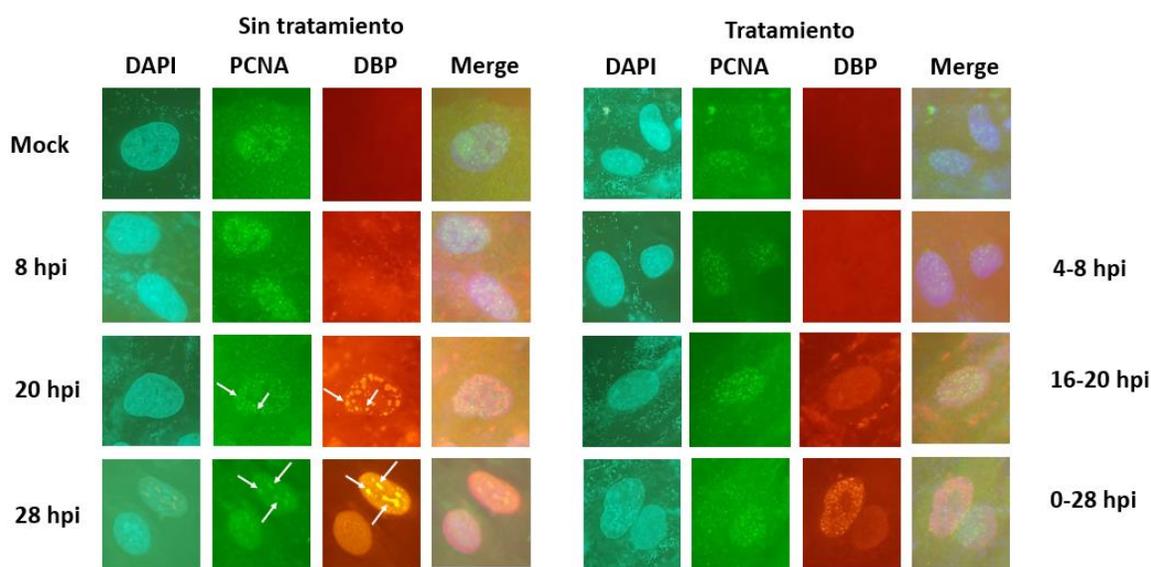
**Figura 6. Efecto de la inhibición de PCNA sobre la eficiencia de producción de progenie viral.** a) Células HFF se infectaron con HAdV5 con una MOI de 30 FFU/célula, se añadió T2AA (inhibidor de PCNA) en la etapa temprana de la infección (4-8 hpi), temprana-tardía (16-20 hpi) y durante todo el ciclo de replicación del virus (36 hpi), posteriormente las células se cosecharon a las 36 hpi y se cuantificó la progenie viral por conteo de focos fluorescentes. b) Tabla de títulos virales.

### 7.5 Localización intracelular de WT1 y PCNA.

Con el objetivo de analizar el efecto de la infección en presencia de los inhibidores T2AA o curcumina sobre la localización intracelular de PCNA o WT1, respectivamente, se infectaron células HFF con HAdV5 y se analizó la localización intracelular de las proteínas en diferentes tiempos postinfección que corresponde a los tiempos en los que se determinó el efecto de las drogas sobre la producción de progenie, 8, 20 y 36 hpi. Usando microscopía de epifluorescencia se analizó la distribución de PCNA y WT1 con anticuerpos específicos, y se incluyó también un anticuerpo contra la proteína viral DBP como un marcador de los compartimentos de replicación de adenovirus.

En la figura 6 se muestran los resultados representativos de la localización de PCNA sin/con tratamiento, en la primera columna, en azul se muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI. En la segunda columna, en verde se muestra PCNA (Alexa 488). En la tercera columna, en rojo DBP (Alexa 568). La cuarta columna representa la sobreposición de los 3

canales. En la primera fila se muestran las células Mock y en las siguientes las células infectadas procesadas a las 8 hpi, 20 hpi y 28 hpi sin/con tratamiento, como se indica. A la derecha se indican los tiempos de adición del inhibidor T2AA. En células Mock sin tratamiento, PCNA se localizó en puntos nucleares como se esperaría y como se ha descrito en la literatura. Esta localización se mantiene en la etapa temprana de la infección. En etapas tardías de la infección (20 y 28 hpi) su localización es similar a DBP, en los compartimentos de replicación. Adicionalmente, en las células infectadas y tratadas con el inhibidor la intensidad de fluorescencia de la señal de DBP disminuyó y tanto la localización de PCNA como la de DBP parecen mantenerse en puntos de menor tamaño.

