



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Establecimiento de una memoria metabólica inducida por estímulos nutricionales transitorios

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Brandon Bustos García

Dr. V. Julián Valdés Rodríguez  
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dra. Lorena Aguilar Arnal  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. Agosto, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**“El medio en el que [el científico] trabaja no se presta a dar placer al oído de quien escucha. Cuando plantea sus experimentos o los ejecuta con atención devota a los detalles, puede decirse a sí mismo: “Esta es mi composición; la pipeta es mi clarinete.” Y en la orquesta acaso haya instrumentos rebuscadísimos.**

**Para otros, sin embargo, su música es tan silenciosa como la música de las esferas. Acaso se diga a sí mismo: “Mi historia es una posesión para siempre, no una composición que sea escuchada y olvidada.”**

**Con eso no hace más que engañarse solo. Los libros de los grandes científicos se cubren de polvo en los anaqueles de las bibliotecas sabias. Y así debe ser. El científico se dirige a un auditorio infinitesimal de colegas compositores. Su mensaje no está desprovisto de universalidad, pero su universalidad es descarnada y anónima.**

**En tanto que la comunicación del artista está vinculada para siempre con su forma original, la del científico es modificada, ampliada, fundida con las ideas y resultados de otros, y se disuelve en la corriente de conocimiento e ideas que forma nuestra cultura. El científico sólo tiene esto en común con el artista: que no puede encontrar mejor retiro del mundo ni más fuerte nexo con el mundo que su trabajo”.**

Max Delbrück.

## **Agradecimientos académicos**

Esta tesis se elaboró para cumplir con los requerimientos y obtener el grado de Maestro en Ciencias del programa de “Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas” de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo se desarrolló bajo la asesoría del Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez, en el laboratorio 302-O en el Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Durante el desarrollo de este proyecto se contó con una beca para estudios de posgrado otorgada por el CONACyT con el número de CVU: 1005898.

Además, la segunda parte del trabajo fue financiado por la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (SECTEI) de la Ciudad de México a través del proyecto #277

"CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN CÉLULAS ENDOTELIALES FETALES COMO MARCADORES MOLECULARES DEL IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE ÁCIDO FÓLICO Y OBESIDAD MATERNA SOBRE EL RIESGO METABÓLICO DE RECIÉN NACIDO"

otorgado a Víctor Julián Valdés. Para la realización de este proyecto. Conté con el apoyo de una beca por parte del mismo proyecto de la SECTEI de agosto a octubre de 2021.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo brindado para la realización del proyecto con clave IN203830.

A los miembros del bioterio del Instituto de Fisiología Celular:

Claudia Verónica Rivera Cerecedo, MVZ  
Gabriela Xochitl Ayala Méndez, M en C  
Héctor Alfonso Malagón Rivero, MVZ

Por el apoyo técnico brindado en el cuidado de mis animales de experimentación.

A la Dra. Lilia Guadalupe Noriega López, por el apoyo técnico brindado para utilizar el analizador de flujo extracelular en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

## Personales

A mi familia, porque no importa de qué nuevo proyecto aventurado y sin mucho sentido les cuente, siempre están dispuestos a echarme la mano para que yo pueda alcanzar a ser una mejor versión de mí mismo. Nunca voy a poder pagarles todo lo que hacen por mí. Los amo infinitamente.

A mis amigos Adrián, Jaq, Angie y Andrea. Su amistad me cambió la vida y soy una mejor persona desde que los conozco. Gracias por acompañarme y por siempre escuchar mis dramas, la maestría no habría sido la mitad de divertida sin ustedes y sí el doble de difícil. Los quiero mucho.

A mi amiga Marianita, por ser la única en el lab que realmente entiende mi ansiedad y me acompaña cuando es muy grande. Gracias por ofrecerme tu amistad aunque yo no sé ser el mejor amigo y por ser siempre linda y atenta conmigo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Daniel, Martí, Carlos, Gaby, Itzel, Olga, por tomarse en serio mi proyecto y mi formación y en conjunto hacer del lab uno de mis lugares favoritos en el mundo.

A nuestra técnico académico, que no solo ha sido la mejor técnico del planeta sino también una gran amiga para mí. Me he apoyado en ti más de lo que te das cuenta, que seas mi amiga ha hecho todo mucho más fácil. Te quiero mucho Nalle.

Al Dr. Julián Valdés, por aceptarme cuando ni siquiera podía inscribirme oficialmente en su laboratorio, y por siempre confiar en mí y en mi ideas aunque honestamente a veces no son tan buenas. Nunca te lo digo, pero creo que eres el mejor jefe del mundo.

Last but not least, I wanna thank me  
I wanna thank me for believing in me  
I wanna thank me for doing all this hard work  
I wanna thank me for having no days off  
I wanna thank me for never quitting  
I wanna thank me for always being a giver  
And tryna give more than I recieve  
I wanna thank me for tryna do more right than wrong  
I wanna thank me for just being me at all times

# Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abreviaciones</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>Resumen</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>Introducción</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>Interacciones entre el genoma y el ambiente nutricional</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>Mecanismos de integración de las señales ambientales: la regulación epigenética</b> .....   | <b>11</b> |
| La metilación del DNA .....  | 12        |
| Acetilación de histonas .....  | 13        |
| Metilación de histonas .....   | 13        |
| <b>Regulación transcripcional a través del epigenoma</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>La relación entre el epigenoma y el metabolismo energético</b> .....  | <b>17</b> |
| Dinámica de metilación de las histonas y DNA .....   | 18        |
| Dinámica de acetilación y desacetilación de histonas .....   | 19        |
| <b>Efectos persistentes del metabolismo sobre el epigenoma: la memoria metabólica</b> .....  | <b>20</b> |
| Modelos para el establecimiento de la memoria transcripcional metabólica.....  | 21        |
| <b>Planteamiento del problema</b> .....  | <b>24</b> |
| <b>Hipótesis</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>Objetivo general:</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>Objetivos particulares</b> .....  | <b>25</b> |
| <b>Métodos</b> .....   | <b>26</b> |
| Protocolo: Obtención de fibroblastos dermales de ratones neonatos .....  | 26        |
| Protocolo: Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) .....  | 26        |
| Determinación del fenotipo metabólico con el equipo Seahorse (Agilent Technologies).....   | 27        |
| Cuantificación de proteína en placas de 96 pozos.....  | 27        |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>29</b> |
| <b>Distintos estímulos nutricionales modifican el fenotipo metabólico de manera persistente en células HEK 293-FT</b> .....                        | <b>29</b> |
| <b>Estímulos nutricionales suprafisiológicos resultan en el establecimiento de una memoria metabólica en fibroblastos murinos en cultivo</b> ..... | <b>32</b> |
| <b>Células endoteliales humanas también desarrollan una memoria metabólica por pulsos suprafisiológicos de glucosa</b> .....                       | <b>37</b> |
| <b>La exposición a altas concentraciones de glucosa de manera transitoria afecta la proliferación de las HUVEC</b> .....                           | <b>40</b> |
| <b>Altas concentraciones de glucosa y ácido palmítico, por separado y en conjunto, inducen una memoria metabólica MEFs</b> .....                   | <b>40</b> |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| <i>Discusión</i> .....    | 47 |
| <i>Conclusiones</i> ..... | 55 |
| <i>Perspectivas</i> ..... | 56 |
| <i>Referencias</i> .....  | 57 |
| <i>Anexo</i> .....        | 64 |

# Abreviaciones

5hmC – 5-hidroximetil-Citosina  
5mC – 5-metil-Citosina  
Ac-CoA – Acetil-Coenzima A  
AGE – Productos de Glicación Avanzados  
AP – Ácido Palmítico  
ATAC – Ensayo de Cromatina Accesible a la Transposasa  
DNMT – DNA metil transferasas  
ECAR- Tasa de Acidificación Extracelular  
ERO – Especies Reactivas del Oxígeno  
FAD – Dinucleótido de Flavina y Adenina  
GAPDH – Gliceraldehído-3-Fosfato-Deshidrogenasa  
Glu – Glucosa  
HAT – Acetil Transferasas de Histonas  
HDAC – Desacetilasas de Histonas  
HMT – Metil Transferasas de Histonas  
HUVEC – Células Endoteliales de Vena de Cordón Umbilical Humano  
iPSC – Células Troncales Pluripotentes Inducidas  
LSD – Desmetilasa Específica de Lisinas  
MEFs – Fibroblastos Embrionarios de Ratón  
NAD – Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina  
NMDF – Fibroblastos Derales de Ratón Neonato  
Nox – NADPH Oxidasa  
OCR – Tasa de Consumo de Oxígeno  
PKC – Proteína Cinasa C  
SAH – S-Adenosil-Homocisteína  
SAM – S-Adenosil-Metionina  
SOD – Superóxido Dismutasa  
TET – Hidroxilasas de DNA  
 $\alpha$ KG – Alfa-ceto-glutarato



Además del proyecto enmarcado en el título de este trabajo y derivado de la evolución de la pandemia, participé en un proyecto paralelo sobre detección de SARS-CoV2 en muestras de saliva sin extracción de RNA. Este proyecto se realizó en colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y fue apoyado por la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (SECTEI). Un reporte de los resultados de este proyecto se incluye como anexo al final de esta tesis.

# Resumen

La exposición a diversos estímulos ambientales provoca que diferentes enzimas modificadoras de la cromatina catalicen la adición o remoción de marcas epigenéticas sobre el DNA o las histonas, las cuales contribuyen a ajustar el programa transcripcional para contender con el estímulo. En el caso específico del ambiente nutricional, se ha descrito que diversos estímulos nutricionales -por ejemplo, variaciones en la fuente de carbono- pueden inducir una respuesta transcripcional asociada al metabolismo de dicho nutriente, la cual se transmite durante varias rondas de división celular aún si el estímulo original cesa; a este fenómeno se le conoce como **memoria transcripcional metabólica**. Recientemente se ha propuesto que uno de los mecanismos para el establecimiento de una memoria transcripcional asociada al ambiente nutricional es **la regulación metabólica de las enzimas modificadoras de la cromatina**. Dado que muchas de estas enzimas utilizan como sustratos, cofactores y/o reguladores alostéricos a diferentes metabolitos intermediarios, ante un estímulo nutricional que modifique significativamente su concentración, se generaría un asa de retroalimentación entre el estado epigenético a nivel local y el flujo metabólico que perpetúe los cambios transcripcionales.

Para poner a prueba esta hipótesis, en este trabajo desarrollamos un protocolo de inducción de memoria metabólica *in vitro*. El protocolo consiste en retar a las células con diferentes nutrientes a concentraciones supra fisiológicas durante tres, cuatro o cinco días, para posteriormente remover el estímulo durante una ventana de tiempo equivalente y finalmente ensayar el fenotipo metabólico. Estos ensayos se realizaron con el equipo *Seahorse Bioscience*, el cual nos permitió evaluar la tasa de consumo de oxígeno -asociada al flujo de la cadena transportadora de electrones- y la tasa de acidificación extracelular -asociada a la producción de lactato vía glucólisis- directamente en células vivas. Los datos obtenidos fueron comparados contra el fenotipo metabólico de células que no han estado expuestas a ninguno de los estímulos nutricionales.

Nuestros resultados indican que es posible inducir una memoria metabólica con diferentes nutrientes en células HEK 293-FT, en fibroblastos murinos neonatales o embrionarios, así como en células endoteliales humanas (HUVEC) siempre y cuando se consideren el perfil metabólico y la tasa de replicación de cada cultivo. Los efectos sobre el fenotipo metabólico son específicos para la mayoría de los nutrientes ensayados en este trabajo y varían entre tipos celulares. En el caso concreto de la suplementación del medio con altas concentraciones de glucosa, este tratamiento provoca un incremento persistente en ambos tipos de metabolismo -glucolítico y respiratorio- en células HEK 293-FT y fibroblastos de ratón neonato, pero solo afectó el metabolismo respiratorio en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), y únicamente el metabolismo glucolítico de células HUVEC. Por otro lado, el efecto de nuestros tratamientos también se manifiesta a nivel de estrés oxidante. Al concluir los ensayos de inducción de memoria en MEFs, la suplementación con ácido palmítico a diferentes concentraciones provoca una reducción persistente en el potencial redox de las células, mientras que la suplementación con glucosa provocó un incremento persistente en el potencial redox. Finalmente, nuestros experimentos en células HUVEC nos sugieren que algunos aspectos de la memoria metabólica no son del todo evidentes cuando se ensaya el fenotipo metabólico en estado basal, pero sí cuando se somete a las células a una condición de estrés mediante la adición de fármacos como la oligomicina y el FCCP; aunque el fenotipo de memoria metabólica no fue evidente en condiciones basales, el reto farmacológico reveló que las células expuestas a alta glucosa eran incapaces de modular su metabolismo glucolítico.

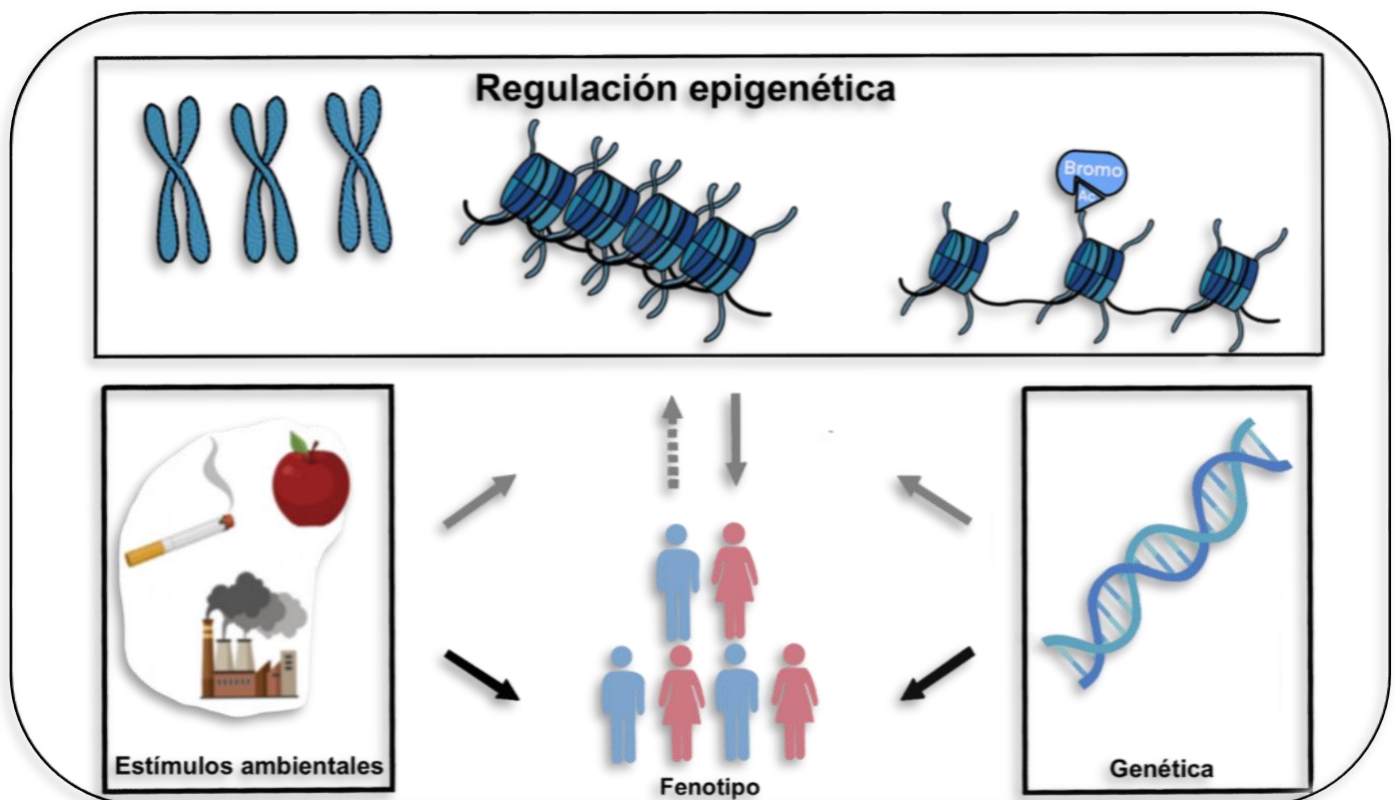
Aunque en un contexto evolutivo la memoria transcripcional les confiere adaptabilidad a los organismos, algunos reportes indican que la memoria transcripcional metabólica juega un papel clave en la etiología de enfermedades como la diabetes o el síndrome metabólico y sus complicaciones asociadas. En este sentido, el desarrollo de estrategias y modelos experimentales que permitan abordar los mecanismos de establecimiento de este tipo de memoria es esencial para mejorar nuestro entendimiento de este fenómeno en contextos patológicos. Nuestro protocolo de inducción de memoria abre la posibilidad de ensayar *in vitro* el uso de fármacos u otros tratamientos para prevenir el establecimiento de la memoria metabólica.

# Introducción

## *Interacciones entre el genoma y el ambiente nutricional*

Todos los organismos se encuentran constantemente expuestos a estímulos provenientes del ambiente como lo son la temperatura, la presión, la exposición a factores de crecimiento, la disponibilidad relativa de nutrientes, entre muchos otros. En condiciones constantes o con variaciones estables (por ejemplo, los ciclos de luz-oscuridad), el mantenimiento de un único fenotipo representa una ventaja adaptativa (Dekel & Alon, 2005; Kussell & Leibler, 2005). Sin embargo, debido a la naturaleza variable de algunos estímulos, la célula ha desarrollado diferentes mecanismos que le permiten integrar las señales ambientales y ajustar su fisiología en respuesta a las fluctuaciones ambientales en tiempo real.

Para contender de manera eficiente contra estos estímulos cambiantes, las células ajustan de manera específica su programa transcripcional. Como cualquier fenotipo, el programa transcripcional de la célula resulta de la interacción entre estos estímulos provenientes del ambiente y el genoma del organismo en cuestión (Figura 1). Para asegurar que la integración de señales entre estos dos componentes sea eficiente y la magnitud y la velocidad de la respuesta sean apropiadas, la maquinaria transcripcional debe ser capaz de percibir con mucha precisión las variaciones ambientales.



**Figura 1. El fenotipo es resultado de la interacción entre el genoma y el ambiente.** A través de la maquinaria de regulación epigenética, la célula es capaz de montar una variedad de respuestas transcripcionales o fenotipos integrando la información proveniente del ambiente y la información codificada en el genoma.

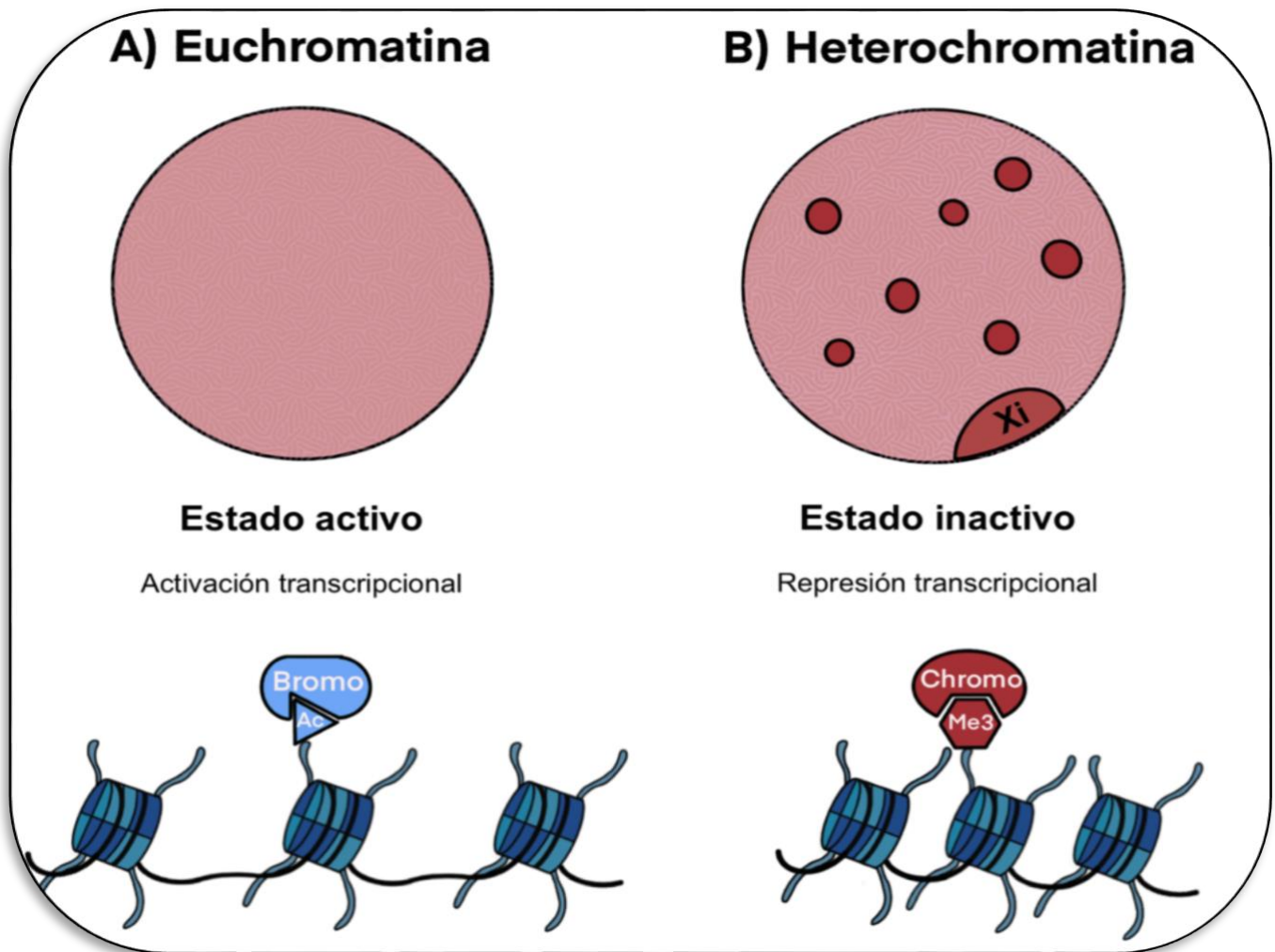
En el caso específico del ambiente nutricional, los organismos tienen que ser capaces de percibir la disponibilidad de nutrientes y ajustar así la tasa de captura y utilización. La maquinaria metabólica debe manejar diferentes tipos y cantidades de nutrientes, lo que implica que ésta debe de modificar su

actividad constantemente en respuesta a variaciones en la concentración de nutrientes en el medio. Uno de los componentes que repercute en la eficiencia de esta respuesta es genético, pues toda la maquinaria metabólica se encuentra codificada en los genomas nuclear y mitocondrial; por otro lado, el componente ambiental estaría representado por la disponibilidad de nutrientes en el medio (Figura 1).

Gracias a la naturaleza heredable y reversible de las modificaciones epigenéticas, se ha propuesto que estas pueden explicar los ajustes repentinos y persistentes en el programa transcripcional en respuesta a cambios en las condiciones ambientales. Procesos como la metilación del DNA, las modificaciones post-traduccionales de las histonas, así como la organización tridimensional del genoma y el perfil local de accesibilidad de diferentes loci estarían involucrados en esta regulación. A través de estos mecanismos, la información proveniente del ambiente quedaría codificada sobre el genoma de manera reversible, aunque también conservaría un carácter heredable.

*Mecanismos de integración de las señales ambientales: la regulación epigenética*

En el caso de los genomas eucariontes, el material genético se encuentra empaquetado dentro del núcleo en una estructura que llamamos **cromatina**, entendida como la asociación de DNA y RNA con diferentes proteínas. Esta cromatina está constituida por una sucesión de **nucleosomas**, los cuales son un arreglo octamérico que contiene dos copias de cada una de las proteínas histonas H2A, H2AB, H3 Y H4 (Figura 4). Dependiendo del grado de compactación, esta cromatina puede dividirse en dos clases: **eucromatina** y **heterocromatina**, asociadas a un estado transcripcionalmente activo e inactivo, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2. Eucromatina y heterocromatina.** La cromatina dentro del núcleo se puede encontrar en dos estados fundamentales: a) la eucromatina, caracterizada por presentar un nivel de compactación relativamente bajo y estar asociada a regiones de transcripción activa y b) la heterocromatina, que presenta niveles elevados de compactación y está asociada a un estado de represión transcripcional.

La transición entre un estado transcripcional activo y uno inactivo está mediado, entre otros factores, por las modificaciones post-traduccionales en los extremos N-terminal de las histonas y la metilación del DNA, las cuales a su vez sirven como señales de reclutamiento para modificadores de la cromatina que pueden aumentar o disminuir el estado de compactación de la cromatina (Allis & Jenuwein, 2016). Los dos fenómenos más estudiados relacionados con la regulación epigenética son la metilación del DNA y las modificaciones post-traduccionales a las histonas; a continuación se describen muy brevemente ambos fenómenos por separado.

## La metilación del DNA

La metilación del DNA es una marca epigenética que se hereda de forma simétrica o asimétrica a través de las rondas de división celular, y que consiste en la transferencia de un grupo metilo proveniente del donador S-Adenosil-Metionina (SAM) al carbono número 5 de la citosina (5mC) (Robertson, 2005). Aunque esta marca puede ocurrir en cualquier contexto dentro del genoma, aproximadamente el 98% ocurre en posiciones con dinucleótidos CpG en células somáticas de mamíferos (Lister et al., 2009). La presencia de esta marca está fuertemente asociada con un estado de represión transcripcional, pues la

presencia de grupos metilo bloquea el reconocimiento de factores de transcripción y/o recluta proteínas represoras.

El proceso de metilación de los dinucleótidos CpG está regulado por la actividad de las proteínas metiltransferasas de DNA (DNMT, por sus siglas en inglés), las cuales catalizan la transferencia del grupo metilo al DNA. Esta familia de proteínas está representada por 5 miembros: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y la DNMT3L. Mientras que las primeras dos se consideran las responsables de mantener el patrón de metilación durante la replicación del DNA (Probst et al., 2009), los otros tres miembros están generalmente asociados al proceso de metilación *de novo* como respuesta a diferentes estímulos (Jin et al., 2011).

A su vez, el proceso mediante el cual el DNA pierde la metilación se puede clasificar en dos tipos esenciales según sus requerimientos energéticos: desmetilación pasiva y desmetilación activa. La desmetilación pasiva ocurre cuando, a través de las rondas de división celular, la herencia asimétrica del patrón de metilación se va diluyendo entre cada ciclo de replicación. Por otro lado, la desmetilación activa ocurre a través de la actividad de enzimas de tipo hidroxilasa denominadas TET. Estas enzimas catalizan la oxidación de la 5mC hacia 5-hidroximetil-citosina (5hmC), la cuál atraviesa diferentes eventos de oxidación secuenciales para convertirse nuevamente en citosina y se ha asociado a activación transcripcional (Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009).

## Acetilación de histonas

La acetilación de las histonas se regula por la actividad antagónica de dos tipos diferentes de enzimas: las acetil-transferasas de histonas (HAT, por sus siglas en inglés) y las desacetilasas de histonas (HDAC, por sus siglas en inglés). Estas enzimas catalizan la adición y la remoción, respectivamente, de un grupo acetilo proveniente de la acetil coenzima-A a ciertos residuos de aminoácidos en las proteínas, típicamente lisinas y argininas (Bannister & Kouzarides, 2011).

Las HATs son enzimas que catalizan la transferencia de un radical acetilo en el grupo amino de la cadena lateral de la lisina o la arginina. Esta reacción provoca que la carga positiva de estos aminoácidos se neutralice, afectando directamente la estabilidad de unión entre las histonas y el DNA. Típicamente, esta modificación de las histonas resulta en una activación transcripcional, pues en este estado la interacción entre el DNA y los nucleosomas se debilita. Como se dijo antes, estas enzimas utilizan como cofactor a la acetil-coenzima-A (Ac-CoA) (Hodawadekar & Marmorstein, 2007).

Por su parte, las desacetilasas de histonas remueven los grupos acetilo de estos aminoácidos. Como es de esperarse, su actividad favorece la estabilización de la arquitectura local al restablecer las cargas positivas de las histonas y mejorar la unión nucleosoma-DNA, provocando la compactación de la cromatina y la represión transcripcional a nivel local (Yang & Seto, 2007).

A su vez, esta familia de proteínas puede subdividirse en 4 tipos, entre los que destacan las pertenecientes al Tipo III -denominadas también Sirtuinas- porque utilizan como cofactor al NAD<sup>+</sup>, lo que las vuelve además sensores directos del estado redox de la célula (Yang & Seto, 2007).

## Metilación de histonas

A diferencia de la acetilación, la metilación de histonas es una modificación que no afecta directamente las propiedades físicoquímicas de los nucleosomas, por lo que no tiene consecuencias en la estructura de

la cromatina por sí sola, además de que pueden estar asociadas a la represión o activación transcripcional dependiendo del residuo en el que se ubiquen. Dicho de otra forma, esta modificación requiere de la *lectura* por parte de otras proteínas, las cuales tienen dominios de unión a estas modificaciones.

Además de esto, los residuos de lisina pueden ser mono-, di-, y trimetilados, mientras que los residuos de arginina se pueden monometilar y dimetilar asimétrica- o simétricamente (Ng et al., 2009), lo que agrega un nivel extra de complejidad al fenómeno de modificación post-traducciona de las histonas.

La metilación de los residuos de las histonas se lleva a cabo por un grupo de enzimas llamadas metil-transferasas de histonas (HMT, por sus siglas en inglés *Histone Methly-Transferases*), las cuales catalizan la transferencia de un grupo metilo proveniente de la S-Adenosil-Metionina o SAM, al grupo amino de la cadena lateral de lisinas y argininas.

Debido a la cantidad de modificaciones que pueden resultar, a lo largo de la evolución estas enzimas se han especializado en la modificación de residuos específicos. Por ejemplo, en *Neurospora crassa* la proteína DIM5 metila específicamente el residuo 9 de la histona H3 (H3K9me, a partir de ahora), mientras que SET7/9 solo actúa sobre el residuo 4 de la histona H3, ó H3K4me. Además, la especificidad también puede observarse en el grado de metilación en el que están involucradas; mientras que DIM5 puede catalizar únicamente la trimetilación de la lisina 9 (H3K9me3) (Tamaru et al., 2003), SET7/9 solo puede monometilar a la lisina 4 (Xiao et al., 2003).

Aunque originalmente se propuso que la metilación de las histonas era una marca permanente, en el 2004 se descubrió la primera desmetilasa de histonas, LSD1 (por sus siglas en inglés *Lysine-Specific Demethylase*), la cual utiliza como cofactor al FAD (Yujiang Shi et al., 2004). Además de volverla un sensor metabólico al igual que las Sirtuinas, el mecanismo de reacción que involucra la utilización del FAD limita la actividad de esta enzima a residuos mono- y dimetilados (Klose & Zhang, 2007).

Sin embargo, más tarde se describió una nueva familia de proteínas capaces de remover esta modificación, las proteínas con dominios Jumonji (JMJD), que utilizan Fe(II) y alfa-ceto-glutarato como cofactores (Tsukada et al., 2006). Notablemente, en este grupo se encuentra la primera enzima descrita que cataliza la remoción de la marca de trimetilación en los residuos 9 y 36 de la histona 3 (H3K9me3 y H3K36me3, respectivamente), lo que además sugirió que al igual que las HMT, la actividad de estas enzimas es específica a nivel de sustrato y niveles de modificación (Whetstine et al., 2006).

