UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

PROGRAMA DE DESARROLLO DE CIENCIAS BÁSICAS

ÁREA BIOLOGÍA

# ESTUDIO FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN CCDC28B-BBS4 Y SU IMPACTO EN LA PATOGÉNESIS DEL SÍNDROME DE BARDET-BIEDL

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Subárea Biología Celular y Molecular

**MSc. MatíasFabregat**

Tutor:

Dr. José Badano

Co-tutores:

Dr. Carlos Escande

Dra. Florencia Irigoín

Laboratorio de Genética Molecular Humana

Institut Pasteur de Montevideo

Julio de 2022

# ÍNDICE

**RESUMEN…… 3**

**ABREVIATURAS…… 6**

**ÍNDICE DE FIGURAS…… 8**

**INTRODUCCIÓN…… 10**

1.1 LA CILIA PRIMARIA……10
1.2 CILIOPATÍAS……..14
1.3 EL SÍNDROME DE BARDET-BEIDL……..16
1.4 IDENTIFICACIÓN DE CCDC28B: UN MODIFICADOR SECUNDARIO DE BBS…….19
1.5 ¿QUÉ SABEMOS DE LA FUNCIÓN DE CCDC28B?.....21
1.6 BBS4……24
1.7 MODELO MURINO BBS4 -/-……25
1.8 OBESIDAD…….27
1.9 TEJIDO ADIPOSO……..30
1.10 OBESIDAD SALUDABLE……..33
1.11 OBESIDAD EN BBS……..36
1.12 DIFERENTES PRESENTACIONES DE LA OBESIDAD EN CILIOPATÍAS……39

**HIPÓTESIS…… 41**

**OBJETIVO GENERAL…… 42**

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS…… 42**

**MATERIALES Y MÉTODOS…… 43**

2.1 GENERACIÓN DEL MODELO MURINO CCDC28B -/- POR EDICIÓN GENÓMICA BASADA EN CRISPR-CAS9…… 43
2.2 EXPERIMENTOS IN VIVO EN MODELOS MURINOS BBS4 -/- Y CCDC28B -/-…… 48
2.3 EXPERIMENTOS IN VITRO EN CÉLULAS EN CULTIVO BBS4 -/- Y CCDC28B -/-……54
2.4 EXPERIMENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR……59

**RESULTADOS…… 65**

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO MURINO BBS4 -/- RESPECTO A SU FENOTIPO DE OBESIDAD Y DESARROLLO DE RESISTENCA A LA INSULINA……65
3.2 GENERACIÓN DE UN MODELO MURINO CCDC28B -/- POR EDICIÓN GENÓMICA BASADA EN CRISPR/CAS9……87
3.3 CARACTERIZACIÓN DE LA ADIPOGÉNESIS EN AUSENCIA DE BBS4 Y DE CCDC28B……115

**DISCUSIÓN…… 121**

**AGRADECIMIENTOS……142**

**BIBLIOGRAFÍA…… 144**

“I’ve missed more than 9,000 shots in my career. I’ve lost almost 300 games. Twenty-six times, I’ve been trusted to take the game-winning shot and missed. I’ve failed over and over and over again in my life. And that is why I succeeded.”