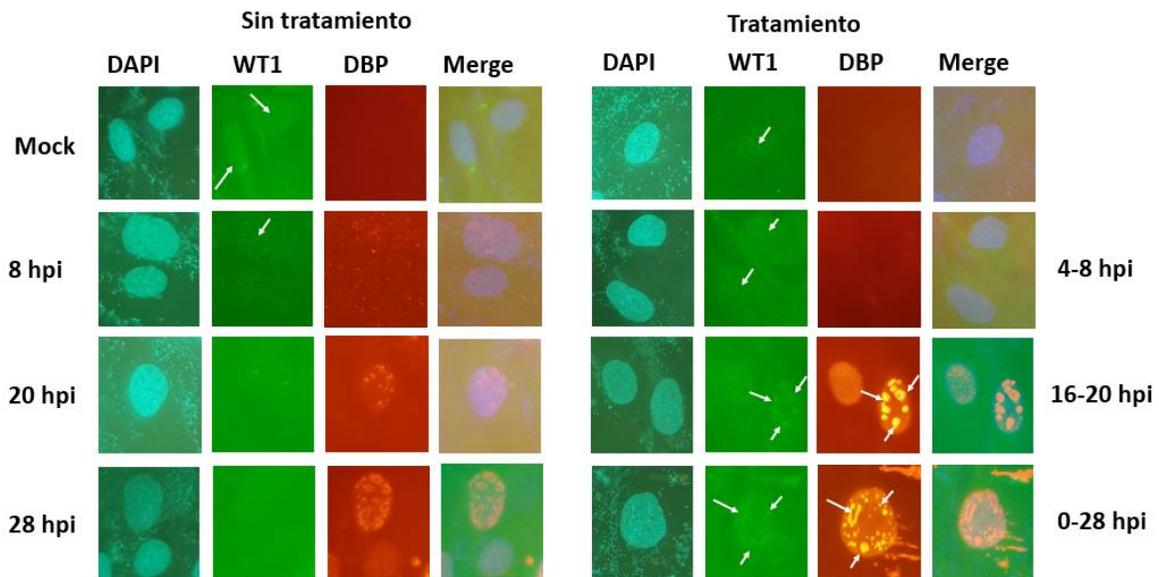


**Figura 7. Localización intracelular de PCNA en células infectadas y no infectadas con/sin tratamiento.** En la primera columna, en azul se muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI. En las segunda columna, en verde se muestra PCNA (Alexa 488). En la tercera columna, en rojo DBP (Alexa 568). La cuarta columna representa la sobreposición de los 3 canales.

En el caso de WT1, los resultados de su localización sin/con tratamiento se muestran en la figura 7. En la primera columna, en azul se muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI. En la segunda columna, en verde se muestra WT1 (Alexa 488) y en la tercera columna, en rojo DBP (Alexa 568). La cuarta columna representa la sobreposición de los 3 canales. Al igual que en la figura 6, la primera fila representa células Mock, y las siguientes las células

infectadas 8 hpi, 20 hpi y 28 hpi sin/con curcumina (respectivamente) y a la derecha se indican los tiempos de adición del inhibidor.

En células mock sin curcumina, WT1 mostró una localización difusa en toda la célula, con algunos puntos nucleares de mayor intensidad. La localización citoplásmica se mantiene a lo largo de la infección (8, 20 y 28 hpi). En células mock e infectadas a 8 hpi tratadas con curcumina, la localización en puntos nucleares por una principalmente nuclear. Mientras que en células tratadas con curcumina, tanto Mock como infectadas la distribución de WT1 en puntos nucleares fue más evidente y en las células infectadas mostró una distribución similar a DBP, sugiriendo que se encuentra en compartimentos de replicación. Adicionalmente, en las células infectadas y tratadas con curcumina, la intensidad de fluorescencia de la señal de DBP aumentó.



**Figura 8. Localización intracelular de WT1 en células infectadas y no infectadas con/sin tratamiento.** En la primera columna, en azul se muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI. En la segunda columna, en verde se muestra WT1 (Alexa 488) y en la tercera, en rojo DBP (Alexa 568). La cuarta columna representa la sobreposición de los 3 canales.

