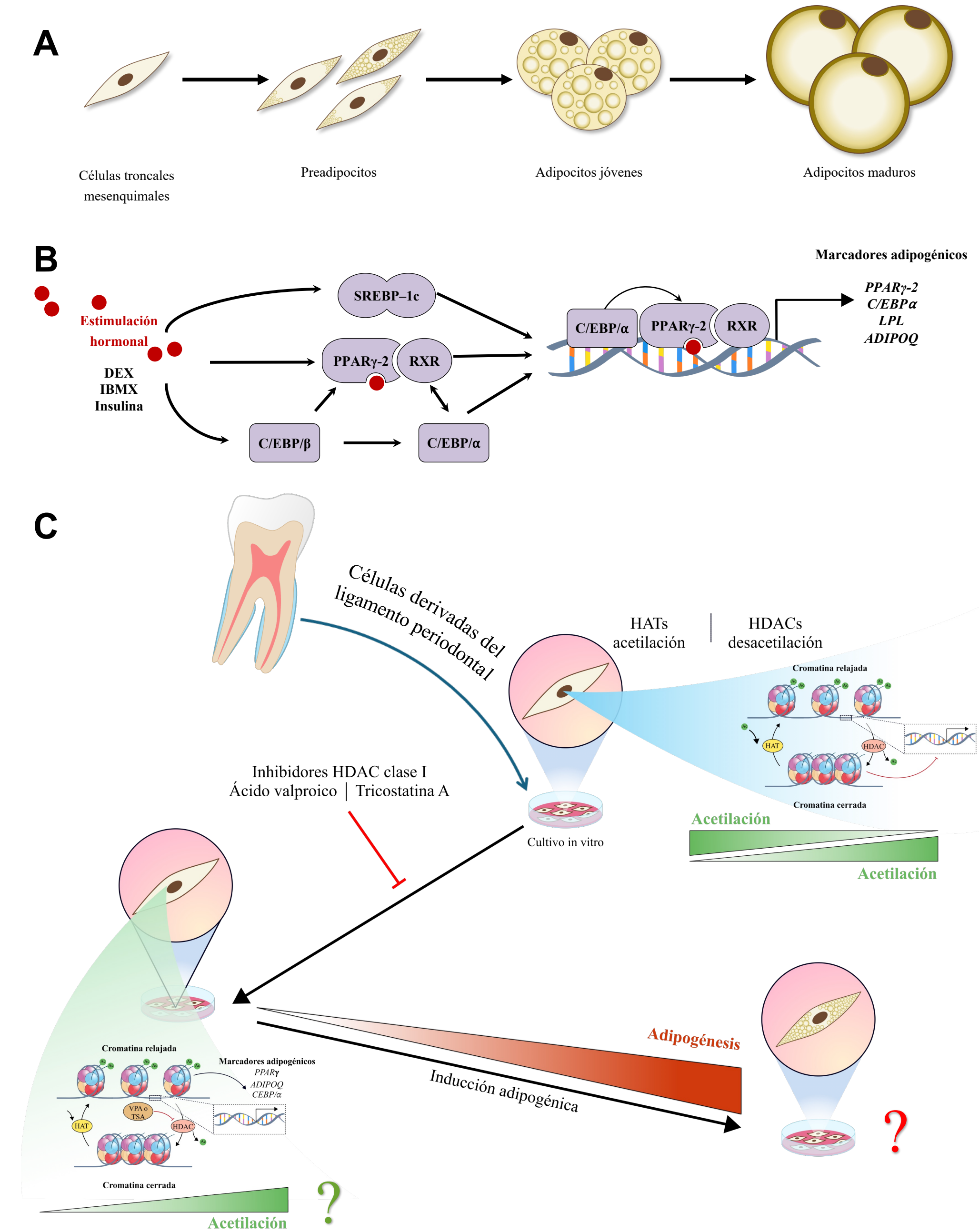


## INTRODUCCIÓN

La diferenciación de las células troncales mesenquimales (CTM) hacia adipocitos es un proceso crítico para el mantenimiento de la homeostasis metabólica de los lípidos. Sin embargo, las disrupciones en este proceso se han asociado con patologías como la diabetes [1]. Aunque se han realizado estudios en diversos modelos celulares, como las células madre del ligamento periodontal (CTLP), aún persiste una brecha en el entendimiento del marco epigenético que regula los factores de transcripción relacionados con la adipogénesis (Fig. 1B) [1,2]. En este contexto, el uso de inhibidores de histonas desacetilasas (iHDAC), como el ácido valproico (VPA) y la Tricostatina A (TSA) para la acetilación de la histona H3 lisina 9 (H3K9) [3, 4] emerge como una estrategia prometedora para inducir la expresión de genes asociados con el fenotipo adipogénico (Fig. 1C).