**Michael Jordan**

# RESUMEN

La cilia primaria es un organelo que actúa en forma de antena censando el medio extracelular y participando de diversas vías de señalización fundamentales para el desarrollo y mantenimiento de órganos y tejidos, como por ejemplo las vías de SHH (*Sonic-Hedgehog*), Wnt (Acrónimo de *Wingless* e *Int1*), IGF (*Insulin-like Growth Factor 1*) y PDGFα (*Platelet-derived growth factor Alpha*), entre otras. La participación en estos procesos, así como su presencia casi ubicua en células de mamíferos, la convierten en un organelo esencial, cuyo mal funcionamiento está asociado a un importante número de patologías complejas denominadas ciliopatías. Estas enfermedades presentan un amplio rango de fenotipos, incluyendo en muchos casos patologías de alto impacto en la salud pública como son la obesidad, diabetes, trastornos del comportamiento y poliquistosis renal. La presencia de estos fenotipos en un conjunto de enfermedades de transmisión genética permite utilizar a las ciliopatías como objeto de estudio para caracterizar y entender mejor algunos de estos problemas. El Síndrome de Bardet-Biedl (BBS) es una ciliopatía caracterizada por degeneración de retina, polidactilia, enfermedad renal y obesidad. Desde un punto de vista genético resulta un modelo interesante ya que, si bien en muchos casos se hereda como un rasgo autosómico recesivo, en distintas familias se ha demostrado que presenta un patrón de herencia oligogénica, donde mutaciones en más de un gen colaboran en el desarrollo del fenotipo. Hasta la fecha se han identificado 22 genes causales, muchos de los que a su vez participan en casos de herencia oligogénica. Por otro lado, se identificó a *CCDC28B* (*Coiled coil domain containing protein 28B*) como un modificador secundario del síndrome. En este caso, las mutaciones encontradas en *CCDC28B* no son suficientes para causar la enfermedad, pero sí para modificar su presentación en presencia de mutaciones en otros genes BBS. La mayoría de las proteínas BBS se ubican en la base de la cilia o dentro de la misma y en cuanto a su función, están involucradas en un gran número de procesos. En particular, hay un grupo de proteínas BBS que conforman un complejo octamérico (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9 y BBS10) denominado BBSoma, que participa en el ensamblado de la cilia mediando el transporte de proteínas de membrana hacia la base de la cilia y dentro de la misma. Uno de los focos de este trabajo de tesis es BBS4, una de las primeras proteínas BBS en ser caracterizada funcionalmente y con la cual nuestro grupo ha venido trabajando en el marco de su vínculo con el desarrollo de obesidad. Su deficiencia no provoca necesariamente la ausencia de cilias en los tejidos, pero sí genera defectos en el transporte de algunos receptores a la membrana ciliar, así como en la secreción de *Follistatin like-1* (FSTL1), una glicoproteína que nuestro grupo y otros han mostrado que juega un rol en la diferenciación de adipocitos. La otra proteína central para este trabajo de tesis

es CCDC28B, originalmente fue identificada por su interacción física directa con BBS4 en ensayos de doble híbrido en levadura, mostrando posteriormente que también es capaz de interactuar con otras proteínas BBS. En cuanto a su función, trabajos de nuestro grupo han mostrado que CCDC28B regula la formación y el largo de las cilias tanto *in vitro* como *in vivo*, en *zebrafish*. Dados estos antecedentes, nuestro grupo se ha planteado estudiar las consecuencias funcionales de la interacción ya conocida entre BBS4 y CCDC28B, tanto *in vitro* como *in vivo* concentrándonos fundamentalmente en el fenotipo de obesidad, de alta prevalencia en pacientes BBS y también presente en varios modelos murinos *knockouts* en genes BBS, entre ellos en los ratones *Bbs4 -/-*. La bibliografía hasta el momento describe a la obesidad, tanto en pacientes BBS como en el modelo murino *Bbs4 -/-*, como un producto de la afectación de las cilias en el Sistema Nervioso Central, particularmente en el hipotálamo, que genera una desregulación de la ingesta y consecuente hiperfagia. Sin embargo, poco se ha estudiado sobre el rol de la cilia y las proteínas BBS en los tejidos periféricos relevantes para la obesidad, como el tejido adiposo.

