

ChIP-qPCR: ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO DE LA ACETILACIÓN EN LA HISTONA H3 LISINA 9 EN LA ADIPOGÉNESIS DE CÉLULAS DE LIGAMENTO PERIODONTAL

Angelica A. Serralta Interian^{1,2}, Julio A. Montero Del Toro ^{1,2}, Beatriz A. Rodas Junco ^{2,3,*}

¹ Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte Kilómetro 33.5. Mérida, Yucatán, CP 97302.

² Laboratorio Traslacional de Células Troncales de la Cavidad Bucal, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán, calle 61A x 90 y 92. Mérida, Yucatán, CP 97000.

³ CONAHCYT- Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte Kilómetro 33.5, Mérida, Yucatán, CP 97203

Fecha de recepción: 28 de noviembre de 2023 - Fecha de aceptación: 7 de junio de 2024

Resumen

Las células de ligamento periodontal (CLP) representan una estrategia prometedora para el desarrollo de terapias celulares para el tratamiento de enfermedades, entre ellas la obesidad. Lo anterior, debido a su fácil obtención, escasos conflictos éticos y su potencial de diferenciación al linaje adipogénico. En el proceso adipogénico interviene la actividad de factores de transcripción como el receptor de peroxisoma activado por proliferador γ ($PPAR\gamma$) e isoformas como $PPAR\gamma 2$, los cuales pueden ser regulados por marcas epigenéticas como la acetilación de la histona 3 en la lisina 9 (H3K9ac); sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en esta interacción han sido poco abordados en las CLP. Una estrategia metodológica empleada para responder si una marca epigenética está asociada con la diferenciación celular es la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Por lo tanto, en este trabajo se analizó el enriquecimiento de la H3K9ac mediante ChIP-qPCR empleando oligonucleótidos que corresponden al sitio probable de la región promotora de $PPAR\gamma 2$ en CLP durante la diferenciación adipogénica. Los resultados obtenidos demostraron el enriquecimiento de la marca H3K9ac en los sitios 3 y 4 cercanos al inicio de la transcripción en el gen $PPAR\gamma 2$. Estos hallazgos permitirán comprender la contribución de H3K9ac en el mecanismo molecular de la adipogénesis.

Palabras clave: Células de ligamento periodontal, inmunoprecipitación de la cromatina, obesidad, $PPAR\gamma 2$, acetilación de histonas

*beatriz.rodas@correo.uady.mx

ChIP-qPCR: ANALYSIS OF HISTONE H3 LYSINE 9 ACETYLATION ENRICHMENT IN PERIODONTAL LIGAMENT CELL IN ADIPOGENESIS

Abstract

Periodontal ligament cells (PLC) represent a promising strategy for the development of cellular therapies for the treatment of diseases, including obesity, this is due to their easy obtaining, few ethical conflicts, and their potential for differentiation to the adipogenic lineage. The adipogenic process involves the activity of transcription factors such as peroxisome proliferator-activated receptor γ (*PPAR γ*) and isoforms such as *PPAR γ 2*, which can be regulated by epigenetic marks such as the acetylation of histone 3 at lysine 9 (H3K9ac). However, the molecular mechanisms involved in this interaction have been poorly addressed in CLPs. One methodological strategy used to answer whether an epigenetic mark is associated with cellular differentiation is chromatin immunoprecipitation (ChIP). Therefore, this work analyzed the enrichment of H3K9ac by ChIP-qPCR at four probable *PPAR γ 2* transcription initiation sites in CLP during adipogenic differentiation. The results demonstrated the enrichment of the H3K9ac mark in sites 3 and 4 close to the start of transcription in the *PPAR γ 2* gene. These findings will allow us to understand the contribution of H3K9ac in the molecular mechanism of adipogenesis.

Keywords: Periodontal ligament cells, chromatin immunoprecipitation, obesity, *PPAR γ 2*, histone acetylation

1. Introducción

La obesidad se define como el incremento excesivo del tejido adiposo y actualmente emerge como un desafío cada vez más apremiante en el ámbito de la salud a nivel mundial. Se proyecta que para el año 2030 (Masood & Moorthy, 2023), aproximadamente el 58% de la población adulta se verá afectada por esta condición. Este fenómeno no solo se limita a la acumulación de grasa, sino que también conlleva el riesgo de inducir comorbilidades, tales como hipertensión arterial, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 (DMT2), síndrome metabólico (SM), enfermedades cardiovasculares, entre otras (Franzago et al., 2022).

Una estrategia empleada para abordar este problema es el uso de las células troncales de origen dental (CTOD) ya que se han convertido en herramientas prometedoras para la terapia celular dada su accesibilidad, potencial de

autorrenovación, baja inmunogenicidad y capacidad de diferenciación multilineaje (Rodas-Junco et al., 2017). Entre ellas, destacan las células obtenidas de ligamento periodontal humano (CLP), debido a que poseen un potencial de diferenciación al linaje adipogénico, además de expresar genes relacionados a este fenotipo (Mercado-Rubio et al., 2021).