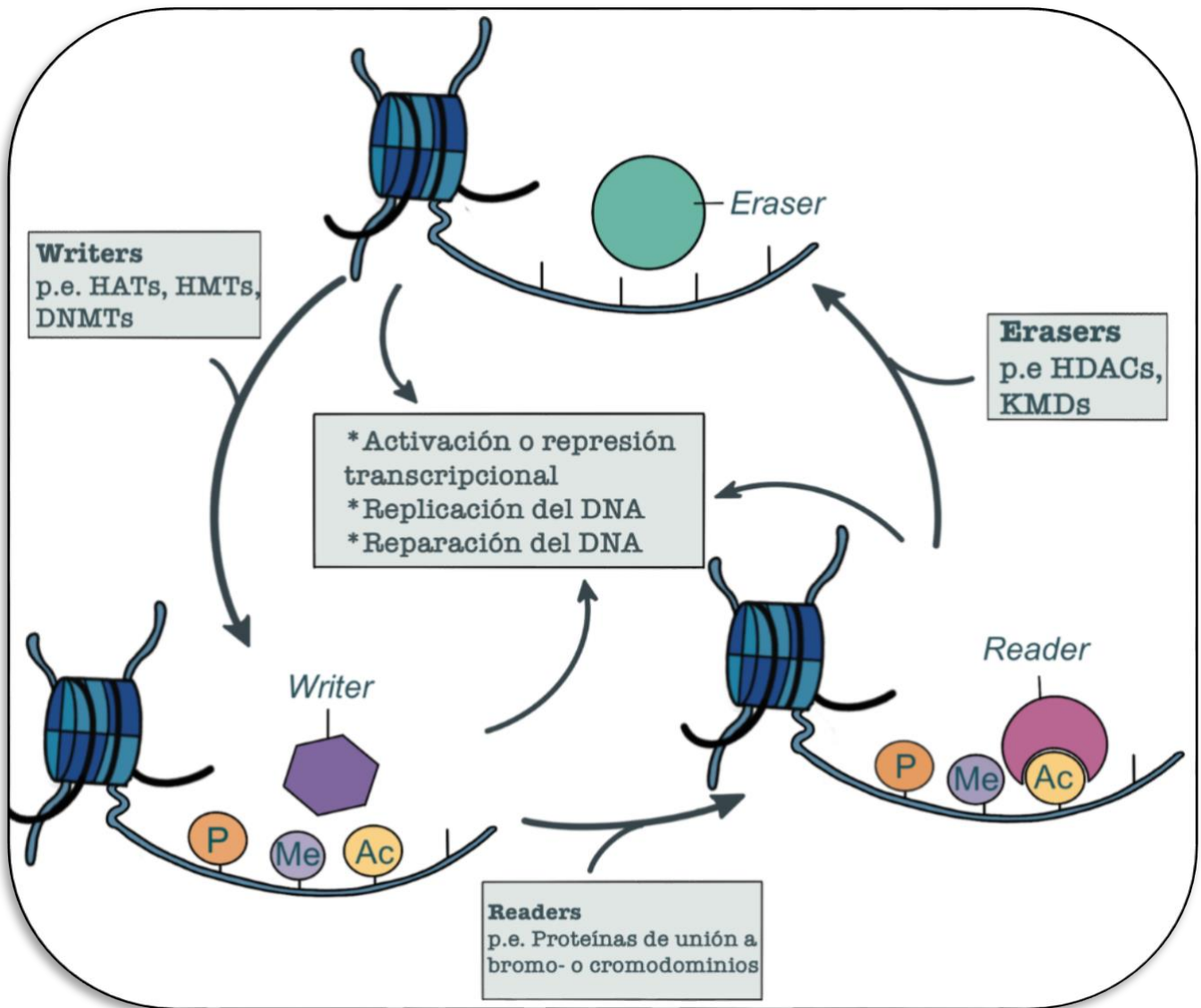
#### *Regulación transcripcional a través del epigenoma*

El papel principal tanto de la metilación del DNA como de las diferentes modificaciones post-traduccionales de las histonas es la regulación de la transcripción, ya sea a través de alteraciones en la estructura local de la cromatina, o bien a través del reclutamiento de factores de transcripción y otras moléculas efectoras que faciliten o inhiban el ensamblaje de la maquinaria transcripcional.

Mientras que algunas modificaciones como la fosforilación y la acetilación de algunos residuos de las histonas afectan directamente su estructura al neutralizar sus cargas positivas, otros tipos de modificación como la ubiquitinación afectan la estructura local de la cromatina al agregar una molécula de gran tamaño a las histonas, alterando la interacción entre el DNA y los nucleosomas; de esta forma y en términos generales, su adición o remoción resulta en una cromatina más o menos accesible, respectivamente (Figura 2) (Kiefer et al., 2008; Kouzarides, 2007). Por otro lado, la metilación tanto de las histonas como del DNA en todos sus niveles resulta ser una modificación relativamente neutral en términos estructurales. Debido a que por sí solas estas modificaciones no afectan significativamente la

estructura local o global de la cromatina, su efecto se manifiesta en presencia de diferentes proteínas encargadas de “leer” esta información.

Para entender esto, es necesario explicar lo que se ha denominado como el modelo de “writers”, “erasers” y “readers” (Allis & Jenuwein, 2016). En este modelo de la regulación transcripcional, todas las enzimas que catalicen la adición o remoción de modificaciones covalentes al DNA o a las histonas (DNMTs, TETs, HATs, HDACs, etc.) fungirían como los *writers* y *readers*, respectivamente. Por su parte, para entender el fenómeno de *reading* es necesario hablar de cómo es que estas proteínas son capaces de reconocer de manera específica las numerosas modificaciones a la cromatina.



**Figura 3. Modelo de *writers*, *erasers* y *readers*.** Los elementos de tipo *writer* catalizan la adición de marcas como la metilación o la acetilación de histonas, mientras que los elementos de tipo *eraser* catalizan la remoción de estas marcas. Por su parte, los elementos de tipo *reader* se encargan de leer la información codificada en estas modificaciones y reclutar a proteínas asociadas con la represión o la activación transcripcional.

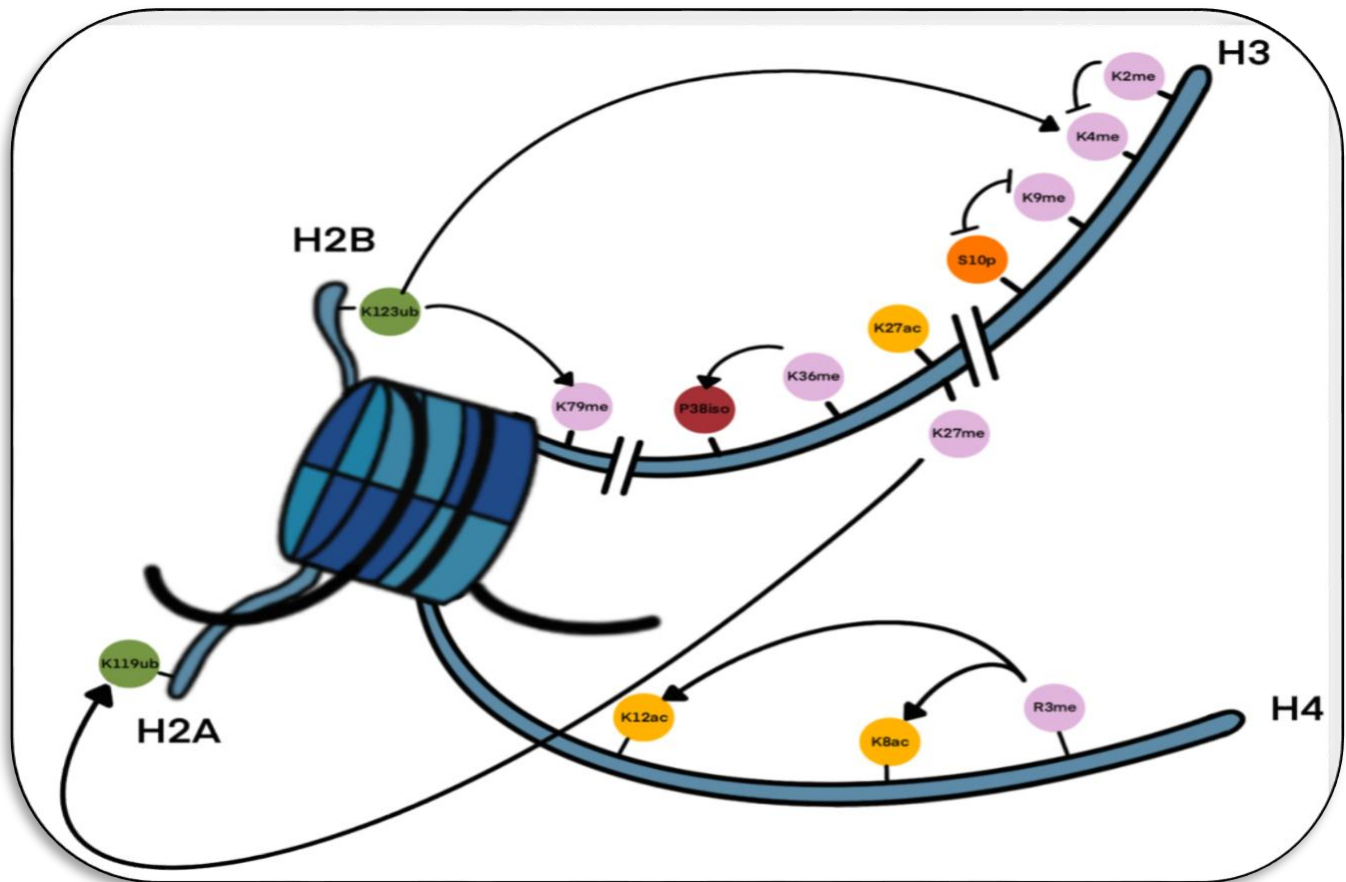
Existen diferentes proteínas asociadas a la cromatina, las cuales interactúan con ella a través de diferentes dominios de unión a ciertas modificaciones (Xhemalce et al., 2011). Como es de esperarse, la gran mayoría de estos dominios interaccionan únicamente con lisinas modificadas. Entre los diferentes



dominios de unión a lisinas metiladas se encuentran los **cromodominios** (Champagne & Kutateladze, 2009) y las proteínas de la familia Tudor (Kim et al., 2006), la cual engloba a proteínas con dominios PWWP Y MBT (Champagne & Kutateladze, 2009); por otro lado, tenemos a las proteínas con **bromodominios** (Figura 3) los cuales interaccionan selectivamente con residuos de lisina acetilados (Mujtaba et al., 2007). Notablemente, dentro de estas proteínas podemos encontrar representantes de las acetil transferasas de histonas y algunos remodeladores de la cromatina como el complejo SWI/SNF (Hassan et al., 2002). Además, muchas de estas proteínas también contienen dominios de interacción con otros factores de tipo *writer* y *reader*.

Un ejemplo bien descrito es el de la proteína HP1, la cual interactúa con la histona H3 cuando su residuo nueve se encuentra trimetilado (H3K9me3), una marca típicamente asociada con una cromatina compacta y represión transcripcional. HP1 se une a la marca H3K9me3 a través de un cromodominio presente en su extremo amino y posteriormente facilita el reclutamiento de otras proteínas efectoras que se encargarán de compactar la cromatina de manera constitutiva (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). En contraposición a este ejemplo, es importante mencionar que estos factores no solamente facilitan el reclutamiento de efectores, sino que también pueden prevenirlo. Tal es el caso de la modificación H3K4me3, una marca típicamente asociada con una cromatina abierta y un estado transcripcional activo, la cual impide la unión del factor de transcripción NuRD, a su vez asociado con la represión transcripcional (Nishioka et al., 2002; Zegerman et al., 2002). Esta modificación también previene la unión de la metil transferasa de DNA DNMT3L (Adams-Cioaba & Min, 2009).

La enorme diversidad de modificaciones epigenéticas en la cromatina es quizás el reflejo de que la célula ha desarrollado un mecanismo de regulación transcripcional altamente sensible a las fluctuaciones en el ambiente, y aunque el fenómeno de reconocimiento y unión a estas marcas es bastante complejo, lo más interesante es la lectura en sí misma. Todas estas modificaciones, además, tienen efectos de diferente grado sobre las otras: estas marcas pueden ser interdependientes, antagónicas, inhibitorias o cooperativas entre sí (Xhemalce et al., 2011), lo cual ha dado lugar la hipótesis del **código de histonas** (Figura 4) (Jenuwein & Allis, 2001).



**Figura 4. El código de histonas.** Esta hipótesis propone que la deposición o remoción de todas las modificaciones post-traduccionales de las histonas tiene un efecto competitivo, inhibitor, cooperativo o antagónico sobre las otras. De esta forma, la información relativa al estado transcripcional a nivel local se regula de manera muy fina.

La propuesta del código de histonas es que la presencia o ausencia de modificaciones post-traduccionales específicas determina el estado transcripcional a nivel local. En apoyo a esta idea, actualmente se reconoce la correlación entre la presencia de algunas marcas y el tipo de compartimento dentro del núcleo. Mientras que en las regiones transcripcionalmente activas generalmente están representadas las marcas H3K4me1 (asociada a elementos regulatorios de tipo “*enhancer*”) (Hon et al., 2009), H3K4me3 (asociada a promotores) (Barski et al., 2007; Schneider et al., 2004), otras marcas como la H3K27me3 y la H3K9me3 están asociadas a regiones de heterocromatina facultativa (p.e. el cromosoma X en mamíferos) y constitutiva (como centrómeros y telómeros), respectivamente (Trojer & Reinberg, 2007).

#### *La relación entre el epigenoma y el metabolismo energético*

El metabolismo energético es el resultado de diferentes reacciones enzimáticas que utilizan los nutrientes provenientes del medio para alcanzar los requerimientos energéticos de la célula, pero también funge como el medio para sintetizar todo tipo de componentes orgánicos como nucleótidos, aminoácidos o lípidos, los cuales son necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de proteínas o el almacenamiento de energía, respectivamente. Estas reacciones pueden ser manipuladas farmacológicamente o bien a través de la dieta, lo cual tiene efectos significativos en procesos como la identidad celular (Yucel et al., 2019), el desarrollo (Tang et al., 2017), la división celular, entre otros. Más allá de describir extensamente estas redes metabólicas y las reacciones necesarias para la producción de los metabolitos intermediarios, en este trabajo pretendo explicar la relevancia biológica del fenómeno de la regulación metabólica del epigenoma.

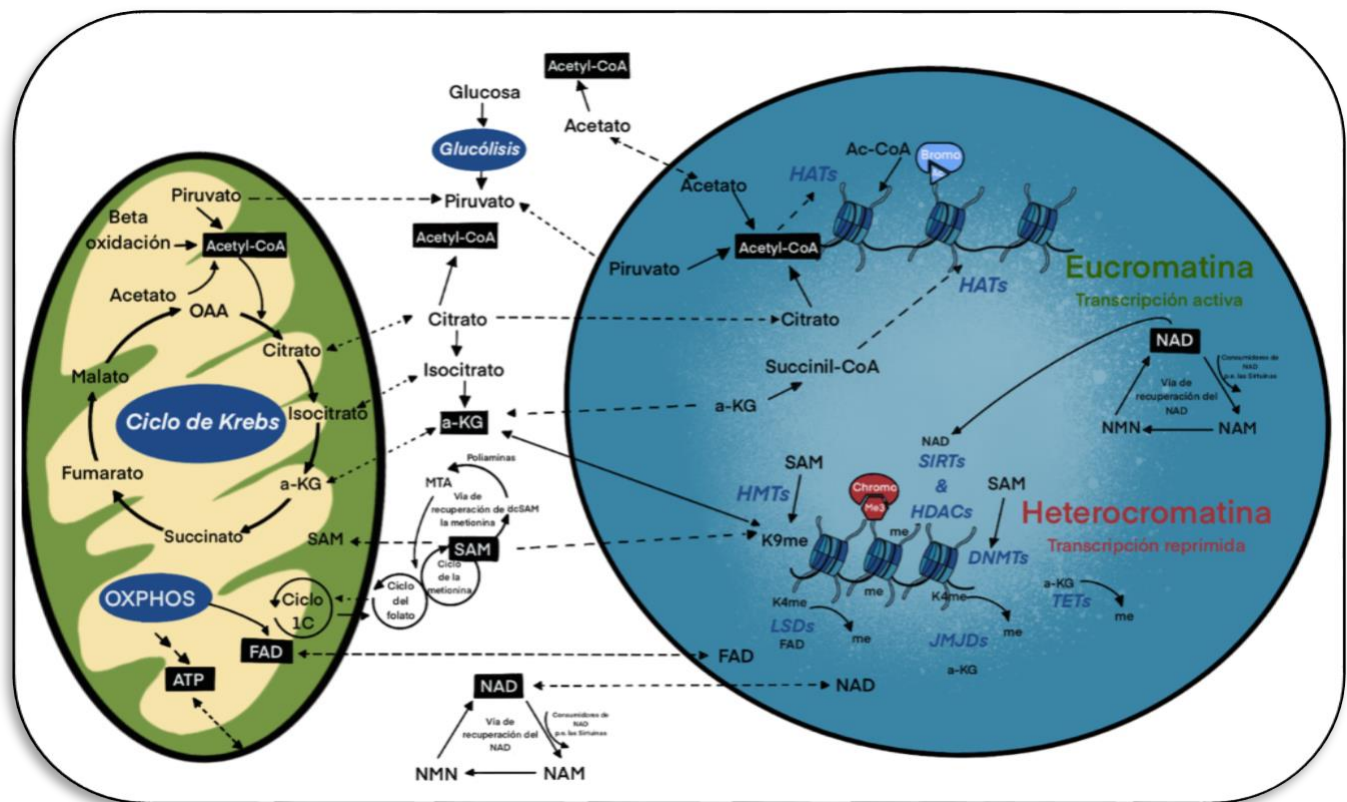
Una gran cantidad de enzimas modificadoras de la cromatina como las HATs, HDACs, HMTs, TET, e incluso algunos remodeladores de la cromatina utilizan como sustratos, cofactores y/o reguladores alostéricos a moléculas pequeñas derivadas de rutas metabólicas como el ciclo de la metionina, el ciclo de Krebs y la glucólisis (Figura 5). Estos metabolitos incluyen a la S-adenosil-metionina (SAM, donadora de grupos metilo), la acetil-coenzima A (Ac-CoA, donadora de grupos acetilo), NAD<sup>+</sup>, el alfa-ceto-glutarato ( $\alpha$ KG), entre otros (Reid et al., 2017). De esta forma, el metabolismo funge como un eje de integración de señales relacionadas con el ambiente nutricional y como un mecanismo de transmisión de esta información hacia el estado de la cromatina.

La capacidad de la célula de responder a las variaciones en la disponibilidad de nutrientes es el resultado de las características cinéticas y termodinámicas de las enzimas modificadoras de la cromatina, pues las constantes de disociación de algunas acetil-transferasas y metil-transferasas se encuentran muy cerca de las concentraciones fisiológicas de sus sustratos, lo que convierte a estas enzimas en sensores indirectos del metabolismo (Reid et al., 2017). Como consecuencia, su actividad es altamente sensible a la concentración de metabolitos intermedios como la SAM y la Ac-CoA.

## **Dinámica de metilación de las histonas y DNA**

La metilación tanto del DNA como de las histonas se lleva a cabo por enzimas que utilizan como cofactores a la SAM, la cual se produce principalmente mediante el metabolismo de aminoácidos como la metionina y la treonina (Shyh-Chang et al., 2013; Zhang, 2018). Tanto las DNMTs como las HMTs utilizan este metabolito para añadir un grupo metilo a diferentes bases nitrogenadas o residuos de aminoácidos en las histonas, convirtiéndolo en S-adenosil-homocisteína (SAH). A su vez, la SAH actúa como un inhibidor competitivo y regula negativamente la actividad catalítica de estas enzimas (Sanderson et al., 2019). En este contexto, el patrón de metilación global del DNA y de las histonas es sensible a la suplementación de estos aminoácidos en la dieta o a la activación/inhibición farmacológica de las enzimas metabólicas responsables de su procesamiento.

Por su parte, la pérdida de metilación del DNA depende de la actividad de las proteínas TET, las cuales utilizan como sustrato al  $\alpha$ KG y al oxígeno para catalizar la oxidación de esta marca (Kohli & Zhang, 2013). A su vez, la desmetilación de las histonas depende de la concentración de más de dos nutrientes: mientras que las proteínas de la familia Jumonji (JHDMS) también utilizan al  $\alpha$ KG y el oxígeno como sustratos, las proteínas LSD utilizan al dinucleótido de flavina y adenina (FAD) como cofactor (Yang Shi, 2007). Así, la actividad de las TET y las JHDMS se ve inhibida por la disponibilidad de oxígeno y la concentración de análogos del  $\alpha$ KG como el succinato y el fumarato, mientras que la actividad de las proteínas LSD dependerá parcialmente de la actividad de la cadena transportadora de electrones y la producción metabólica del equivalente FAD.



**Figura 5. Regulación metabólica del epigenoma.** Debido a que la actividad de los diferentes modificadores de la cromatina depende de la concentración de metabolitos intermedios como la Ac-CoA y la SAM, estímulos que alteren el flujo metabólico y por ende la producción de estos metabolitos tendrán un efecto directo sobre la estructura local de la cromatina.

## Dinámica de acetilación y desacetilación de histonas

Aunque existen mecanismos no enzimáticos para la adición de un grupo acetilo a residuos de aminoácidos, en condiciones fisiológicas la mayor parte de la acetilación de las histonas se lleva a cabo por las HATs, las cuales utilizan como cofactor a la acetil-coenzima A (Ac-CoA).

En mamíferos la mayor parte de la producción de Ac-CoA depende del metabolismo catabólico de la glucosa y ácidos grasos provenientes del medio (Cluntun et al., 2015; Wellen et al., 2009). Mientras que la glucosa alimenta la vía glucolítica y el metabolismo mitocondrial para generar citrato -el cual es exportado fuera de la mitocondria-, la suplementación de ácidos grasos alimenta la vía de la  $\beta$ -oxidación; ambas vías tienen como resultado la producción de Ac-CoA y su exportación al citosol en forma de citrato. Además, el consumo de acetato -un ácido graso de cadena corta- por parte de la enzima acetil-CoA sintetasa 2 también es una fuente importante para la producción de este intermediario (Liu et al., 2018). Así, se puede afectar significativamente el perfil global de acetilación mediante la suplementación de estos nutrientes en el medio o bien a través de la modulación farmacológica de la vía glucolítica y la  $\beta$ -oxidación.

Por su parte, la desacetilación de histonas por parte de las HDACs también se ve afectada por la disponibilidad de diferentes metabolitos intermedios. Las HDACs de la clase I y II ven inhibida su actividad por la concentración del butirato y el  $\beta$ -hidroxibutirato producidos por la oxidación de ácidos grasos o la cetogénesis, respectivamente (Shimazu et al., 2013). Las Sirtuinas, que utilizan al NAD<sup>+</sup> como cofactor para remover el grupo acetilo, son sensibles a la modulación del ciclo de Krebs y del estado redox de la célula (Chalkiadaki & Guarente, 2012).

## *Efectos persistentes del metabolismo sobre el epigenoma: la memoria metabólica*

Uno de los ejemplos en donde se manifiesta claramente el impacto que tiene el metabolismo sobre la regulación transcripcional y el establecimiento de una memoria transcripcional patológica es el desarrollo de enfermedades metabólicas como la diabetes, la obesidad y el síndrome metabólico. En principio, factores tanto genéticos como ambientales están involucrados en el desarrollo de estas enfermedades. Sin embargo, estudios de asociación a nivel genómico han demostrado que la variabilidad genética explica muy poco acerca del desarrollo de estas condiciones metabólicas (Allum & Grundberg, 2020). En concreto, actualmente se reconoce que existen muy pocas variantes genéticas relacionadas con el desarrollo de estos padecimientos, y aún estas variantes explican sólo el 10% de la predisposición. Estas observaciones han dado lugar a la propuesta de que los factores ambientales como el consumo de dietas altas en azúcares y grasas son el principal detonante de estas enfermedades.

Precisamente, el origen del término “memoria metabólica” se remonta a ensayos clínicos sobre el control de los niveles de glucosa en sangre en pacientes con diabetes tipo I. En un primer ensayo, los pacientes fueron separados en dos grupos: el primero fue tratado con dos inyecciones diarias de insulina, mientras que el segundo grupo fue sometido a un tratamiento intensivo de 3 o 4 inyecciones diarias para controlar sus niveles de glucemia. Estos ensayos reportaron que el grupo sometido al tratamiento intensivo tuvo una incidencia mucho menor en la aparición de diferentes complicaciones de la diabetes como la retinopatía y la nefropatía (Genuth et al., 2002). Dadas las diferencias tan pronunciadas, en un segundo ensayo los pacientes que habían estado recibiendo el tratamiento estándar fueron sometidos al tratamiento intensivo; sin embargo, el grupo de pacientes que se sometió al tratamiento intensivo desde el primer ensayo mostró una menor incidencia de complicaciones tardías como alteraciones micro- y macrovasculares (Writing Team, 2003). En conjunto, estos ensayos dieron lugar a la hipótesis de que la aparición de las complicaciones de la diabetes depende en gran medida del momento en que se inicia el tratamiento para controlar los niveles de glucosa en sangre.

Desde entonces, el fenómeno de memoria metabólica se ha probado en una variedad de modelos experimentales como las células vasculares de músculo liso (Villeneuve & Natarajan, 2010), células endoteliales (El-Osta et al., 2008), células de endotelio retinal (Kanwar et al., 2007), entre otros. Aunque la mayoría de los esfuerzos por descifrar los mecanismos del establecimiento de la memoria se ha centrado en la producción de especies reactivas del oxígeno en la mitocondria, trabajos recientes han propuesto que la regulación epigenética juega un papel importante (Allum & Grundberg, 2020). Actualmente sabemos que factores como la desnutrición o la obesidad, el nivel de actividad u otros factores ambientales pueden afectar mecanismos epigenéticos en adultos y en la descendencia, los cuales resultan en la expresión aberrante de genes involucrados en enfermedades metabólicas y vasculares (Wang et al., 2012).

A pesar de toda la evidencia que existe actualmente sobre el fenómeno de la memoria metabólica en modelos de diabetes *in vitro* e *in vivo*, en sentido estricto la mayor parte del trabajo en torno a la memoria metabólica se ha realizado en organismos unicelulares como la levadura. La exposición previa a un estímulo específico ha probado reducir el tiempo de respuesta cuando el estímulo inductor se vuelve a presentar, y lo más interesante de este fenómeno es que puede presentarse aún en la progenie, es decir en células que jamás han estado expuestas al estímulo inicial (D'Urso et al., 2016). El fenómeno en sí mismo se ha propuesto como un ejemplo de memoria transgeneracional o “memoria celular” y ha sido nombrado en la literatura como *comportamiento dependiente de la historia* (*History Dependent Behaviour, HBD*). Se cree que este fenómeno les permite a las células adaptarse mucho más rápido en un escenario en el que el estímulo inductor se presenta de forma cíclica (Cerulus et al., 2018).

Específicamente, los ejemplos mejor estudiados son los cambios transcripcionales inducidos por la sustitución de diferentes fuentes de carbono, entre los cuales la expresión del gen GAL1 es quizá el ejemplo mejor estudiado y fue descrito precisamente en *Saccharomyces cerevisiae* (Stockwell et al., 2015). En su momento, estos trabajos reportaron que cuando las células se transfieren de un medio con glucosa a uno con galactosa, se induce una expresión débil de GAL1 con su fase *lag* asociada. Sin embargo, cuando esta misma población se transfiere a un medio con glucosa y eventualmente se recoloca en un medio con galactosa, la expresión de GAL1 alcanzaba niveles mucho mayores con respecto al primer ciclo de inducción y la fase *lag* no se presentaba.

Aunque los mecanismos detrás de este comportamiento siguen explorándose, actualmente se reconoce que las modificaciones de la cromatina juegan un papel muy importante y que las levaduras pueden heredar la información relativa al estado de accesibilidad de un promotor en particular. En el caso específico del gen GAL1 diferentes grupos han reportado que tras el primer ciclo de exposición, la maquinaria remodeladora de la cromatina remueve los nucleosomas del promotor del gen GAL1, dejándolo disponible para el acceso de la maquinaria transcripcional. De esta forma, al presentarse la segunda exposición, el promotor se encuentra disponible y la tasa de transcripción es más rápida y eficiente (D'Urso et al., 2016; Sood et al., 2017). Siguiendo la misma línea argumental, a este fenómeno se le ha sub-clasificado como “memoria transcripcional metabólica” (Bheda, 2020).

## Modelos para el establecimiento de la memoria transcripcional metabólica

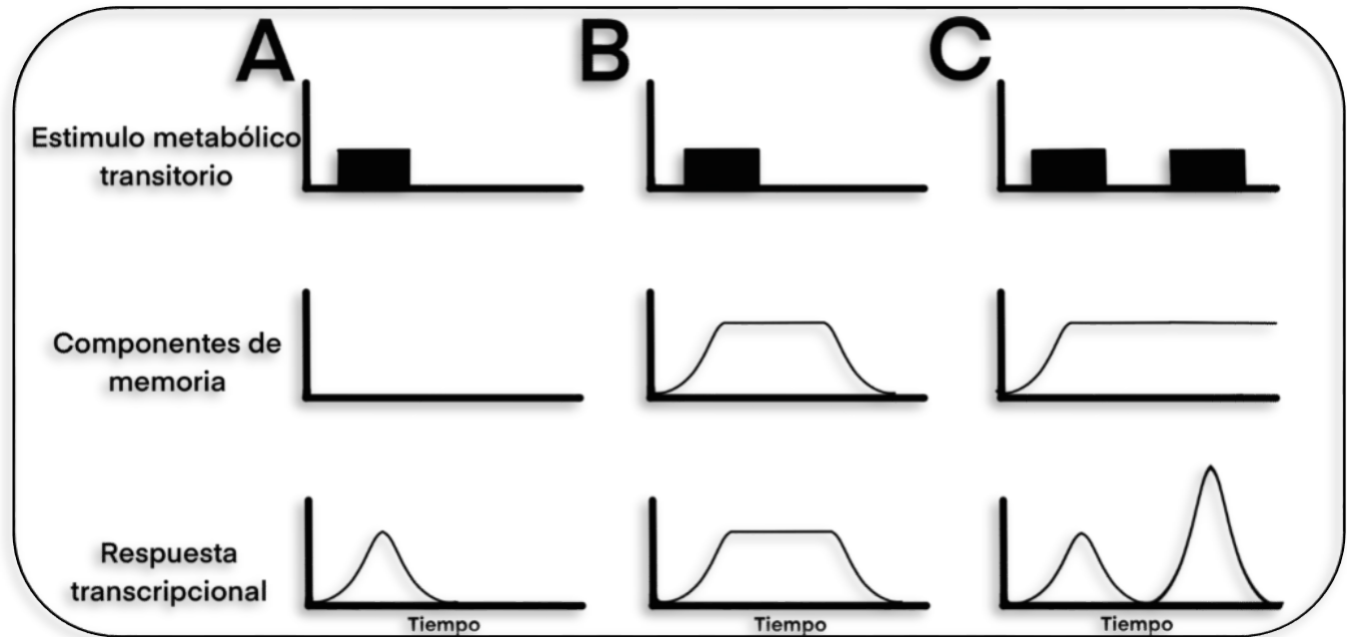
Por definición, las modificaciones epigenéticas son heredadas a través de las rondas de división celular, generando así una **memoria epigenética** que contribuye al mantenimiento de la identidad celular. Ante la exposición a nuevos estímulos ambientales, la célula modifica su programa transcripcional mediante la adición o remoción de estas marcas epigenéticas, facilitando o inhibiendo el reclutamiento de la maquinaria de transcripción para responder a dichos estímulos (Figura 3) (Allis & Jenuwein, 2016).

Como se dijo anteriormente, para que los ajustes en el programa transcripcional sean adecuados, la célula debe responder con mucha precisión a las variaciones repentinas en las condiciones ambientales. Una de las estrategias que las células implementan en respuesta a estímulos ambientales que se presentan de forma cíclica es la llamada **memoria transcripcional**. Para entender este concepto, la respuesta transcripcional se puede dividir en dos tipos generales: respuestas rápidas y respuestas sostenidas (Bartke & Schneider, 2020).

El primer tipo, la respuesta rápida, describe un escenario en el que la célula activa o reprime la transcripción de genes de respuesta a un estímulo durante el mismo tiempo que dura la exposición. Esta respuesta se llevaría a cabo a través de moléculas sensoras preexistentes, moléculas señalizadoras o bien la acción de diferentes factores de transcripción presintetizados. Una vez que el estímulo inductor es removido, la célula ajustaría nuevamente su programa transcripcional para alcanzar la homeostasis en las condiciones basales o iniciales (Figura 6, A).