## 8. Discusión

Los genes tempranos de adenovirus, E1A, E1B y E4 codifican para proteínas que alteran múltiples funciones celulares y establecen condiciones óptimas en la célula infectada para la síntesis de grandes cantidades de macromoléculas virales y la producción muy eficiente de progenie viral. Como se describió en la introducción estos son oncogenes que regulan el metabolismo, proliferación y muerte celular, así como las defensas celulares contra la infección. Algunos de los mecanismos celulares que son blanco común de las proteínas E1A, E1B y E4 es la SUMOilación y ubiquitilación de proteínas. Las proteínas E1A y E1B-55K se asocian a la única E2 ligasa de SUMO, UBC9, y E1B-55K puede funcionar como ligasa de SUMO, una actividad que también se ha relacionado a la proteína E4Orf3. Por otra parte, la E1B-55K y la E4Orf6 ensamblan una E3 ubiquitina ligasa. Los blancos celulares que han sido identificados para cada caso son supresores tumorales, como p53; varios componentes de la maquinaria de reparación de DNA (como Mre11, Nbs1, Rad50, DNA ligasa IV), entre otros.

Los adenovirus pueden inducir la transformación oncogénica de la célula y alterar el metabolismo celular induciendo un estado adipogénico. Los genes celulares que son alterados en ambos casos pueden ser regulados por SUMO/Ub, por lo que la alteración por las proteínas virales de estas modificaciones podrían ser un mecanismo fundamental en la interacción virus-célula.

La base de datos que se analizó en este trabajo muestra que la infección con adenovirus altera la abundancia relativa de un número muy grande de proteínas que son modificadas por SUMO/Ub, lo que respalda la hipótesis que la regulación de funciones celulares por estos mecanismos es importante para la replicación del virus.

Se seleccionaron dos proteínas celulares en la base datos para las que existen evidencias de interacción física o funcional con las proteínas E1A o E1B. E1A activa la expresión de PCNA (Morris & Mathews, 1990), lo que sugiere que el aumento en los niveles de PCNA en la célula infectada favorece algún paso del ciclo de replicación viral. El genoma de adenovirus es una molécula de DNA lineal y su presencia en el núcleo activa la maquinaria de reparación de DNA. En células infectadas con adenovirus mutantes que no expresan E1B-55K, E4Orf3 o E4Orf6 la maquinaria de reparación de DNA no es eficientemente inhibida y el genoma viral es concatenado, resultando en moléculas de DNA que no pueden ser encapsidadas y

consecuentemente no se produce progenie viral. Los datos de este trabajo muestran que la inhibición de PCNA (un componente de la maquinaria de reparación de DNA) tiene un efecto negativo en la producción de progenie, confirmando que el aumento en los niveles de PCNA inducido por E1A favorece la replicación del virus. La localización de PCNA en un patrón similar al de DBP en los compartimentos de replicación indican que la proteína es relocalizada a los sitios en los que se localiza, expresa y replica el DNA. Será por lo tanto interesante determinar si PCNA participa en algún mecanismo relacionado a la replicación del DNA viral. El factor de transcripción WT1 se observó principalmente en citoplasma, sin embargo, durante su inhibición, su patrón se alteró a uno que coincidió con los compartimentos de replicación, además de mostrar un efecto positivo temporal en la producción de progenie. Estos hallazgos son interesantes ya que el efecto más claro se observó en un intervalo de tiempo que corresponde al inicio del programa de expresión de los genes virales tempranos (E1A, E1B y E4), lo que sugiere que WT1 puede interferir con la expresión eficiente de estos genes y debe ser inhibido durante la infección. No es claro si la modificación de WT1 por SUMO/Ub tiene un efecto inhibitorio, pero será interesante determinar el efecto de WT1 en ausencia de las oncoproteínas de adenovirus, en células infectadas con mutantes del virus que no expresan estos genes.

En conjunto los resultados de esta tesis permiten concluir que WT1 y PCNA, dos genes que están implicados en la regulación de proliferación celular son blancos moleculares cuyo nivel de SUMO/Ub es alterado durante la infección por adenovirus.

## **9. Conclusiones.**

- El análisis bioinformático permitió seleccionar proteínas cuya SUMOilación y Ubicuitilación cambia en células infectadas, y que están relacionadas con metabolismo, cáncer, apoptosis o ciclo celular.
- PCNA favorece la producción de progenie viral. Su localización corresponde a una distribución similar a DBP, lo que podría estar relacionado con la inhibición de vías de reparación de daño en DNA.
- WT1 tiene un efecto negativo sobre la producción de progenie. En presencia de curcumina cambió su distribución a una similar a DBP, además de tener un efecto positivo temporal sobre la eficiencia en la producción de progenie que podría estar relacionado con su papel en la regulación de la transcripción de genes virales.