La regulación génica de la obesidad está influenciada por la actividad de factores de transcripción (FT) como la proteína β de unión al potenciador de CCAAT (C/EBPB y C/EBPA), y el receptor de peroxisoma activado por proliferador γ (PPAR γ) (Zhang et al., 2012). PPAR γ , en particular su isoforma 2, desempeña un papel importante en el proceso adipogénico (Jin et al., 2014). PPAR γ 2 está modulado por mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y los ARN no codificantes (Qian et al., 2021).

La acetilación, es una modificación en las histonas, que tiene un papel en la regulación de la expresión génica. Ya que, facilita la formación de una estructura de cromatina más accesible,

además, de estar asociada directamente con eventos biológicos como la progresión de la obesidad (Funato et al., 2011; Tateishi et al., 2009). En este contexto, se ha observado una inducción en la acetilación de las lisinas 9 y 27 en la histona H3 (H3K9ac, H3K27ac) en el locus del gen *PPAR γ* (Mikkelsen et al., 2010). Específicamente, la marca epigenética H3K9ac participa en el proceso de adipogénesis, aunque su papel exacto aún se desconoce. Algunos estudios sugieren que puede actuar como coactivador y facilitar la unión de factores de transcripción a sus genes diana, promoviendo así la expresión génica durante la diferenciación adipogénica (Zhou et al., 2014). Otro estudio sugiere que H3K9ac puede mantener la pluripotencia de las células e inhibir la adipogénesis en determinadas condiciones (Hezroni et al., 2011).

Por lo tanto, para estudiar la relación que existe entre esta marca epigenética y el gen *PPAR γ 2*, una estrategia metodológica empleada es la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), la cual permite mapear modificaciones de histonas y factores de transcripción que se unen al ADN. Este enfoque proporciona una visión *in vivo* de los cambios nucleares dinámicos que tienen lugar durante el proceso adipogénico, ofreciendo así una comprensión más completa de la regulación genética de este (Cardamone et al., 2018; Haim et al., 2013).

Wang et al. (2008) empleó la metodología de ChIP con el análisis de microarreglos (ChIP-chip) para investigar la interacción entre los genes reguladores de la adipogénesis (*PPAR γ* y *CEBP α*) y las modificaciones de histonas en diferentes etapas de la adipogénesis en células de adipocitos 3T3-L1. Donde encontró que los niveles elevados de H3K4me3 estaban correlacionados con los sitios de inicio de la transcripción (TSS), mientras que las regiones enriquecidas con H3K4me2 y H3K9ac se asociaban con las regiones potenciadoras (Bernstein et al., 2006; Heintzman & Ren, 2009).

En células diferenciadas 3T3-L1, Lee y Ge, 2014 observaron mediante ChIP y análisis de secuenciación (ChIP-seq) un enriquecimiento

significativo de las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K27ac en la región promotora y regiones potenciadoras intergénicas de *PPAR γ 2* que favorecía su actividad transcripcional para el desarrollo del mecanismo adipogénico (Lee y Ge, 2014). En células embrionarias de ratón, las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K14ac presentan un enriquecimiento en diferentes regiones genómicas de *PPAR γ* que incluyen al promotor, regiones intergénicas e intrónicas asociada con una mayor transcripción del gen (Karmodiya et al., 2012).

Los resultados anteriores destacan la importancia del estudio de la interacción entre la marca epigenética H3K9ac y el regulador más importante del fenotipo adipogénico *PPAR γ 2*, la cual ha sido ampliamente estudiada en modelos murinos; sin embargo, su papel en la adipogénesis en CTOD es poco conocido.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar el enriquecimiento de H3K9ac en diferentes regiones génicas de *PPAR γ 2* en CLP en la diferenciación adipogénica.

2. Metodología

2.1 Cultivo celular

La CLP criopreservadas fueron aisladas de un paciente masculino de 17 años, con previa firma del consentimiento informado de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión del protocolo experimental aprobado por el Comité de Investigación Ética del Centro Regional de Investigación Dr. Hideyo Noguchi, UADY (Número de Aprobación: CIE-06-2017). Las CLP se cultivaron en Medio Eagle's alfa modificado (α -MEM, Gibco) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco) y 1% de Antibiótico-Antimicótico (penicillin/streptomycin, Gibco) a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda hasta alcanzar el pase celular 4 para realizar los estudios posteriores.