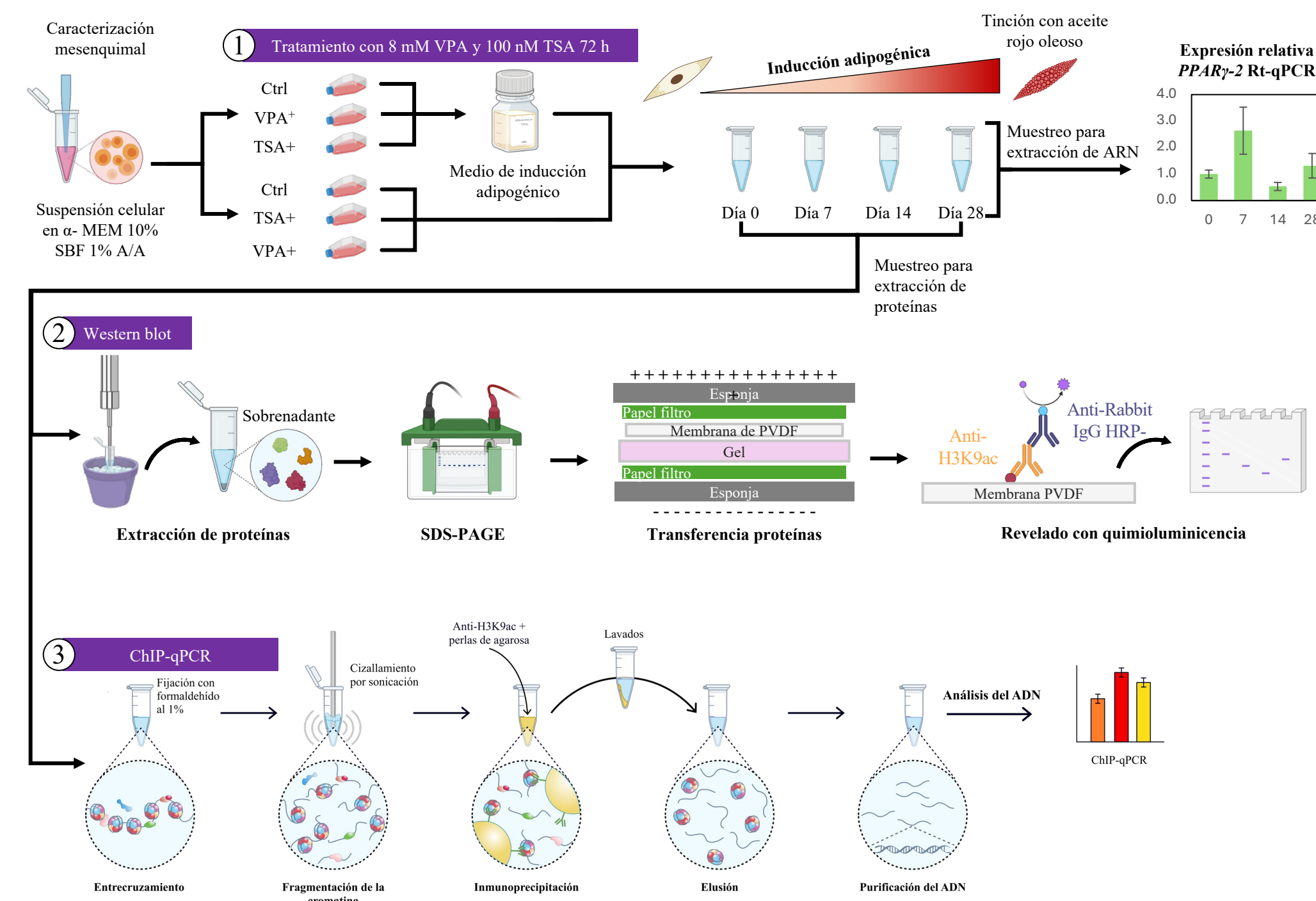
**Figura 1.** Acetilación de histonas para la diferenciación adipogénica. (A) Proceso de diferenciación adipogénica. (B) Regulación transcripcional de la adipogénesis. (C) Mecanismo de acetilación de histonas con células de origen troncales del ligamento periodontal.

## OBJETIVO

Analizar el perfil de acetilación y el enriquecimiento en la H3K9 durante la adipogénesis de células troncales de ligamento periodontal empleando los inhibidores epigenéticos de la desacetilación, el ácido valproico y la tricostatina A.