## 10. Perspectivas

- Confirmar los experimentos de inhibición para WT1 y PCNA.
- Confirmar la localización intracelular de WT1 y PCNA con microscopía confocal.
- Evaluar la producción de DNA viral en presencia/ausencia de T2AA o curcumina.
- Evaluar la producción de mRNA virales en presencia/ausencia de T2AA o curcumina.

## 10. Referencias:

- Arnold, M., Leitzmann, M., Freisling, H., Bray, F., Romieu, I., Renehan, A., & Soerjomataram, I. (2016). Obesity and cancer: An update of the global impact. *Cancer Epidemiology*, *41*, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2016.01.003>
- Arnold, M., Pandeya, N., Byrnes, G., Renehan, A. G., Stevens, G. A., Ezzati, M., Ferlay, J., Miranda, J. J., Romieu, I., Dikshit, R., Forman, D., & Soerjomataram, I. (2015). Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study. *The Lancet Oncology*, *16*(1), 36-46. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(14\)71123-4](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(14)71123-4)
- Atkinson, R. L. (2007). Viruses as an Etiology of Obesity. *Mayo Clinic Proceedings*, *82*(10), 1192-1198. <https://doi.org/10.4065/82.10.1192>
- Barquera, S., Hernández-Barrera, L., Trejo-Valdivia, B., Shamah, T., Campos-Nonato, I., & Rivera-Dommarco, J. (2020). Obesidad en México, prevalencia y tendencias en adultos. *Ensanut 2018-19. Salud Publica de Mexico*, *62*(6), 682–692.
- Bernard, A., Zwingelstein, G., Meister, R., & Wild, T. F. (1988). Hyperinsulinemia induced by canine distemper virus infection of mice and its correlation with the appearance of obesity. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, *91*(4), 691–696. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90193-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90193-9)
- Bremer, A. A., & Jialal, I. (2013). Adipose Tissue Dysfunction in Nascent Metabolic Syndrome. *Journal of Obesity*, *2013*, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2013/393192>
- Carter, J. K., Ow, C. L., & Smith, R. E. (1983). Rous-associated virus type 7 induces a syndrome in chickens characterized by stunting and obesity. *Infection and Immunity*, *39*(1), 410-422. <https://doi.org/10.1128/iai.39.1.410-422.1983>
- Chakraborty, A. A., & Tansey, W. P. (2008). Adenoviral E1A Function through Myc: Figure 1. *Cancer Research*, *69*(1), 6-9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-3026>
- Chambers, J. W., Maguire, T. G., & Alwine, J. C. (2009). Glutamine Metabolism Is Essential for Human Cytomegalovirus Infection. *Journal of Virology*, *84*(4), 1867-1873. <https://doi.org/10.1128/jvi.02123-09>
- Chung, R., & Schaefer, E. (2013). HCV and Host Lipids: An Intimate Connection. *Seminars in Liver Disease*, *33*(04), 358-368. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1358524>
- Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. *The Development and Causes of Cancer*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>