2.2 Diferenciación adipogénica

Para la diferenciación adipogénica, se emplearon un total de 3 x 10⁴ células/mL de CLP en pase 4, con una confluencia del 80%. Las células fueron

sometidas a inducción adipogénica durante un periodo de 21 días empleando el medio de diferenciación adipogénico [MIA: α -MEM suplementado con 10 % SFB, 1 % antibiótico/antimicótico, dexametasona (1 μ M), 3-isobutil-1 metil xantina (500 μ M), indometacina (60 μ M), insulina (1.72 μ M)].

2.3 Tinción con aceite rojo oleoso

Para confirmar que las células presentaban la formación de las vacuolas lipídicas características del fenotipo adipogénico. Las CLP se fijaron durante 30 min con paraformaldehído al 10%, se lavaron con PBS 1x y se tiñeron con solución de aceite rojo oleoso (0.21% de Oil Red O en alcohol isopropílico al 60%) durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron con agua y se fotografiaron mediante un microscopio invertido.

2.4 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Los ensayos de ChIP para PPAR γ 2 se realizaron mediante la adaptación de los protocolos descritos por (Raha et al., 2010; Rodríguez-Ubrea & Ballestar, 2014; Sullivan & Santos, 2020) para las CLP en adipogénesis. Los ensayos de inmunoprecipitación (IP) se llevaron a cabo utilizando 1×10^6 células/mL, las cuales se recuperaron de la caja de cultivo mediante triptinización y se resuspendieron en PBS 1X pH 7.4. Las células se fijaron con formaldehído al 16% durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo con glicina 1.25 M a 4°C. Posteriormente las células fijadas fueron centrifugadas a 750g durante 5 min a 4°C para recolectar la pastilla. Esta se resuspendió en un buffer de sonicación (0.1% SDS, 0.1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1, 500mM NaCl, más un coctel de inhibidor de proteasas 1x SIGMA).

Posteriormente se realizó la fragmentación de la cromatina mediante la sonicación de la muestra empleando el equipo CV18 (Cole Parmer) con 50% de amplitud a 4°C hasta alcanzar 30 ciclos (30 seg on/30 seg off). Para inmunoprecipitar los fragmentos de cromatina, se incubó la cromatina sonicada junto con el anticuerpo H3K9ac 1:20 (Invitrogen) toda la noche a 4°C en agitación y

como control se empleó una muestra sin el anticuerpo de interés (INPUT). Después, se añadió la proteína G agarosa (Invitrogen) y se incubó durante 3 h a 4°C en rotación. Tras ello, se llevaron a cabo una serie de lavados empleando las siguientes soluciones: amortiguador de baja concentración salina (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl), amortiguador de alta concentración salina (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl), amortiguador de LiCl y amortiguador Tris-EDTA (TE). Una vez finalizados los lavados, se eluyó la cromatina inmunoprecipitada con buffer de elución (1% p/v SDS, 100 mM NaHCO₃). Finalmente, para aislar el ADN de interés, se incubó la muestra con 160 mM NaCl y 20 μ g de RNAasa, seguido de 2 h de incubación a 45°C con la proteinasa K, la extracción se llevó a cabo mediante el método fenol-cloroformo y precipitación con etanol.

2.5 Diseño de oligonucleótidos para la región promotora de PPAR γ 2

Con la finalidad de evaluar si existe un enriquecimiento significativo de H3K9ac en las regiones genómicas de PPAR γ 2, se diseñaron oligonucleótidos específicos para evaluar la interacción de ADN con esta marca epigenética. Para ello, se empleó la secuencia del gen PPAR γ 2 reportada en el NCBI (NG_011749.1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), seleccionando un fragmento de esta de 5640 pb (87061-92701), que comprende dos CDS (90643 pb, ATGgttgaca y 92253, GTGcaatcaa). A partir del cual, se seleccionaron cuatro sitios probables de unión a la región promotora del gen PPAR γ 2 (Figura 2A) mediante el servidor Promoter 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/Promoter-2.0/>). Posteriormente, se generaron los pares de oligonucleótidos con el programa Primer 3, asegurando que los amplicones tuvieran una longitud entre 100 y 250 pb, y con un contenido de GC del 50% (Tabla 1). Los oligonucleótidos diseñados fueron validados mediante una PCR punto final utilizando como templado ADN genómico de CLP obtenido con el Kit Zymo

Research Quick-DNA (No. Cat. D3012) de acuerdo con las instrucciones del proveedor

Tabla 1. Secuencias y localización respecto al TSS de los oligonucleótidos empleados para ChIP-qPCR

Oligonucleótidos	Secuencia 5' a 3'	Localización respecto al TSS
Oligonucleótido 1	gccccttctgctgaaactc tccccactggctaacaagg	-655 pb
Oligonucleótido 2	gtctcgaactcctgacctca aaggatacaggccaggcac	-492 pb
Oligonucleótido 3	gcgcccagatgagattactt agaatggcatctctgtgtaaa	-123 pb
Oligonucleótido 4	cctctcacatgtctccatacaca ctgaaatgaaataataaagttcaaca	1586 pb