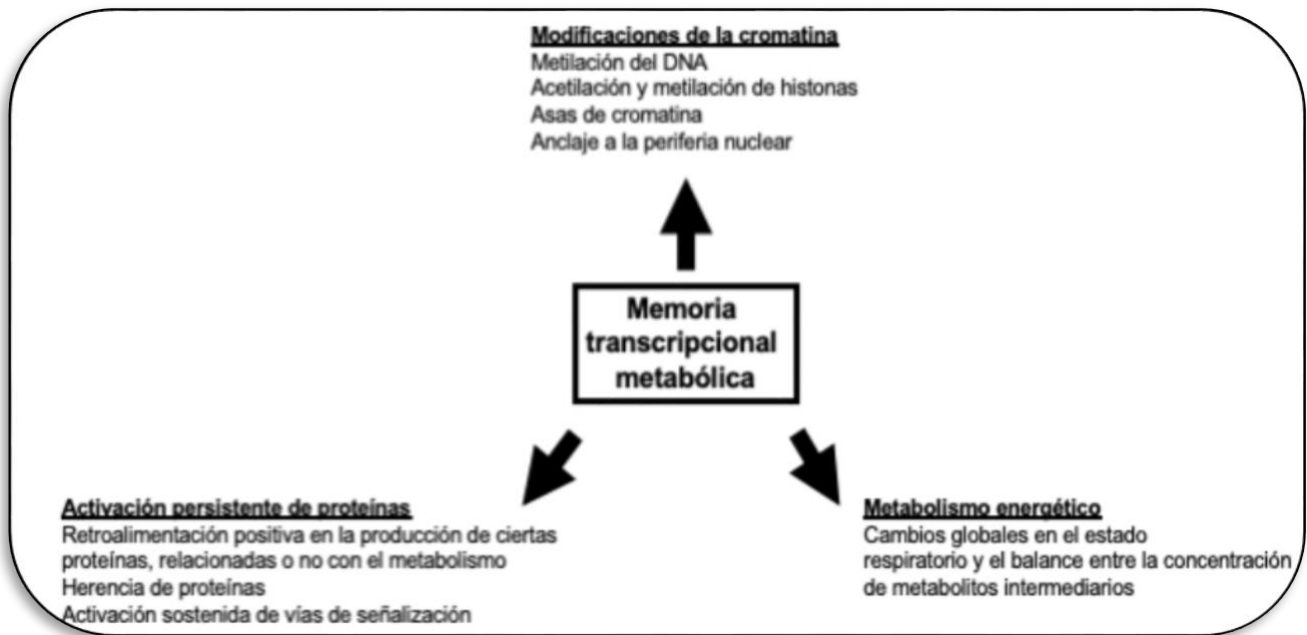
El otro tipo, la respuesta sostenida, describe un escenario en el cual los ajustes transcripcionales se mantienen aún después de la ventana de exposición, e incluso pueden ser heredados a través de las rondas de división celular. Ésta, a su vez, puede subdividirse en al menos dos casos: en el primero, tanto los componentes de memoria como la respuesta transcripcional se mantendrían en el tiempo, aún después de remover el estímulo inductor (Figura 6, B), mientras que en el segundo caso, la respuesta transcripcional se retrae cuando termina la ventana de exposición, aunque los componentes de memoria se mantienen a través de las divisiones; de esta forma, si el estímulo se presenta de nuevo, la célula estaría preparada para montar una respuesta más rápida e incluso de mayor magnitud. (Figura 6, C). A la luz de estos

modelos, el requerimiento para el establecimiento y mantenimiento de este tipo de memoria es que exista un mecanismo de transferencia bidireccional de información entre el ambiente y la estructura local de la cromatina.



**Figura 6. Tipos de respuesta transcripcional ante estímulos súbitos.** A) La respuesta transcripcional rápida está caracterizada por un cambio transcripcional que se mantiene únicamente mientras el estímulo inductor está presente. Presumiblemente, no existen componentes de memoria en este tipo de respuesta. B) Ante un estímulo de suficiente magnitud, los componentes de memoria de la célula permanecería alterado y se mantendría en la misma magnitud aún en ausencia del inductor. A esto se le llama memoria de mantenimiento. C) En caso de estímulos que varían de forma cíclica, el transcriptoma de la célula ya estaría preparado para responder a este cambio y responde con una mayor magnitud cuando el estímulo se presenta de nuevo. Modificada de Bheda, 2020.

En el contexto de la regulación metabólica del epigenoma, ante la presencia de estímulos que modifiquen el metabolismo y afecten la concentración relativa de metabolitos como la SAM o la Ac-CoA, la actividad de los modificadores de la cromatina resultaría en el establecimiento de un programa transcripcional que permita contender con el estímulo. Si dicho programa transcripcional incluye la expresión de genes involucrados en el metabolismo, se generaría un asa de retroalimentación positiva en el que la respuesta transcripcional perpetúa la producción de algún metabolito intermedio a niveles suficientes para afectar la actividad de los modificadores de la cromatina (Figura 7).



**Figura 7. Elementos para el establecimiento de la memoria transcripcional metabólica.** El establecimiento de una memoria transcripcional de carácter metabólico depende de una correcta transferencia de información proveniente del ambiente nutricional a través del metaboloma, lo que resulta en modificaciones al perfil de accesibilidad de la cromatina a través de procesos como la metilación del DNA o de las histonas. Por su parte, los elementos de tipo proteico o de RNA involucrados en la respuesta transcripcional también participarían en el mecanismo de retroalimentación que perpetúe el nuevo programa transcripcional. Modificado de Bheda, 2020.



# Planteamiento del problema

Cuando las células se exponen a nuevos estímulos ambientales, diferentes enzimas modificadoras de la cromatina catalizan la adición o remoción de modificaciones al DNA y a las histonas que contribuyen a ajustar el programa transcripcional. Estas modificaciones pueden ser heredadas a lo largo de varias generaciones celulares de manera estable, aún cuando el estímulo que las provocó haya sido removido.

A su vez, se ha reportado que la actividad de las enzimas modificadoras de la cromatina está fuertemente regulada por la concentración de metabolitos intermediarios provenientes del metabolismo central, los cuales actúan como sustratos, cofactores y/o reguladores alostéricos. Con base en estos antecedentes, en este trabajo nos propusimos exponer a células somáticas a diferentes estímulos metabólicos en el medio de cultivo de manera transitoria para evaluar el establecimiento de una memoria metabólica y/o epigenética.

El completar este proyecto nos permitirá determinar si existe una memoria metabólica inducida por estímulos nutricionales diversos en células somáticas animales, y si esta memoria metabólica resulta en una memoria epigenética estable en las células. Además, establecer un modelo de inducción de memoria metabólica a través de la suplementación transitoria del medio de cultivo nos permitirá abordar o evaluar los mecanismos mediante los cuales se heredan estos programas transcripcionales.

# Hipótesis

Exponer células somáticas animales a diferentes estímulos nutricionales de manera transitoria, inducirá una memoria metabólica que estará presente aún después de varias rondas de división celular.

## Objetivo general:

Establecer un modelo *in vitro* para determinar si la exposición de diferentes tipos celulares de mamíferos a distintos estímulos nutricionales de manera transitoria resulta en cambios metabólicos persistentes.

## Objetivos particulares

- Establecer cultivos primarios de fibroblastos murinos (neonatales y embrionarios) y de células endoteliales humanas y exponerlos a concentraciones suprafisiológicas de diferentes nutrientes de manera transitoria *in vitro* para establecer un modelo de memoria metabólica.
- Evaluar la respiración mitocondrial y la glucólisis de las células expuestas a los distintos estímulos metabólicos durante los tratamientos y días después de removido el estímulo para determinar si existe una memoria metabólica utilizando un analizador de flujo extracelular.
- Evaluar el estado oxidativo (mediante reducción de MTT) de las células donde se ha establecido una memoria metabólica.

# Métodos

## *Protocolo: Obtención de fibroblastos dermales de ratones neonatos*

1. Obtener ratones neonatos de entre 0 y 3 días de edad (P0-P3) de la cepa C57/BL6. Limpiar a los ratones con etanol al 70 % para eliminar cualquier resto de suciedad.
2. Sacrificar a los individuos cortándoles la cabeza en un solo movimiento con ayuda de unas tijeras de disección. Permitir que la sangre salga del cuerpo del animal. (chechar con el comité de bioética del Instituto si esto está permitido, pues en muchos casos piden anestésiar al animal).
3. Lavar los cuerpos con PBS 1x para deshacerse del exceso de sangre; lavar una vez en etanol al 70 %.
4. En la campana de flujo laminar, cortar las patas y la cola con cuidado de no perforar más allá de la piel.
5. A partir de los orificios de las extremidades, cortar la piel del lomo completo de los ratones utilizando pinzas para despegar la piel del tejido muscular.
6. Con tijeras de disección estériles, cortar la piel del lomo en trozos lo más pequeños posible.
7. Resuspender los fragmentos de piel en tubos cónicos con 5 mL de tripsina al 0.05 % y agitar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
8. Diluir la tripsina con medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10 % y pasar la suspensión de células a través de un filtro de 50 o 100  $\mu\text{m}$ .
9. Centrifugar la suspensión filtrada a 1,300 rpm durante 5 minutos.
10. Resuspender las células en medio DMEM y sembrar las células en cajas previamente tratadas con gelatina al 0.1 %.
11. Cultivar las células en una incubadora con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C hasta alcanzar un 70-80 % de confluencia.

## *Protocolo: Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)*

1. Sacrificar una ratona de la cepa C57/BL6 con 13.5 días de gestación por dislocación cervical (chechar con bioética de Instituto).
2. Rociar etanol al 70% en el abdomen.
3. Realizar una incisión en la piel con tijeras de disección.
4. Con ayuda de unas pinzas, exponer la cavidad abdominal.
5. Remover ambos cuernos uterinos y colocarlos en un tubo PSB 1x estéril.
6. Dar un lavado a los cuernos uterinos en alcohol al 70 % y uno más en PSB 1x para retirar los restos de sangre.
7. En la campana de flujo laminar, utilizar una caja Petri de 10cm con PBS 1x para remover los embriones del útero y retirar el saco vitelino de cada uno.
8. Decapitar a cada uno de los embriones y retirar los órganos rojos. Poner los cuerpos en una nueva caja de Petri.
9. Con ayuda de un bisturí estéril, cortar en pequeños pedazos los cuerpos de los embriones.
10. Colocar estos fragmentos en tubos cónicos de polipropileno con 5 mL de tripsina al 0.05 % y mantener en agitación a temperatura ambiente por 15 minutos.
11. Inactivar la tripsina con medio suplementado con suero fetal bovino y centrifugar 5 minutos a 13,000 rpm.
12. Retirar el sobrenadante y resuspender los fragmentos de piel en medio de cultivo (DMEM Low Glucose suplementado con suero fetal bovino y glutamina), con una concentración de antibiótico 2x.

13. Sembrar en cajas de 15 cm tratadas previamente con gelatina al 0.1 % y cultivar las células en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.
14. Cambiar medio DMEM + 10% de SFB a las 24 hrs y mantener el cultivo.

*Determinación del fenotipo metabólico con el equipo Seahorse (Agilent Technologies)*

Se cultivaron células HEK 293-FT, fibroblastos dermales de ratones neonatos (NMDF, por sus siglas en inglés) y MEFs en medios suplementados con diferentes nutrientes (Tabla 1).

**Tabla 1. Concentración utilizada para cada nutriente y para cada tipo celular.**

| Nutriente/tratamiento     | Concentración utilizada por tipo celular |  |                                    |        |
|---------------------------|--|--|------------------------------------|--------|
|                           | HEK 293-FT                               | Fibroblastos dermales de ratón neonato | Fibroblastos embrionarios de ratón | HUVEC  |
| <b>Glucosa baja</b>       | 5.5 mM                                   | 5.5 mM                                 | 5.5 mM                             | 5.5 mM |
| <b>Glucosa alta</b>       | 25 mM                                    | 25 mM                                  | 25 mM                              | 30 mM  |
| <b>Sin glucosa</b>        | 0 mM                                     | 0 mM                                   | 0 mM                               | -      |
| <b>Treonina</b>           | 3.2 mM                                   | 3.2 mM                                 | 3.2 mM                             | -      |
| <b>Colesterol</b>         | 500 µM                                   | 500 µM                                 | 500 µM                             | -      |
| <b>Adenosina</b>          | 1 mM                                     | 500 µM                                 | 500 µM                             | -      |
| <b>Oxígeno</b>            | -  | -                                      | 18 %                               | -      |
| <b>Ácido Ascórbico</b>    | 200 µM                                   | 200 µM                                 | 200 µM                             | -      |
| <b>Acetato de potasio</b> | 300 µM                                   | 300 µM                                 | 300 µM                             | -      |
| <b>Ácido palmítico</b>    | 300 µM                                   | 200 µM                                 | 200 µM                             | -      |

Las células se cultivaron durante tres, cuatro o cinco días (HEK 293FT, HUVEC y fibroblastos, respectivamente) en los diferentes medios de cultivo y después se mantuvieron durante un periodo de la misma duración en las condiciones de cultivo basales que simularan las concentraciones en sangre (glucosa [5.5 mM] y oxígeno al 8 %). Durante todos los días que duró cada experimento, el medio se cambió cada 24 horas para mantener la concentración de todos los nutrientes lo más estable posible. Un día antes de utilizar el equipo, las células se tripsinizaron y sembraron en placas de 96 pozos Seahorse 96-well XF Cell Culture Microplates (Agilent Technologies). Para cada tratamiento se sembraron un total de 6 pozos con 15,000; 10,000 ó 20,000 células (HEK 293FT, HUVEC y fibroblastos, respectivamente). Adicionalmente, a mitad del ensayo se añadieron oligomicina y FCCP a 1 mM y 500 µM, respectivamente, para ensayar el fenotipo metabólico en condiciones de estrés.

El analizador de flujo extracelular realiza ocho mediciones periódicas cada 6 minutos para un total aproximado de 48 minutos de ensayo. El **metabolismo basal** se calcula durante las primeras tres mediciones, mientras que el **metabolismo en estrés** se calcula después de la inyección de oligomicina y FCCP durante los 30 minutos restantes. El **potencial metabólico** se calcula con el cociente del metabolismo en estrés entre el metabolismo basal, y se expresa en términos de porcentaje.

*Cuantificación de proteína en placas de 96 pozos*

La cuantificación de proteína se realizó mediante el método de Lowry modificado utilizando el kit de cuantificación de proteínas Bio-Rad DC siguiendo las especificaciones del proveedor.

## **Ensayos de reducción de MTT** chechar tamaño en el original

Para ensayar el estado redox de las células en las diferentes condiciones experimentales, se realizaron ensayos de reducción de MTT con el kit *Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit* de Invitrogen. Brevemente, las células son incubadas con 60  $\mu\text{L}$  del reactivo de MTT y 600  $\mu\text{L}$  de PBS durante 3 hrs a 37 °C. Posteriormente se añaden 600  $\mu\text{L}$  de SDS-HCl y se incuban entre 4 y 18 hrs a 37 °C. Concluido el tiempo de incubación, se cuantifica la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro.

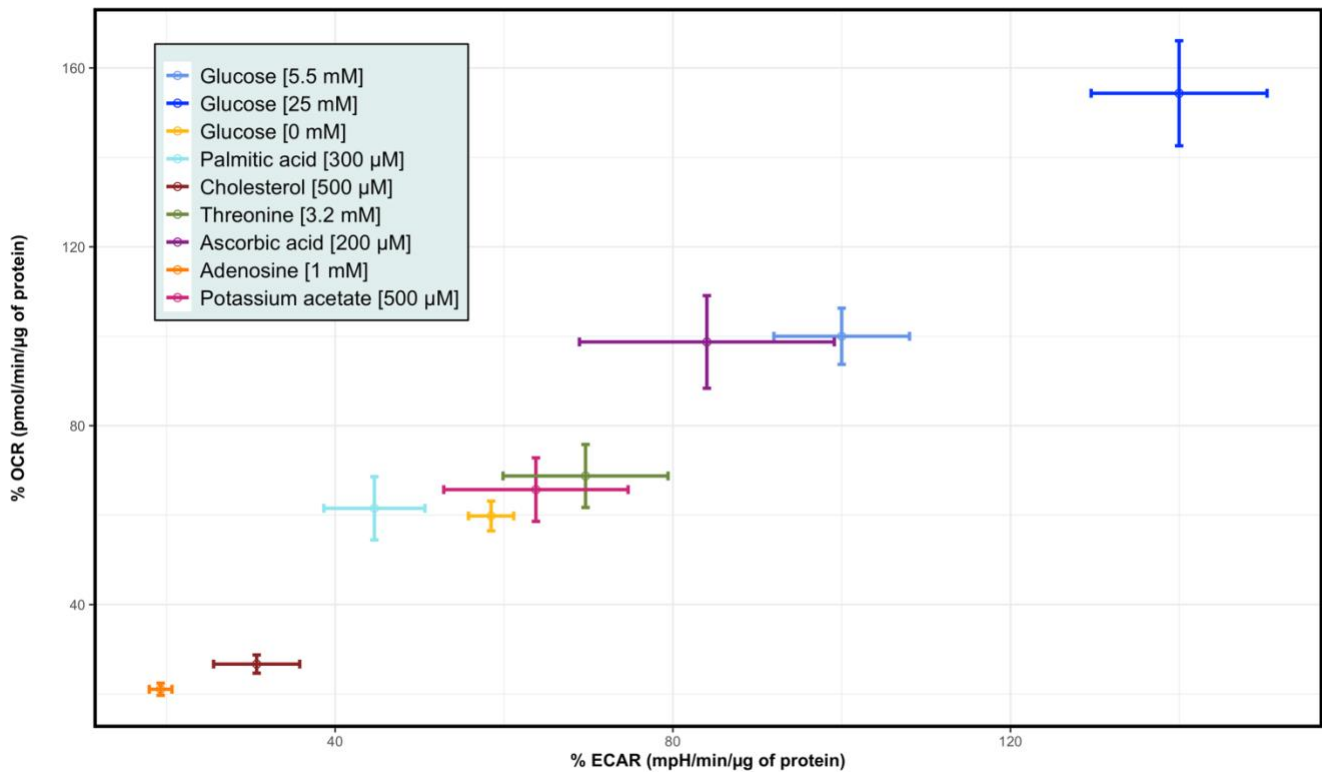
# RESULTADOS

*Distintos estímulos nutricionales modifican el fenotipo metabólico de manera persistente en células HEK 293-FT*

El primer paso de este proyecto fue determinar si distintas condiciones de cultivo que representarían un reto metabólico eran capaces de inducir cambios apreciables en el fenotipo metabólico de células en cultivo. Como condición control, formulamos un medio de cultivo cuya concentración de glucosa y oxígeno se ajustara a las concentraciones que se pueden observar en la sangre de pacientes en ayuno (glucosa [5.5 mM] y oxígeno al 8 %). A su vez, los criterios para la formulación de las condiciones experimentales fueron 1) utilizar concentraciones suprafisiológicas de cada nutriente -i.e. glucosa 25 mM, que asemeja las concentraciones de glucosa que se pueden llegar a observar en la sangre de pacientes con diabetes no controlada- y 2) que impactaran el flujo metabólico desde diferentes vías -i.e. el consumo de ácido palmítico o colesterol afectaría la  $\beta$ -oxidación, mientras que el consumo de adenosina o treonina afectaría el metabolismo de un carbono (1C).

Utilizamos el equipo *Seahorse Bioscience* para determinar la tasa de consumo de oxígeno (OCR, asociado a la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR, asociado a la producción de lactato proveniente de la glucólisis) mediante un ensayo de determinación del fenotipo metabólico (*Cell Energy Phenotype Test*). Elegimos comenzar con células HEK 293-FT pues se trata de una línea inmortalizada; de esta forma, la proliferación del cultivo durante las ventanas de exposición no sería un factor a considerar a la hora de interpretar los resultados (Figura 8, tabla 1).

De forma muy general, los cambios en la OCR y la ECAR indican que la suplementación del medio de cultivo con un único nutriente es suficiente para modificar significativamente el fenotipo metabólico de las células HEK 293-FT. Aunque en la literatura esta línea celular se describe típicamente como un cultivo glucolítico, es interesante notar que en nuestros experimentos tanto la OCR como la ECAR se modifican con todos los estímulos nutricionales, sugiriendo que el metabolismo respiratorio contribuye significativamente a la producción de energía en este tipo celular.

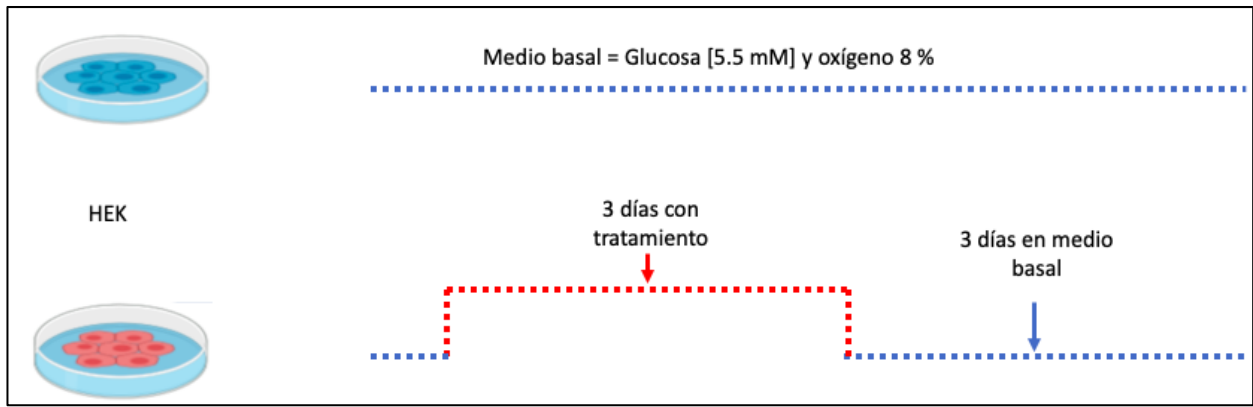


**Figura 8. Cambios metabólicos inducidos por estímulos nutricionales *in vitro*.** El fenotipo metabólico de células HEK 293-FT expuestas por 3 días a diferentes formulaciones del medio de cultivo fue cuantificado por Seahorse. Condiciones basales de referencia: DMEM+SFB con glucosa [5.5 mM] y oxígeno al 8 %. Se muestra el promedio de 6 pozos por condición. Barras de error: error estándar.

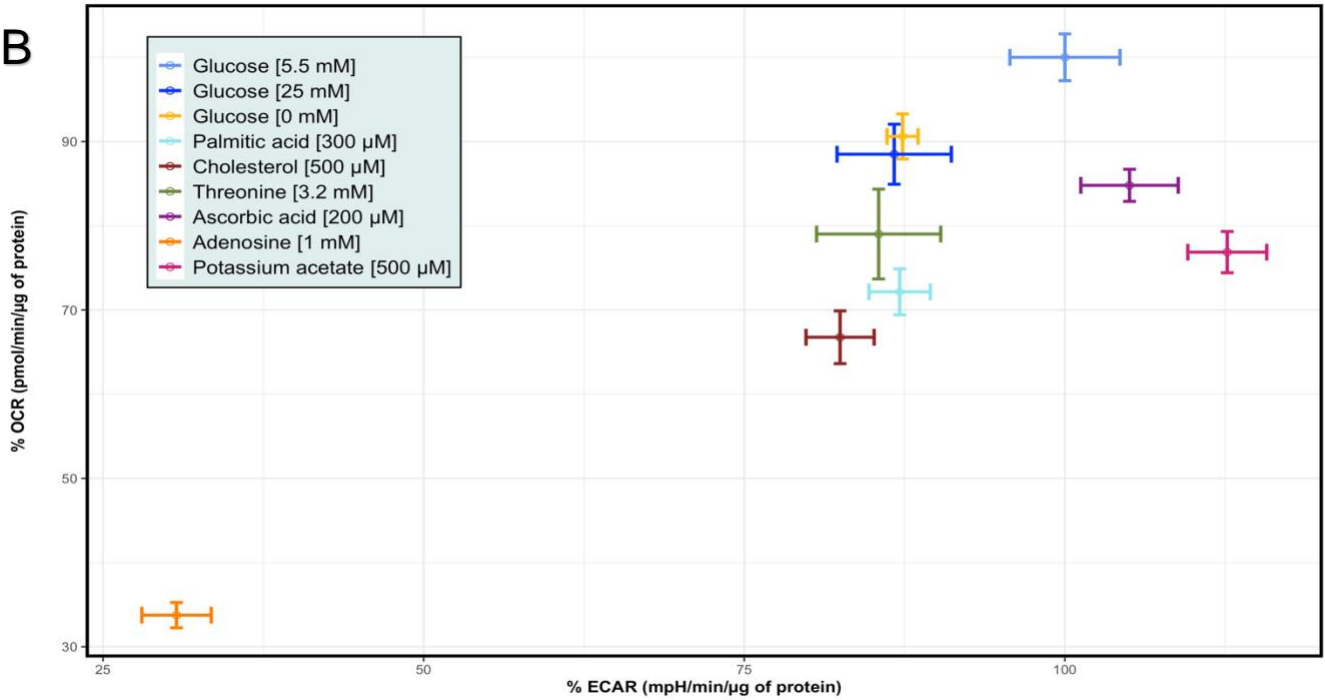
Una vez que corroboramos que nuestras condiciones inducen cambios en el fenotipo metabólico, nos preguntamos si éstos podrían mantenerse a lo largo de las divisiones celulares, aún en ausencia del estímulo inductor. Para esto, realizamos un nuevo ensayo de determinación del fenotipo metabólico, pero esta vez en células cultivadas en medio control (5.5 mM de glucosa y oxígeno al 8 %) durante 3 días posteriores a los estímulos nutricionales (Figura 9, A). Estos resultados mostraron que las diferencias en el metabolismo de las células, aunque disminuyen en su magnitud, se mantienen aún cuando removemos el estímulo nutricional. Notablemente, las diferencias en la OCR (eje vertical) son más pronunciadas que en la ECAR (eje horizontal) después de la ventana de recuperación, lo que sugiere que el metabolismo respiratorio es más sensible a las alteraciones en el flujo metabólico provocadas por nuestros tratamientos. Más importante aún, estos resultados sugieren que los distintos tratamientos *in vitro* indujeron una memoria metabólica en células HEK 293-FT.

Es importante mencionar que realizamos dos pases (diluyendo 1:3 el número de células en cada uno) antes de realizar las mediciones y que al momento de la medición las células habían llegado a un 80% de confluencia, indicando que las células atravesaron varios ciclos de división lo que argumenta en favor de que los cambios observados son verdaderamente una memoria metabólica en la progenie de las células originalmente expuestas al estímulo metabólico.

A



**B**



**Figura 9. Inducción de memoria metabólica *in vitro* por estímulos nutricionales.** A) Esquema del diseño experimental. B) El fenotipo metabólico de células HEK293-FT después de 3 días de crecimiento en diferentes formulaciones del medio de cultivo y 3 días de crecimiento en medio basal (DMEM+SFB con glucosa [5.5 mM] y oxígeno al 8 %) fue evaluado con el equipo Seahorse. Se muestra el promedio de 6 pozos por condición. Barras de error: error estándar.



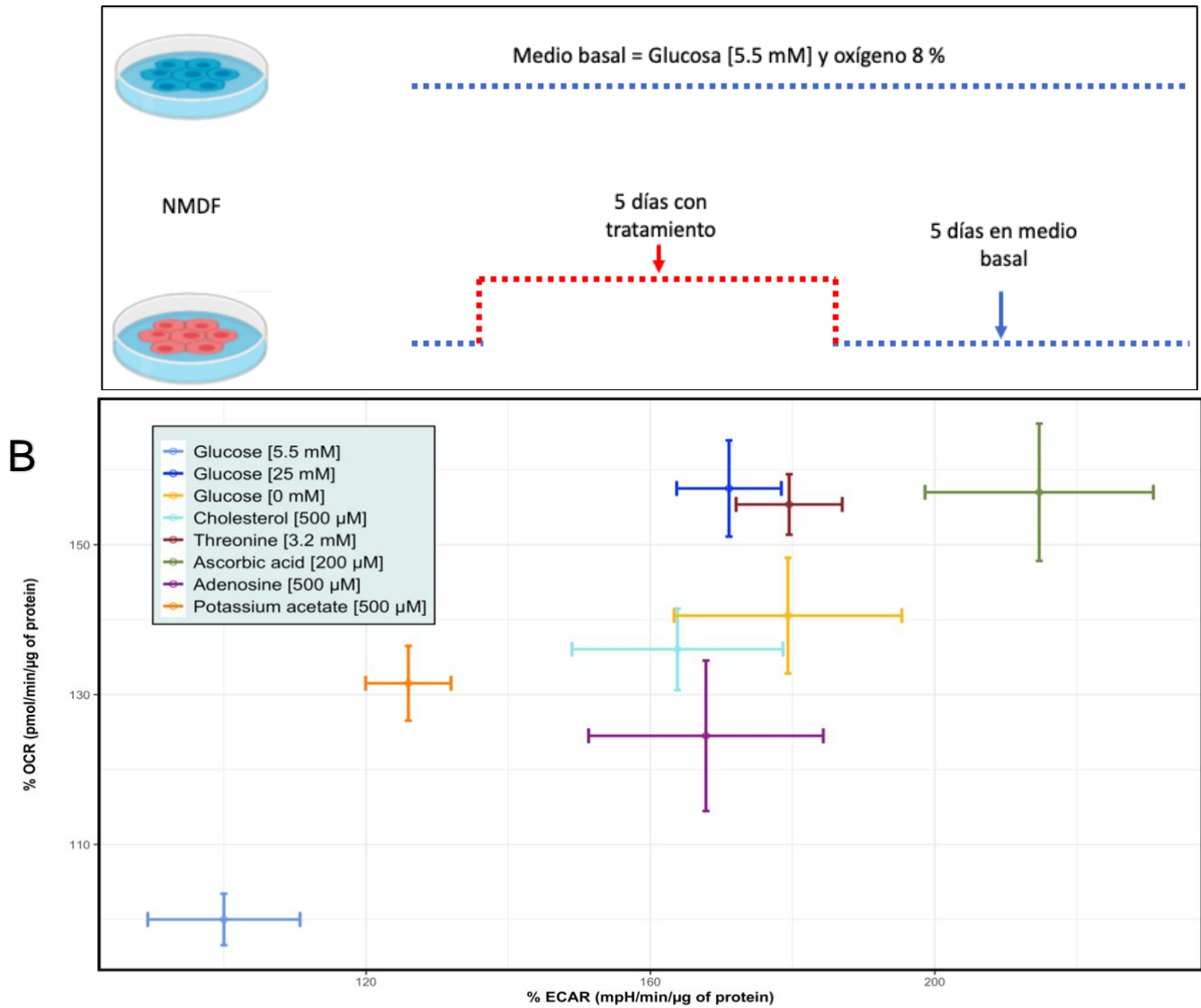
*Estímulos nutricionales suprafisiológicos resultan en el establecimiento de una memoria metabólica en fibroblastos murinos en cultivo*

Una vez que definimos que las condiciones de cultivo propuestas inducen una memoria metabólica en las células HEK 293-FT (Figura 9), procedimos a evaluar fibroblastos murinos en condiciones similares para definir si este fenómeno era exclusivo de una línea celular humana o si se extendía a cultivos primarios de otros mamíferos. Con los fibroblastos modificamos el protocolo a 5 días de tratamiento seguidos de 5 días de recuperación en medio basal dado que los fibroblastos tienen una tasa de división menor que las células HEK 293-FT. Se evaluaron fibroblastos dermales de ratones neonatos y fibroblastos provenientes de embriones de 13.5 días (MEFs) de forma paralela. A continuación, se presentan los resultados de cada uno por separado:

- Fibroblastos Derales Neonatales:

Los resultados evaluando ECAR y OCR mostraron diferencias en el fenotipo metabólico ante los distintos tratamientos con respecto al medio control. Notablemente, en todos los casos se observa una tendencia a que el metabolismo de las células se vuelva más energético, es decir que se aumenta tanto la tasa de consumo de oxígeno como la tasa de acidificación extracelular. Aunque en principio este resultado es similar a lo observado en células HEK 293-FT, es importante notar que el efecto de cada nutriente por separado es distinto entre tipos celulares; específicamente, en el caso de los fibroblastos neonatales todos los tratamientos aumentaron ambos tipos de metabolismo.