De esta forma, el objetivo central de este trabajo fue continuar entendiendo por qué la disminución de CCDC28B en pacientes BBS resulta en una presentación más severa de la enfermedad. Para esto dividimos el trabajo en dos bloques principales. Por un lado, la caracterización más detallada del metabolismo energético y la funcionalidad del tejido adiposo en los ratones *Bbs4 -/-* frente a diferentes estímulos, y por otro lado, la generación de un modelo murino *Ccdc28b -/-* utilizando la tecnología de CRISPR/Cas9, que nos permitiera posteriormente recapitular la interacción génica observada en pacientes. Los resultados de esta tesis nos han permitido, en primer lugar, confirmar que el fenotipo de obesidad presente en el modelo *Bbs4 -/-* es generado como consecuencia de la hiperfagia, siendo corregido cuando se controla la ingesta. Además, al rescatar el fenotipo de ganancia de peso aumentada controlando la ingesta, pero estimulando el desarrollo de obesidad a la par, en animales *Bbs4 -/-* y controles, mediante la alimentación con dieta rica en grasa, no observamos diferencias en los dos grupos en cuanto al manejo sistémico de la glucosa. Sin embargo, sí pudimos identificar diferencias en algunos aspectos que resultan de sumo interés para entender la presentación de la obesidad en BBS, como por ejemplo, una disminución estadísticamente significativa en el nivel de ácidos grasos libres en sangre en los *Bbs4 -/-* con respecto a los controles, lo que podría indicar cambios en la capacidad de buffer o almacenamiento del tejido adiposo en estos animales. También identificamos diferencias en el manejo de la glucosa dependientes del sexo, observando peores resultados en machos que en hembras, pese a que estas últimas aumentan más rápidamente de peso. Además, los resultados de los experimentos de adipogénesis *in vitro* utilizando distintos tipos de precursores de adipocitos, mostraron que existe una capacidad aumentada de

diferenciación en células *Bbs4 -/-*. En conclusión, más allá que la obesidad en este modelo es gatillada por un problema a nivel del Sistema Nervioso Central en la regulación de la saciedad, el funcionamiento del tejido adiposo también parece estar afectado. Como mencionamos, un segundo eje de este trabajo fue el desarrollo de un ratón *Ccdc28b -/-*. Nuestros resultados mostraron que la eliminación de CCDC28B resulta en un fenotipo leve, consistente con el rol de modificador secundario que le fue asignado a este gen en humanos. Por un lado, los ratones *Ccdc28b -/-* no presentan afectación estructural de las cilias, aunque sí hay diferencias leves en el largo de estos organelos en algunos tejidos. Por otro lado, no desarrollan degeneración de retina ni obesidad, dos fenotipos característicos de BBS. Interesantemente, los ratones *Ccdc28b -/-* sí presentan defectos comportamentales relacionados con la interacción social, así como patrones de comportamiento estereotipados consistentes con trastornos del espectro autista (TEA). Este hallazgo es relevante en el contexto de BBS ya que un número de trabajos han mostrado que existen trastornos del comportamiento en pacientes BBS. A su vez, nuestros resultados preliminares sugieren que el rol de Ccdc28b en el desarrollo de este tipo de patologías podría exceder a BBS, ya que cuando analizamos una base de datos de pacientes con TEA (*Simmons Simplex Collection*) también encontramos mutaciones en *CCDC28B*. En conclusión, este trabajo nos permitió desarrollar una nueva línea murina que no solamente servirá para modelar lo que sucede en pacientes BBS (generando dobles mutantes para una proteína causal, BBS4, y un modificador secundario, CCDC28B), sino que además se identificó una asociación novedosa entre *CCDC28B* y comportamientos relacionados con TEA, que permitirán continuar entendiendo las bases moleculares y genéticas de este grupo de trastornos.