2.6 ChIP-qPCR

Para analizar el ADN inmunoprecipitado se llevó a cabo una qPCR utilizando SYBR® Green dye (BioRad), empleando como templado el ADN inmunoprecipitado de las CLP (IP) y como control el ADN total de las CLP (IN). El enriquecimiento se calculó con los valores de CT obtenidos de la reacción de qPCR de los sitios probables de unión al promotor en las muestras IP e IN mediante la fórmula:

$$\text{Enriquecimiento} = 2^{((CT (IN) - CT (IP)))}$$

2.7 Análisis estadísticos

Para evaluar las diferencias significativas entre datos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando SigmaPlot v12. Este análisis se aplicó a los datos recopilados en el análisis de expresión relativa de las muestras IP e IN. Posteriormente, para identificar las diferencias específicas entre

los datos, se llevó a cabo la prueba de Tukey como un análisis *post hoc*.

3. Resultados

3.1 Diferenciación adipogénica en células de ligamento periodontal

Con el objetivo de evaluar la interacción entre *PPARγ2* y la marca epigenética H3K9ac durante el proceso adipogénico, fue importante verificar que las CLP presentaran la morfología característica para este fenotipo. En este sentido, se observó que las CLP presentaron un incremento significativo en la deposición de lípidos después de 21 días de diferenciación adipogénica (Figura 1B). Esto se corroboró mediante la tinción con aceite rojo oleoso (OROS, Figura 1C). Por lo tanto, las CLP tienen la capacidad de diferenciarse hacia el linaje adipogénico.

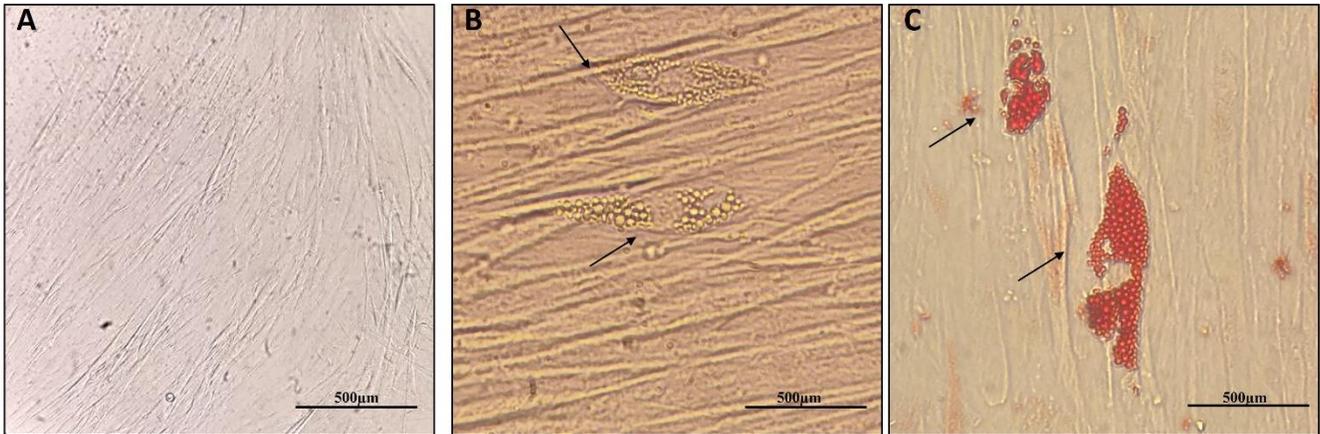


Figura 1. Microfotografías del proceso de diferenciación adipogénica de CLP a los 21 días de inducción. (A) Microfotografía del control sin inducción adipogénica. (B) Microfotografía de las CLP sometidas al proceso de diferenciación adipogénica, mostrando la formación de vacuolas lipídicas. (C) Microfotografía de la tinción de las vacuolas lipídicas con el aceite rojo oleoso (OROS).

3.2 Validación de los oligonucleótidos específicos para ChIP-qPCR

Los juegos de oligonucleótidos seleccionados para verificar los posibles sitios de interacción de la H3K9ac con la región promotora de *PPARγ2* se presentan en la Figura 2A. Los oligonucleótidos 1-3 se distribuyen a -655 pb, a -492 pb y a -123 pb respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS), mientras que los oligonucleótidos número 4 fueron diseñados a 1586 pb respecto al TSS.