## MATERIALES Y MÉTODOS

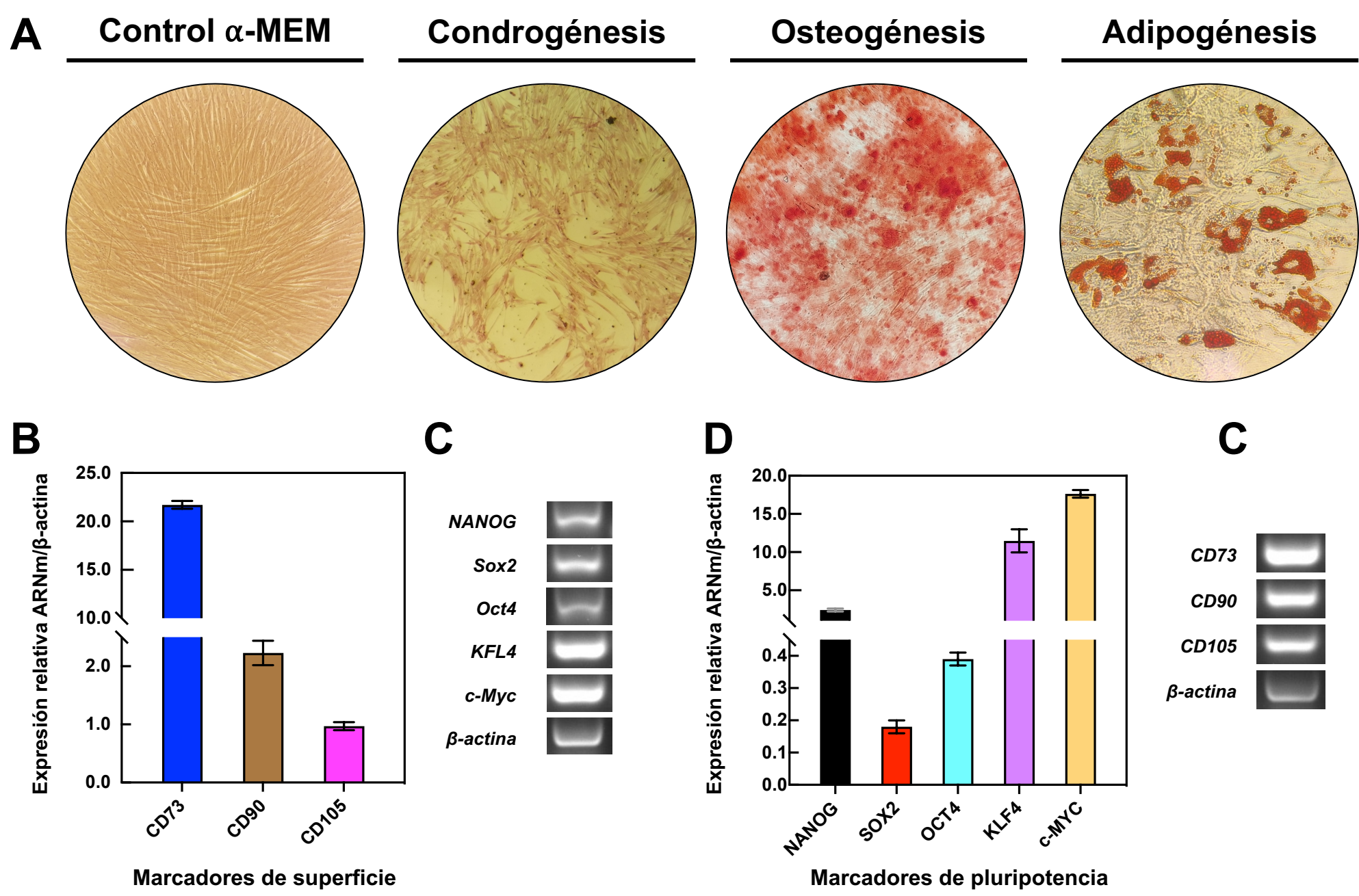
Las células del ligamento periodontal humanas (CLPh) se obtuvieron del Banco celular del Laboratorio Traslacional de Células Troncales de la Cavidad Bucal de la UADY, donadas por un paciente masculino de 13 años con previo consentimiento informado, y se procedió con la metodología descrita en la Fig 2.



**Figura 2.** Materiales y métodos del protocolo de investigación. (1) evaluación morfológica de células tratadas con ácido valproico (VPA). (2) Expansión celular y diseño de los tratamientos para el muestreo de células. (3) Análisis del perfil de acetilación temporal por western blot. (4) Determinación del enriquecimiento de la acetilación en la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac) mediante la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y análisis de los marcadores adipogénicos por qPCR de las regiones genómicas asociadas con la H3K9ac. Los resultados se muestran como el promedio ± desviación estándar (n=3), las diferencias significativas (\*) y no significativas (ns) entre los grupos de datos se determinaron mediante un ANOVA con comparación múltiple de Tukey (P Valor < 0.05).