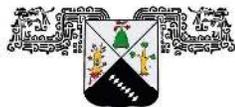
- Darnell, J. E., & Eagle, H. (1958). Glucose and glutamine in poliovirus production by HeLa cells. *Virology*, 6(2), 556-566. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(58\)90102-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(58)90102-8)
- Dhurandhar, N. V. (2001). Infectobesity: Obesity of Infectious Origin. *The Journal of Nutrition*, 131(10), 2794S-2797S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.10.2794s>
- Dhurandhar, N. V., Kulkarni, P. R., Ajinkya, S. M., Sherikar, A. A., & Atkinson, R. L. (1997). Association of adenovirus infection with human obesity. *Obesity research*, 5(5), 464–469. <https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1997.tb00672.x>
- Dhurandhar, N. V., Kulkarni, P., Ajinkya, S. M., & Sherikar, A. (1992). Effect of adenovirus infection on adiposity in chicken. *Veterinary microbiology*, 31(2-3), 101–107. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90068-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90068-5)
- Dong, Y., Tu, R., Liu, H., & Qing, G. (2020). Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 6–12. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00235-2>
- Eagle, H., & Habel, K. (1956). THE NUTRITIONAL REQUIREMENTS FOR THE PROPAGATION OF POLIOMYELITIS VIRUS BY THE HELA CELL. *Journal of Experimental Medicine*, 104(2), 271-287. <https://doi.org/10.1084/jem.104.2.271>
- FANTUZZI, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(5), 911-919. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.02.023>
- FISHER, T. N., & GINSBERG, H. S. (1957). Accumulation of organic acids by HeLa cells infected with type 4 adenovirus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 95(1), 47–51. <https://doi.org/10.3181/00379727-95-23113>
- Fontaine, K. A., Camarda, R., & Lagunoff, M. (2014). Vaccinia Virus Requires Glutamine but Not Glucose for Efficient Replication. *Journal of Virology*, 88(8), 4366-4374. <https://doi.org/10.1128/jvi.03134-13>
- Fontaine, K. A., Sanchez, E. L., Camarda, R., & Lagunoff, M. (2015). Dengue virus induces and requires glycolysis for optimal replication. *Journal of virology*, 89(4), 2358–2366. <https://doi.org/10.1128/JVI.02309-14>
- Fuster, J. J., Ouchi, N., Gokce, N., & Walsh, K. (2016). Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circulation research*, 118(11), 1786–1807. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306885>
- Genoni, G., Prodam, F., Marolda, A., Giglione, E., Demarchi, I., Bellone, S., & Bona, G. (2014). Obesity and infection: two sides of one coin. *European journal of pediatrics*, 173(1), 25–32. <https://doi.org/10.1007/s00431-013-2178-1>
- Gosztonyi, G., Ludwig, H., Bode, L., Kao, M., Sell, M., Petrusz, P., & Halász, B. (2020). Obesity induced by Borna disease virus in rats: key roles of hypothalamic

- fast-acting neurotransmitters and inflammatory infiltrates. *Brain Structure and Function*, 225(5), 1459-1482. <https://doi.org/10.1007/s00429-020-02063-0>
- Hornig, M., & Lipkin, W. I. (2014). Borna Disease Virus. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, 444-447. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385157-4.00372-9>
  - Jin, L., Alesi, G. N., & Kang, S. (2016). Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene*, 35(28), 3619–3625. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.447>
  - Kadouh, H. C., & Acosta, A. (2017). Current paradigms in the etiology of obesity. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, 19(1), 2-11. <https://doi.org/10.1016/j.tgie.2016.12.001>
  - Knipe, D. S. A. S. O. E. M., & Howley, P. (2013). *Fields Virology* (6th Sixth, . ed.). LWW.
  - Kona, F. R., Buac, D., & Dou, Q. P. (2013). Ubiquitin. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 242–245. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374984-0.01599-0>
  - Kumari, A. (2018). Glycolysis. *Sweet Biochemistry*, 1-5. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814453-4.00001-7>
  - Landini, M. P. (1984). Early Enhanced Glucose Uptake in Human Cytomegalovirus-infected Cells. *Journal of General Virology*, 65(7), 1229-1232. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-7-1229>
  - LEVY, H. I. L. T. O. N. B., & BARON, S. A. M. U. E. L. (1956). Some Metabolic Effects of Poliomyelitis Virus on Tissue Culture. *Nature*, 178(4544), 1230-1231. <https://doi.org/10.1038/1781230a0>
  - LEWIS, V. J., Jr, & SCOTT, L. V. (1962). Nutritional requirements for the production of herpes simplex virus. I. Influence of glucose and glutamine of herpes simplex virus production by HeLa cells. *Journal of bacteriology*, 83(3), 475–482. <https://doi.org/10.1128/JB.83.3.475-482.1962>
  - Li, Y., Webster-Cyriaque, J., Tomlinson, C. C., Yohe, M., & Kenney, S. (2004). Fatty Acid Synthase Expression Is Induced by the Epstein-Barr Virus Immediate-Early Protein BRLF1 and Is Required for Lytic Viral Gene Expression. *Journal of Virology*, 78(8), 4197-4206. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.8.4197-4206.2004>
  - Liao J. B. (2006). Viruses and human cancer. *The Yale journal of biology and medicine*, 79(3-4), 115–122.
  - Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
  - Lin, S., Liu, N., Yang, Z., Song, W., Wang, P., Chen, H., Lucio, M., Schmitt-Kopplin, P., Chen, G., & Cai, Z. (2010). GC/MS-based metabolomics reveals fatty acid biosynthesis and cholesterol metabolism in cell lines infected with influenza A virus. *Talanta*, 83(1), 262-268. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.019>
  - Lodish H, Berk A, Zipursky SL y col. *Biología celular molecular*. 4ª edición. Nueva York: WH Freeman; 2000. Sección 6.3, Virus: estructura, función y usos. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21523/>