La validación de la especificidad de los oligonucleótidos se llevó a cabo mediante pruebas

de amplificación por RT-PCR utilizando ADN genómico de CLP como control positivo para simular las condiciones del entorno biológico real. Esto permitió obtener resultados precisos y reproducibles para evaluar las interacciones proteína-cromatina. Los resultados revelaron bandas únicas y definidas en las muestras de ADN genómico de CLP (Figura 2B). Con ello, se validó que los cebadores eran idóneos para su utilización en ensayos de ChIP-qPCR, asegurando una amplificación específica y eficiente para analizar los sitios de interés durante la inmunoprecipitación de la cromatina.

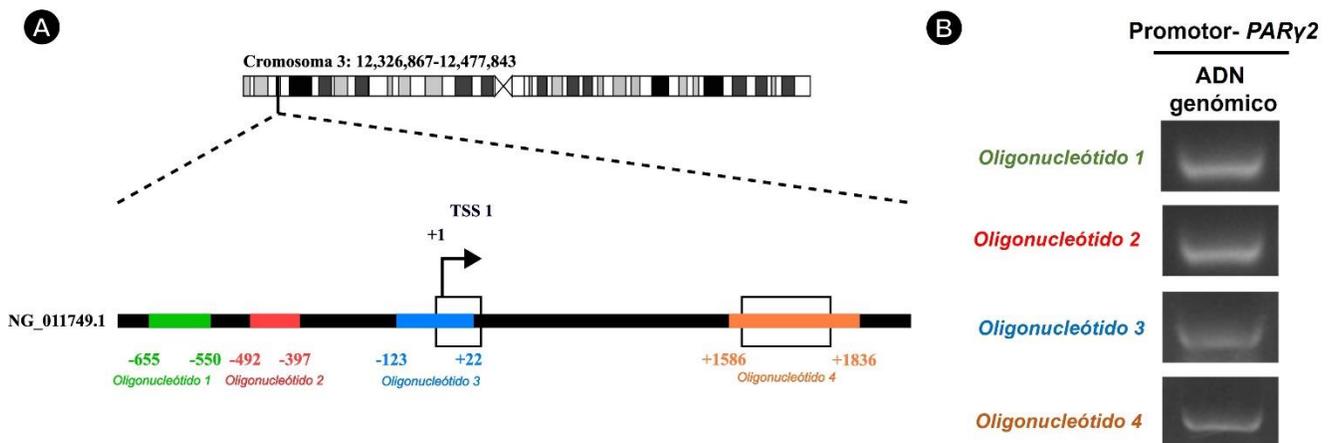


Figura 2. Mapa de localización y validación de los oligonucleótidos empleados para ChIP-qPCR. (A) Localización de los oligonucleótidos diseñados para identificar los sitios probables unión a la región promotora de

PPAR γ 2. (B) Validación de oligonucleótidos empleando como templado ADN genómico de CLP mediante RT-PCR. El producto de la PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Gold.

3.3 Análisis del enriquecimiento de H3K9ac en la región promotora de *PPAR γ 2*

Con la finalidad de analizar las posibles interacciones de la histona H3K9ac en la región promotora del gen *PPAR γ 2*, se empleó la metodología de ChIP-qPCR. Los resultados obtenidos de la ChIP-qPCR revelaron un patrón de enriquecimiento particular entre los cuatro oligonucleótidos correspondientes a sitios probables de unión a la región promotora del gen *PPAR γ 2*. Observando que los oligonucleótidos 3 y 4 presentaron un incremento significativo en el enriquecimiento con la histona H3K9ac en contraste con los oligonucleótidos 1 y 2. Específicamente, el oligonucleótido 3 mostró un aumento del 20% en comparación con el oligonucleótido 4, y de alrededor del 75% y 90% en comparación con los oligonucleótidos 1 y 2, respectivamente. Esto indica una mayor unión de la marca H3K9ac en este sitio específico, el cual

se encuentra cercano al sitio de inicio de la transcripción (TSS). Por otro lado, se observó un aumento del 60% y 80% en el enriquecimiento de H3K9ac con el oligonucleótido 4 en comparación con los resultados obtenidos con los oligonucleótidos 1 y 2, respectivamente. En contraste, los oligonucleótidos 1 y 2 no mostraron un enriquecimiento significativo, lo que sugiere una falta de interacción entre H3K9ac durante las condiciones experimentales. Estos hallazgos resaltan una selectividad diferencial en la unión de H3K9ac a los sitios específicos de la región promotora, destacando un enriquecimiento significativo en la región proximal al TSS utilizando el oligonucleótido 3 (Figura 3B). Este perfil de enriquecimiento ofrece una visión crucial sobre la regulación diferencial de la actividad génica asociada con estos sitios particulares de inicio de la transcripción.