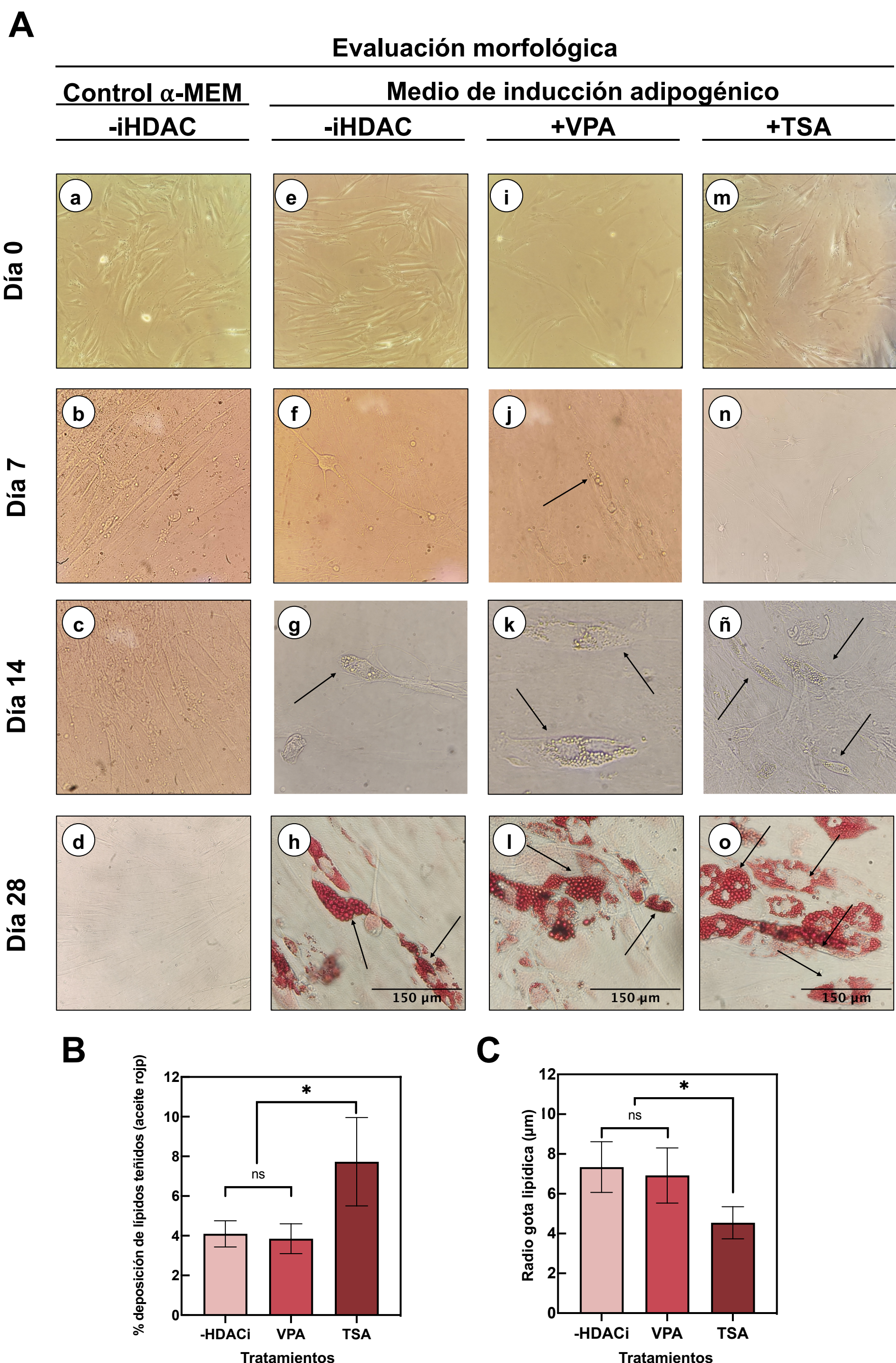
## RESULTADOS

Las CTLP fueron caracterizadas según los lineamientos de la Sociedad Internacional de Terapia Celular SITC [5]. Demostrando poseer la capacidad de diferenciación *in vitro* hacia los linajes condrogénico, Osteogénico y Adipogénico (Fig. 3A). Así como se detectó la expresión positiva de los marcadores de superficie del fenotipo mesenquimal CD73, CD90 y CD105 (Fig. 3B) y los marcadores de pluripotencia *NANOG*, *SOX2*, *OCT4*, *KLF4* y *c-MYC* (Fig. 3C).