- Lorizate, M., & Kräusslich, H. G. (2011). Role of lipids in virus replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(10), a004820. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004820>
- Luo, G. G., & Ou, J. H. (2015). Oncogenic viruses and cancer. *Virologica Sinica*, 30(2), 83–84. <https://doi.org/10.1007/s12250-015-3599-y>
- Lyons, M. J., Faust, I. M., Hemmes, R. B., Buskirk, D. R., Hirsch, J., & Zabriskie, J. B. (1982). A virally induced obesity syndrome in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 216(4541), 82–85. <https://doi.org/10.1126/science.7038878>
- McDowell, G. S., & Philpott, A. (2013). Non-canonical ubiquitylation: Mechanisms and consequences. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(8), 1833–1842. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.026>
- McIntosh, K., Payne, S., & Russell, W. C. (1971). Studies on lipid metabolism in cells infected with adenovirus. *The Journal of general virology*, 10(3), 251–265. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-10-3-251>
- Melkonian EA, Schury MP. Biochemistry, Anaerobic Glycolysis. [Updated 2020 Oct 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546695/>
- Milner, J. J., & Beck, M. A. (2012). The impact of obesity on the immune response to infection. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 71(2), 298–306. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000158>
- Munger, J., Bennett, B., Parikh, A. *et al.* Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. *Nat Biotechnol* 26, 1179–1186 (2008). <https://doi.org/10.1038/nbt.1500>
- Muraleedharan, K. M., & Avery, M. A. (2007). Advances in the Discovery of New Antimalarials. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 765-814. <https://doi.org/10.1016/b0-08-045044-x/00227-3>
- Namazue, J., Kato, T., Okuno, T., Shiraki, K., & Yamanishi, K. (1989). Evidence for Attachment of Fatty Acid to Varicella-Zoster Virus Glycoproteins and Effect of Cerulenin on the Maturation of Varicella-Zoster Virus Glycoproteins. *Intervirology*, 30(5), 268-277. <https://doi.org/10.1159/000150102>
- Nieman DC, Henson DA, Nehlsen-Cannarella SL, Ekkens M, Utter AC, Butterworth DE, Fagoaga OR. Influence of obesity on immune function. *J Am Diet Assoc.* 1999 Mar;99(3):294-9. doi: 10.1016/S0002-8223(99)00077-2. PMID: 10076580
- Nigro, E., Scudiero, O., Monaco, M. L., Palmieri, A., Mazzarella, G., Costagliola, C., Bianco, A., & Daniele, A. (2014). New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *BioMed research international*, 2014, 658913. <https://doi.org/10.1155/2014/658913>
- O’Shea, H., Blacklaws, B. A., Collins, P. J., McKillen, J., & Fitzgerald, R. (2019). Viruses Associated with Foodborne Infections. *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.90273-5>