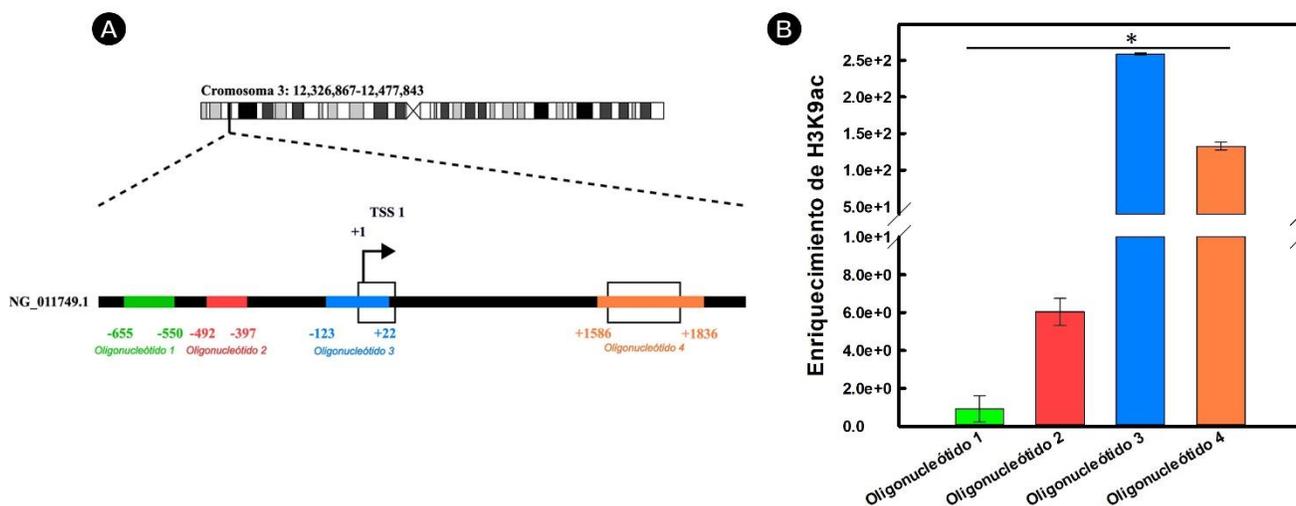


Figura 3. Enriquecimiento de H3K9ac en los sitios probables de unión a la región promotora de *PPAR γ 2*. (A) Mapa de localización de los sitios probables de interacción de H3K9ac en la región promotora. (B) En la figura se presentan los resultados obtenidos de los análisis por ChIP-qPCR de los diferentes sitios de unión a la región promotora seleccionados mediante el Promoter 2.0. Los resultados representan la media \pm error estándar (ES) para $n=3$. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de pruebas *post hoc* de Tukey, con una significancia estadística $p \leq 0.05$.

4. Discusión

La metodología de ChIP-qPCR es una herramienta importante para investigar las interacciones proteína-ADN a nivel molecular (Sullivan y Santos, 2020). Esta técnica, puede contribuir en la identificación de los mecanismos moleculares asociados al proceso adipogénico. Específicamente, a investigar la contribución de los genes asociados con la diferenciación adipogénica, como *PPAR γ 2*.

Los resultados obtenidos mediante la técnica ChIP-qPCR revelan un patrón distintivo de enriquecimiento de la histona H3K9ac, identificado mediante los cuatro juegos de oligonucleótidos que corresponden a sitios probables unión al promotor del gen *PPAR γ 2* (Figura 3). De manera interesante, se observó un aumento significativo con los oligonucleótidos 3 y 4 en comparación con los oligonucleótidos 1 y 2, sugiriendo una deposición diferencial de la modificación epigenética en estos sitios específicos (Figura 3).

En particular, el oligonucleótido 3 el cual se encuentra ubicado cerca del inicio de la transcripción del gen *PPAR γ 2*, presentó un incremento significativo en el enriquecimiento con H3K9ac. Este hallazgo podría indicar una función clave de este sitio en la regulación de la actividad génica asociada a *PPAR γ 2*. La histona H3K9ac, conocida por su papel en la activación transcripcional, podría estar desempeñando un papel crucial en la promoción de la expresión génica en este sitio en particular. Esto se ha reportado en células de ratón donde se ha encontrado un aumento en H3K27ac en los sitios de inicio de la transcripción de *Ppar γ 1sv* y *Ppar γ 2* después de la diferenciación adipogénica (Takenaka et al., 2019).

En el caso de las células 3T3-L1 en diferenciación adipogénica se ha reportado un enriquecimiento en H3K9ac en regiones proximales al sitio de inicio de la transcripción (Wang et al., 2019), indicando que estas áreas tenían un papel importante en la regulación de la transcripción de *PPAR γ 2*.