A

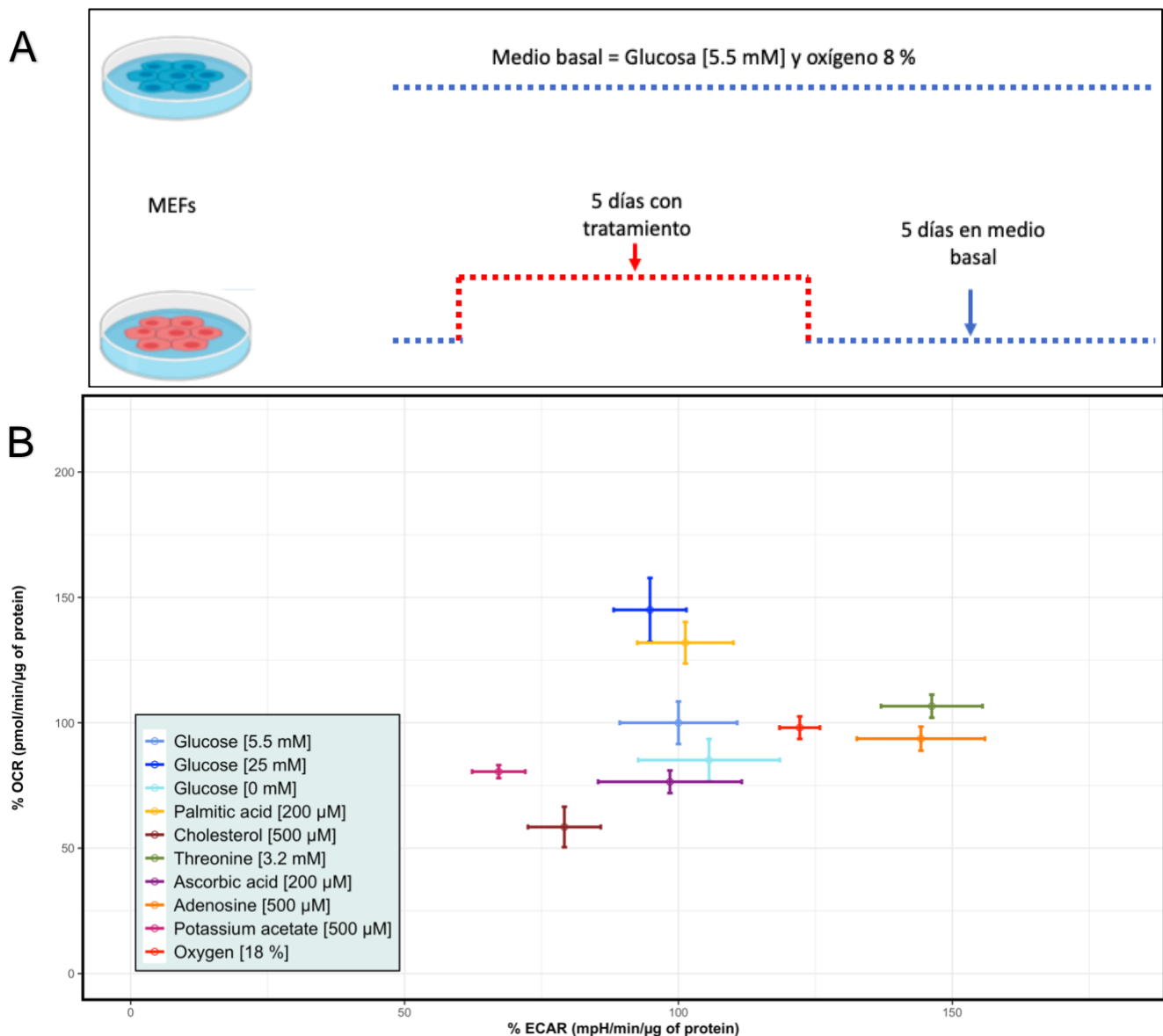


**Figura 10. Memoria metabólica en fibroblastos dermales neonatales.** A) Esquema del diseño experimental. B) El fenotipo metabólico de fibroblastos dermales de ratones neonatos fue evaluado en el equipo Seahorse después de 5 días de crecimiento en las diferentes formulaciones del medio de cultivo y 5 días de crecimiento en medio basal (DMEM+SFB con glucosa [5.5 mM] y oxígeno al 8 %). Se muestra el promedio de 6 pozos por condición normalizado contra la concentración de proteína por pozo. Para tener una mejor cuantificación de los parámetros, los datos de este experimento fueron normalizados mediante la cuantificación de proteína total en cada uno de los pozos. Barras de error: error estándar.

- Fibroblastos Embrionarios de Ratón (MEFs)

Extrajimos fibroblastos embrionarios de ratón a partir de embriones de 13.5 días de edad y se repitió el protocolo de 5 días de crecimiento bajo los diferentes estímulos nutricionales y 5 días de crecimiento en medio basal, acoplado al ensayo de determinación de fenotipo metabólico del equipo Seahorse (Figura 11). En este experimento añadimos una condición experimental extra (5 días con oxígeno al 20 %) basándonos en trabajo de Spyrou y colaboradores (2019) en el que reportan que exponer a las células a diferentes concentraciones de oxígeno afectaba significativamente el proceso de reprogramación. Aunque en principio se trata de fibroblastos, nuevamente observamos que el efecto de cada nutriente es diferente entre tipos celulares. En el caso de los MEFs, algunos tratamientos afectaron únicamente el metabolismo respiratorio -i.e. glucosa y ácido palmítico-, mientras que algunos modificaron

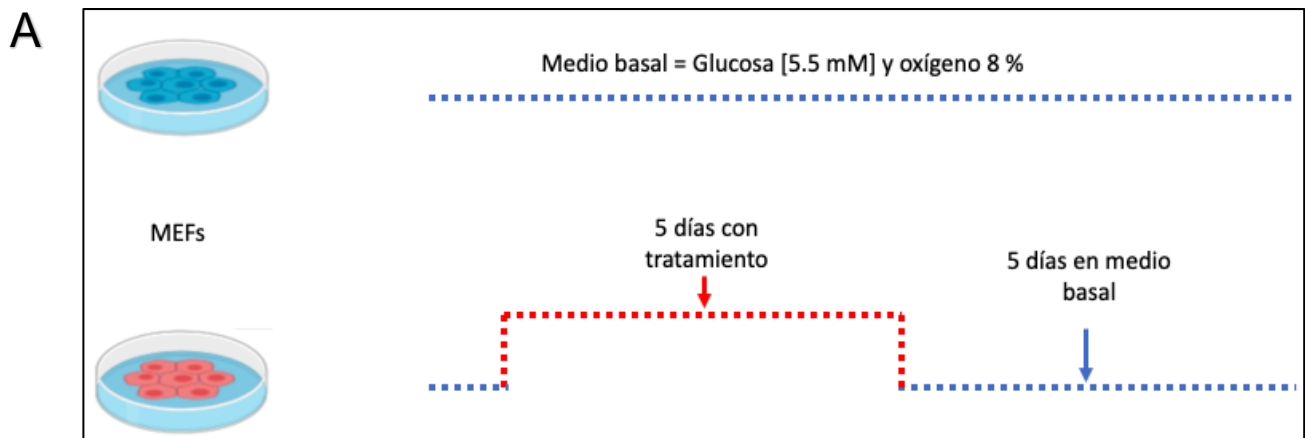
solamente el metabolismo glucolítico -treonina y adenosina-, lo que argumenta en favor de que estamos afectando el flujo metabólico desde diferentes vías con nuestros tratamientos.

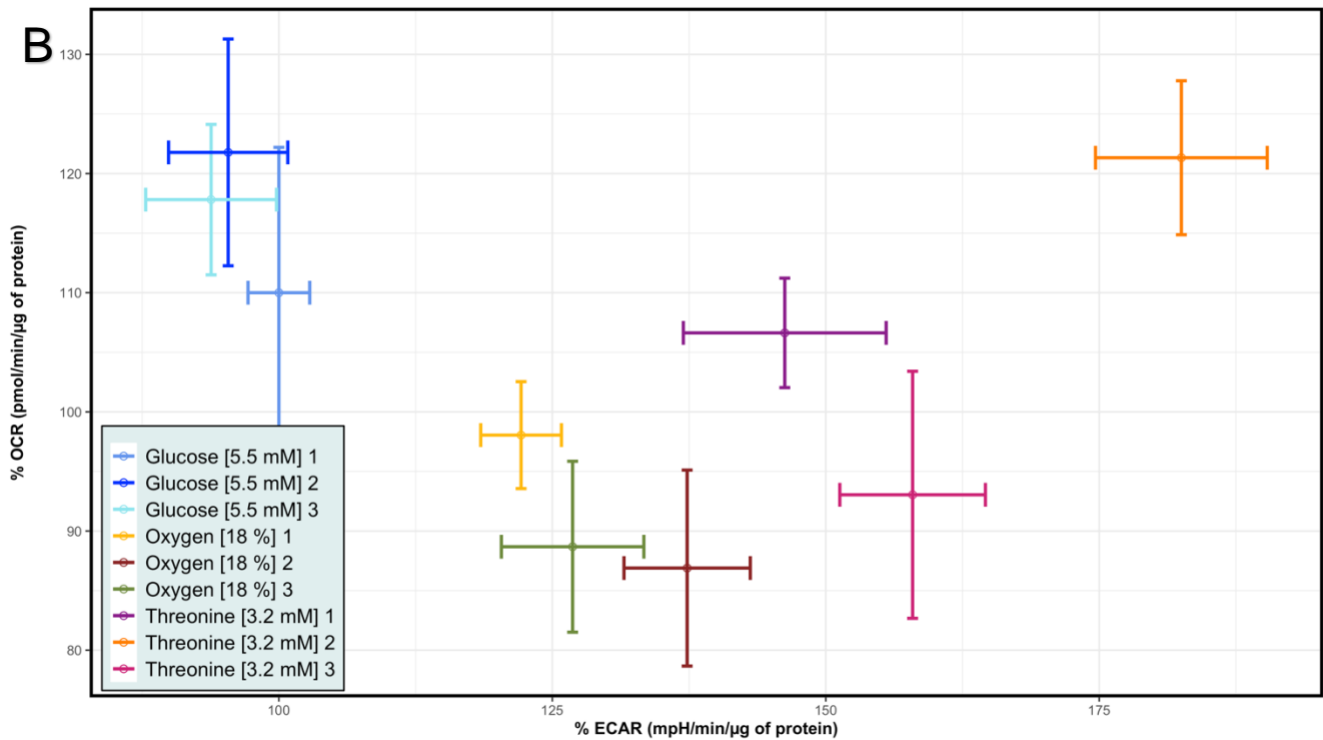


**Figura 11. Memoria metabólica en fibroblastos embrionarios de ratón.** A) Esquema del diseño experimental. B) El fenotipo metabólico fue evaluado en el equipo Seahorse después de 5 días de crecimiento en diferentes formulaciones del medio de cultivo y 5 días de crecimiento en medio basal (DMEM+SFB con glucosa [5.5 mM] y oxígeno al 8 %). Se muestra el promedio de 6 pozos por condición normalizado por cantidad de proteína por pozo. Barras de error: error estándar.

Por otro lado, diseñamos un experimento que sirviera como control técnico de los resultados obtenidos en el equipo Seahorse. El experimento consistió en elegir tres condiciones suficientemente distintas entre sí y realizar 3 réplicas biológicas de cada uno para analizarlas con el equipo en la misma corrida. Los tratamientos elegidos fueron: baja glucosa (control), treonina [3.2 mM] -que en principio afectaría el metabolismo 1C- y oxígeno al 20 % -el cual afectaría el flujo de la cadena transportadora de electrones. Como se esperaba, las réplicas biológicas de cada uno de los tratamientos se agruparon entre sí y resultaron ser claramente distintas entre tratamientos (Figura 12). Aunque en ambos casos se afectaron ambos tipos de metabolismo, resulta interesante notar que el tratamiento de oxígeno se desplaza

principalmente en el eje de la OCR, mientras que el tratamiento con treonina provoca un desplazamiento muy pronunciado en el eje del metabolismo glucolítico.



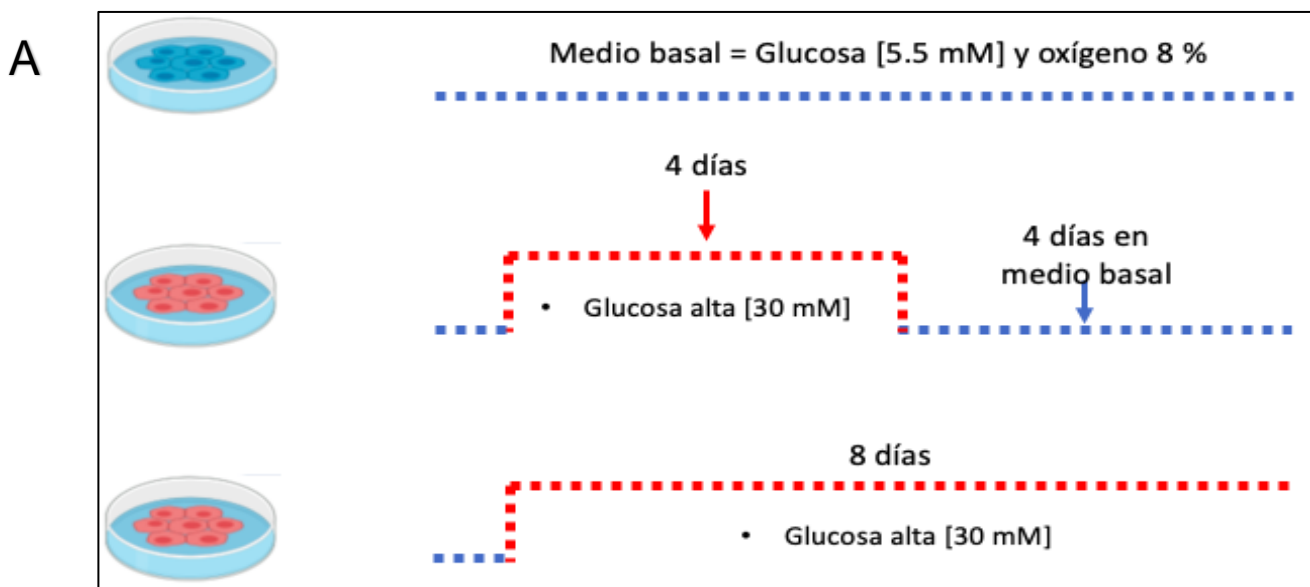


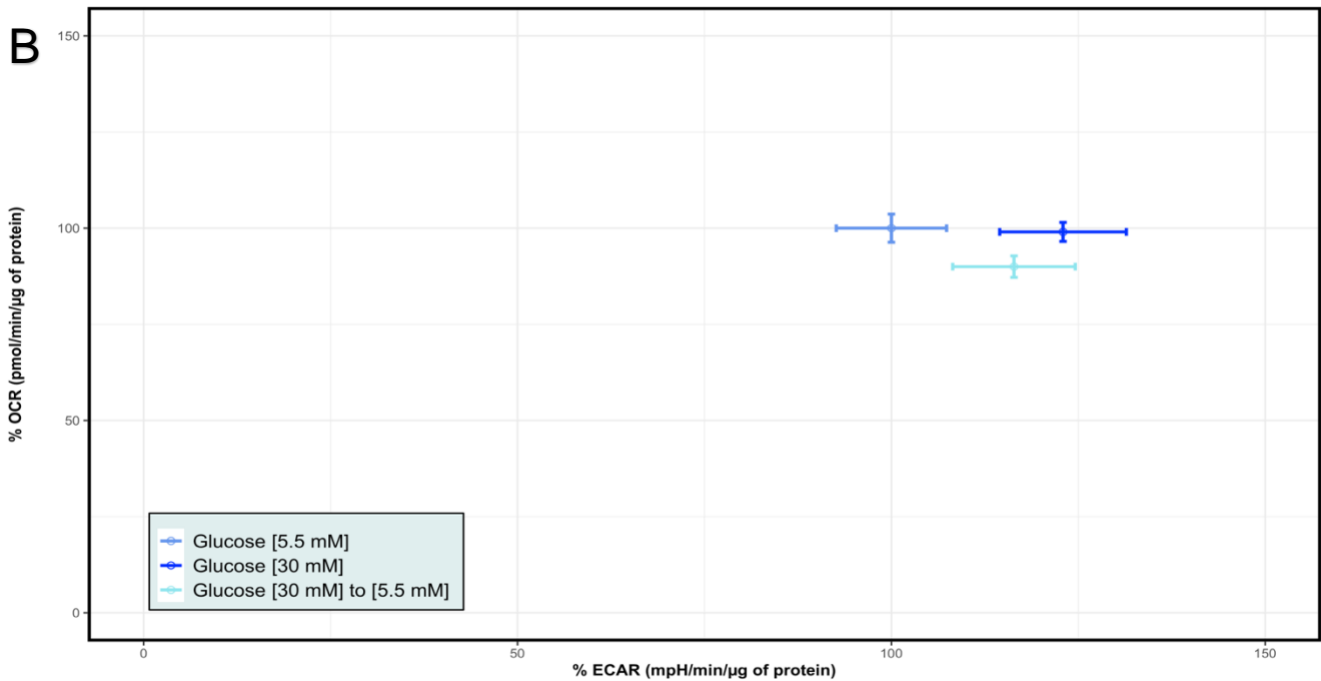
**Figura 12. Memoria metabólica entre réplicas biológicas.** El fenotipo metabólico de fibroblastos embrionarios de ratón fue evaluado en el equipo Seahorse después de 5 días de crecimiento en tres diferentes formulaciones del medio de cultivo y 5 días de crecimiento en medio basal (DMEM+SFB con glucosa [5.5 mM] y oxígeno al 8 %). Se muestra el promedio de 6 pozos por condición normalizado a la cantidad de proteína por pozo. Barras de error: error estándar.

## Células endoteliales humanas también desarrollan una memoria metabólica por pulsos suprafisiológicos de glucosa

Para descartar la posibilidad de que nuestros tratamientos resultaran en una selección de sub-poblaciones en el cultivo de fibroblastos -pues los fibroblastos son un cultivo considerablemente heterogéneo-, realizamos ensayos de inducción de memoria en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), un modelo que ya utilizamos en nuestro laboratorio para estudiar memoria metabólica inducida por hiperglucemia. Por otro lado, las células endoteliales son particularmente sensibles a las concentraciones de nutrientes en el medio al estar en contacto directo con el torrente sanguíneo. Además, al ser células donde la entrada de glucosa no depende de insulina, son particularmente sensibles a altas concentraciones de glucosa en el medio; como resultado, personas con diabetes no controlada desarrollan diversas patologías vasculares asociadas a un estado de hiperglucemia sostenida, lo que vuelve a estas células un modelo muy relevante para estudiar el establecimiento de una memoria metabólica.

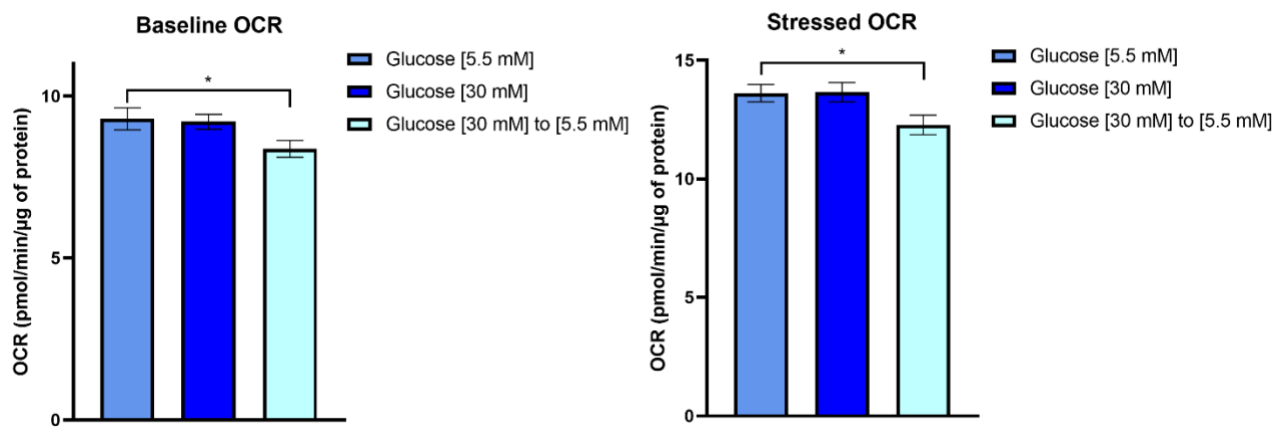
En el caso de las HUVEC, las condiciones experimentales fueron las siguientes: glucosa [5.5] mM por 8 días, glucosa [30 mM] por 8 días, y un tratamiento de “memoria” consistente en glucosa alta por 4 días seguidos de 4 días en baja glucosa (Figura 13, A). Los ensayos fueron realizados por triplicados biológicos, con 6 réplicas técnicas en cada caso. Como se esperaba, el fenotipo metabólico obtenido con estos ensayos demostró que el tratamiento de memoria se agrupa con el tratamiento de alta glucosa (Figura 13, B) lo que corrobora que en las células endoteliales humanas una exposición transitoria a altas concentraciones de glucosa puede inducir cambios metabólicos persistentes. Un hecho interesante es que, en apariencia, los tratamientos de alta glucosa afectaron únicamente el metabolismo glucolítico, lo que sugiere que en un tipo celular con un metabolismo principalmente glucolítico como las HUVEC, el metabolismo respiratorio es menos sensible a la suplementación del medio de cultivo con glucosa a altas concentraciones.





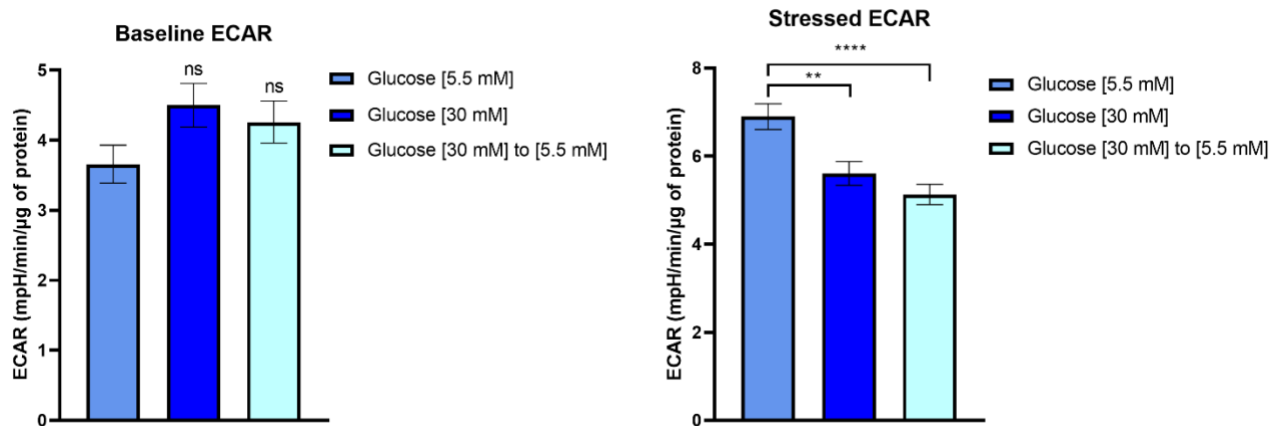
**Figura 13. Memoria metabólica en células HUVEC.** A) Esquema del diseño experimental. B) El fenotipo metabólico fue evaluado en el equipo Seahorse después de 8 días de crecimiento en baja glucosa [5.5 mM], alta glucosa [30mM] y el tratamiento de memoria (de 30 mM a 5.5 mM). El color de cada uno de las muestras se indica debajo de la gráfica. Se muestra el promedio de 3 réplicas biológicas con 6 réplicas técnicas, cada una normalizado a la cantidad de proteína por pozo. Barras de error: error estándar.

Para profundizar el análisis de las diferencias entre los 3 tratamientos, graficamos la OCR (respiración) y la ECAR (glucólisis) por separado; además trabajamos con los datos obtenidos después de administrar una mezcla de oligomicina y FCCP a las células (fenotipo metabólico en estrés). En el caso del consumo de oxígeno **basal**, no observamos diferencias significativas entre los tratamientos de baja y alta glucosa, aunque existe una diferencia aparente con el tratamiento de memoria (Figura 14, izquierda). Por su parte, el consumo de oxígeno **en estrés** muestra el mismo comportamiento, sugiriendo que nuestros tratamientos no afectaron la capacidad de las células de modular su metabolismo oxidativo (Figura 14, derecha). Aunque existe una diferencia con significancia estadística en el tratamiento de memoria al compararlo con el control, el índice del potencial metabólico nos sugiere que esa diferencia no tiene relevancia biológica (Figura 16).



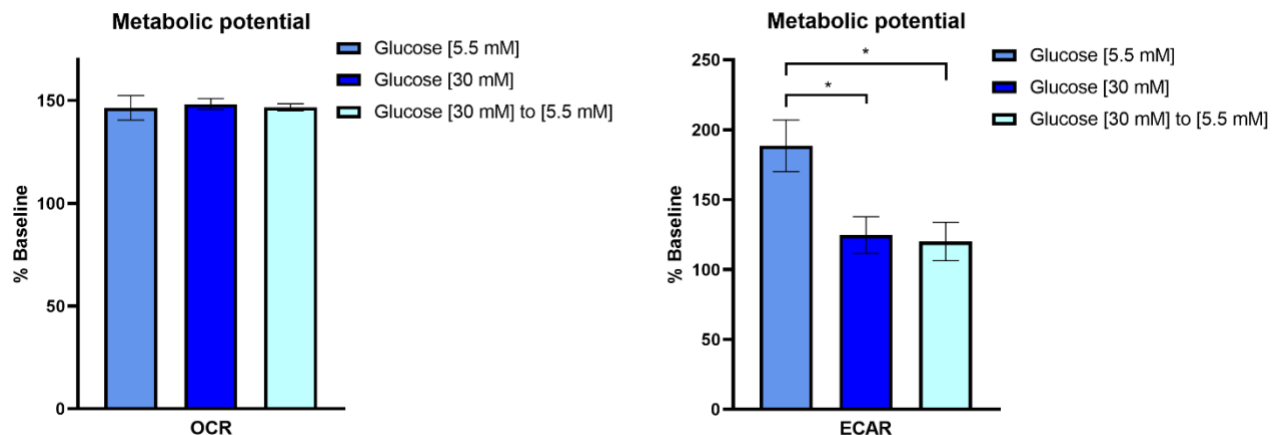
**Figura 14. Tasa de consumo de oxígeno basal y en estrés de HUVEC.** El consumo de oxígeno en condiciones basales y de estrés fue cuantificado con el equipo Seahorse y normalizado a la cantidad de proteína por pozo. N=3; barras de error: error estándar.

Al analizar la tasa de acidificación extracelular observamos que, en contraposición a lo observado con el consumo de oxígeno, existen diferencias en el metabolismo glucolítico **basal** (aunque no son estadísticamente significativas) entre los tratamientos de baja y alta glucosa, misma que se observa en el tratamiento de memoria (Figura 15, izquierda). Como se esperaba, esta diferencia adquirió significancia estadística en el caso de la ECAR **en estrés**, en donde se observó que los tratamientos de memoria y de alta glucosa fueron incapaces de responder a la acción de la oligomicina y el FCCP (Figura 15).



**Figura 15. Metabolismo glucolítico medido a través de la tasa de acidificación extracelular basal y en estrés en HUVEC.** El pH extracelular en condiciones basales y de estrés fue cuantificado con el equipo Seahorse y normalizado a la cantidad de proteína por pozo. N=3; barras de error: error estándar.

Para corregir la diferencia de escala que existe entre las gráficas de metabolismo basal y metabolismo estresado, se calculó el índice de **potencial metabólico**, el cual expresa el porcentaje de aumento en el metabolismo estresado con respecto al metabolismo basal (Figura 16).



**Figura 16. Potencial metabólico en la tasa de consumo de oxígeno y la tasa de acidificación extracelular.** Se calculó el índice de potencial metabólico para la OCR y la ECAR por separado. N=3; barras de error: error estándar.

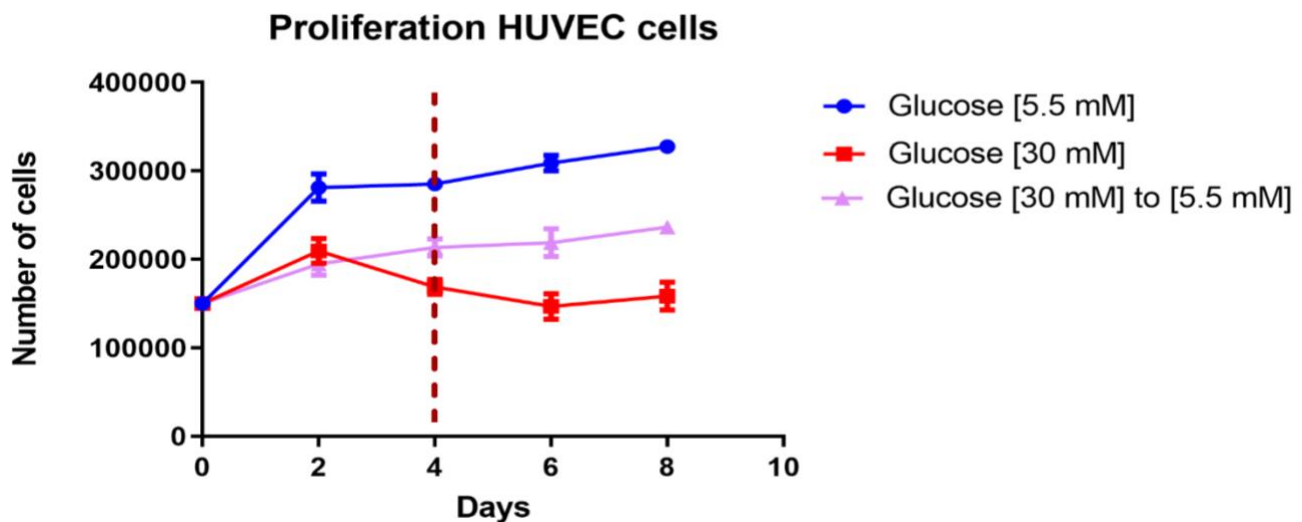
Con el cálculo de este índice concluimos que el tratamiento de alta glucosa de manera transitoria no provocó una alteración en el metabolismo oxidativo de las células endoteliales, pero sí provocaron un fenotipo de memoria metabólica en la capacidad glucolítica. Estos resultados indican que cultivar a las



HUVEC en un ambiente hiperglucémico provoca alteraciones **persistentes** en el metabolismo glucolítico, las cuales no son del todo evidentes hasta que se somete a las células a un reto como lo es la adición de fármacos que afectan el metabolismo respiratorio (FCCP y la oligomicina).

*La exposición a altas concentraciones de glucosa de manera transitoria afecta la proliferación de las HUVEC*

Para complementar el argumento del establecimiento de una memoria metabólica y descartar que nuestro fenotipo se trate únicamente de un proceso de adaptación de las mismas células a las condiciones de cultivo, realizamos ensayos de proliferación en células HUVEC para comprobar que se estuvieran dividiendo durante los tratamientos. Como se esperaba, el número de células incrementó durante el experimento en las condiciones de baja glucosa y de memoria; sin embargo, en el caso del tratamiento de alta glucosa se observó una disminución en el número de células al final del experimento (Figura 17).



**Figura 17. Ensayo de proliferación en HUVEC.** Se sembraron 150,000 células en placas de 6 pozos por triplicado. Cada dos días se tripsinizaron, se contaron con ayuda de un hemocitómetro y en cada ocasión se resembró el total de células en una placa nueva. La línea punteada indica el cambio a medio basal en la condición de memoria. N=3; barras de error desviación estándar. ¿Por qué usó en unos casos error y en otros desviación? El cambio de medio fue el día 4. Pero no queda claro si la medición se hizo antes o después del cambio.

Este resultado sugiere que, al menos en la condición de memoria, el fenotipo metabólico que observamos en el equipo Seahorse no es resultado únicamente de un proceso de adaptación, sino que probablemente las células están heredando información relativa al ambiente nutricional a través de las divisiones celulares. Debido a que las HUVEC son un cultivo primario muy delicado y con una tasa de replicación considerablemente baja, valdría la pena repetir estos experimentos reduciendo el número de ciclos de conteo (tripsinización, centrifugación, resiembra) a la mitad -es decir, contar cada cuatro días- para disminuir el estrés en todas las condiciones.

*Altas concentraciones de glucosa y ácido palmítico, por separado y en conjunto, inducen una memoria metabólica MEFs*

Después de reproducir el fenómeno de memoria metabólica en tres tipos celulares muy distintos (línea celular humana, fibroblastos murinos, y células endoteliales humanas), decidimos continuar caracterizando este fenómeno en fibroblastos (véase *Discusión*). Una vez seleccionadas las condiciones en las que pretendemos seguir caracterizando el fenómeno de memoria metabólica, decidimos proponer una tercera condición en la que combináramos dos nutrientes (glucosa y ácido palmítico), condiendo que en

contextos patológicos en humanos, rara vez la hiperglucemia o la hiperlipidemia se presentan por separado.

Para determinar las concentraciones a utilizar y evitar el uso de concentraciones citotóxicas que enmascaren su efecto en el flujo metabólico, realizamos ensayos de proliferación a diferentes concentraciones de glucosa y ácido palmítico por separado y en conjunto (Figura 18). En este ensayo decidimos explorar tres estrategias diferentes: en una primera prueba se mantuvo una concentración elevada de ácido palmítico [200  $\mu\text{M}$ ] y la concentración de glucosa se incrementó gradualmente; en otra condición la glucosa se encontró siempre en una concentración de 25 mM y el ácido palmítico incrementó gradualmente; la tercera prueba consistió en aumentar la concentración de ambos nutrientes de manera paralela. La relación de concentraciones utilizadas se encuentra en la tabla 2.

Es importante recalcar que cada vez que las células se tripsinizaron y se contaron, se resembró el total en una placa nueva. Debido a que algunos de los tratamientos alcanzaron el 100% de confluencia durante los primeros días de tratamiento, es posible que la estimación de la proliferación no sea la más adecuada. Es por ello que en experimentos posteriores decidimos resembrar únicamente el 50% del total de células entre cada conteo.