- Pérez-Hernández, A. I., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., & Frühbeck, G. (2014). Mechanisms Linking Excess Adiposity and Carcinogenesis Promotion. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 5:65. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00065>
- Prusinkiewicz, M. A., & Mymryk, J. S. (2019). Metabolic Reprogramming of the Host Cell by Human Adenovirus Infection. *Viruses*, 11(2), 141. <https://doi.org/10.3390/v11020141>
- Renehan, A. G., Zwahlen, M., & Egger, M. (2015). Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nature Reviews Cancer*, 15(8), 484-498. <https://doi.org/10.1038/nrc3967>
- ROZEE, K. R., OTTEY, L. J., & VAN ROOYEN, C. E. (1957). Some metabolic effects of adenovirus infection in HeLa cells. *Canadian journal of microbiology*, 3(7), 1015–1020. <https://doi.org/10.1139/m57-113>
- San Martín C. (2012). Latest insights on adenovirus structure and assembly. *Viruses*, 4(5), 847–877. <https://doi.org/10.3390/v4050847>
- Sanchez, E. L., & Lagunoff, M. (2015). Viral activation of cellular metabolism. *Virology*, 479-480, 609-618. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.038>
- Sohn, S. Y., & Hearing, P. (2016). The adenovirus E4-ORF3 protein functions as a SUMO E3 ligase for TIF-1 $\gamma$  sumoylation and poly-SUMO chain elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(24), 6725–6730. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603872113>
- Spencer, C. M., Schafer, X. L., Moorman, N. J., & Munger, J. (2011). Human Cytomegalovirus Induces the Activity and Expression of Acetyl-Coenzyme A Carboxylase, a Fatty Acid Biosynthetic Enzyme Whose Inhibition Attenuates Viral Replication. *Journal of Virology*, 85(12), 5814-5824. <https://doi.org/10.1128/jvi.02630-10>
- Thai, M., Graham, N. A., Braas, D., Nehil, M., Komisopoulou, E., Kurdistani, S. K., McCormick, F., Graeber, T. G., & Christofk, H. R. (2014). Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell anabolic glucose metabolism and virus replication. *Cell metabolism*, 19(4), 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.009>
- Thai, M., Graham, N. A., Braas, D., Nehil, M., Komisopoulou, E., Kurdistani, S. K., McCormick, F., Graeber, T. G., & Christofk, H. R. (2014). Adenovirus E4ORF1-Induced MYC Activation Promotes Host Cell Anabolic Glucose Metabolism and Virus Replication. *Cell Metabolism*, 19(4), 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.009>
- Thaker, S.K., Ch'ng, J. & Christofk, H.R. Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biol* 17, 59 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0678-9>
- Vastag, L., Koyuncu, E., Grady, S. L., Shenk, T. E., & Rabinowitz, J. D. (2011). Divergent Effects of Human Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus-1 on Cellular Metabolism. *PLoS Pathogens*, 7(7), e1002124. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002124>

- Wang, T., & He, C. (2018). Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 44, 38-50. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.10.002>
- Wang, Y., & Dasso, M. (2009). SUMOylation and deSUMOylation at a glance. *Journal of cell science*, 122(Pt 23), 4249–4252. <https://doi.org/10.1242/jcs.050542>
- Wilkinson, K. A., & Henley, J. M. (2010). Mechanisms, regulation, and consequences of protein SUMOylation. *The Biochemical journal*, 428(2), 133–145. <https://doi.org/10.1042/BJ20100158>
- Wimmer, P., & Schreiner, S. (2015). Viral Mimicry to Usurp Ubiquitin and SUMO Host Pathways. *Viruses*, 7(9), 4854–4872. <https://doi.org/10.3390/v7092849>
- Wolf, A. M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B., & Tilg, H. (2004). Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 323(2), 630–635. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.145>
- Xiao, Y., Lucas, B., Molcho, E., Schiff, T., & Vigodner, M. (2016). Inhibition of CDK1 activity by sumoylation. *Biochemical and biophysical research communications*, 478(2), 919–923. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.051>
- Yi, Z., & Yuan, Z. (2017). Hepatitis C Virus-Associated Cancers. *Advances in experimental medicine and biology*, 1018, 129–146. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-5765-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5765-6_8)
- Yu, L., Chen, X., Wang, L., & Chen, S. (2018). Oncogenic virus-induced aerobic glycolysis and tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 9(20), 3699–3706. <https://doi.org/10.7150/jca.27279>
- Yu, Y., Maguire, T. G., & Alwine, J. C. (2011). Human cytomegalovirus activates glucose transporter 4 expression to increase glucose uptake during infection. *Journal of virology*, 85(4), 1573–1580. <https://doi.org/10.1128/JVI.01967-10>
- Yu, Y., Maguire, T. G., & Alwine, J. C. (2014). ChREBP, a glucose-responsive transcriptional factor, enhances glucose metabolism to support biosynthesis in human cytomegalovirus-infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(5), 1951–1956. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310779111>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



### VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.  
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **CASTAÑEDA MENDOZA MARTHA YESENIA** con número de matrícula **10002812** cuyo título es:

“Identificación de blancos moleculares regulados por SUMO o Ubiquitina durante la infección con HAdV5.”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 28 de abril del 2022

Atentamente  
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

**DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVAÉZ PADILLA**  
**DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA**  
**DR. RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCÍA-CONDE**  
**DRA. DELIA VANESSA LÓPEZ GUERRERO**  
**DRA. SONIA DAVILA RAMOS**

**(PRESIDENTE).**  
**(SECRETARIO).**  
**(VOCAL).**  
**(SUPLENTE).**  
**(SUPLENTE)**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2022-04-29 00:53:43 | Firmante**