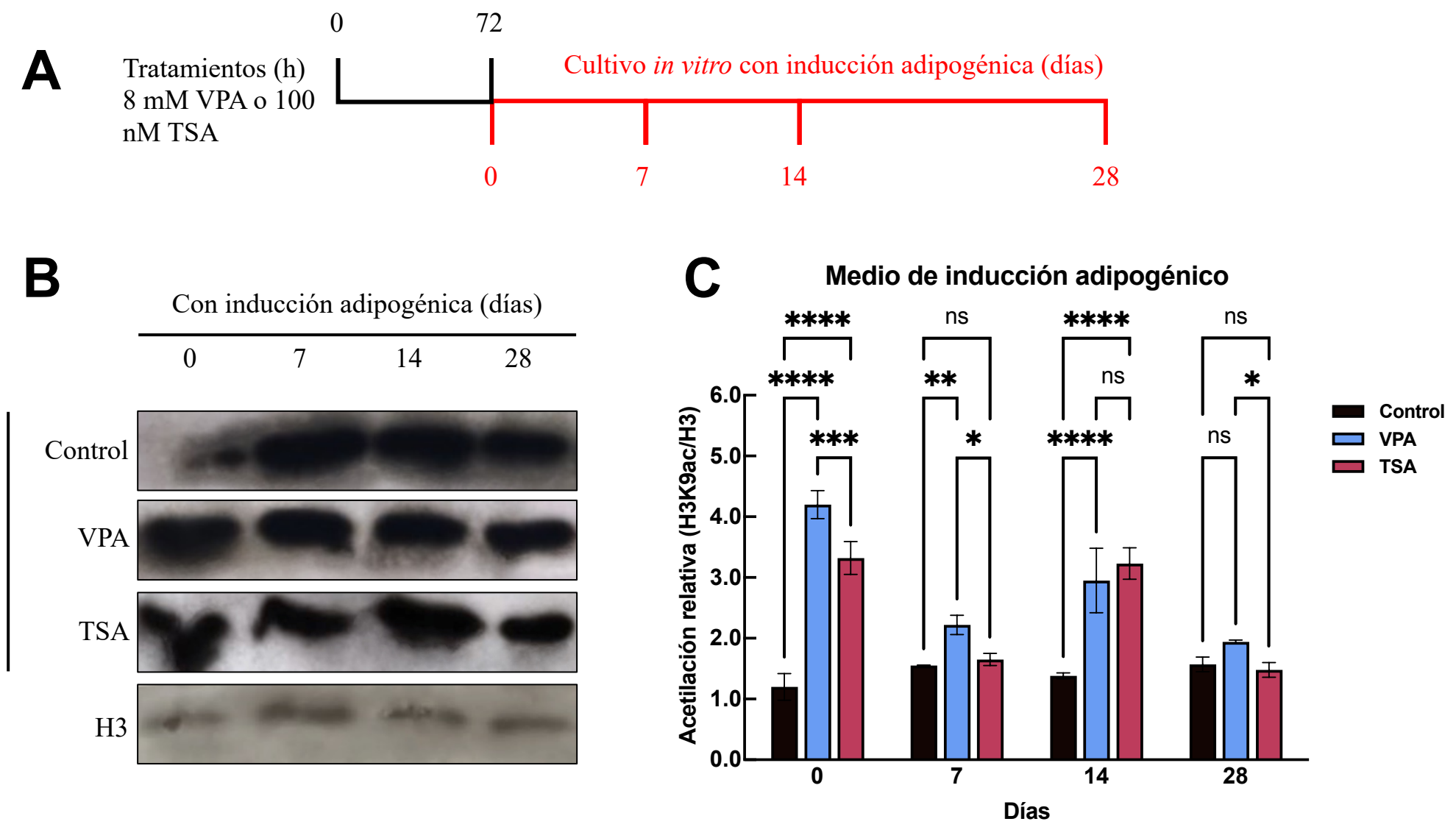
**Figura 3.** Análisis de las características mesenquimales de las células derivadas del ligamento periodontal. (A) Evaluación de la capacidad de diferenciación hacia los linajes condrogénico (día 14), osteogénico (día 14) y adipogénico (día 21). (B) Evaluación de los marcadores de superficie mesenquimales CD73, CD90 y CD105, mediante RT-qPCR. (C) Productos de qPCR de los marcadores de superficie. (D) Evaluación de los marcadores STEM del potencial de diferenciación multipotente mediante RT-qPCR. (E) Productos de qPCR de los marcadores de pluripotencia. *β-actina*: gen constitutivo para la normalización de los datos.

Durante el proceso de inducción adipogénica (Fig. 4A), se observaron cambios morfológicos significativos en las células tratadas con VPA a partir del día 7) con la aparición de gotas lipídicas intracelulares (Fig. 4j). mientras que la diferenciación celular inducida por TSA se inició en el día 14 (Fig. 4ñ). Este retraso en la aparición de cambios morfológicos se asoció con una mayor capacidad de deposición de lípidos intracelulares en el día 28 en las células tratadas con TSA en comparación con las células tratadas con VPA y el control (Fig. 4B). Además de un menor tamaño de radio en las gotas lipídicas (Fig. 4C).