En contraste, los resultados con los oligonucleótidos 1 y 2 no muestran el mismo nivel de enriquecimiento, esto podría sugerir una heterogeneidad funcional dentro de los sitios probables de unión a la región promotora. Esta variabilidad podría relacionarse con la conformación de la cromatina en estos sitios y podría ser importante para entender la complejidad de la regulación génica asociada a *PPAR γ 2*. De la misma forma se ha reportado que el enriquecimiento de H3K9ac en regiones distales al sitio de inicio de la transcripción favorece la generación de adipocitos por efecto del reclutamiento de histonas metiltransferasas; además, se sugiere que *PPAR γ* también puede ser capaz de orquestrar bucles de ADN como un mecanismo de regulación genética facilitando el reclutamiento de la polimerasa, lo que explicaría la presencia de un gran número de sitios de unión distales de *PPAR γ* (Lefterova et al., 2008; West y Fraser, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos en el trabajo muestran que las regiones proximales al TSS podrían tener un papel importante en el proceso de diferenciación adipogénica de las CLP (Figura 3) a diferencia de las distales.

Por otro lado, en modelos murinos, donde resultados de ChIP-Seq han revelado un enriquecimiento con H3K27ac en las regiones intergénicas cercanas al TSS de *PPAR γ 2*, sugiriendo su función como potenciadores activos específicos del tejido adiposo. Nuestros resultados sugieren que el enriquecimiento de H3K9ac, independientemente de las regiones de unión a *PPAR γ 2* analizadas, podrían tener un papel importante como elemento potenciador del proceso adipogénico.

Por otro lado, es fundamental reconocer las limitaciones de la técnica ChIP-qPCR, como la posibilidad de variabilidad experimental y la necesidad de confirmación con otras técnicas complementarias tales como ChIP-seq (Kim & Dekker, 2018), o metodologías más precisas como es el caso de CUT&RUN (Skene y Henikoff, 2017).

En resumen, la variación en el patrón de enriquecimiento diferencial identificado entre los cuatro sitios seleccionados plantea preguntas acerca de los posibles mecanismos que podrían estar relacionados con el aumento o disminución en el enriquecimiento de H3K9ac. Por lo tanto, es importante explorar a fondo estas interacciones para obtener una visión integral de los procesos epigenéticos y de regulación transcripcional que están ocurriendo en la actividad de *PPAR γ 2*.

5. Conclusión

ChIP-qPCR es una herramienta que permite profundizar en la comprensión de la diferenciación en células troncales desde una perspectiva epigenética. En ese sentido, la metodología de ChIP-qPCR permitió detectar un

incremento en el enriquecimiento de H3K9ac con el oligonucleótido 3, el cual es cercano al TSS de *PPAR γ 2*. Esto permite inferir que H3K9ac podría ser un modulador importante de la expresión génica durante el compromiso adipogénico de las CLP.

6. Agradecimientos

La presente investigación fue financiada por el proyecto Ciencia de Frontera-CONAHCYT Núm. 429849 y en el marco del programa Investigadores por México (No. de proyecto 1882). Y estancias posdoctorales por México Núm. 474111. De igual forma, se agradece a la Facultad de Ingeniería Química y a la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán por el apoyo brindado.

Referencias

- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S. L., & Lander, E. S. (2006). A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*, 125(2), 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>
- Cardamone, M. D., Tanasa, B., Cederquist, C. T., Huang, J., Mahdavian, K., Li, W., Rosenfeld, M. G., Liesa, M., & Perissi, V. (2018). Mitochondrial Retrograde Signaling in Mammals Is Mediated by the Transcriptional Cofactor GPS2 via Direct Mitochondria-to-Nucleus Translocation. *Molecular Cell*, 69(5), 757-772.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.037>
- Franzago, M., Pilenzi, L., Di Rado, S., Vitacolonna, E., & Stuppia, L. (2022). The epigenetic aging, obesity, and lifestyle. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 985274. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.985274>
- Funato, H., Oda, S., Yokofujita, J., Igarashi, H., & Kuroda, M. (2011). Fasting and high-fat diet alter histone deacetylase expression in the medial hypothalamus. *PLoS ONE*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018950>
- Haim, Y., Tarnovscki, T., Bashari, D., & Rudich, A. (2013). A chromatin immunoprecipitation (ChIP) protocol for use in whole human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 305, 1172–1177. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00598.2012.-Chro>
- Heintzman, N. D., & Ren, B. (2009). Finding distal regulatory elements in the human genome. In *Current Opinion in Genetics and Development*, 19, (6), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.09.006>
- Hezroni, H., Tzchori, I., Davidi, A., Mattout, A., Biran, A., Nissim-Rafinia, M., Westphal, H., & Meshorer, E. (2011). H3K9 histone acetylation predicts pluripotency and reprogramming capacity of ES cells. *Nucleus*, 2(4), 300–309. <https://doi.org/10.4161/NUCL.2.4.16767>