**Tabla 2. Concentraciones de glucosa y ácido palmítico utilizadas para realizar los ensayos de proliferación en MEFs.**

|          | Palmitic acid constant |                   |                   |                   |                   |
|----------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Glucose  | 5.5 mM                 | 5.5 mM            | 10 mM             | 15 mM             | 20 mM             |
| Pal. Ac. | 0 $\mu\text{M}$        | 200 $\mu\text{M}$ | 200 $\mu\text{M}$ | 200 $\mu\text{M}$ | 200 $\mu\text{M}$ |

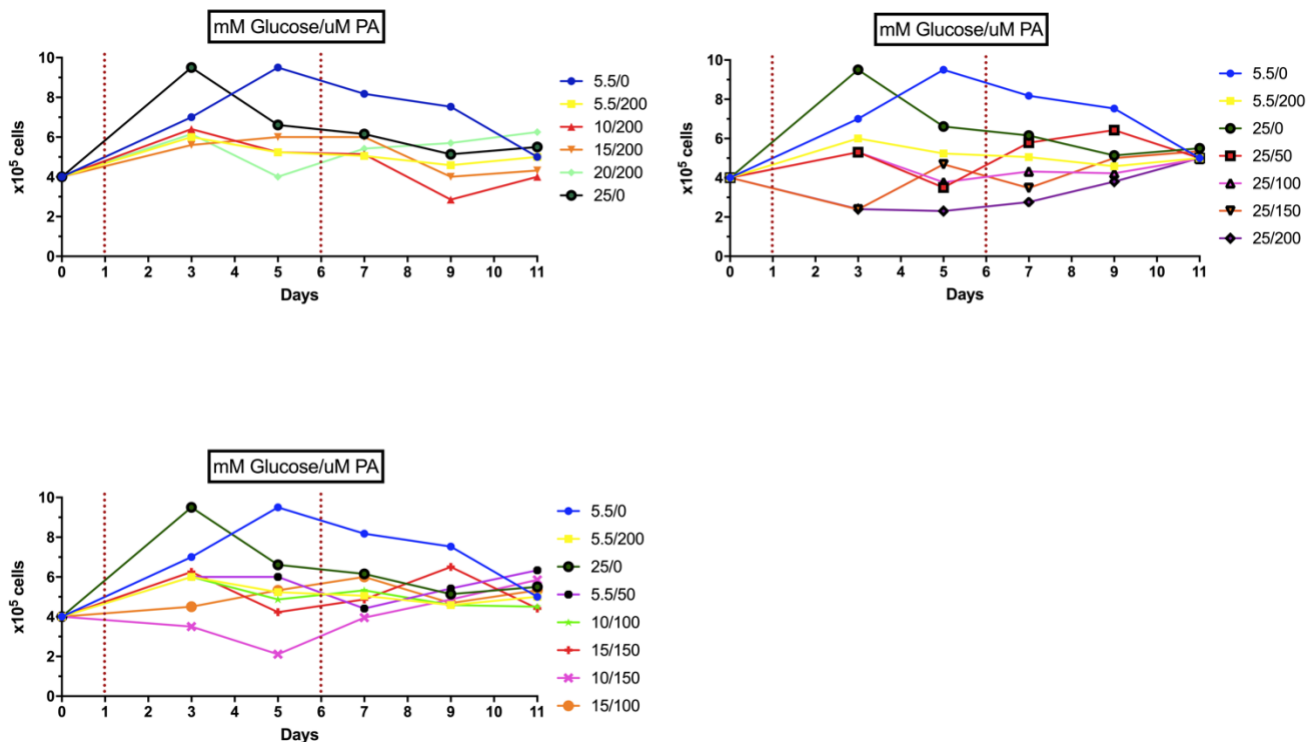
  

|          | Glucose constant |                  |                   |                   |                   |
|----------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Glucose  | 25 mM            | 25 mM            | 25 mM             | 25 mM             | 25 mM             |
| Pal. Ac. | 0 $\mu\text{M}$  | 50 $\mu\text{M}$ | 100 $\mu\text{M}$ | 150 $\mu\text{M}$ | 200 $\mu\text{M}$ |

|          | Both increasing  |                   |                   |                   |                   |
|----------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Glucose  | 5.5 mM           | 10 mM             | 15 mM             | 10 mM             | 15 mM             |
| Pal. Ac. | 50 $\mu\text{M}$ | 100 $\mu\text{M}$ | 150 $\mu\text{M}$ | 150 $\mu\text{M}$ | 100 $\mu\text{M}$ |

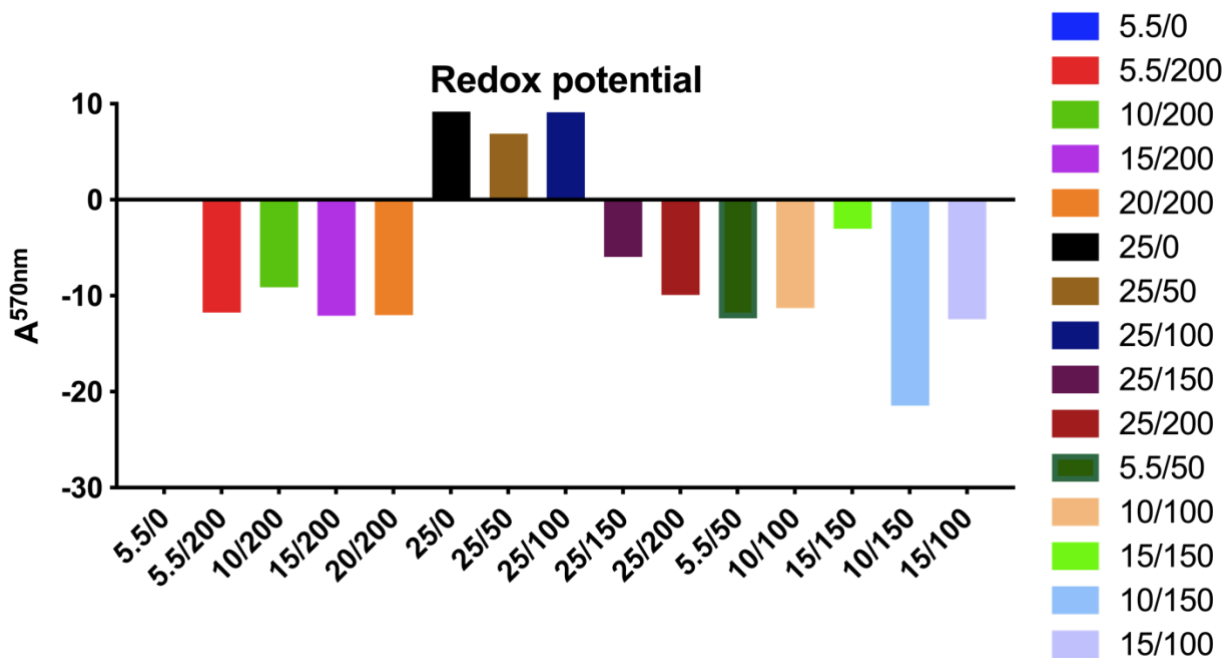
Como se observa en la figura 18 (paneles superiores e inferior izquierdo), cada condición experimental presentó una dinámica de proliferación bastante distinta de las demás durante los 5 días del tratamiento. En primera instancia, resultó evidente que en todas las condiciones en las que se incrementó la concentración de cualquiera de los dos nutrientes, la dinámica de proliferación se vio afectada en comparación con la condición control. Sin embargo, es importante señalar que al final del experimento se tenía un número similar de células en cada condición, sugiriendo que ninguna de nuestras condiciones resultaba en un efecto citotóxico exacerbado para los fibroblastos, y que en principio podríamos utilizar las condiciones más drásticas (25 mM de glucosa y 200  $\mu\text{M}$  de ácido palmítico). Creo que sea importante considerar que si bien terminan a los 11 días con valores celulares similares, lo que muestran las gráficas son periodos de proliferación y de muerte celular que no pueden ignorarse. Las dinámicas parecen ser muy diferentes y pueden representar también procesos de selección clonal en las distintas condiciones.



**Figura 18. Ensayos de proliferación a diferentes concentraciones de ácido palmítico y glucosa.** Se sembraron fibroblastos embrionarios de ratón en placas de 6 pozos. Las células pasaron 5 días en las concentraciones de ácido palmítico y glucosa indicadas seguidos de 5 días en medio basal. Cada dos días se tripsinizaron, se contaron con ayuda de un hemocitómetro y en cada ocasión se resembró el total de células en una placa nueva. Las líneas punteadas indican la ventana de tiempo en que se suplementó el medio de cultivo.

Uno de los mecanismos propuestos para el desarrollo de la memoria metabólica en pacientes con diabetes tipo 2 que han estado bajo tratamiento es el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno por la mitocondria de manera sostenida (Kowluru, 2017). Con esto en mente realizamos un ensayo de MTT para verificar si existían diferencias a nivel de estrés oxidante después de los pulsos de glucosa y ácido palmítico por separado y en conjunto.

Al evaluar la capacidad oxidante de los cultivos sí se encontraron diferencias: comparados con el control (normalizado a cero), las condiciones en las que el ácido palmítico se encontraba en altas concentraciones mostraron una disminución en el potencial redox, aún cuando se iba incrementando la concentración de glucosa; por el contrario, las condiciones en las que la glucosa se encontraba en la concentración más alta, la capacidad oxidante de las células era mayor que en control; de forma interesante, al incrementar la concentración de ambos nutrientes al mismo tiempo puede observarse que el efecto de ambos se neutraliza gradualmente, lo que es especialmente evidente en la condición Glu [15 mM] + AP [150  $\mu$ M] (Figura 19).

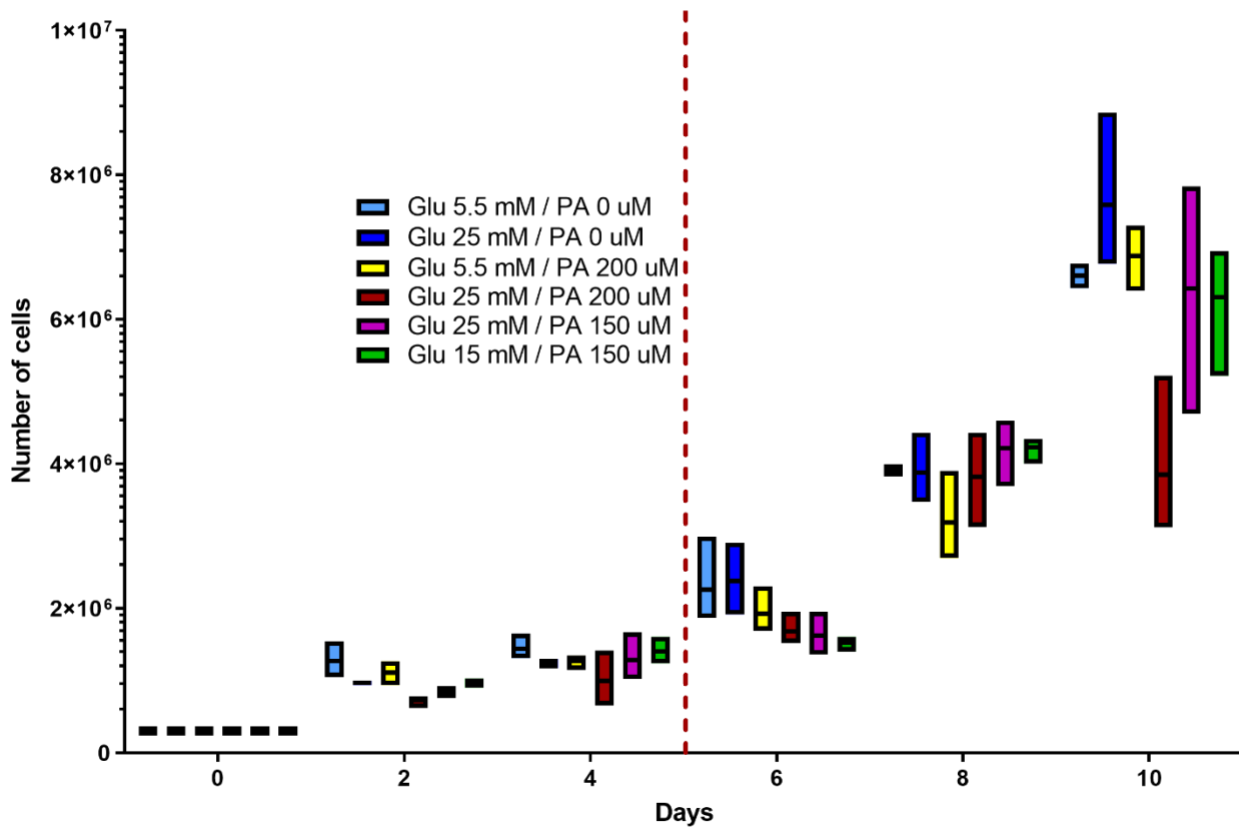


**Figura 19. Determinación del potencial redox por reducción de MTT.** Las células provenientes del experimento de proliferación fueron lisadas y tratadas con reactivo de formazan para evaluar el potencial redox. El primer número en las leyendas se refiere a la concentración de glucosa en el orden de milimolar (mM); el segundo número, a la concentración de ácido palmítico en el orden de micromolar (μM).

Estas observaciones indican que la exposición transitoria a una concentración alta de glucosa provoca un incremento en el potencial redox de la célula aún después de cinco días de crecimiento en medio basal; por el contrario, el efecto del ácido palmítico parece ser el de disminuir el potencial redox con respecto al control. Notablemente, en algunas de las condiciones en donde se aumentó la concentración de ambos nutrientes de forma paralela, puede observarse que ambos efectos se neutralizan, lo cual es congruente con reportes en donde se observa que la suplementación con ácido palmítico en presencia de glucosa inhibe la oxidación de otros ácidos grasos e incrementa el índice  $NAD^+/NADH$ .

Con base en estos resultados, realizamos un segundo experimento de proliferación para corroborar que las células se estuvieran dividiendo consistentemente durante nuestros tratamientos. En esta ocasión ensayamos sólo seis condiciones: glucosa [5.5 mM], glucosa [25 mM], ácido palmítico [200 μM], y 3 condiciones mezclando ambos nutrientes a distintas concentraciones. A diferencia del experimento anterior, en cada conteo sembramos únicamente el 50% del total de las células para evitar que el estrés de alcanzar el 100% de confluencia afectara los resultados. Esta estrategia nos permitió observar que no solo cada condición sigue una dinámica de proliferación distinta antes y después del estímulo nutricional, sino que el número de células no es el mismo entre condiciones al final del experimento (Figura 20). En el caso de la condición donde tanto glucosa como ácido palmítico están a la máxima concentración (Glu [25 mM] + AP [200 μM]), el número de células dejó de incrementar a partir del día 8, sugiriendo que este tratamiento agota el potencial replicativo de las células días después de removidos los nutrientes. Sin embargo, en las condiciones Glu [25 mM] + AP[150 μM] y Glu[15 mM] + AP [150 μM] las células continuaron dividiéndose hasta el final del experimento, lo que sugiere que podemos utilizar cualquiera de estas dos condiciones para analizarlas en el equipo Seahorse.

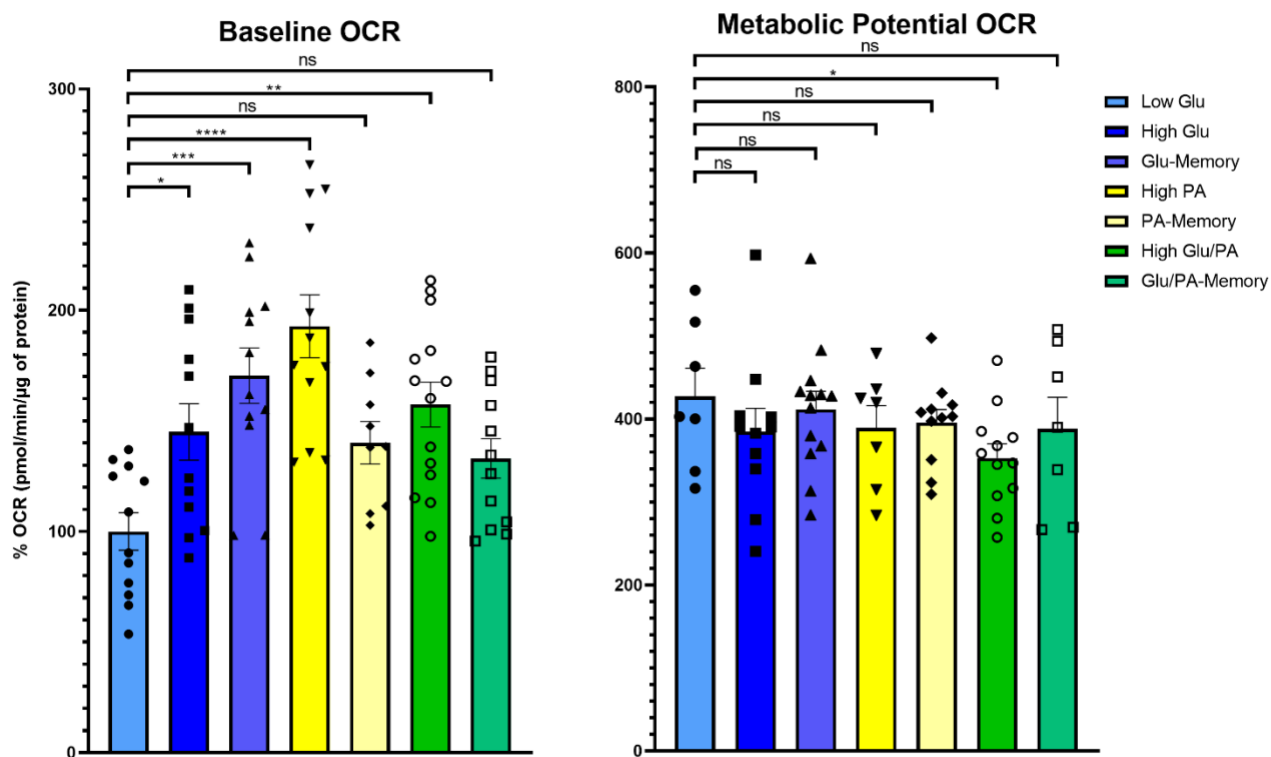
## Proliferation MEFs



**Figura 20. Proliferación en fibroblastos embrionarios de ratón a diferentes concentraciones de ácido palmítico y glucosa.** Se sembraron fibroblastos embrionarios de ratón en placas de 6 pozos. Las células pasaron 5 días en las concentraciones de ácido palmítico y glucosa indicadas, seguidos de 5 días en medio basal. Cada dos días se tripsinizaron, se contaron con ayuda de un hemocitómetro y en cada ocasión se resembró el 50% del total de células en una placa nueva. La línea punteada indica la ventana de tiempo en que se suplementó el medio de cultivo. Las cajas representan la media y la desviación estándar en cada caso. N=3.

Con los ensayos de proliferación en fibroblastos embrionarios con diferentes concentraciones de ácido palmítico y glucosa, determinamos las concentraciones en las que sería más conveniente seguir caracterizando el fenotipo de memoria metabólica. Para esto, realizamos ensayos de determinación del fenotipo metabólico en MEFs en siete condiciones finales: glucosa [5.5 mM], glucosa [25 mM], ácido palmítico [200  $\mu$ M] y glucosa + ácido palmítico ([15 mM] + [150  $\mu$ M]) por diez días, con sus respectivos tratamientos de memoria. Estos experimentos se realizaron por duplicados biológicos con al menos seis réplicas técnicas cada uno. Las células fueron tripsinizadas cada dos días, y en cada ocasión resembramos el 50% del total en un pozo nuevo para asegurarnos de que las células se dividieran durante todo el tratamiento. Un día antes del ensayo en el equipo Seahorse, sembramos 20,000 células por pozo en una placa para el equipo.

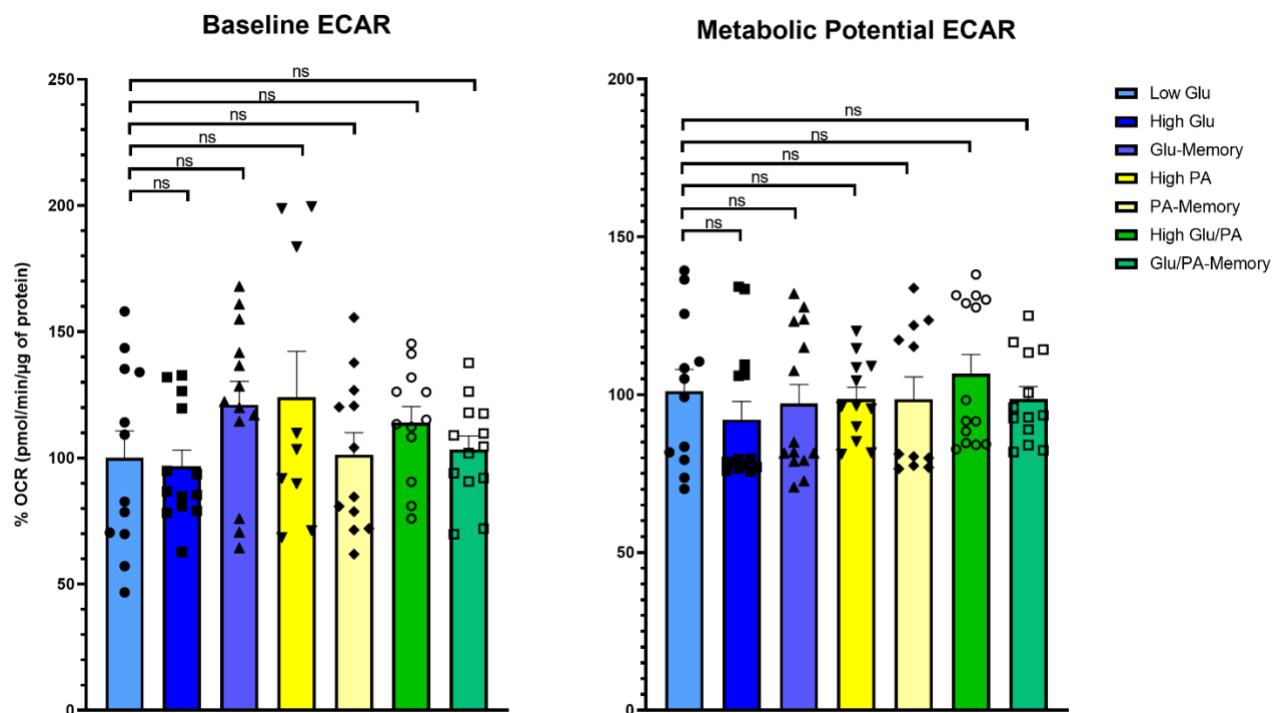
A diferencia de lo que ocurría con las HUVEC, el consumo de oxígeno **basal** sí se mostró afectado de forma significativa en casi todas las condiciones en los cultivos de fibroblastos al compararlas con la condición de glucosa [5.5 mM], excepto en el caso del tratamiento de memoria con ácido palmítico y el tratamiento de Glu-AP (Figura 21, izquierda). Sin embargo, al someter a las células a la incubación con oligomicina y FCCP y calcular el **potencial metabólico**, no se observan diferencias significativas entre todas las condiciones (Figura 21, derecha).



**Figura 21. Consumo de oxígeno basal y potencial metabólico en fibroblastos embrionarios de ratón.** El consumo de oxígeno en condiciones basales y de estrés fue cuantificado con el equipo *Seahorse* y normalizado a la cantidad de proteína por pozo. Se calculó el índice de potencial metabólico para la OCR. N=3; barras de error: error estándar.

Estos resultados nos sugieren que aunque nuestros tratamientos sí están afectando el flujo metabólico de las células (OCR basal), no estamos comprometiendo la integridad de las mitocondrias y por ende las células son capaces de responder a la condición de estrés del ensayo.

Por otro lado, el metabolismo glucolítico no parece estar afectado de forma significativa en ninguno de los tratamientos, ya sea en condiciones basales o de estrés (Figura 22).



**Figura 22. Tasa de acidificación extracelular basal y potencial metabólico en fibroblastos embrionarios de ratón.** El consumo de oxígeno en condiciones basales y de estrés fue cuantificado con el equipo *Seahorse* y normalizado a la cantidad de proteína por pozo. Se calculó el índice de potencial metabólico para la OCR. N=3; barras de error: error estándar.

# Discusión

En este trabajo desarrollamos un protocolo de estimulación nutricional *in vitro* que puede inducir cambios metabólicos significativos en una línea celular humana inmortalizada (HEK 293-FT), en fibroblastos murinos (neonatales o embrionarios) y en células endoteliales humanas (HUVEC). Además, dichas alteraciones metabólicas se mantienen aún después de varios días de remover los estímulos nutricionales y de que las células atravesaran varias rondas de división celular apoyando la idea de que se establece una memoria metabólica. Notablemente, el efecto de cada nutriente sobre el flujo metabólico es específico para cada tipo celular y, en la mayoría de los casos, son claramente distintos entre nutrientes. A pesar de que existen pocos modelos experimentales bien establecidos para el estudio de la memoria metabólica, nuestros resultados sugieren que este fenómeno se puede reproducir en una variedad de tipos celulares *in vitro* siempre que las concentraciones de los estímulos nutricionales, así como las ventanas de exposición y recuperación se ajusten a las características metabólicas y las dinámicas de proliferación de cada tipo de cultivo.

## Pulsos de estimulación con altas concentraciones de distintos nutrientes inducen una memoria metabólica *in vitro* en diferentes tipos celulares

La mayor parte del conocimiento acerca de los mecanismos del establecimiento de la memoria metabólica se ha obtenido trabajando con organismos unicelulares como *Escherichia coli* o la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Estos mecanismos incluyen las modificaciones covalentes a las histonas, la herencia de proteínas y/o alteraciones en el estado de accesibilidad de ciertos promotores (Bheda et al., 2020; Cerulus et al., 2018). Aunque los mecanismos no necesariamente estarán conservados en su totalidad en organismos multicelulares, estos trabajos han sentado las bases para el estudio de la memoria transcripcional en el contexto de la modulación metabólica.

A pesar de que las primeras referencias al término de la memoria metabólica provienen de trabajos en humanos, la herencia/transmisión de información relativa al ambiente nutricional se ha observado en modelos animales como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Buescher et al., 2013), el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Rechavi et al., 2014), e incluso en modelos de diabetes en ratones (R. A. Kowluru et al., 2004), lo cual ha dado pie a pensar que este tipo de memoria transcripcional es un fenómeno universal en la naturaleza que permite a los organismos responder a estímulos ambientales de carácter nutricional. En apoyo a esta idea, los resultados que obtuvimos con nuestro protocolo de estimulación por pulsos *in vitro* sugieren que la memoria metabólica se puede reproducir en una variedad de modelos celulares siempre que se consideren la cinética de proliferación y la tasa de utilización de los nutrientes de cada tipo celular.

Las células HEK 293-FT son consideradas un tipo celular con un metabolismo predominantemente glucolítico. Los trabajos preliminares para entender el metabolismo de estas células se basaron en la suplementación del medio de cultivo con glucosa marcada con  $^{13}\text{C}$  acoplado a métodos de cuantificación de metabolitos por cromatografía y espectrometría de masas (Henry et al., 2011), los cuales reportan que aún en presencia de oxígeno, el 77% de la glucosa consumida alimentaba la producción de lactato vía glucólisis -fenómeno conocido como efecto Warburg- y el 22% se utilizaba para la producción de Ac-CoA y la síntesis de lípidos. Además, estas células tienen una tasa de proliferación muy elevada comparada con otros tipos celulares, lo que en principio las vuelve un cultivo muy conveniente para ensayar la inducción de la memoria metabólica. Sin embargo, el hecho de que nuestros resultados en HEK 293-FT muestran que la suplementación del medio de cultivo con diferentes nutrientes resulte en alteraciones a nivel de la ECAR y la OCR (Figura 8) sugiere que la actividad mitocondrial también contribuye significativamente a la modulación metabólica en esta línea.



Por otro lado, los fibroblastos -un cultivo primario- son considerados un tipo celular con un metabolismo predominantemente respiratorio dado que la relación entre el consumo de oxígeno (pmoles de oxígeno consumidos por minuto) y la tasa de acidificación extracelular (mpH producidos por minuto) oscila entre 2.5 y 3.0 (Panopoulos et al., 2012). Sin embargo, en el caso específico de los fibroblastos neonatales observamos que la suplementación del medio de cultivo con los diferentes nutrientes tuvo un efecto muy similar a lo observado en células HEK; esto es, que se afectaron tanto la OCR como la ECAR en respuesta a los estímulos nutricionales. Dado que los fibroblastos son un cultivo heterogéneo, esto podría deberse a que los fibroblastos neonatales estén enriquecidos (o se estén seleccionando) tipos celulares con un metabolismo más glucolítico como los queratinocitos, cuyo radio OCR:ECAR es de alrededor de 2.0 (Panopoulos et al., 2012).

Por otro lado, en el caso de los experimentos con fibroblastos de embriones de 13 días (MEFs) el fenotipo metabólico resultante fue significativamente distinto al obtenido con los fibroblastos neonatales. Mientras algunos tratamientos provocaron alteraciones únicamente en el metabolismo glucolítico -treonina, oxígeno, acetato-, otras condiciones alteraron principalmente el metabolismo oxidativo (ácido palmítico, glucosa alta, ácido ascórbico). Además, es interesante señalar que algunos tratamientos -colesterol, ausencia de glucosa- no tuvieron un efecto significativo en ningún tipo de metabolismo. En primera instancia, las diferencias entre este experimento y el realizado con fibroblastos neonatales podría deberse a que el cultivo de MEFs es más heterogéneo. Además, estas diferencias también podrían sugerir que el establecimiento de la memoria metabólica es más variable en un cultivo donde las células tienen una mayor tasa de replicación, como es el caso de los MEFs en comparación con los fibroblastos neonatales.

Finalmente, las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) se pueden considerar un tipo celular mayoritariamente glucolítico, aunque también presentan niveles importantes de actividad mitocondrial; su radio OCR:ECAR oscila entre 1.5 y 2 (Panopoulos et al., 2012). Esta observación quedaría parcialmente confirmada con los experimentos que realizamos, pues logramos determinar que una exposición transitoria a una concentración alta de glucosa induce cambios únicamente en el metabolismo glucolítico aún cuando los niveles de glucosa vuelven a la normalidad. Además de esto, nuestros resultados sugieren que algunos aspectos de la memoria metabólica no son del todo evidentes cuando se ensaya el fenotipo metabólico en condiciones basales; el efecto de la hiperglucemia fue mucho más evidente cuando se sometió a las células a un reto metabólico como la adición de oligomicina y FCCP, que tienen como efecto incrementar tanto la OCR como la ECAR.

Como se ha dicho repetidamente, las células responden a los cambios abruptos en las condiciones ambientales ajustando una variedad de funciones celulares -entre ellas el metabolismo- para protegerse del daño celular o incluso la muerte a causa del estímulo. La mayoría de estos cambios son transitorios incluso cuando el estímulo inductor es de gran magnitud, y eventualmente los valores fisiológicos vuelven a niveles normales. Esta estrategia de respuesta alrededor de un fenotipo estable les confiere a las células una gran capacidad de adaptación ante cambios súbitos y, generalmente, este tipo de respuesta comparte elementos entre varios tipos de estrés a nivel molecular. Sin embargo, en escenarios en donde las variaciones ambientales se presentan durante periodos de tiempo prolongados, las células deben ser capaces de ajustar su programa transcripcional de tal forma que la respuesta ante el estímulo inductor sea específica y además sea capaz de sostenerse en el tiempo. En ese sentido, la capacidad de establecer un equilibrio entre un tipo de respuesta y el otro es lo que confiere mayor o menor adaptabilidad a los organismos.

Esta disyuntiva en la respuesta ante los estímulos nutricionales se puede observar claramente en el experimento de determinación del fenotipo metabólico realizado en MEFs (Figura 11). Las variaciones alrededor del fenotipo estable -la condición control de baja glucosa- estarían representadas por aquellos tratamientos que no indujeron memoria metabólica -i.e. la condición de glucosa 0 mM o el ácido ascórbico-, mientras que las respuestas específicas estarían representadas por aquellos tratamientos que provocaron un fenotipo metabólico claramente distinto del grupo control.

A pesar de que no existen muchos modelos bien establecidos para el estudio de la memoria metabólica, nuestros resultados sugieren que se trata de un fenómeno ampliamente distribuido en la naturaleza. Si se tienen en cuenta factores como la tasa de replicación del tipo celular, la cinética de consumo del nutriente en cuestión, así como la concentración y el tiempo de exposición, es posible inducir una memoria metabólica en diferentes modelos.