2ZJWNpbEpE5hHJ9/vsDAMjsPbk3ynzPHXS7+4PT511bZCR+X0ONdeorP6aem39yAuxlKCTxgf/IFwpV6JkBXRCrnpqSnWfrBMcw9PQGaOHOBMSBssDrgANt5IT97RsAxCiIU+eDh4nsPrCRdWDgt6xMCEGDJ+bk85CEltAeg0vFROYgoblFH/talZG+xXUsBne+2xVoblaZDTMzPZJh75a4jxuu+UFDjmaZes+o/o2gJrQiyV4mE5n27Y4KoX2z4X4PzFkqq7sXN6VanXD3TKUZUF2v+leh9vUsTNwayhHjWCH1L6l7eLYHu8sZd3szH5DOfWt9hEgyERG96wfjg==

**RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2022-04-29 08:44:11 | Firmante**

GcELx20wsPa7vc2c0bPErOKKdDue1Kuc5YHGbjWJrUfFpLOY+X+knwT0dlrSGFTMMqXMyfsIADBEd7x+brK8vk56824k0GtiSYMQNin3BGIsCGv49rs/XSRF3fBZK8W2GKMMn2Fqll2y808Qa1IWZMHyqzvCwIRFOPUioS158JoDcHc5CjO7/+ZiC8snADHZCTymbdb9iY2E0rHAeyZkBW3zhVhn7R02mz9oqnSfU5SZAey/A+++IPDhrQg4YjIF6GyAk9tuRmgThm0cW9hhCShOzDspJ/HdVEwBC+WGOdLKDqftcZJAVtPT0OvDzGTOAY393Q/u17qa3riQhALwQ==

**VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2022-04-29 10:26:01 | Firmante**

NV/KsXOIQVZbxmGIOSveGUcVzy6vhvry5k8tHrrL4rUw3LErALQn2WQBycdM5i9/3awvtOQC0qylBF4B4ULAbnIdiUyCyVNeifKq2yuSxcxFmm5zFWHE7Um+eLVXbQKsLFYyGxXwkbxELyKpT5P637zyp7XS8SeoD3/rZRxpV0wctBRs+tY26bcnPD1X3niwqcm9UHZHARjbbubDLe5vzFJNsHu3NRLS8c9Pj8ZpTJ1Qyaas4UlrJKZE/HZBCly4vP0/vrezTUOMg84QCmqikxwZrFauHbBueB/ijl0zUC8llEcgcylbGdf0TzmWB8BeMyF7kGPDUUSYEifQ==

**ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2022-05-03 10:21:32 | Firmante**

qSQbZRceZi+YzJCTiUyIMIMIQQ19bulX6F187eAN7N4AeUrBTwhCMHqDYZQ4UHGsH7bXwO25K2Hk12AK35rdPLt4yrt02PaMdul7I8625c/m4g4+WEP0/wJKXl0wW4yW5ahi01LSZloFdTR6xDOPy2cHssmWaGCySu3MM8eYjTV9G1+oiJNM6qgi7Ps+XSAT3hvTMT9vHHpIWH2jq40pFGnW9BKjkGRShB208po8PJ8VloH4FKaqlxfSWLSsuTihWF+19DG6SYupaKLqvPtFRgTcPnM0dlAz5JzOgw1ewQnlXRhlR9Wlm9/3r/r1Q9iu4az4bjKtSatfifDwZ/6w==

**SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2022-05-12 08:47:53 | Firmante**

mnWPgxb47eAUJQmWpeFLJIKHcU0LkDbfaVwGFanK0jUn/C0AP27G2Hu0PTR08fCPQj0Pkp+9wGpXr5BI95RmKPTHrtWSEoSkiF+e+vva0tLhL8qbyJACImI7gor8qbwRZT/1qw8Zzs96kfeCPPULhsmZ10nck6kwpB/ZWLwYD2r6pIPGI9HRHFcu93X3sj3ggYV7fmGRARyRN5K6kzSc72c+QnB41rQ/1uTEV2E0HXC/ActQ4UtuDV3ltcaBtrURZ/gkVV/z9f4UznkV3Kac+gZ4IGBf7nefj6LdlUvHht40mQIRL6/6lpCzJz4bvsMX4seD78l/6vZzDuOc67x8BQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



g8tC1E6fP

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/4gNcCOFnUlKkVeGegqWzDx9C85FoV2>