# ABREVIATURAS

**ARL6:** *ADP-ribosylation factor like 6*

**BBS:** *Bardet-BiedlSyndrome*

**CCDC28B:** *Coiled coil domain containing protein 28B*

**CRISPR:** *Clustered Regulary Interspaced Short Palindromic Repeats*

**FSTL1:** *Follistatin like 1*

**GTT:** *Glucose Tolerance Test*

**HDR:** *Homology directed repair*

**IFT:** *Intraflagellar Transport*

**IGF:** *Insulin Growth Factor*

**IL-6:** Interleuquina-6

**IMC:** Índice de Masa Corporal

**IPMon:** Institut Pasteur de Montevideo

**ITT:** *Insulin Tolerance Test*

**MEF:** *Mouse Embrionary Fibroblasts*

**MKS:** *Meckel-Gruber Syndrome*

**mTOR:** *Mammalian Target of Rapamycin*

**NHEJ:** *Non-homologous DNA End Joining*

**OS:** Obesidad saludable

**PCM1:** *Pericentriolar material 1*

**PDGFα:** *Platelet derived growth factor alpha*

**Shh:** *Sonic Hedgehog*

**SVC:** *Stromal Vascular Cells*

**TAB:** Tejido adiposo blanco

**TAP:** Tejido adiposo pardo

**TEA:** Trastornos del espectro autista

**TMR:** Tasa Metabólica de Reposo

**TNFα:** *Tumor Necrosis Factor Alpha*

**UBAL:** Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio

**UCP-1:** *Uncoupling protein 1*

**Wnt:** *Wingless*

**ZT:** Zona de transición

# ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1. Estructura básica de la cilia……10**
**Figura 2. Esquema de la ultraestructura ciliar y cortes longitudinales de las secciones que la componen……...12**
**Figura 3. Rasgos fenotípicos característicos del Síndrome de Bardet-Biedl……...16**
**Figura 4. Modelo tridimensional de la estructura del BBSoma y sus dominios……17**
**Figura 5. Modificación del splicing en la variante C430T de CCDC28B y epistasis en su herencia……20**
**Figura 6. CCDC28B regula ciliogénesis……22**
**Figura 7. La participación de CCDC28B en el proceso de ciliogénesis, depende al menos en parte, de la región de localización nuclear de la proteína……23**
**Figura 8. Construcción del modelo murino Bbs4 -/-……25**
**Figura 9. Organización del tejido adiposo en humano y ratón……30**
**Figura 10. Estrategias del tejido adiposo para su expansión durante el balance energético positivo……...34**
**Figura 11. Regulación del eje BBS4-FSTL1-Cilia……37**
**Figura 12. Caracterización metabólica del modelo murino Bbs12 -/- en machos de 12 semanas de edad……...39**
**Figura 13. Esquema del sistema de edición genómica CRISPR-Cas9……44**
**Figura 14. Mecanismos de reparación del ADN aprovechados por el sistema CRISPR-Cas9 para la edición genómica……..45**
**Figura 15. Diseño de los primers utilizados para genotipar los ratones……..51**
**Figura 16. Caracterización metabólica de los ratones Bbs4 en fondo genético C57BL/6J……68**
**Figura 17. Cuantificación de parámetros de ingesta y desechos en caja metabólica……69**
**Figura 18. Curvas de crecimiento de los ratones Bbs4 en fondo genético 129/BL6 y en normo dieta……70**
**Figura 19. Cuantificación de la comida en cajas convencionales……71**
**Figura 20. Cuantificación de parámetros de ingesta y desechos en caja metabólica de ratones Bbs4 +/+ y Bbs4 -/-……71**
**Figura 21. Caracterización metabólica de ratones Bbs4 -/- en fondo genético 129/BL6……...72**
**Figura 22. Biopsias de tejidos relevantes de ratones Bbs4 -/- y controles a las 25 semanas de edad……73**