#### *Consideraciones para ensayar la memoria metabólica*

Teniendo en mente la propuesta de que la memoria se sostiene en componentes tales como modificaciones covalentes, proteínas o metabolitos, **la concentración y el tiempo de exposición** a los estímulos nutricionales serán elementos clave para el establecimiento de esta memoria, independientemente de si esta será de **mantenimiento** (Figura 6, B) o de **reinducción** (Figura 6, C). En este sentido, distintos aspectos de la naturaleza de cada tipo celular deben ser tomados en cuenta para estudiar el fenómeno de la memoria metabólica: para considerar que la información relativa al ambiente nutricional esté siendo heredada, la tasa de replicación del cultivo debería ser constante durante todo el tratamiento, especialmente durante la ventana de exposición al estímulo nutricional; por otro lado, resultaría conveniente trabajar con un cultivo tan homogéneo como sea posible para descartar la posibilidad de que la suplementación del medio con los diferentes nutrientes favorezca la proliferación de ciertas subpoblaciones o tipos celulares con distintos perfiles metabólicos dentro del cultivo.

Las células HEK tienen una tasa de replicación muy elevada comparada con otros tipos celulares, lo que en principio las vuelve un cultivo muy conveniente para ensayar la inducción de la memoria metabólica. Sin embargo, el fondo genético de estas células se encuentra significativamente alterado, pues presentan un cariotipo pseudotriploide (Bylund et al., 2004); esto es, que tienen 3 copias de casi todos sus cromosomas, lo que las vuelve poco convenientes a la hora de acoplar los experimentos de inducción de memoria a diferentes metodologías de secuenciación masiva. Como se dijo anteriormente, dado que la maquinaria metabólica está codificada en los genomas nuclear y mitocondrial, el balance entre el metabolismo glucolítico y respiratorio depende en parte de la tasa de transcripción de la maquinaria metabólica y, por ende, del número de copias de cada gen presente en el genoma. En este sentido, trabajar con este tipo celular dificultaría la reconstrucción de los efectos específicos de cada nutriente en el fenotipo metabólico.

A su vez, las HUVEC pueden considerarse un cultivo homogéneo en comparación con los fibroblastos, lo cual cumple con uno de los requisitos mencionados al inicio de este apartado. Por otro lado, aunque en principio resulta muy conveniente que en estas células se afecte únicamente el metabolismo glucolítico, los ensayos de proliferación nos permitieron determinar que las células se dividen muy poco en nuestras condiciones experimentales. A pesar de que se observa un incremento en el número de células -lo que es compatible con que se está transmitiendo información relacionada al fenotipo metabólico a través de las rondas de división celular-, la tasa de replicación de estos cultivos es considerablemente baja, lo cual representa una gran desventaja para ensayar el establecimiento de la memoria metabólica, pues este

rasgo también limita las variaciones que podemos aplicar a nuestro protocolo con respecto a las ventanas de exposición y recuperación a los diferentes estímulos nutricionales.

Por su parte, el cultivo de fibroblastos tiene sus propias ventajas y desventajas asociadas para ensayar el establecimiento de la memoria metabólica. En primera instancia, hay que considerar el hecho de que estos cultivos presentan una tasa de replicación elevada aún cuando son sometidos a las concentraciones elevadas de todos los nutrientes propuestos aquí. Además, los MEFs son el tipo celular utilizado por excelencia para la producción de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) -un protocolo que dura al menos 20 días en cultivo-, lo cual abre la posibilidad de ensayar el establecimiento de la memoria metabólica a diferentes intervalos de tiempo de exposición y recuperación a los estímulos nutricionales. Por otro lado, la heterogeneidad celular de los fibroblastos es un debate activo en la literatura. Aunque originalmente se les consideraba un cultivo homogéneo después de algunos pases en cultivo, reportes recientes en los que se explora el estado transcripcional a nivel de célula única sugieren que en realidad se trata de un cultivo con un grado de heterogeneidad bastante considerable y además cambiante a lo largo de los pases en cultivo, al irse seleccionando distintas subpoblaciones *in vitro* de manera natural (Singhal et al., 2016).

A la luz de estos resultados, nosotros consideramos que los dos cultivos más interesantes para ensayar la memoria metabólica con nuestro protocolo son las células HUVEC y los fibroblastos embrionarios de ratón. Sin embargo, la elección entre estos dos tipos de cultivo representa un reto debido a que cada uno tiene un comportamiento distinto al someterlo a nuestro protocolo de inducción de memoria. En principio, estas diferencias se pueden explicar si se reconoce que existe una disyuntiva funcional entre el estado de diferenciación de cualquier tipo celular y el establecimiento de un programa transcripcional que favorezca la proliferación: como regla general, las células indiferenciadas mantienen una proliferación constante antes de comprometerse con un linaje determinado, mientras que esta diferenciación coincide con un cese en la proliferación y una salida del ciclo celular (Ruijtenberg & van den Heuvel, 2016).

La presencia de diferentes linajes no reconocibles por métodos convencionales es un atributo común en muchos tipos celulares, incluidos los progenitores hematopoyéticos (Chang et al., 2008), células de músculo esquelético (Uezumi et al., 2006), entre otros. Hasta qué grado esta heterogeneidad es transitoria -esto es, que sea el reflejo del llamado “ruido transcripcional”- o representa la existencia de diferentes subtipos celulares con paisajes epigenéticos discretos es un campo de extenso debate. Un ejemplo claro de heterogeneidad a nivel transcripcional son los cultivos de células troncales embrionarias, en los que se observan niveles variables de transcripción de factores de transcripción relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia como *Nanog* (Singh et al., 2007); sin embargo, la mayoría de las clonas derivadas de estos cultivos son perfectamente capaces de dar origen a linajes celulares de las tres capas embrionarias, lo cual argumenta en favor de la idea de que las variaciones transcripcionales en cultivos considerados heterogéneos representan “ruido” y no la determinación de linajes específicos en el cultivo.

Teniendo en mente los rasgos de estos dos tipos celulares y su desempeño en las condiciones experimentales propuestas, decidimos continuar caracterizando el establecimiento de la memoria metabólica en los cultivos de MEFs.

## Estímulos nutricionales de carácter patológico son especialmente efectivos para el establecimiento de la memoria metabólica

Dado que el flujo metabólico tiene un impacto directo sobre la actividad de las enzimas que colocan o remueven marcas epigenéticas, una alteración en la disponibilidad de nutrientes como la glucosa, ácidos

grasos o bien algunos aminoácidos puede tener repercusiones importantes sobre el mantenimiento de las modificaciones epigenéticas.

En apoyo a esta idea, existen numerosos reportes que correlacionan el consumo de todos los nutrientes utilizados en este trabajo con la ganancia o pérdida de modificaciones epigenéticas. Por citar algunos ejemplos, a través en ensayos de marcaje radioactivo se ha determinado que el consumo de treonina alimenta directamente la producción de la Ac-CoA requerida para la síntesis de SAM en células troncales embrionarias de ratón (Shyh-Chang et al., 2013), lo cual correlaciona con un aumento en la marca de activación de promotores H3K4me3, además de un aumento en los niveles de acetilación de histonas a nivel global. Por otro lado, se ha reportado que el consumo de diferentes ácidos grasos a través de la  $\beta$ -oxidación contribuye con hasta el 90% de la acetilación de ciertos residuos específicos en las histonas (McDonnell et al., 2016). Una revisión detallada y actualizada acerca del efecto que tienen diferentes nutrientes en el epigenoma se puede consultar en la reciente publicación del grupo de Locasale (Dai et al., 2020).

### *Hiperglucemia*

A pesar de que se puede establecer una relación entre el metabolismo de todos los tratamientos ensayados en este trabajo con la modificación del paisaje epigenético, se ha propuesto que estímulos metabólicos de carácter patológico podrían ser especialmente efectivos en el establecimiento de un nuevo programa transcripcional que se herede durante varias generaciones celulares, aún si dichos estímulos se presentan solo de manera transitoria (Bheda, 2020). En sintonía con esta idea, existen diversos reportes que correlacionan el consumo de altas concentraciones de glucosa o dietas altas en grasa con la aparición de diferentes marcadores epigenéticos alterados.

Uno de los efectos de la hiperglucemia prolongada que vale la pena mencionar en el contexto de este trabajo es la inactivación de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), cuya actividad facilita la progresión de la vía glucolítica (Du et al., 2003; Heiden et al., 2009). En diferentes modelos de células endoteliales de retina, se ha observado que la actividad de esta enzima se ve significativamente reducida (A. Kowluru, 2003; Kowluru, 2017; R. A. Kowluru & Chan, 2010; R. A. Kowluru & Kanwar, 2007), lo cual tiene como resultado una disminución en la tasa glucolítica, la activación de la vía de la Proteína Cinasa C (PKC) y la formación de productos de glicación avanzada (AGEs) (Du et al., 2003). En principio, estas observaciones serían compatibles con nuestros resultados en células HUVEC; en un escenario similar, una incapacidad de aumentar la producción de la GAPDH ante un reto -farmacológico en este caso- explicaría por qué las células sometidas a una concentración alta de glucosa fueron incapaces de modular su metabolismo glucolítico.

Dado que la modulación de los niveles de glucosa en sangre se considera un factor de carácter ambiental, se ha propuesto que las modificaciones epigenéticas juegan un papel importante en el establecimiento de programas transcripcionales patológicos. Sin embargo, no se ha explorado si esta disminución en la actividad de la GAPDH está relacionada con alteraciones en el paisaje epigenético de estas células.

Entre los genes que se sí han visto alterados a nivel epigenético en el contexto de la hiperglicemia prolongada se encuentra la enzima súper óxido dismutasa 2 (SOD2) que en modelos de retinopatía asociada a la diabetes se ha visto que la disminución en la transcripción de este gen se debe al incremento en la marca H4K20me3 -típicamente asociada a la represión transcripcional- en el promotor de esta enzima, así como una disminución en la marca de activación H3K4me1/2 (Zhong & Kowluru, 2013a). En estos mismos trabajos, también se reportó que el gen de la metaloproteinasa MMP-9 presenta una disminución en la marca H3K9me2, lo que correlaciona con un aumento en su transcripción y la aparición de daño mitocondrial (Zhong & Kowluru, 2013b).

## *Hiperlipidemia*

Con respecto al metabolismo de ácidos grasos, también existe un gran cuerpo de evidencia que demuestra la correlación entre la hiperlipidemia y el desarrollo de muchas de las complicaciones asociadas a diferentes enfermedades metabólicas. En el contexto de la diabetes, se ha reportado que una sobrecarga de ácidos grasos provoca un mal funcionamiento en células  $\beta$ -pancreáticas, inhibiendo la secreción de insulina en respuesta a pulsos de glucosa y además induce la muerte celular por apoptosis (Cnop et al., 2001). Una amplia revisión del efecto del metabolismo de ácidos grasos en el desarrollo de enfermedades metabólicas desde una perspectiva epigenética se puede consultar en el trabajo de González-Becerra y colaboradores (González-Becerra et al., 2019).

En el caso específico del ácido palmítico (AP), está reportado que la suplementación del medio con este único ácido graso en cultivos de células pancreáticas humanas es suficiente para el desarrollo de la resistencia a la insulina, la disminución en la tasa glucolítica y gluconeogénica, así como una disminución en el metabolismo oxidativo de otros ácidos grasos. Es aún más interesante que estas alteraciones se correlacionan con un cambio en el perfil de metilación a nivel genómico en células pancreáticas humanas (Hall et al., 2014). Además, en un modelo de células renales podocíticas humanas también se ha reportado que este ácido graso induce una disminución en la tolerancia a la glucosa y la tasa gluconeogénica, así como una reducción en el metabolismo oxidativo de otros ácidos grasos; estos efectos además se correlacionan con alteraciones en la deposición de las marcas H3K27me3 -una marca típicamente represiva- y la H3K36me2 -una marca de activación- en el promotor del gen FOXO1 (Kumar et al., 2016).

Dado que el AP es el ácido graso saturado más abundante en el cuerpo humano -representa entre el 20 y el 30 % del total de ácidos grasos membranales y almacenados en forma de triacilglicéridos- (Carta et al., 2017), no resulta sorprendente que la suplementación de este único nutriente sea suficiente para reproducir el desarrollo de las diferentes complicaciones asociadas a la hiperlipidemia.

Finalmente, también es ampliamente reconocido que la combinación de ambos tipos de estrés metabólico (hiperglucemia e hiperlipidemia) exacerba los efectos nocivos de la glucosa y los ácidos grasos sobre el funcionamiento y la sobrevivencia de las células pancreáticas (Poitout & Robertson, 2002). Algunos trabajos han reportado que altas concentraciones de glucosa incrementan la muerte celular inducida por la suplementación de ácidos grasos vía la inhibición de la  $\beta$ -oxidación, lo que afecta directamente los mecanismos de detoxificación de lípidos en estos modelos (El-Assaad et al., 2003). Por esta razón, decidimos que también sería interesante ensayar el establecimiento de la memoria metabólica en una condición en la que se combinaran tanto la glucosa como el ácido palmítico.

### **La memoria metabólica también se manifiesta en el potencial oxidante de las células sometidas a altas concentraciones de glucosa y/o ácido palmítico**

Con respecto a los ensayos de reducción de MTT que realizamos en MEFs, los resultados son congruentes con lo reportado en la literatura acerca del impacto de estos nutrientes en el metabolismo y el estado redox de la célula.

Como se ha dicho, la hiperglucemia prolongada es uno de los factores más importantes para el desarrollo de las diferentes complicaciones de la diabetes y otras enfermedades metabólicas. Específicamente, su efecto a nivel de estrés oxidante se ha estudiado con mucho detalle por ser considerado uno de los mecanismos del establecimiento de la memoria metabólica. Los trabajos con diferentes modelos de hiperglucemia han reportado efectos que van desde la activación de la proteína cinasa C (PKC), la formación de AGEs y la producción elevada de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Brownlee, 2001; R. A. Kowluru, 2005) durante las primeras etapas de la exposición. Por otro lado, trabajos más recientes

coinciden en que un efecto consistente de la exposición prolongada es la activación de la enzima NADPH oxidasa (Nox) (Kowluru et al., 2014).

Estos reportes indican que la activación de Nox depleta el NADPH en el citosol y resulta en la sobreproducción de radicales superóxido a través de la cadena transportadora de electrones. A largo plazo, el número de mitocondrias -inferido mediante cuantificación de DNA mitocondrial (mtDNA)- disminuye, y las mitocondrias restantes presentan niveles altos de daño al mtDNA. Como consecuencia, la transcripción de los genes codificados en el DNA mitocondrial disminuye, generando un asa de retroalimentación positiva que perpetúa la producción de radicales superóxido y el daño mitocondrial (Kowluru, 2017; Trudeau et al., 2010; Zhong & Kowluru, 2011). En conjunto, todas estas observaciones son congruentes con el incremento en la reducción de MTT observado en las condiciones donde la concentración de glucosa era mucho más alta que la de ácido palmítico (Figura 20).

Por otro lado, los resultados obtenidos en las condiciones donde se incrementó la concentración de ácido palmítico (AP) son más difíciles de interpretar. A grandes rasgos, aproximadamente el 20% del AP es metabolizado a través de la  $\beta$ -oxidación, lo cual en principio conduciría a una disminución en el ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  y un aumento en la reducción del MTT. Sin embargo, el metabolismo de este ácido graso no depende únicamente de su concentración absoluta en el medio de cultivo, sino en el ratio que existe entre la concentración de ácidos grasos saturados e insaturados y la disponibilidad de glucosa en el medio (Abbott et al., 2012). En un escenario donde la concentración de glucosa en el medio es suficiente para cumplir con los requerimientos energéticos para sostener la proliferación, el ácido palmítico tiene un efecto inhibitorio sobre la oxidación de otros ácidos grasos (Kien et al., 2005), lo cual a su vez provoca que el índice  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  se vea **incrementado**. En estas condiciones, la reacción de reducción del MTT se vería **disminuida**.

Este comportamiento se ha observado en otros modelos de suplementación de ácido palmítico en el medio en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. Específicamente, Alnahdi y colaboradores reportaron que en un cultivo de células pancreáticas secretoras de insulina (RIN-5F), la viabilidad del cultivo -determinada mediante ensayos de reducción de MTT- se ve disminuida cuando se suplementa el cultivo con AP a concentraciones que van desde 60 a 500  $\mu\text{M}$ , con un comportamiento dosis-dependiente (Alnahdi et al., 2019). Lo más interesante de este reporte es que el efecto del ácido palmítico es aún más dramático cuando se suplementa en un medio con una concentración de glucosa elevada (25 mM), lo cual es congruente con lo observado en nuestras condiciones Glu [10 mM] + AP [150  $\mu\text{M}$ ] y Glu [15 mM] + AP [100  $\mu\text{M}$ ] (Figura 19). Además, esta observación también explica por qué en la condición donde los dos nutrientes se suplementaron a la concentración más alta en nuestros experimentos el potencial replicativo del cultivo se agota antes de terminar el protocolo de inducción de memoria (Figura 20).

## Otros aspectos de la memoria metabólica

*Vías de señalización:*

Aunque existe una relación muy clara entre los niveles elevados de glucosa y ácidos grasos en sangre y el desarrollo de diferentes complicaciones de la diabetes, en realidad existen muchos otros factores que contribuyen a que estos se desarrollen. Estos agentes activan vías como la de NF- $\kappa$ B o las SMADs, resultando en la expresión de factores de crecimiento y citocinas involucradas en la disfunción endotelial, crecimiento vascular, infiltración de macrófagos, fibrosis, inflamación y disfunción orgánica; en principio, cualquiera de estos mecanismos tiene el potencial de explicar una gran parte del fenómeno de la memoria metabólica.

Uno de los ejemplos que representa claramente esta postura es el trabajo del grupo de Natarajan. Este grupo reporta que el tratamiento de células mesangiales con concentraciones elevadas de glucosa resulta

en el establecimiento de diferentes marcadores epigenéticos; sin embargo, para nosotros lo más interesante de estos reportes es que cuando se ensayan los efectos de la hiperglucemia en presencia de un anticuerpo contra TGF- $\beta$ , se observa una disminución de estos marcadores (Sun et al., 2010; Yuan et al., 2013). Estos resultados sugieren que la respuesta a estímulos nutricionales no depende únicamente del efecto en el metabolismo y su influencia en la regulación epigenética, sino que la activación de diferentes vías de señalización también es un pilar importante para el establecimiento de un nuevo programa transcripcional. En este sentido, no descartamos la posibilidad de abordar el estudio de la memoria metabólica desde una perspectiva como esta.

#### *Balance energético y la herencia de proteínas:*

Finalmente, otro aspecto interesante a discutir es la influencia que tiene el balance entre el metabolismo glucolítico y el metabolismo respiratorio en la respuesta que las células presentarán ante los diferentes estímulos nutricionales. El modelo más conveniente para ensayar este fenómeno es sin duda la levadura; específicamente, el estudio de las modificaciones en el metabolismo y el paisaje epigenético inducidas por el cambio entre fuentes de carbono fermentables y no fermentables en este modelo ha arrojado resultados interesantes en relación con este debate. Como se ha dicho, uno de los mecanismos propuestos para el establecimiento de la memoria metabólica es la herencia de proteínas. Para abordar esto, el grupo de Roncoroni analizó los ajustes transcripcionales en respuesta a la transición periódica entre glucosa y galactosa/maltosa como fuentes de carbono a nivel de célula única en *S. cerevisiae*. Brevemente, observaron que los cambios transcripcionales inducidos por la transición entre fuentes de carbono no dependen directamente de la exposición previa a estos carbohidratos, sino más bien del tiempo que las células fueron crecidas en glucosa antes del cambio de medio. Además, reportaron que los niveles de las proteínas involucradas en el metabolismo de la maltosa o la galactosa no explican la variabilidad que existe entre células con respecto al establecimiento de la memoria transcripcional (Cerulus et al., 2018).

Con estos resultados los autores proponen que cambios en el estado transcripcional a nivel de locus específicos son el reflejo de procesos metabólicos más amplios. La memoria transcripcional involucraría entonces la cinética de cambios globales en el estado respiratorio, y no la vía o forma específica en que este fue alterado. En este sentido, nosotros proponemos que cuantificar la concentración de diferentes metabolitos intermedios en nuestras células nos permitiría reconstruir con mucha más precisión el efecto que tiene cada nutriente sobre el estado energético. Además, esta estrategia nos permitiría abordar la hipótesis de que los cambios persistentes en el metabolismo, inducidos por la exposición prologada a diferentes estímulos nutricionales, representan un mecanismo importante en el establecimiento de la memoria metabólica.

#### *Relevancia clínica:*

Dado el papel que juega el fenómeno de la memoria transcripcional metabólica en el desarrollo de diferentes enfermedades como la diabetes o el síndrome metabólico, sería interesante explorar si este fenómeno está involucrado en contextos patológicos de otra naturaleza como el cáncer, el envejecimiento o las enfermedades neurodegenerativas, los cuales se han asociado en cierto grado con el consumo de dietas altas en grasas y azúcares. Un ejemplo claro de esto es la restricción calórica, la cual ha mostrado tener un efecto protector contra el envejecimiento en una variedad de organismos a través de diferentes mecanismos, entre los que destaca una reducción en la tasa de utilización de la glucosa (Kapahi et al., 2017; Mobbs, 2018). En este sentido, dilucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales se establece la memoria metabólica contribuirá a mejorar nuestro entendimiento sobre la etiología de estas enfermedades, lo cual puede tener implicaciones importantes para el desarrollo de fármacos u otro tipo de tratamientos.

#### *Determinación del perfil de accesibilidad de la cromatina a nivel genómico*

En general, podríamos pensar en dos mecanismos para el establecimiento de la memoria transcripcional a través de las rondas de división celular: 1) la herencia de proteínas u otros **componentes de memoria** y 2) los cambios locales en la estructura de la cromatina. Mientras que en el primer escenario la probabilidad de que se establezca una memoria celular estaría limitada por la vida media de las proteínas, las modificaciones epigenéticas son un buen candidato para explicar la herencia de programas transcripcionales por su naturaleza reversible y heredable, por lo que han sido el blanco más popular para estudiar este fenómeno. En sintonía con esta idea y como se mencionó en la introducción de este trabajo, actualmente se sugiere que uno de los factores que determinan la capacidad de la célula de ajustar su programa transcripcional a través de la remodelación de su epigenoma es la disponibilidad relativa de nutrientes y la regulación metabólica de las enzimas modificadoras de la cromatina (Wiese & Bannister, 2020).

Existen numerosos reportes que correlacionan el consumo de todos los nutrientes utilizados en este trabajo con la ganancia o pérdida de modificaciones epigenéticas en diferentes modelos experimentales (véase *Discusión*); sin embargo, dado que el efecto de cada nutriente sobre el flujo metabólico resultó ser específico para cada tipo celular, se vuelve complicado explorar si existen alteraciones epigenéticas a nivel de modificaciones puntuales. Es por ello que nuestra propuesta es analizar el paisaje epigenético a nivel global mediante ensayos de tagmentación de la cromatina acoplados a secuenciación masiva (ATAC-seq, *Assay for Transposase-Accessible Chromatin*) (Buenrostro et al., 2015), los cuales permitirán evaluar el estado de accesibilidad de la cromatina a nivel del genoma completo.

Durante el tratamiento de los cultivos de MEFs con glucosa y/o ácido palmítico para los ensayos de determinación del fenotipo metabólico, en el cuarto pase (día 9) el total de células de cada condición se dividió en dos cajas independientes. Las células de las segundas cajas fueron utilizadas, una vez concluidos los 10 días del experimento, para realizar ensayos de tagmentación de la cromatina. Las reacciones de transposición, así como la amplificación y la purificación de las librerías se llevaron a cabo según lo descrito en la sección de materiales y métodos y las librerías ya fueron enviadas a secuenciar. Una vez obtenidos los datos de ATAC-seq, nos centraremos en identificar si hay promotores y *enhancers* que se encuentren diferencialmente accesibles ante los estímulos nutricionales, y en evaluar qué tan conservados están estos cambios en la condición de memoria.

## Conclusiones

1. En este trabajo hemos establecido un protocolo robusto para inducir y detectar cambios metabólicos persistentes (memoria celular) *in vitro* con el equipo *Seahorse* en tanto en células HEK 293-FT, HUVEC, como en fibroblastos de ratón (embrionarios y neonatales).
2. Los efectos provocados por la suplementación del medio de cultivo con distintos nutrientes son distinguibles entre sí y varían entre tipos celulares.
3. La exposición a una alta concentración de glucosa provoca alteraciones persistentes en el metabolismo glucolítico en células HUVEC.
4. Las células se están dividiendo durante los tratamientos, lo que sugiere que se está transmitiendo información relativa al fenotipo metabólico a través de las rondas de división celular.
5. El fenotipo de memoria metabólica también se ve reflejado en el estado redox de las células.
6. Hemos determinado las concentraciones más interesantes de glucosa y ácido palmítico, en separado y en conjunto, para caracterizar el fenotipo de memoria no sólo a nivel metabólico sino también para evaluar el estado de accesibilidad de la cromatina.



# Perspectivas

1. Evaluar la memoria celular metabólica a nivel de potencial redox mediante ensayos de MTT, XTT o Alamar Blue en las condiciones de alta glucosa y ácido palmítico por separado y en conjunto.
2. Analizar el nivel de algunos metabolitos intermedios, por ejemplo, el NAD<sup>+</sup> o la acetil-CoA para explorar si el fenotipo de memoria metabólica también se manifiesta a nivel de la concentración relativa de estas moléculas entre los diferentes tratamientos
3. Paralelamente, pretendemos comenzar a explorar si esta memoria metabólica está asociada a cambios epigenéticos mediante el análisis bioinformático de las librerías provenientes de los ensayos de ATAC-seq para evaluar el grado de accesibilidad de la cromatina a una escala genómica poniendo especial atención en promotores, enhancers y sitios de unión de factores de transcripción.

# Referencias

- Abbott, S. K., Else, P. L., Atkins, T. A., & Hulbert, A. J. (2012). Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(5). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.011>
- Adams-Cioaba, M. A., & Min, J. (2009). Structure and function of histone methylation binding proteins. *Biochemistry and Cell Biology*, 87(1), 93–105. <https://doi.org/10.1139/O08-129>
- Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, 17(8), 487–500. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>
- Allum, F., & Grundberg, E. (2020). Capturing functional epigenomes for insight into metabolic diseases. *Molecular Metabolism*, 38(February), 100936. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.12.016>
- Alnahdi, A., John, A., & Raza, H. (2019). N-acetyl cysteine attenuates oxidative stress and glutathione-dependent redox imbalance caused by high glucose/high palmitic acid treatment in pancreatic Rin-5F cells. *PLoS ONE*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226696>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., & Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410(6824), 120–124. <https://doi.org/10.1038/35065138>
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., & Zhao, K. (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*, 129(4), 823–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>
- Bartke, T., & Schneider, R. (2020). You are what you eat – How nutrition and metabolism shape the genome through epigenetics. *Molecular Metabolism*, 38(April), 100987. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.100987>
- Bheda, P. (2020). Metabolic transcriptional memory. *Molecular Metabolism*, 38(February), 100955. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.01.019>
- Bheda, P., Aguilar-Gómez, D., Kukhtevich, I., Becker, J., Charvin, G., Kirmizis, A., & Schneider, R. (2020). Microfluidics for single-cell lineage tracking over time to characterize transmission of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *STAR Protocols*, 1(3). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100228>
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. In *Nature* (Vol. 414, Issue 6865). <https://doi.org/10.1038/414813a>
- Buenrostro, J. D., Wu, B., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2015). ATAC-seq: A method for assaying chromatin accessibility genome-wide. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2015. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2129s109>
- Buescher, J. L., Musselman, L. P., Wilson, C. A., Lang, T., Keleher, M., Baranski, T. J., & Duncan, J. G. (2013). Evidence for transgenerational metabolic programming in *Drosophila*. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 6(5). <https://doi.org/10.1242/dmm.011924>
- Bylund, L., Kytölä, S., Lui, W. O., Larsson, C., & Weber, G. (2004). Analysis of the cytogenetic stability of the human embryonal kidney cell line 293 by cytogenetic and STR profiling approaches. *Cytogenetic and Genome Research*, 106(1). <https://doi.org/10.1159/000078556>
- Carta, G., Murru, E., Banni, S., & Manca, C. (2017). Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 8, Issue NOV). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00902>
- Cerulus, B., Jariani, A., Perez-Samper, G., Vermeersch, L., Pietsch, J. M. J., Crane, M. M., New, A. M., Gallone, B., Roncoroni, M., Dzialo, M. C., Govers, S. K., Hendrickx, J. O., Galle, E., Coomans, M., Berden, P., Verbandt, S., Swain, P. S., & Verstrepen, K. J. (2018). Transition between fermentation and respiration determines history-dependent behavior in fluctuating carbon sources. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.39234>
- Chalkiadaki, A., & Guarente, L. (2012). Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient

- availability. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 8, Issue 5).  
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.225>
- Champagne, K., & Kutateladze, T. (2009). Structural Insight Into Histone Recognition by the ING PHD Fingers. *Current Drug Targets*, 10(5), 432–441. <https://doi.org/10.2174/138945009788185040>
- Chang, H. H., Hemberg, M., Barahona, M., Ingber, D. E., & Huang, S. (2008). Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature*, 453(7194).  
<https://doi.org/10.1038/nature06965>
- Cluntun, A. A., Huang, H., Dai, L., Liu, X., Zhao, Y., & Locasale, J. W. (2015). The rate of glycolysis quantitatively mediates specific histone acetylation sites. *Cancer & Metabolism*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40170-015-0135-3>
- Cnop, M., Hannaert, J. C., Hoorens, A., Eizirik, D. L., & Pipeleers, D. G. (2001). Inverse Relationship between Cytotoxicity of Free Fatty Acids in Pancreatic Islet Cells and Cellular Triglyceride Accumulation. *Diabetes*, 50(8). <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1771>
- D'Urso, A., Takahashi, Y. H., Xiong, B., Marone, J., Coukos, R., Randise-Hinchliff, C., Wang, J. P., Shilatifard, A., & Brickner, J. H. (2016). Set1/COMPASS and mediator are repurposed to promote epigenetic transcriptional memory. *ELife*, 5(JUN2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.16691>
- Dai, Z., Ramesh, V., & Locasale, J. W. (2020). The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics. *Nature Reviews Genetics*, 21(12), 737–753. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0270-8>
- Dekel, E., & Alon, U. (2005). Optimality and evolutionary tuning of the expression level of a protein. *Nature*, 436(7050), 588–592. <https://doi.org/10.1038/nature03842>
- Du, X., Matsumura, T., Edelstein, D., Rossetti, L., Zsengellér, Z., Szabó, C., & Brownlee, M. (2003). Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 112(7).  
<https://doi.org/10.1172/JCI18127>
- El-Assaad, W., Buteau, J., Peyot, M. L., Nolan, C., Roduit, R., Hardy, S., Joly, E., Dbaibo, G., Rosenberg, L., & Prentki, M. (2003). Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic  $\beta$ -cell death. *Endocrinology*, 144(9). <https://doi.org/10.1210/en.2003-0410>
- El-Osta, A., Brasacchio, D., Yao, D., Pocai, A., Jones, P. L., Roeder, R. G., Cooper, M. E., & Brownlee, M. (2008). Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *Journal of Experimental Medicine*, 205(10).  
<https://doi.org/10.1084/jem.20081188>
- Genuth, S., Lipps, J., Lorenzi, G., Nathan, D. M., Davis, M. D., Lachin, J. M., & Cleary, P. A. (2002). Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *Journal of the American Medical Association*, 287(19). <https://doi.org/10.1001/jama.287.19.2563>
- González-Becerra, K., Ramos-Lopez, O., Barrón-Cabrera, E., Riezu-Boj, J. I., Milagro, F. I., Martínez-López, E., & Martínez, J. A. (2019). Fatty acids, epigenetic mechanisms and chronic diseases: A systematic review. In *Lipids in Health and Disease* (Vol. 18, Issue 1).  
<https://doi.org/10.1186/s12944-019-1120-6>
- Hall, E., Volkov, P., Dayeh, T., Bacos, K., Rönn, T., Nitert, M. D., & Ling, C. (2014). Effects of palmitate on genome-wide mRNA expression and DNA methylation patterns in human pancreatic islets. *BMC Medicine*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-103>
- Hassan, A. H., Prochasson, P., Neely, K. E., Galasinski, S. C., Chandy, M., Carrozza, M. J., & Workman, J. L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell*, 111(3), 369–379. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01005-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01005-X)
- Heiden, M. G. V., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. In *Science* (Vol. 324, Issue 5930).  
<https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Henry, O., Jolicoeur, M., & Kamen, A. (2011). Unraveling the metabolism of HEK-293 cells using lactate isotopomer analysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(3).