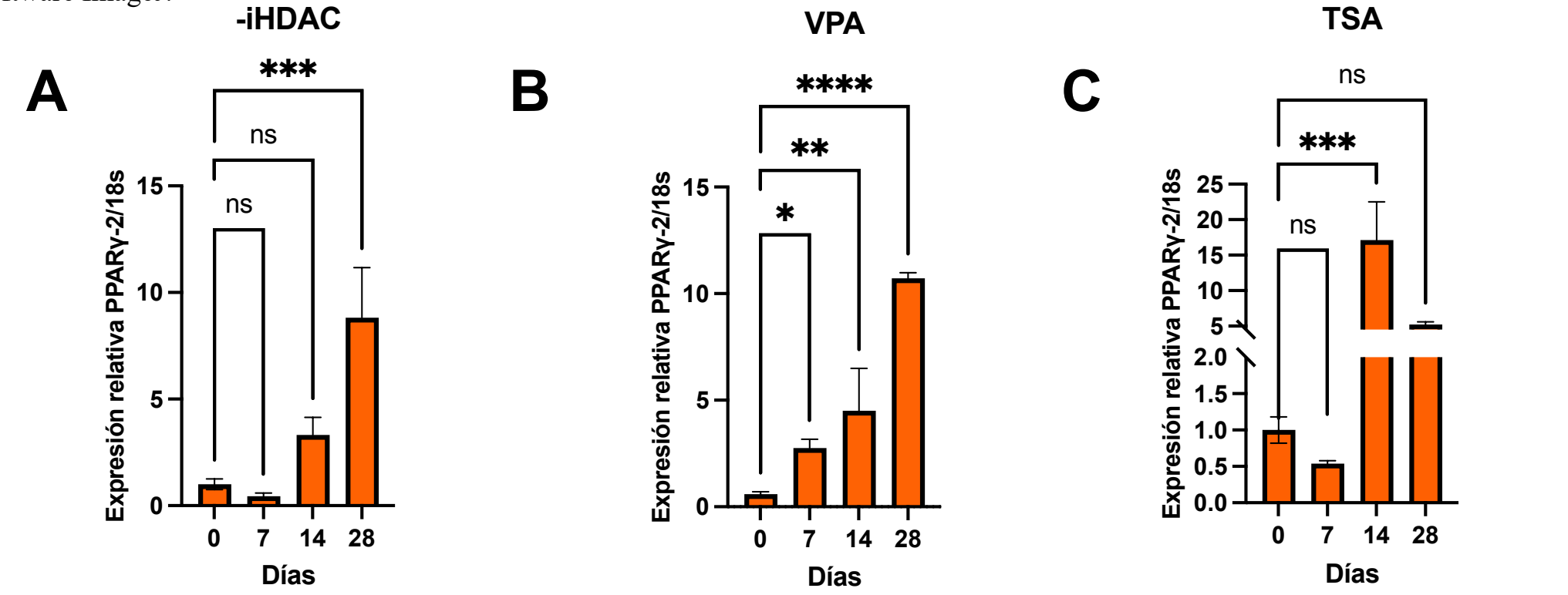


**Figura 4.** Efecto de los inhibidores de las histonas desacetilasas durante la inducción adipogénica en células troncales del ligamento periodontal humano. (A) Microfotografías a 20x durante el cultivo *in vitro* mantenidos con (a-d) medio basal  $\alpha$ -MEM sin inhibidores de las histonas desacetilasas (-iHDAC) y (e-o) mantenidos con medio de inducción adipogénico bajo el efecto de 8 mM VPA y 100 nM TSA. (B) Análisis fotográfico (n=10 c/u) de la deposición de lípidos mediante tinción con aceite rojo en el día 28 de inducción adipogénica. (C) Tamaño promedio del radio de las gotas lipídicas, en el día 28 de inducción.

En las células bajo inducción adipogénica (Fig.5A-B) se determinaron dos picos de acetilación en los días 0 (VPA: 3.50, TSA: 2.77, Ctrl: 1) y 14 (VPA: 2.33, TSA: 2.13, Ctrl: 1) en las células tratadas con VPA y TSA durante la adipogénesis. Además, se observó un aumento en la expresión del gen regulador *PPAR $\gamma$ -2*, en el día 7 en las células tratadas con VPA (Fig. 6B) y en el día 14 con TSA (Fig. 6C).