- Karmodiya, K., Krebs, A. R., Oulad-Abdelghani, M., Kimura, H., & Tora, L. (2012). H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-424>
- Kim, T. H., & Dekker, J. (2018). ChIP-seq. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(5), pdb. prot082644. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT082644>
- Lee, J.-E., & Ge, K. (2014). *Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR γ expression during adipogenesis*. *Cell & bioscience*, 4, 1-11. <https://doi.org/10.1621/datasets.02001>
- Lefterova, M. I., Zhang, Y., Steger, D. J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C. J., Liu, X. S., & Lazar, M. A. (2008). PPAR γ and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes and Development*, 22(21), 2941–2952. <https://doi.org/10.1101/gad.1709008>
- Masood, B., & Moorthy, M. (2023). Causes of obesity: a review. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, 23(4), 284–291. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2023-0168>
- Mercado-Rubio, M. D., Pérez-Argueta, E., Zepeda-Pedreguera, A., Aguilar-Ayala, F. J., Peñaloza-Cuevas, R., Kú-González, A., Rojas-Herrera, R. A., Rodas-Junco, B. A., & Nic-Can, G. I. (2021). Similar features, different behaviors: A comparative in vitro study of the adipogenic potential of stem cells from human follicle, dental pulp, and periodontal ligament. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8), 738. <https://doi.org/10.3390/JPM11080738/S1>
- Mikkelsen, T. S., Xu, Z., Zhang, X., Wang, L., Gimble, J. M., Lander, E. S., & Rosen, E. D. (2010). Comparative epigenomic analysis of murine and human adipogenesis. *Cell*, 143(1), 156–169. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.006>
- Qian, H., Zhao, J., Yang, X., Wu, S., An, Y., Qu, Y., Li, Z., Ge, H., Li, E., & Qi, W. (2021). TET1 promotes RXR α expression and adipogenesis through DNA demethylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1866(6), 158919. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2021.158919>
- Raha, D., Hong, M., & Snyder, M. (2010). ChIP-Seq: A Method for Global Identification of Regulatory Elements in the Genome. *Current Protocols in Molecular Biology*, 91(1), 21.19.1-21.19.14. <https://doi.org/10.1002/0471142727.MB2119S91>
- Rodas-Junco, B. A., Canul-Chan, M., Rojas-Herrera, R. A., de-la-Peña, C., & Nic-Can, G. I. (2017). Stem cells from dental pulp: What epigenetics can do with your tooth. *Frontiers in Physiology*, 8, 999. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00999>
- Rodríguez-Ubreva, J., & Ballestar, E. (2014). Chromatin immunoprecipitation. *Methods in Molecular Biology*, 1094, 309–318. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-706-8_24/COVER
- Skene, P. J., & Henikoff, S. (n.d.). *An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites*. *eLife*, 6, e21856. <https://doi.org/10.7554/eLife.21856.001>
- Sullivan, A. E., & Santos, S. D. M. (2020). An Optimized Protocol for ChIP-Seq from Human Embryonic Stem Cell Cultures. *STAR Protocols*, 1(2). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100062>
- Takenaka, Y., Nakano, T., Ikeda, M., Kakinuma, Y., & Inoue, I. (n.d.). Epigenetic regulation of a mouse PPAR γ splicing variant, Ppary1sv, during adipogenesis in 3T3-L1 cells. *bioRxiv*, 647842. <https://doi.org/10.1101/647842>
- Tateishi, K., Okada, Y., Kallin, E. M., & Zhang, Y. (2009). Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance. *Nature*, 458(7239), 757–761. <https://doi.org/10.1038/nature07777>
- Wang, X., Wang, Z., Wang, Q., Liang, H., & Liu, D. (2019). Trichostatin A and vorinostat promote adipogenic differentiation through H3K9 acetylation and dimethylation. *Research in Veterinary Science*, 126, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.09.002>

- West, A. G., & Fraser, P. (2005). Remote control of gene transcription. *Human Molecular Genetics*, 14(1), R101–R111. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi104>
- Zhang, Q., Ramlee, M. K., Brunmeir, R., Villanueva, C. J., Halperin, D., & Xu, F. (2012). Dynamic and distinct histone modifications modulate the expression of key adipogenesis regulatory genes. *Cell Cycle*, 11(23), 4310–4322. <https://doi.org/10.4161/cc.22224>
- Zhou, Y., Peng, J., & Jiang, S. (2014). Role of histone acetyltransferases and histone deacetylases in adipocyte differentiation and adipogenesis. *European Journal of Cell Biology*, 93(4), 170–177. <https://doi.org/10.1016/J.EJCB.2014.03.001>