- <https://doi.org/10.1007/s00449-010-0468-9>
- Hodawadekar, S. C., & Marmorstein, R. (2007). Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: Structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene*, 26(37), 5528–5540. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210619>
- Hon, G. C., Hawkins, R. D., & Ren, B. (2009). Predictive chromatin signatures in the mammalian genome. *Human Molecular Genetics*, 18(R2), 12–14. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp409>
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. In *Science* (Vol. 293, Issue 5532). <https://doi.org/10.1126/science.1063127>
- Jin, B., Li, Y., & Robertson, K. D. (2011). DNA methylation: Superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes and Cancer*, 2(6), 607–617. <https://doi.org/10.1177/1947601910393957>
- Kanwar, M., Chan, P. S., Kern, T. S., & Kowluru, R. A. (2007). Oxidative damage in the retinal mitochondria of diabetic mice: Possible protection by superoxide dismutase. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(8). <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1280>
- Kapahi, P., Kaeberlein, M., & Hansen, M. (2017). Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 39). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.12.005>
- Kiefer, C. M., Hou, C., Little, J. A., & Dean, A. (2008). Epigenetics of  $\beta$ -globin gene regulation. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 647(1–2), 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.07.014>
- Kien, C. L., Bunn, J. Y., & Ugrasbul, F. (2005). Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82(2). <https://doi.org/10.1093/ajcn/82.2.320>
- Kim, J., Daniel, J., Espejo, A., Lake, A., Krishna, M., Xia, L., Zhang, Y., & Bedford, M. T. (2006). Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Reports*, 7(4), 397–403. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400625>
- Klose, R. J., & Zhang, Y. (2007). Regulation of histone methylation by demethylation and demethylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(4), 307–318. <https://doi.org/10.1038/nrm2143>
- Kohli, R. M., & Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. In *Nature* (Vol. 502, Issue 7472). <https://doi.org/10.1038/nature12750>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Kowluru, A. (2003). Defective protein histidine phosphorylation in islets from the Goto-Kakizaki diabetic rat. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 285(3 48-3). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00121.2003>
- Kowluru, R. A. (2005). Diabetic retinopathy, oxidative stress and antioxidants. In *Current Topics in Nutraceutical Research* (Vol. 3, Issue 4).
- Kowluru, R. A. (2017). Diabetic retinopathy, metabolic memory and epigenetic modifications. *Vision Research*, 139, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2017.02.011>
- Kowluru, R. A., Abbas, S. N., & Odenbach, S. (2004). Reversal of hyperglycemia and diabetic nephropathy: Effect of reinstatement of good metabolic control on oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 18(5). <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2004.03.002>
- Kowluru, R. A., & Chan, P. S. (2010). Metabolic memory in diabetes - from in vitro oddity to in vivo problem: Role of Apoptosis. *Brain Research Bulletin*, 81(2–3). <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.05.006>
- Kowluru, R. A., & Kanwar, M. (2007). Effects of curcumin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes. *Nutrition and Metabolism*, 4. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-4-8>
- Kowluru, R. A., Kowluru, A., Veluthakal, R., Mohammad, G., Syed, I., Santos, J. M., & Mishra, M. (2014). TIAM1-RAC1 signalling axis-mediated activation of NADPH oxidase-2 initiates mitochondrial damage in the development of diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 57(5).

- <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3194-z>
- Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in purkinje neurons and the brain. *Science*, 324(5929), 929–930. <https://doi.org/10.1126/science.1169786>
- Kumar, S., Pamulapati, H., & Tikoo, K. (2016). Fatty acid induced metabolic memory involves alterations in renal histone H3K36me2 and H3K27me3. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 422. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.12.019>
- Kussell, E., & Leibler, S. (2005). Ecology: Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science*, 309(5743), 2075–2078. <https://doi.org/10.1126/science.1114383>
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., & Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410(6824), 116–120. <https://doi.org/10.1038/35065132>
- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q. M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson, J. A., Ren, B., & Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315–322. <https://doi.org/10.1038/nature08514>
- Liu, X., Cooper, D. E., Cluntun, A. A., Warmoes, M. O., Zhao, S., Reid, M. A., Liu, J., Lund, P. J., Lopes, M., Garcia, B. A., Wellen, K. E., Kirsch, D. G., & Locasale, J. W. (2018). Acetate Production from Glucose and Coupling to Mitochondrial Metabolism in Mammals. *Cell*, 175(2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.040>
- McDonnell, E., Crown, S. B., Fox, D. B., Kitir, B., Ilkayeva, O. R., Olsen, C. A., Grimsrud, P. A., & Hirschey, M. D. (2016). Lipids Reprogram Metabolism to Become a Major Carbon Source for Histone Acetylation. *Cell Reports*, 17(6). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.012>
- Mobbs, C. V. (2018). Glucose-induced transcriptional hysteresis: Role in obesity, metabolic memory, diabetes, and aging. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00232>
- Mujtaba, S., Zeng, L., & Zhou, M. M. (2007). Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene*, 26(37), 5521–5527. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210618>
- Ng, S. S., Yue, W. W., Oppermann, U., & Klose, R. J. (2009). Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(3), 407–422. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8303-z>
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C. D., Tempst, P., & Reinberg, D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes and Development*, 16(4), 479–489. <https://doi.org/10.1101/gad.967202>
- Panopoulos, A. D., Yanes, O., Ruiz, S., Kida, Y. S., Diep, D., Tautenhahn, R., Herrerías, A., Batchelder, E. M., Plongthongkum, N., Lutz, M., Berggren, W. T., Zhang, K., Evans, R. M., Siuzdak, G., & Belmonte, J. C. I. (2012). The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Research*, 22(1). <https://doi.org/10.1038/cr.2011.177>
- Poitout, V., & Robertson, R. P. (2002). Minireview: Secondary  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes - A convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. In *Endocrinology* (Vol. 143, Issue 2). <https://doi.org/10.1210/endo.143.2.8623>
- Probst, A. V., Dunleavy, E., & Almouzni, G. (2009). Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(3), 192–206. <https://doi.org/10.1038/nrm2640>
- Rechavi, O., Houri-Ze'evi, L., Anava, S., Goh, W. S. S., Kerk, S. Y., Hannon, G. J., & Hobert, O. (2014). Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in *C. elegans*. *Cell*, 158(2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.020>
- Reid, M. A., Dai, Z., & Locasale, J. W. (2017). The impact of cellular metabolism on chromatin dynamics and epigenetics. *Nature Cell Biology*, 19(11), 1298–1306. <https://doi.org/10.1038/ncb3629>

- Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg1655>
- Ruijtenberg, S., & van den Heuvel, S. (2016). Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. In *Cell Cycle* (Vol. 15, Issue 2). <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1120925>
- Sanderson, S. M., Gao, X., Dai, Z., & Locasale, J. W. (2019). Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 19, Issue 11). <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0187-8>
- Schneider, R., Bannister, A. J., Myers, F. A., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C., & Kouzarides, T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nature Cell Biology*, 6(1), 73–77. <https://doi.org/10.1038/ncb1076>
- Shi, Yang. (2007). Histone lysine demethylases: Emerging roles in development, physiology and disease. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 8, Issue 11). <https://doi.org/10.1038/nrg2218>
- Shi, Yujang, Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A., & Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119(7), 941–953. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012>
- Shimazu, T., Hirschey, M. D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., Grueter, C. A., Lim, H., Saunders, L. R., Stevens, R. D., Newgard, C. B., Farese, R. V., De Cabo, R., Ulrich, S., Akassoglou, K., & Verdin, E. (2013). Suppression of oxidative stress by  $\beta$ -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*, 339(6116). <https://doi.org/10.1126/science.1227166>
- Shyh-Chang, N., Locasale, J. W., Lyssiotis, C. A., Zheng, Y., Teo, R. Y., Ratanasirintrawoot, S., Zhang, J., Onder, T., Unternaehrer, J. J., Zhu, H., Asara, J. M., Daley, G. Q., & Cantley, L. C. (2013). Influence of Threonine Metabolism on S-Adenosylmethionine and Histone Methylation. *Science*, 339(6116), 222–226.
- Singh, A. M., Hamazaki, T., Hankowski, K. E., & Terada, N. (2007). A Heterogeneous Expression Pattern for Nanog in Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 25(10). <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0126>
- Singhal, P. K., Sassi, S., Lan, L., Au, P., Halvorsen, S. C., Fukumura, D., Jain, R. K., & Seed, B. (2016). Mouse embryonic fibroblasts exhibit extensive developmental and phenotypic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(1). <https://doi.org/10.1073/pnas.1522401112>
- Sood, V., Cajigas, I., D'Urso, A., Light, W. H., & Brickner, J. H. (2017). Epigenetic transcriptional memory of GAL genes depends on growth in glucose and the tup1 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 206(4). <https://doi.org/10.1534/genetics.117.201632>
- Stockwell, S. R., Landry, C. R., & Rifkin, S. A. (2015). The yeast galactose network as a quantitative model for cellular memory. In *Molecular BioSystems* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.1039/c4mb00448e>
- Sun, G., Reddy, M. A., Yuan, H., Lanting, L., Kato, M., & Natarajan, R. (2010). Epigenetic histone methylation modulates fibrotic gene expression. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(12). <https://doi.org/10.1681/ASN.2010060633>
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., David, R., Aravind, L., & Rao, A. (2009). *NIH Public Access*. 324(5929), 930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>. Conversion
- Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, D., Singh, P. B., Nakayama, J. ichi, Grewal, S. I., Allis, C. D., Cheng, X., & Selker, E. U. (2003). Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature Genetics*, 34(1), 75–79. <https://doi.org/10.1038/ng1143>
- Tang, S., Fang, Y., Huang, G., Xu, X., Padilla-Banks, E., Fan, W., Xu, Q., Sanderson, S. M., Foley, J. F., Dowdy, S., McBurney, M. W., Fargo, D. C., Williams, C. J., Locasale, J. W., Guan, Z., & Li, X. (2017). Methionine metabolism is essential for SIRT1-regulated mouse embryonic stem cell maintenance and embryonic development. *The EMBO Journal*, 36(21). <https://doi.org/10.15252/embj.201796708>

- Trojer, P., & Reinberg, D. (2007). Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Molecular Cell*, 28(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.011>
- Trudeau, K., Molina, A. J. A., Guo, W., & Roy, S. (2010). High glucose disrupts mitochondrial morphology in retinal endothelial cells: Implications for diabetic retinopathy. *American Journal of Pathology*, 177(1). <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091029>
- Tsukada, Y. I., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P., & Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, 439(7078), 811–816. <https://doi.org/10.1038/nature04433>
- Uezumi, A., Ojima, K., Fukada, S. I., Ikemoto, M., Masuda, S., Miyagoe-Suzuki, Y., & Takeda, S. (2006). Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.037>
- Villeneuve, L. M., & Natarajan, R. (2010). The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications. In *American Journal of Physiology - Renal Physiology* (Vol. 299, Issue 1). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00200.2010>
- Wang, J., Wu, Z., Li, D., Li, N., Dindot, S. V., Satterfield, M. C., Bazer, F. W., & Wu, G. (2012). Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 17, Issue 2). <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4381>
- Wellen, K. E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U. M., Bui, T. V., Cross, J. R., & Thompson, C. B. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science*, 324(5930). <https://doi.org/10.1126/science.1164097>
- Whetstone, J. R., Nottke, A., Lan, F., Huarte, M., Smolnikov, S., Chen, Z., Spooner, E., Li, E., Zhang, G., Colaiacovo, M., & Shi, Y. (2006). Reversal of Histone Lysine Trimethylation by the JMJD2 Family of Histone Demethylases. *Cell*, 125(3), 467–481. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.028>
- Wiese, M., & Bannister, A. J. (2020). Two genomes, one cell: Mitochondrial-nuclear coordination via epigenetic pathways. *Molecular Metabolism*, 38(February), 100942. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.01.006>
- Writing Team, C. (2003). Sustained Effect of Intensive Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus on Development and Progression of Diabetic Nephropathy. *JAMA*, 290(16). <https://doi.org/10.1001/jama.290.16.2159>
- Xhemalce, B., Dawson, M. A., & Bannister, A. J. (2011). Histone Modifications. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1002/3527600906.mcb.201100004>
- Xiao, B., Jing, C., Wilson, J. R., Walker, P. A., Vasisht, N., Kelly, G., Howell, S., Taylor, I. A., Blackburn, M. G., & Gambin, S. J. (2003). Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature*, 421(6923), 652–656. <https://doi.org/10.1038/nature01378>
- Yang, X. J., & Seto, E. (2007). HATs and HDACs: From structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, 26(37), 5310–5318. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210599>
- Yuan, H., Reddy, M. A., Sun, G., Lanting, L., Wang, M., Kato, M., & Natarajan, R. (2013). Involvement of p300/CBP and epigenetic histone acetylation in TGF- $\beta$ 1-mediated gene transcription in mesangial cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 304(5). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00523.2012>
- Yucel, N., Wang, Y. X., Mai, T., Porpiglia, E., Lund, P. J., Markov, G., Garcia, B. A., Bendall, S. C., Angelo, M., & Blau, H. M. (2019). Glucose Metabolism Drives Histone Acetylation Landscape Transitions that Dictate Muscle Stem Cell Function. *Cell Reports*, 27(13). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.092>
- Zegerman, P., Canas, B., Pappin, D., & Kouzarides, T. (2002). Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 11621–11624. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200045200>
- Zhang, N. (2018). Role of methionine on epigenetic modification of DNA methylation and gene expression in animals. In *Animal Nutrition* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.009>

- Zhong, Q., & Kowluru, R. A. (2011). Diabetic retinopathy and damage to mitochondrial structure and transport machinery. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(12).  
<https://doi.org/10.1167/iovs.11-8045>
- Zhong, Q., & Kowluru, R. A. (2013a). Epigenetic modification of Sod2 in the development of diabetic retinopathy and in the metabolic memory: Role of histone methylation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(1). <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10854>
- Zhong, Q., & Kowluru, R. A. (2013b). Regulation of matrix metalloproteinase-9 by epigenetic modifications and the development of diabetic retinopathy. *Diabetes*, 62(7).  
<https://doi.org/10.2337/db12-1141>



# Anexo

## DESARROLLO DE UN MÉTODO SIMPLIFICADO PARA DETECTAR SARS-CoV-2 EN SALIVA SIN PURIFICAR ARN

Colaboradores:

Biólogo. Brandon Bustos García (IFC)  
Dra. Sylvia Garza Manero (IFC)  
Dra. Nallely Cano Domínguez (IFC)  
Dr. Santiago Ávila Ríos (INER-CIENI)  
Dra. Dulce López Sánchez (INER-CIENI)  
Dr. Alfonso Salgado Aguayo (INER)

Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez  
Investigador Titular  
Instituto de Fisiología Celular – UNAM

## 1. IMPORTANCIA DEL TRABAJO

Aunque la detección de SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real es la prueba más sensible y confiable para diagnosticar la COVID-19, tiene una serie de desventajas: se requiere de purificar el material genético de la muestra, (en este caso ARN viral) mediante kits especializados que incrementan considerablemente los costos, el tiempo de procesamiento y que requieren de instalaciones con medidas de bioseguridad adecuadas y de equipo de protección personal para los técnicos que procesan las muestras. Por otro lado, históricamente se ha trabajado con muestras de hisopados nasofaríngeos, requiriéndose de personal especializado para la toma de muestra, instalaciones dedicadas y de equipo de protección personal dado el enorme riesgo que representa el tomar estas muestras para el personal de salud. Por otro lado, las nuevas variantes del virus y el hecho de que aun con el esquema de vacunación completo las personas pueden seguir infectándose y transmitiendo la enfermedad, resulta relevante mejorar y optimizar los procesos de detección de SARS-CoV-2 tanto para diagnóstico como para monitoreo epidemiológico.

Ante este escenario, en nuestro laboratorio nos dimos a la tarea de **desarrollar un método sencillo, rápido, confiable y económico** que permitiera detectar el material genético de SARS-CoV-2 mediante PCR en tiempo real directamente en muestras de saliva sin la necesidad de purificar ARN a la par de reducir al mínimo los riesgos de bioseguridad. Para esto desarrollamos un buffer de inactivación de saliva que permite detectar el material genético del virus por PCR a la par de que la muestra es esterilizada por calor. Además, ideamos un protocolo que permite el **auto-muestreo** utilizando tubos capilares, es decir que la persona coloque su propia saliva en un tubo antes de la inactivación de la muestra con calor. Esto tiene la ventaja de eliminar al personal especializado para la toma de muestra y el equipo de protección personal. Además, nuestro buffer elimina la necesidad del uso de kits comerciales reduciendo drásticamente los costos (el costo por muestra de nuestro buffer ronda en los \$1.4 pesos vs. más de \$100 pesos del protocolo comercial) y reduce el **tiempo de procesamiento de la muestra a 10 minutos**. Además, hemos optimizado el protocolo de PCR para detectar la presencia de dos genes virales y un gene endógeno humano en la misma reacción (mediante el uso de 3 fluorocromos distintos), lo que reduce los costos a 1/3 pues se requiere de 1 reacción de PCR en tiempo real en vez de 3 por cada muestra.

Nuestro protocolo puede ser aplicado en cualquier población en riesgo, incluso permitiendo el monitoreo de casos en población asintomática. Además, al reducir drásticamente el riesgo biológico-infeccioso de manejar muestras, nuestro protocolo puede ser implementado en un mayor número de escenarios. Por otro lado, hemos realizado las pruebas de estabilidad a distintas temperaturas y sabemos que tanto nuestro buffer como las muestras de saliva ya inactivadas con él, son estables antes y posterior a su inactivación, lo que permitiría que nuestro protocolo sea implementado en poblaciones poco accesibles previo al envío de las muestras. Nuestro protocolo y buffer ha sido comparado de manera pareada con el método tradicional de purificar ARN utilizando el kit Qiagene a partir de muestras de saliva de más de 60 pacientes diagnosticados con COVID-19 del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) encontrando que hay una excelente correlación entre ambos métodos detectando a más del 80% de las muestras con nuestro buffer y con un coeficiente de correlación de Pearson entre los dos genes virales (N1 y N2) mayor a 0.9,  $p < 0.001$  con nuestro protocolo, lo que valida su utilización para el diagnóstico; de hecho estamos trabajando para implementar nuestro protocolo en distintas dependencias de la Universidad, obtener una patente y enviar a publicar nuestros resultados.

Así pues, hemos desarrollado un protocolo sencillo, económico, rápido y confiable para detectar a SARS-CoV-2 en saliva por PCR en tiempo real sin necesidad de purificar ARN. Aunque la vacunación avance, es esencial contar con este tipo de opciones diagnósticas dada la aparición de nuevas variantes y la evidencia que indica que aun personas vacunadas son susceptibles de infectarse y transmitir al virus.

## 2. ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y ALCANCE

No hace falta describir el terrible impacto que la pandemia provocada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 ha tenido en todo el planeta y en particular en México. Aunque la vacunación masiva es la estrategia más efectiva para aminorar los efectos de la pandemia de COVID-19, igual de importante es contar con la capacidad para realizar pruebas diagnósticas **eficaces, confiables, sencillas, rápidas y económicas**. En este sentido, la OMS ha hecho repetidos llamados a aumentar la capacidad para realizar pruebas diagnósticas en todo el mundo, tanto para diagnóstico como para vigilancia, sobre todo tomando en cuenta el alto porcentaje de asintomáticos (hasta un 30%) que pueden transmitir la enfermedad sin señal de alarma<sup>1</sup>. Aunque existen distintos métodos para diagnosticar a SARS-CoV-2, no cabe duda de que el estándar de oro es la detección de su material genético mediante PCR en tiempo real, pues esta es la prueba que tiene la mayor sensibilidad y confiabilidad pudiendo detectar unas cuantas moléculas de ARN viral de manera específica<sup>2,3</sup>.

Sin embargo, el implementar la PCR en tiempo real es una metodología costosa, relativamente tardada y que requiere de instalaciones dedicadas y del uso de equipo de protección personal tanto para el personal que toma la muestra como el que las procesa<sup>2,3</sup>. Por otro lado, tradicionalmente se toman muestras de hisopados nasofaríngeos para el diagnóstico de SARS-CoV-2, sin embargo, trabajos recientes han demostrado que la saliva es un extraordinario sustrato para detectar al virus y que incluso las cargas virales en saliva pueden ser más altas que en hisopados<sup>4,6</sup>. Esto quizás se deba a que las glándulas salivales expresan al receptor Ace2 que utiliza el virus para internalizarse<sup>7</sup>. La alta carga viral en la saliva, en parte explicaría lo contagioso de la enfermedad COVID-19 y la razón de que el uso de cubre bocas puede aminorar su transmisión. Sea cual sea el sustrato para realizar la detección del material genético de SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real, es necesario purificar el ARN viral de la muestra lo que requiere de costos kits de extracción que incluso han estado en desabasto y que además requieren de instalaciones certificadas en bioseguridad y de equipo de protección personal para su uso.

Ante este panorama, en este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos para desarrollar un método simplificado que permite detectar por PCR en tiempo real la presencia de SARS-CoV-2 sin purificar ARN mediante el auto muestreo de saliva y su posterior inactivación por calor reduciendo al máximo el tiempo y los requerimientos de bioseguridad y equipo de protección personal:

**OBJETIVO GENERAL:** Establecer un método simplificado, económico, confiable y rápido que permita el auto-muestreo para detectar la presencia de SARS-CoV-2 en saliva por PCR en tiempo real sin necesidad de purificar ARN

**OBJETIVO PARTICULAR:** Desarrollar un buffer que permita lisar saliva para liberar ARN viral, pero previniendo la degradación del material genético del virus al mismo tiempo que se permita su inactivación y establecer las condiciones multiplexing para detectar en una sola reacción de PCR la presencia de dos genes virales y un gene endógeno humano.

**ALCANCES:** Nuestro método optimizado de detección de SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real en saliva puede ser implementado prácticamente en cualquier circunstancia con múltiples ventajas: en laboratorios de diagnóstico tiene la ventaja de reducir costos, disminuir drásticamente el tiempo necesario para procesar una muestra (10 min) y minimizar el riesgo biológico infeccioso pues la saliva es inactivada por calor previo a ensamblar las reacciones de PCR. Esto permite que cualquier laboratorio de biología molecular pueda llevar a cabo el monitoreo de SARS-CoV-2 aun sin contar con las instalaciones BSL3 recomendadas para trabajar con patógenos respiratorios. Por otro lado, el que nuestro protocolo permita el "auto muestreo" en donde la persona deposita su propia saliva directamente en el tubo de PCR elimina la necesidad de personal de salud especializado para la toma de muestra lo que una vez más reduce costos y reduce riesgos de contagio entre el personal. Finalmente, el buffer de inactivación de saliva que hemos desarrollado previene la degradación del ARN al incorporar inhibidores de RNasas y agentes estabilizadores. Esto incluso permite que nuestro buffer pueda ser distribuido y

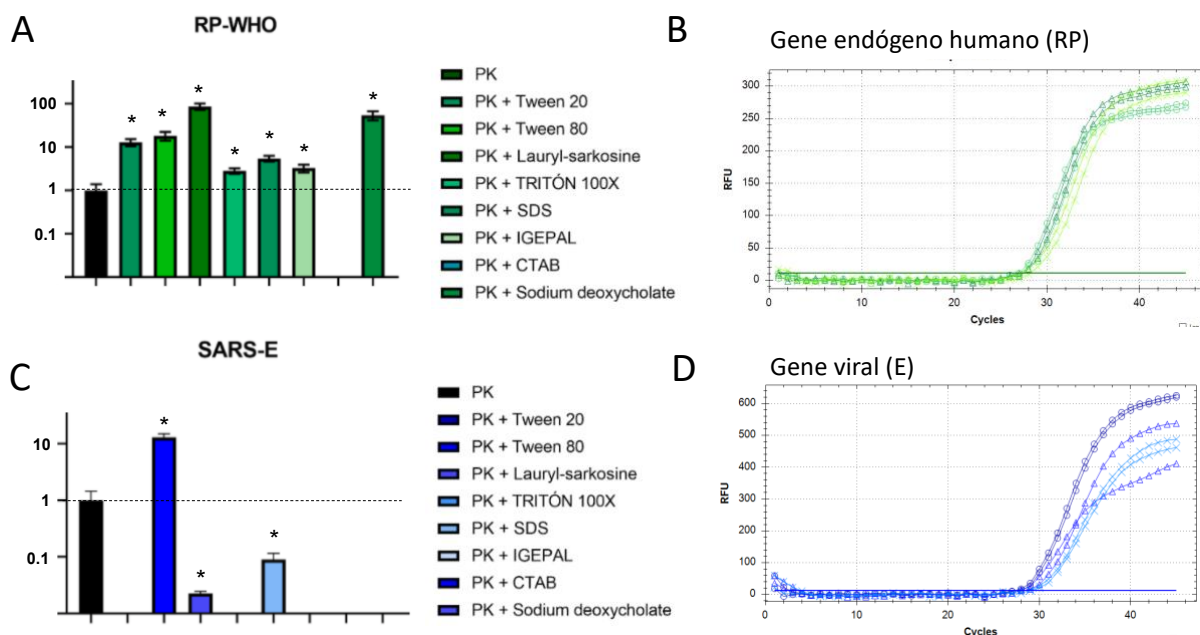
almacenado a temperatura ambiente, y que una vez que tiene la saliva se tiene una ventana de entre 12 y 24 hrs para entregar las muestras para su inactivación por calor, y una vez inactivadas las muestras pueden ser almacenadas en congelación por varios días antes de correr los PCR. Esto tiene la enorme ventaja de que nuestro método podría ser implementado en poblaciones poco accesibles, permitiendo el envío del buffer, la auto toma de muestra y el posterior envío de la muestra de saliva en nuestro buffer al laboratorio de diagnóstico sin sacrificar sensibilidad de manera considerable. Las ventajas del costo reducido, auto muestreo, estabilidad en el transporte y reducción de tiempo, permiten que nuestro protocolo pueda ser implementado en un gran número de personas, permitiendo no solo el diagnóstico del coronavirus SARS-CoV-2, sino de acciones de monitoreo y vigilancia epidemiológica en población de riesgo, por ejemplo, en ambientes hospitalarios, educativos o incluso laborales. Esto es de particular relevancia dado el alto número de asintomáticos reportados que pueden ser la vía para propagar la COVID-19 en dichos espacios<sup>1</sup>. Por otro lado, ante el surgimiento de nuevas variantes que pueden escapar a las estrategias de vacunación<sup>8</sup>, o bien el hecho de que aun las personas vacunadas pueden transmitir la enfermedad<sup>9</sup>, el contar con más y mejores estrategias de diagnóstico de SARS-CoV-2 sin duda puede ayudar a frenar el avance de la pandemia de COVID-19.

### **3. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROYECTO: METODOLOGÍAS EMPLEADAS Y RESULTADOS OBTENIDOS**

#### **DESARROLLO DE UN BUFFER DE INACTIVACIÓN DE SALIVA COMPATIBLE CON qPCR**

Tradicionalmente la detección del coronavirus SARS-CoV-2 se realiza en hisopados nasofaríngeos similar a la detección del virus de influenza. Sin embargo, existe evidencia de que SARS-CoV-2 puede infectar las glándulas salivales dado que estas tienen al receptor ACE2<sup>7</sup>. Por otro lado, diversos grupos han reportado que las cargas virales de SARS-CoV-2 pueden llegar a ser incluso más altas en saliva que en hisopados nasofaríngeos sobre todo al inicio de la enfermedad<sup>4-6</sup>. Mientras que para la toma de hisopados nasofaríngeos se requiere de personal entrenado especializado y representa un alto riesgo de infección para el que toma la muestra, la saliva resulta una alternativa mucho más conveniente.

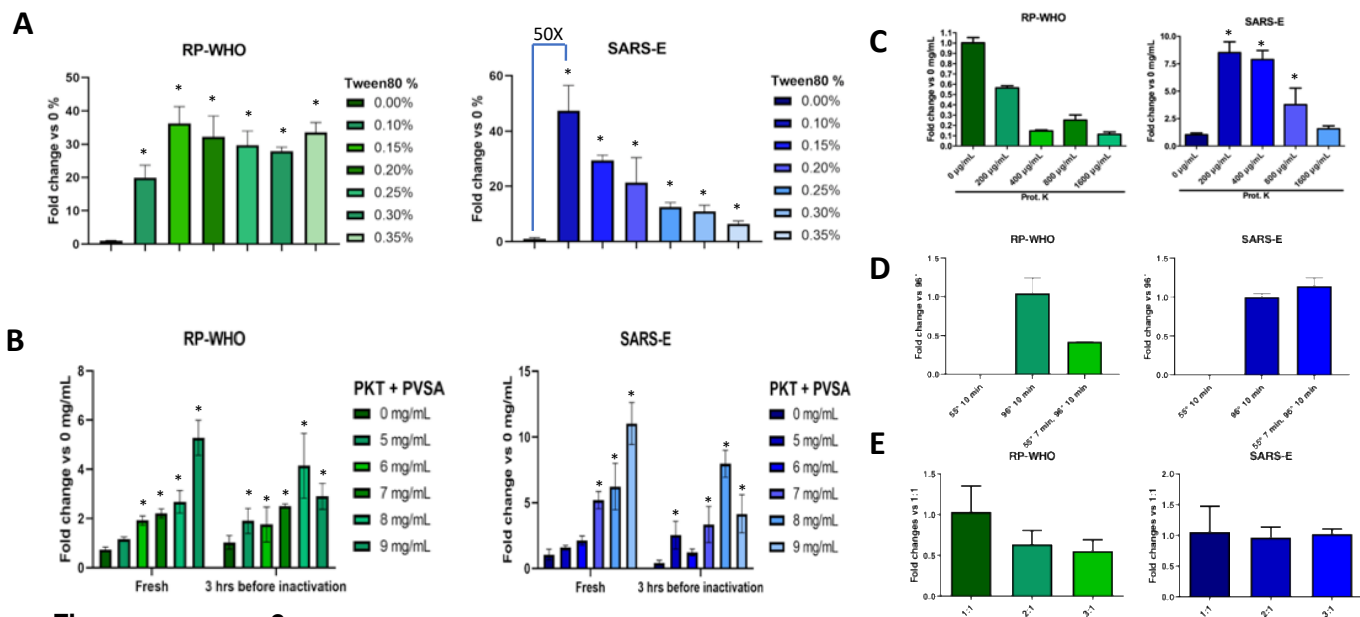
En este trabajo realizamos un tamizaje para diseñar un buffer que permitiera lisar la saliva para liberar el material genético (ARN de SARS-CoV-2) al mismo tiempo que evitara la degradación del ARN y sea compatible con la PCR en tiempo real. Para este tamizaje utilizamos de saliva COVID+ de pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y partimos de un buffer de fosfatos al cual agregamos Proteinasa K con el objetivo de degradar las RNAsas presentes en la saliva. Además, agregamos distintos detergentes para ayudar a lisar las células y liberar el ARN viral. La muestra de saliva fue mezclada con el buffer en una proporción 2:1 e inactivada a 96 ° C para esterilizar la muestra, posteriormente 2 uL de la mezcla saliva:buffer fueron utilizados directamente en la reacción de PCR sin realizar ningún protocolo adicional de purificación de ARN. Para evaluar la presencia de material genético se utilizaron las secuencias de oligonucleótidos aprobados y recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para detectar la presencia del gene viral E de SARS-CoV-2 y RNasa P humana (RP) como control endógeno<sup>10</sup>. Como se puede ver en la Figura 1, el buffer con Proteinasa K (PK) permite la detección tanto del gene viral E como del endógeno RP; agregar detergentes mejora considerablemente la detección de RP en todos los casos (excepto el detergente CTAB) (Figura 1A). En el caso del gene viral E sólo el detergente Tween 80 mejora su detección, de hecho, la adición de este detergente aumenta más de 10 veces la detección del gene E mediante PCR en tiempo real (Figura 1C). Interesantemente la adición de los otros detergentes inhibe la detección del gene viral E, esto quizás debido a que el ARN viral se encuentra en vesículas dentro de las células que hacen que se comporte diferente a los ARN endógenos, o bien a que los oligonucleótidos de la OMS para RP no diferencian ARN de ADN, por lo que quizás se detecte señal genómica adicional. Estos resultados demuestran logramos identificar que el detergente Tween 80 permite la detección en saliva del gene viral E de SARS-CoV-2 sin necesidad de purificar ARN y que es compatible con RT-qPCR.