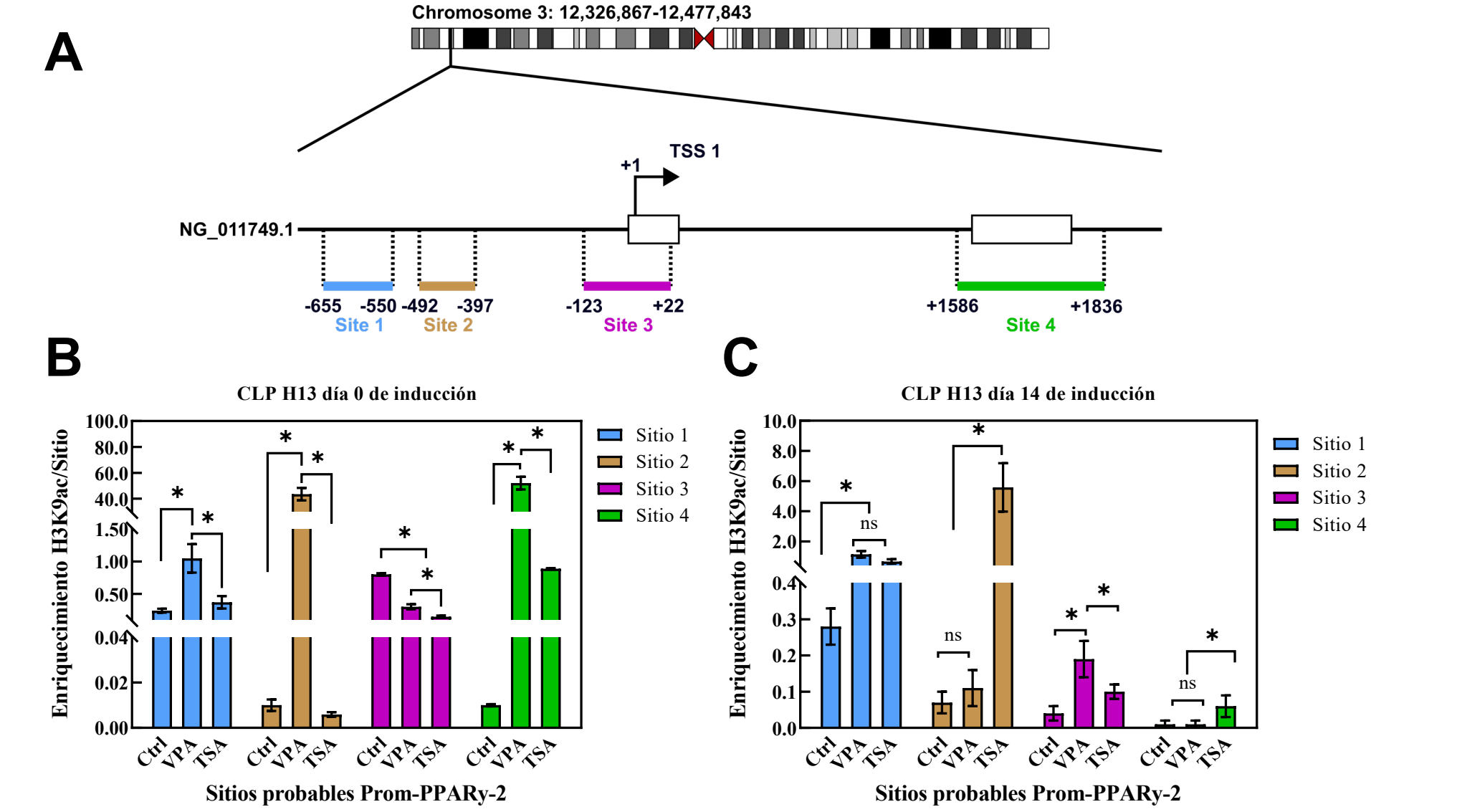


**Figura 4.** Perfil de acetilación en respuesta al tratamiento con 8 mM VPA y 100 nM TSA en las células del ligamento periodontal. (A) Línea de tiempo de las condiciones del estudio. (B) Western blot de la histona H3K9ac y la H3 en respuesta al pretratamiento VPA y TSA (10 µg de proteína/carril). (C) Cuantificación de los niveles de H3K9ac/H3 mediante análisis densitométrico utilizando el software ImageJ.



**Figura 5.** Análisis RT-qPCR de los niveles de expresión de *PPAR $\gamma$ -2* durante la inducción adipogénica en células troncales de ligamento periodontal sin inhibidores de histonas desacetilasas (-iHDAC) y en respuesta al pretratamiento de 72 h con 8 mM VPA y 100 nM TSA.

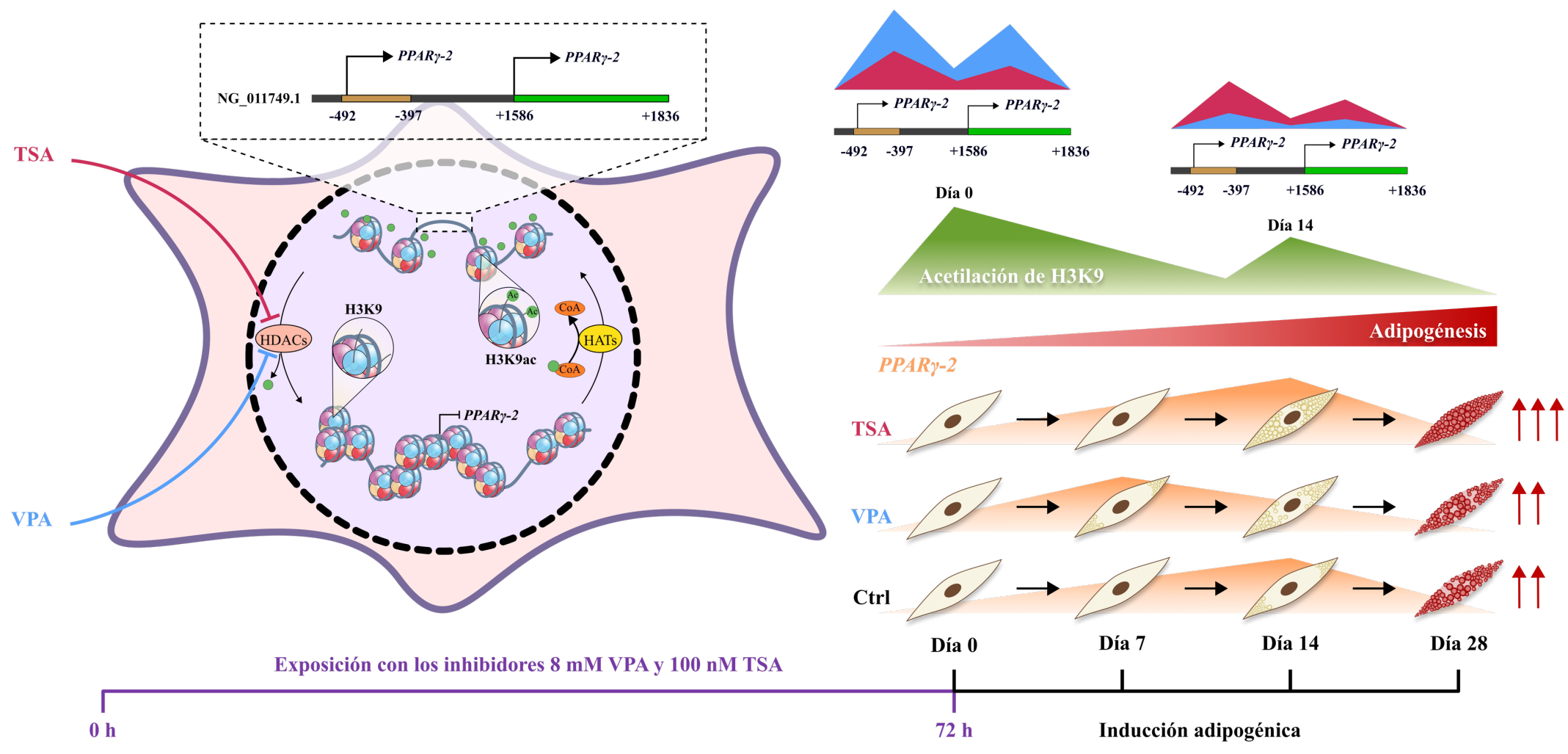
En el análisis ChIP-qPCR, se determinó el enriquecimiento de la acetilación de H3K9 en los sitios probables del inicio de la transcripción de *PPAR $\gamma$ -2*. En el día cero de inducción, el tratamiento con VPA favoreció un mayor enriquecimiento de H3K9ac en el sitio 2 (TSS+1: -492, -397) y el sitio 4 (TSS+1: +1586, +1836) comparado con las células control y TSA. Para el día 14, el tratamiento con TSA condujo a un mayor enriquecimiento de H3K9ac en los sitios 2 y 4.



**Figura 6.** Enriquecimiento de H3K9ac en la región promotora de *PPAR $\gamma$ -2* en células tratadas con 8 mM VPA y 100 nM TSA. (A) Mapa de la distribución genómica de los sitios probables de unión a la promotora del gen *PPAR $\gamma$ -2*. (B-C) Análisis ChIP-qPCR del enriquecimiento de H3K9ac en la región promotora de *PPAR $\gamma$ -2* (Prom-*PPAR $\gamma$ -2*) en los días cero y 14 de inducción adipogénica.

## DISCUSIÓN

Los resultados demostraron una mayor deposición de lípidos en los cultivos *in vitro* en las células tratadas con TSA a diferencia de los tratamientos con VPA y control. Por otro lado, se determinaron dos picos mayores de acetilación en los niveles de H3K9ac en los días cero con respecto al control. El enriquecimiento temprano sobre la región promotora del gen *PPAR $\gamma$ 2* mediado por el VPA podría asociarse con los mayores niveles de transcrito en el día 7, mientras que el efecto tardío de TSA con mayores niveles de *PPAR $\gamma$ 2* en el día 14 y una mayor deposición de lípidos en el día 28.



**Figura 7.** Mecanismo de acción del ácido valproico y la tricostatina A sobre la diferenciación adipogénica en células troncales de ligamento periodontal.

## CONCLUSIONES

El tratamiento con los inhibidores demostró incidir sobre regiones genómicas implicadas en la región promotora de *PPAR $\gamma$ -2* favoreciendo el proceso adipogénico, donde TSA condujo a una mayor eficiencia de inducción adipogénica (Fig. 8). No obstante, aún se requieren más estudios para entender por completo la contribución de H3K9ac sobre los diferentes mecanismos moleculares implicados en el metabolismo de los lípidos y la adipogénesis.

## REFERENCIAS

- Lowe, C. E.; O'Rahilly, S.; Rochford, J. J. Adipogenesis at a Glance. *J Cell Sci* **2011**, 124 (16), 2681–2686. <https://doi.org/10.1242/jcs.079699>.
- Heikkinen, S.; Auwerx, J.; Argmann, C. A. PPAR $\gamma$  in Human and Mouse Physiology. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2007, pp 999–1013. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.03.006>.
- Chen, X.; He, Y.; Fu, W.; Sahabkar, A.; Tan, Y.; Xu, S.; Li, H. Histone Deacetylases (HDACs) and Atherosclerosis: A Mechanistic and Pharmacological Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.581015>.
- Lee, H. B.; Noh, H.; Seo, J. Y.; Yu, M. R.; Ha, H. Histone Deacetylase Inhibitors: A Novel Class of Therapeutic Agents in Diabetic Nephropathy. In *Kidney International*; 2007; Vol. 72.
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F. C.; Krause, D. S.; Deans, R. J.; Keating, A.; Prockop, D. J.; Horvitz, E. M. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* **2006**. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.