**Figura 1. Tamizaje de detergentes para detectar genes por RT-qPCR en saliva.** Saliva de pacientes diagnosticados con CODIV-19 en el INER fue mezclada en una proporción 1:2 con buffer de fosfatos con Proteinasa K (PK) más distintos detergentes al 0.25%. La muestra fue esterilizada por calor (10 min a 96 °C) y 2 uL utilizados directamente en una reacción de 10 uL *one-step* de PCR en tiempo real (RT-qPCR) utilizando sondas TaqMan para detectar el gene humano RNasa P como control endógeno, o al gene E de SARS-CoV-2. En **A** se muestra la razón de cambio (fold change) del gene hRP normalizado a la señal del buffer con Proteinasa K y en **B** se muestran las curvas de amplificación de las primeras tres condiciones. En **C** se muestra la razón de cambio (fold change) del gene viral E respecto a no usar detergentes y en **D** las curvas de amplificación correspondientes. Las secuencias de oligonucleótidos y sondas son las recomendadas por la World Health Organization (WHO) / OMS. \*  $p < 0.01$

Una vez que definimos que Tween 80 es el mejor detergente, decidimos optimizar su concentración. Para esto realizamos una curva de concentración de Tween 80 de 0.1% a 0.35% en el buffer de inactivación de saliva. Nuestros resultados mostraron que variaciones en la concentración de Tween 80 tienen muy poco impacto en la detección por qPCR del gene endógeno hRP, pero disminuir su concentración tiene un efecto altamente positivo en la detección del gene viral E (Figura 2A), de hecho, disminuir su concentración a 0.1% aumenta 50 veces la detección de este gene viral en comparación a no usar detergente.

Una preocupación de utilizar saliva para detectar a SARS-CoV-2 es la estabilidad del ARN en la muestra dada la presencia de RNasas. Por esta razón decidimos agregar ácido polivinil sulfónico (PVSA, por sus siglas en inglés) a nuestro buffer, el PVSA es un inhibidor químico de RNasas de bajo costo que aumenta la estabilidad de ARN a temperatura ambiente en lisados celulares<sup>11</sup>. Nuestros resultados de una curva de concentración de PVSA en el buffer con Tween 80 mostraron que agregar este inhibidor a una concentración de 8 mg/mL mejora considerablemente la detección de hRP y el gene viral E en saliva COVID-19+: hasta 5 veces más hRP y 10 veces más el gene viral E en comparación a no agregar el inhibidor (Figura 2B). El efecto protector de agregar PVSA se observa tanto en la mezcla fresca de saliva más buffer, como cuando se ha incubado saliva más buffer hasta por 3h a temperatura ambiente previa inactivación por calor (Figura 2B). **Esto demuestra que el buffer desarrollado que contiene Proteinasa K, Tween 80 y PVSA no solo es compatible con el RT-qPCR para detectar a SARS-CoV-2 en saliva sin purificar ARN, sino que protege la estabilidad de la muestra previniendo su degradación.**



**Figura 2.**

**Optimización del buffer de inactivación de saliva para detectar a SARS-CoV-2.** Saliva COVID-19 positiva fue mezclada 2:1 con buffer de fosfatos con Proteinasa K y Tween 80; la mezcla fue inactivada 10 min a 96 °C y 2 uL usados en la reacciones de 10 uL one-step de RT-qPCR para detectar el gene endógeno humano RP (verde) y el gene viral E (azul) utilizando sondas TaqMan validadas por la OMS/WHO. En **A** se presenta la razón de cambio (fold change) de distintas concentraciones de Tween 80 en comparación a no usar detergente. De la misma manera, en **B** se ensayaron distintas concentraciones del inhibidor de RNasas PVSA (ácido polivinil sulfónico) en la mezcla de saliva más buffer fresco, o bien incubado 3h a temperatura ambiente antes de inactivar por calor. En **C** se ensayaron distintas concentraciones de Proteinasa K y en **D** distintos protocolos de inactivación por calor. En **E**: se ensayaron distintas proporciones de saliva y buffer en las condiciones optimas definidas. \* p < 0.01

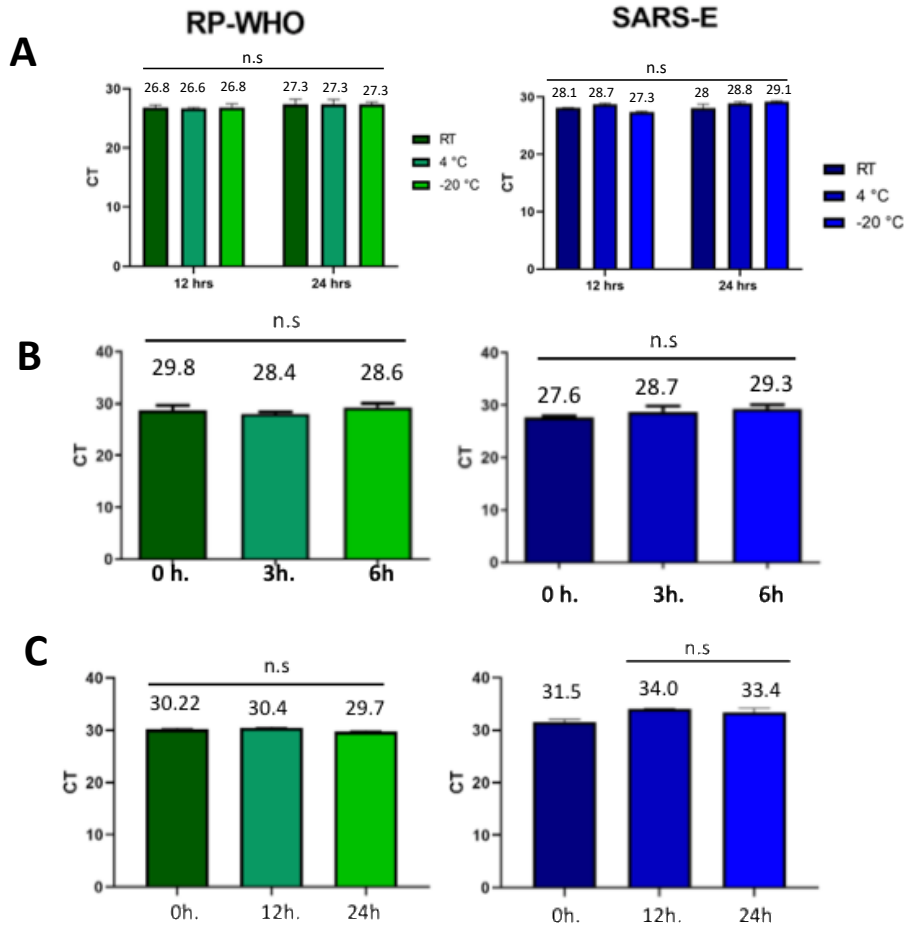
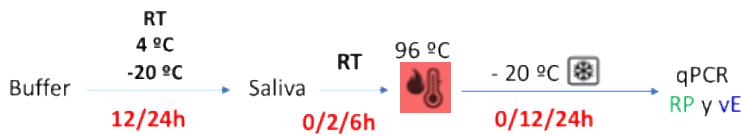
Posteriormente, decidimos realizar una ultima optimización del buffer mediante una curva de concentración de Proteinasa K y de temperaturas de inactivación de la mezcla saliva más buffer. Nuestros resultados mostraron que de hecho, agregar Proteinasa K disminuye la detección del gene humano RP, pero mejora considerablemente la detección del gene viral E, siendo que la concentración más baja ensayada (200 ug/mL) aumenta 900% la detección del gene viral (Figura 2C). Dado que la señal de hRP suele ser siempre muy robusta bajo cualquier circunstancia decidimos favorecer la detección del gene viral para tener un buffer optimizado para detectar la presencia de SARS-CoV-2 en saliva. En cuanto a las condiciones de inactivación se ensayaron tres: 50 °C por 10 minutos (temperatura recomendada para la Proteinasa K), 96 °C por 10 minutos que se ha reportado elimina al virus en muestras humanas<sup>12</sup> y un protocolo híbrido de 7 min a 50 °C seguido de 10 min a 96 °C. Nuestros resultados muestran que 50 °C no permite la detección de ninguno de los dos genes (RP o E), probablemente debido a que la Proteinasa K permanece activa degradando a la retrotranscriptasa y Taq polimerasa imposibilitando la RT-PCR. También definimos que en cuanto a la detección del gene viral E, no hay diferencias estadísticamente significativas entre el protocolo híbrido (55/95 °C) y 10 min a 96 °C, (Figura 2D) por lo que decidimos optar por este ultimo para asegurar la esterilización de la muestra y reducir el riesgo biológico infeccioso. Finalmente, también ensayamos distintas proporciones saliva a buffer (1:1, 2:1 y 3:1), encontrando que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Figura 2E) por lo que decidimos optar por una proporción 2:1 (saliva a buffer) para experimentos posteriores.

Así pues, nuestros resultados demuestran que hemos optimizado un buffer y condiciones experimentales que permiten detectar la presencia de SARS-CoV-2 por RT-qPCR en saliva sin purificar ácidos nucleicos y que además protege la estabilidad del ARN, lo cual es relevante desde el punto de vista de manejo de muestras en un contexto de diagnóstico. Cabe mencionar que el costo de nuestro buffer ronda en \$1.40 MN por muestra, que es diametralmente menor a utilizar kits comerciales para purificar ARN (\$120 MN por muestra según costo publicado en internet en la pagina oficial de Qiagen). La reducción en el costo, aunado a que nuestro protocolo sólo requiere de 10 minutos de inactivación representan una clara ventaja y optimización al método original.

## **PRUEBAS DE ESTABILIDAD Y AUTO TOMA DE MUESTRA**

Una vez optimizado nuestro protocolo, decidimos evaluar que tan estable es tanto el buffer en si, como la saliva antes y después a la inactivación por calor (Figura 3, esquema superior). Para esto, primero evaluamos que tan estable es el buffer si este se almacena a distintas temperaturas (temperatura ambiente, 4°, -20 °C) durante 12 y 24 hrs. previo a agregar la saliva: nuestros resultados muestran que los valores de Ct tanto del gene hRP como el viral E no son estadísticamente diferentes, por lo que concluimos que nuestro buffer es estable y tiene una vida de anaquel aceptable (Figura 3A). Posteriormente nos preguntamos que tan estable es la saliva mezclada con el buffer previo a la inactivación por calor, encontrando que no hay diferencias considerables entre los valores de Ct por lo menos entre 0, 3 y 6h manteniendo las muestras a temperatura ambiente (Figura 3B). Finalmente, analizamos que tan estable es la muestra posterior a la inactivación por calor (10 min a 96 °C). Nuestros datos señalan que no hay diferencias entre 0, 12 y 24h en cuanto al gene endógeno hRP, (Figura 3C) y que solo hay una disminución de 2 Ct entre 24h y 0h del valor de Ct del gene viral E (Figura 3C).

En conjunto estos resultados demuestran que el buffer que desarrollamos es estable a cualquier temperatura de almacenamiento, que el material genético se preserva a temperatura ambiente hasta por 6 hrs previo a la inactivación por calor y que posterior a la inactivación por calor las muestras pueden ser analizadas por RT-PCR en las primeras 12 hrs si se almacenan a -20 °C. Estas características hacen de nuestro buffer altamente atractivo para realizar auto muestreo en casa o en lugares de trabajo y el posterior análisis en laboratorios de diagnóstico.

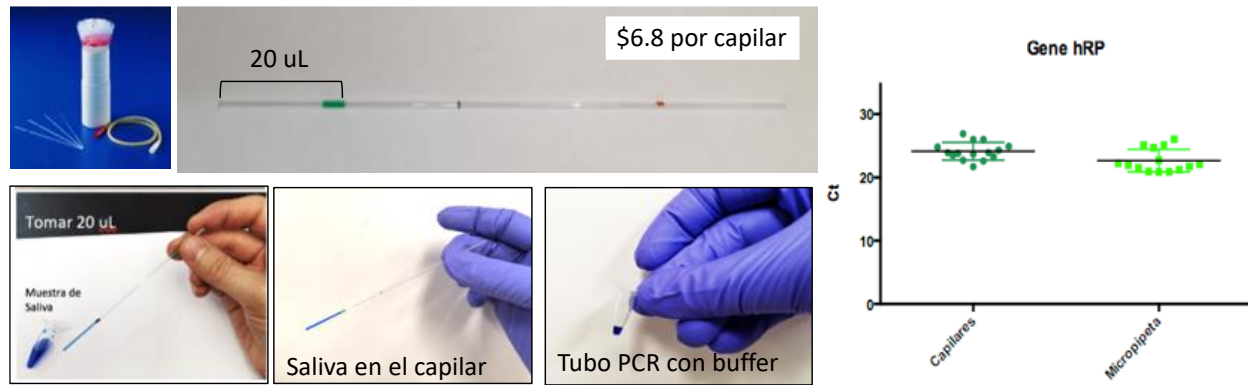


**Figura 3. Estabilidad del buffer y las muestras con saliva.** Mediante RT-qPCR se evaluó la señal (Ct) del gene humano RP y el gene viral E en saliva de pacientes diagnosticados con COVID-19 en el INER. **A.** Para evaluar la vida de anaquel de buffer, este se almaceno a distintas temperaturas durante 12 y 24 hrs previo a agregar saliva. En **B** se evaluó la estabilidad de la mezcla de saliva y buffer (2:1) a temperatura ambiente en los tiempos indicados previo a la inactivación con calor, y en **C**, posterior a la inactivación por calor cuando las muestras son almacenadas a –20 °C. Los números sobre las barras es el promedio de los valores de Ct obtenidos de triplicados. Los oligonucleótidos y las sondas son las aprobadas por la OMS. n.s.: no significativo.

Finalmente, consideramos que una manera que reducir el riesgo biológico infeccioso de procesar muestras sería si se pudiera establecer algún método de auto toma de muestra. Para esto validamos el uso de distintos tubos capilares encontrando que los capilares calibrados de 50 uL (SIGMA P1049) son ideales pues tienen una marca de fábrica justo a lo que corresponde a 20 uL. Por lo tanto, definimos que distribuir 10 uL buffer en tubos de PCR permite que la personas tome, de manera autónoma 20 uL de saliva (para mantener la proporción 2:1 de saliva buffer) y colorar su propia muestra de saliva directamente en un tubo de PCR con el buffer (Figura 4). Este tubo con la muestra de saliva puede ser posteriormente inactivado en un termociclador (10 min a 96 °C) para esterilizar la muestra antes de tomar una alícuota de esta para la reacción de RT-qPCR. También corroboramos que no hay diferencias por lo menos en los valores de Ct de hRP si la saliva se toma con un capilar o bien con micropipeta



(Figura 4, gráfica). Realizar esta metodología elimina por completo el pipeteo y manejo de muestras de saliva, lo que para el personal que realiza las pruebas representa una enorme ventaja pues se minimiza al máximo el riesgo de contagio. De hecho, este protocolo de auto toma de muestra con capilares permite que nuestro protocolo pueda ser implementado en prácticamente cualquier laboratorio de Biología Molecular que tenga acceso a un termociclador para inactivar las muestras. Esto representa una ventaja en términos de costos de equipo de protección personal, personal especializado de toma de muestra e instalaciones BSL3.

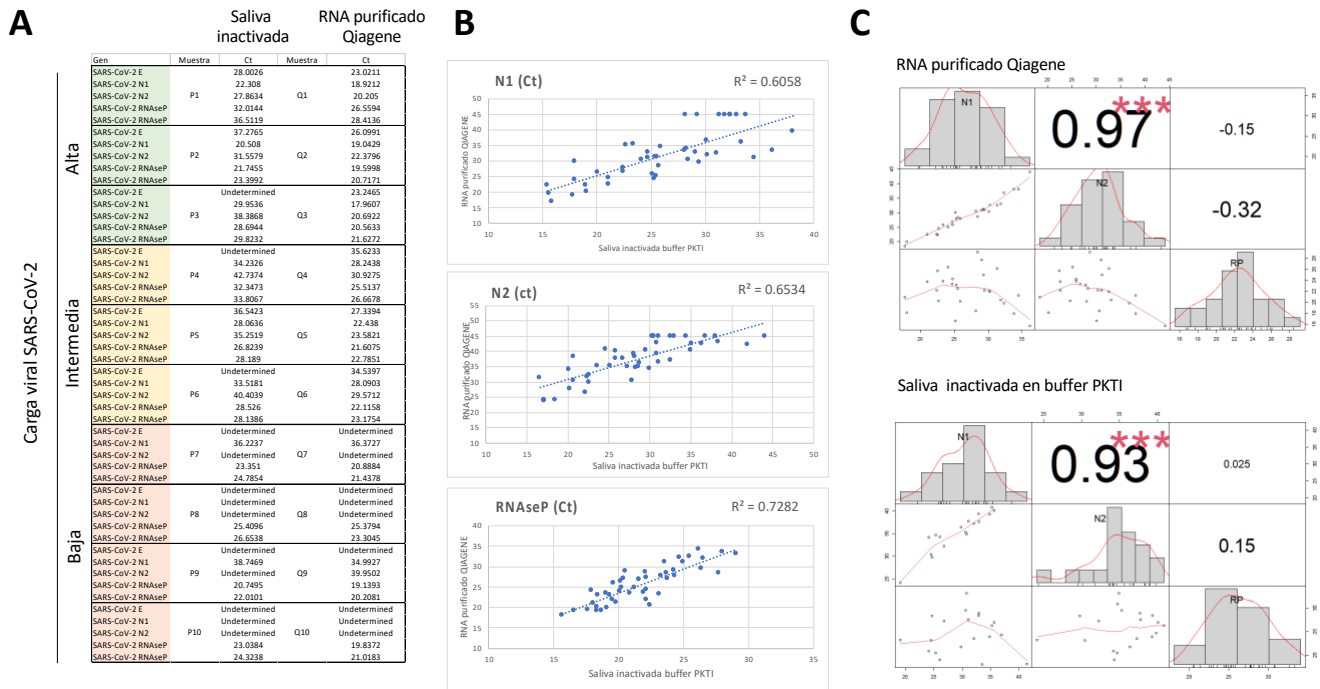


**Figura 4. Estrategia de auto toma de muestra.** Para minimizar riesgos biológicos infecciosos diseñamos un protocolo en la que se usan tubos capilares graduados para tomar 20 uL de saliva y colocarla en un tubo de PCR que ya tiene 10 uL buffer de inactivación de saliva. En la gráfica de la derecha se muestra el valor de Ct del gene humano RP de saliva tomada con capilar o micropipeta no habiendo diferencias estadísticas en los valores.

#### VALIDACIÓN EN SALIVA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON COVID-19 EN EL INER

Para validar que nuestro buffer y protocolo son confiables, decidimos comparar nuestro buffer de inactivación vs. el protocolo aprobado por la OMS y validado por el INDRE que es la extracción de ARN utilizando el kit QIAmp Viral RNA mini Kit (Qiagene). Esto se realizó en colaboración con el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del INER. El proyecto fue revisado y aprobado por el Comité de Ética y Comité de Ética en Investigación del INER (código B12-20). Todos los participantes dieron consentimiento escrito para el uso de muestras de saliva para la realización de pruebas de diagnóstico de SARS-CoV-2. Para comparar nuestro buffer con el kit de Qiagene, muestras de saliva congelada de pacientes con COVID-19 que previamente habían sido diagnosticados por PCR fueron descongeladas y separadas en dos: 200 uL de saliva fueron extraídos utilizando las columnas comerciales del kit de Qiagene, y 20 uL fueron inactivados en nuestro buffer con Proteinasa K, Tween 80 e inhibidor PVSA en un proporción 2:1. Para evaluar la detección de la carga viral se utilizó el protocolo del Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos que evalúa al gene viral N mediante dos juegos de oligonucleótidos (N1 y N2)<sup>13</sup>; a la par también evaluamos el gene viral E y el endógeno humano RP (Figura 5). Los valores de Ct observados son mayores utilizando nuestro buffer en comparación a los obtenidos a partir de ARN purificado. Esto probablemente se deba a la cantidad de material genético por reacción es distinta: mientras que en el caso de nuestro buffer es el equivalente a 3.3 uL de saliva, al purificar el ARN se concentra la muestra y se pone el equivalente a 20 uL de saliva por reacción, es decir 6 veces más. Sin embargo, observamos que nuestro método es capaz de identificar como muestras positivas a todas las muestras con carga viral media y alta (Figura 5A), y en el caso de carga viral baja, solo una muestra (número 9) no hubiera sido detectada como positiva evaluando a N1 y N2. Ante este resultado decidimos aumentar el número de muestras analizadas a 45 salivas más evaluadas por ambos protocolos de manera pareada (Figura 5B) encontrando que tanto para N1 como N2 nuestro buffer detecta al 80% de las muestras como positivas para SARS-CoV-2 con una  $R^2$  mayor a 0.6 en todos los casos. También calculamos el índice de correlación de Pearson (R) entre N1 y N2 en ambas

condiciones el cual es extremadamente alto: 0.97 y 0.93 a partir de ARN y nuestro buffer, respectivamente (Figura 5C). Esto demuestra que hay excelente correlación entre resultados obtenidos con N1 y N2, tanto si se purificó la muestra con el kit Qiagene, como si sólo se trató con nuestro buffer.

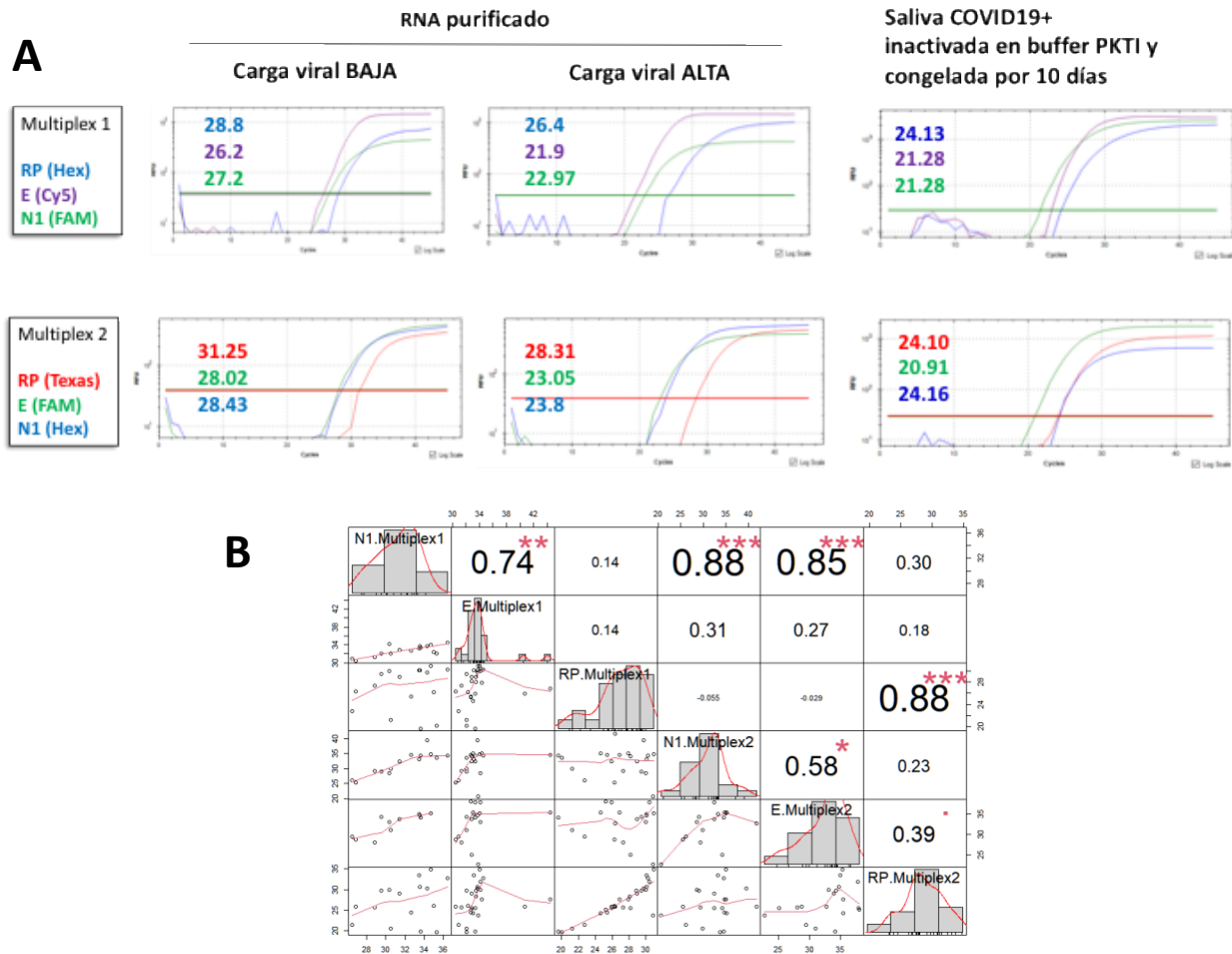


**Figura 5. Comparación entre protocolos en pacientes diagnosticados con COVID-19.** Muestras de saliva de pacientes con COVID-19 del INER fueron desangradas y 200 uL purificados con el Kit de extracción de ARN de Qiagene y 20 uL inactivadas con nuestro buffer PKTI (Proteinasa K, Tween 80, Inhibidor). La presencia de genes virales (E, N1 y N2) y el gene endógeno RP fue evaluada por RT-qPCR utilizando las secuencias y sondas validadas por el CDC y la OMS. N=83. **A:** Se muestran los valores de Ct de 10 muestras con distinta carga viral evaluada con nuestro buffer de inactivación o en ARN purificado con kit Qiagene. **B:** valores comparados de Ct de 45 salivas evaluando N1 y N2 de ambos protocolos mostrando la regresión lineal y el valor de  $R^2$ . **C:** Análisis de correlación de Pearson en 28 muestras. El número indica el valor del coeficiente de correlación, \*\*\* < 0.001. Podemos ver que hay excelente correlación entre resultados obtenidos con N1 y N2, tanto si se purificó la muestra con el kit Qiagene, como si sólo se trató con PKTI. Como era esperado, RP no parece tener correlación ni con N1 ni con N2.

### PROTOCOLO MULTIPLEX PARA DETECTAR DOS GENES VIRALES Y UN GENE ENDÓGENO HUMANO EN LA MISMA REACCIÓN DE RT-qPCR.

Tradicionalmente la detección de los distintos genes virales se realiza en reacciones de PCR separadas por lo que para diagnosticar a SARS-CoV-2 se requieren de 3 reacciones: 2 genes virales y un gene endógeno humano. Sin embargo, los termocicladores modernos permiten utilizar distintas sondas TaqMan marcadas con distintos fluorocromos para realizar ensayos multiplexados donde es posible detectar a varios genes en la misma reacción. Para optimizar la detección de SARS-CoV-2 y disminuir costos nos dimos a la tarea de optimizar las concentraciones de oligonucleótidos y sondas TaqMan para generar dos protocolos multiplexados de RT-qPCR que permitieran detectar a los genes virales E y N1 junto con el gene humano RP en la misma reacción (Figura 6). Actualmente hemos logrado optimizar las condiciones para dos protocolos distintos que utilizan diferentes

combinaciones de fluoróforos en las sondas, pero ambos son capaces de detectar los tres genes de manera eficiente en RNA purificado de muestras de saliva con alta o baja carga viral. Además, corroboramos que ambos protocolos multiplex funcionan en saliva COVID19+ que fue procesada con nuestro buffer de inactivación y posteriormente congelada (Figura 6A). Ambos protocolos multiplex fueron evaluados en 28 muestras de ARN y el coeficiente de correlación de Pearson calculado (Figura 6B) encontrando que hay una buena correlación entre N1 y E en ambos protocolos, siendo mejor el múltiples 1 ( $R = 0.74$ ) que el 2 ( $R=0.58$ ), aunque la correlación de N1 es excelente ( $R=0.88$ ) entre ambos (Figura 6B).



**Figura 6. Protocolo multiplexado para detectar a SARS-CoV-2.** Distintas combinaciones de sondas marcadas con FAM, HEX, Cy5 o Texas Red fueron estandarizadas para detectar al gene endógeno humano RP y los genes virales N1 y E de SARS-CoV-2 en salivas de pacientes diagnosticados con COVID-19 del INER. **A:** se muestran las curvas de amplificación de RNA purificado con el kit de Qiagene o de saliva COVID-19+ inactivada con nuestro buffer PKTI (Proteinasa K, Tween 80, inhibidor PVSA). Los números en las gráficas son el valor de Ct obtenido en la reacción one-step de RT-qPCR. Las secuencias de oligonucleótidos y sondas son las aprobadas por el CDC y la OMS. **B:** Análisis de correlación de Pearson de 28 muestras comparando ambos protocolos multiplex en ARN purificado. El número indica el valor del coeficiente de correlación. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

4. EN CASO DE TRATARSE DE UN TRABAJO EN DESARROLLO, ESPECIFICAR LA ETAPA EN LA QUE SE ENCUENTRA Y LOS ÚLTIMOS RESULTADOS OBTENIDOS.

Consideramos que este trabajo ha sido prácticamente concluido basado en que el protocolo y buffer ha sido ensayado en un número considerable de salivas COVID-19 positivas de pacientes del INER. Cabe mencionar que se cuenta con los protocolos aprobados por los comités de ética del INER y todos los pacientes firmaron cartas de consentimiento informado. Actualmente estamos por completar un total de 60 pacientes para así tener suficiente poder estadístico para enviar a publicar nuestro trabajo a una revista indexada internacional. Por otro lado, estamos asesorando a varios grupos dentro de la UNAM para aplicar nuestro protocolo como una herramienta de vigilancia epidemiológica en protocolos de investigación (aunque no diagnóstico puesto que no ha sido aprobado por el INDRE). Finalmente, también estamos en pláticas con autoridades universitarias para registrar la patente de nuestro buffer que permite detectar a SARS-CoV-2 en saliva sin necesidad de purificar ARN.

#### 5. RECURSOS HUMANOS FORMADOS, EVITANDO LA MENCIÓN DE NOMBRES PROPIOS, TANTO DE LOS RECURSOS HUMANOS FORMADOS COMO DE LOS INVESTIGADORES.

Este proyecto es un ejemplo de cooperación interinstitucional entre varios investigadores del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (Secretaría de Salud). En este proyecto se han sumado las habilidades de investigadores con amplia experiencia en biología molecular e investigadores clínicos que están participando en la vigilancia epidemiológica de la pandemia de la COVID-19 en México. Completar este trabajo fue gracias a la sinergia entre estos investigadores que era lo que se requería para obtener resultados de manera rápida dada la emergencia sanitaria y que ha permitido que nuestro protocolo ahora se este comenzado a aplicar en varios centros académicos de la UNAM. También han participado estudiantes, en particular un estudiante de la maestría en ciencias Bioquímicas será el primer autor del trabajo que estamos próximos a enviar a publicar y estos resultados serán parte de su tesis de maestría; estamos seguros de que dicho estudiante se titulará antes de que acabe este año.

#### REFERENCIAS

- 1 Alene, M. *et al.* Magnitude of asymptomatic COVID-19 cases throughout the course of infection: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **16**, e0249090, doi:10.1371/journal.pone.0249090 (2021).
- 2 La Marca, A. *et al.* Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reprod Biomed Online* **41**, 483-499, doi:10.1016/j.rbmo.2020.06.001 (2020).
- 3 Mardian, Y., Kosasih, H., Karyana, M., Neal, A. & Lau, C. Y. Review of Current COVID-19 Diagnostics and Opportunities for Further Development. *Front Med (Lausanne)* **8**, 615099, doi:10.3389/fmed.2021.615099 (2021).
- 4 Wyllie, A. L. *et al.* Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* **383**, 1283-1286, doi:10.1056/NEJMc2016359 (2020).
- 5 Moreno-Contreras, J. *et al.* Saliva Sampling and Its Direct Lysis, an Excellent Option To Increase the Number of SARS-CoV-2 Diagnostic Tests in Settings with Supply Shortages. *J Clin Microbiol* **58**, doi:10.1128/JCM.01659-20 (2020).
- 6 Herrera, L. A. *et al.* Saliva is a reliable and accessible source for the detection of SARS-CoV-2. *Int J Infect Dis* **105**, 83-90, doi:10.1016/j.ijid.2021.02.009 (2021).
- 7 Song, J. *et al.* Systematic analysis of ACE2 and TMPRSS2 expression in salivary glands reveals underlying transmission mechanism caused by SARS-CoV-2. *J Med Virol* **92**, 2556-2566, doi:10.1002/jmv.26045 (2020).
- 8 Krause, P. R. *et al.* SARS-CoV-2 Variants and Vaccines. *N Engl J Med* **385**, 179-186, doi:10.1056/NEJMSr2105280 (2021).

- 9 Rella, S. A., Kulikova, Y. A., Dermitzakis, E. T. & Kondrashov, F. A. Rates of SARS-CoV-2 transmission and vaccination impact the fate of vaccine-resistant strains. *Sci Rep* **11**, 15729, doi:10.1038/s41598-021-95025-3 (2021).
- 10 Corman, V. M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* **25**, doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045 (2020).
- 11 Earl, C. C., Smith, M. T., Lease, R. A. & Bundy, B. C. Polyvinylsulfonic acid: A Low-cost RNase inhibitor for enhanced RNA preservation and cell-free protein translation. *Bioengineered* **9**, 90-97, doi:10.1080/21655979.2017.1313648 (2018).
- 12 Smyrliki, I. *et al.* Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nat Commun* **11**, 4812, doi:10.1038/s41467-020-18611-5 (2020).
- 13 CDC. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel <https://www.fda.gov/media/134922/download> (2021).