**Figura 23. Caracterización de los adipocitos de ratones de 25 semanas de edad, Bbs4 -/- y controles……74**
**Figura 24 Curvas de crecimiento de los ratones Bbs4 en normo dieta controlada……75**
**Figura 25. Curvas de crecimiento de los ratones Bbs4 en HFD controlada……...76**
**Figura 26. Caracterización metabólica de la respuesta de ratones Bbs4 -/- a una HFD controlada……..77**
**Figura 27. En fondo genético 129/BL6 los ratones Bbs4 -/- se comportan con una gran variabilidad……...78**
**Figura 28. Test de tolerancia a la glucosa y a la insulina de ratones Bbs4 -/- a las 35 semanas de edad luego de una HFD controlada……79**
**Figura 29. Caracterización de los adipocitos de ratones Bbs4 -/- y controles de 36 semanas de edad luego de 24 semanas de tratamiento con HFD controlada……..80**
**Figura 30. Determinación de metabolitos en plasma sanguíneo……..81**
**Figura 31. Curvas de crecimiento de los ratones Bbs4 en fondo genético 129/BL6 en HFD ad libitum……82**
**Figura 32. Caracterización metabólica de de los animales Bbs4 +/+ y Bbs4 -/- sometidos a una HFD ad libitum…….83**
**Figura 33. Glicemia basal en ayuno de los animales Bbs4 -/- y +/+ previo y durante el tratamiento con HFD ad libitum…….85**
**Figura 34. Test de tolerancia a la glucosa en machos y hembras Bbs4 -/- y +/+ sometidos a una HFD ad libitum…….86**
**Figura 35. Hemograma realizado de sangre periférica obtenida por sangrado submandibular donde se observan el número de leucocitos en sangre……...86**
**Figura 36. Análisis de formación de heterodúplex por PAGE en Ccdc28b……..112**
**Figura 37. Diferenciación de MEFs Bbs4 -/- ……...116**
**Figura 38. Diferenciación de SVCs obtenidos de grasa subcutánea Bbs4 -/- y +/+ en fondo genético 129/BL6…….117**
**Figura 39. Puesta a punto del protocolo de caracterización de la diferenciación por citometría de flujo…….118**
**Figura 40. Evaluación de la diferenciación de MEFs Bbs4 +/+ y Bbs4 -/- por citometría de flujo……..119**

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 La Cilia Primaria

La cilia primaria es un organelo conservado a lo largo de la evolución, conformado por una proyección de la membrana plasmática con un esqueleto de microtúbulos central (axonema) que está conectado a un cuerpo basal (centro organizador de microtúbulos, derivado del centriolo madre del centrosoma). Mientras que las plantas superiores y hongos no poseen cilias primarias, y en invertebrados están restringidas a las neuronas sensoriales, en mamíferos estos organelos están presentes en casi todos los tipos celulares (Joukov & De Nicolo, 2019; Satir & Christensen, 2007). Se presentan como una estructura en forma de antena y se agrupan en dos grandes categorías según la estructura del axonema y su movilidad: cilias primarias (generalmente inmóviles), y cilias móviles (Figura 1).

Las cilias móviles presentan un axonema formado por nueve dobletes de microtúbulos periféricos y un par de microtúbulos central, este tipo de configuración se denomina por lo tanto "9+2" (Figura 1). Cada doblete periférico está formado por un microtúbulo completo comprendido por 13 protofilamentos, y un microtúbulo incompleto conformado por 10 protofilamentos. Al igual que los microtúbulos citosólicos, los que conforman el axonema se forman por la polimerización de heterodímeros de α y β tubulina, con su extremo "positivo" (por el cual crecen) orientado hacia el ápice de la cilia (Fisch & Dupuis-Williams, 2011). Además, el axonema presenta algunas estructuras accesorias, como los brazos externos e internos de dineína que colaboran en el movimiento de este

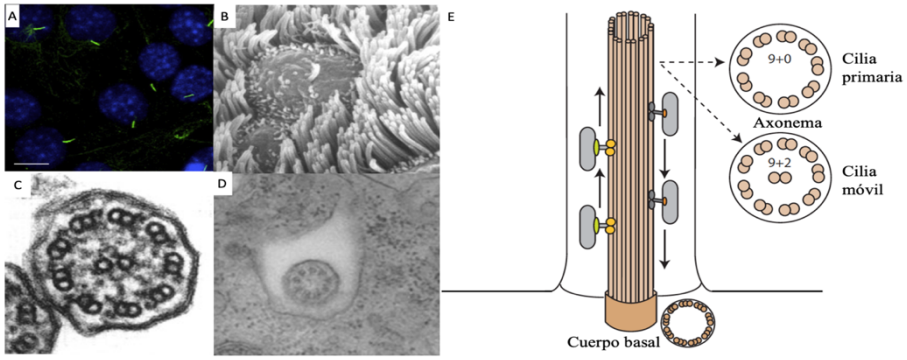


***Figura 1. Estructura básica de la cilia.***
***A)*** *Inmunofluorescencia confocal de condrocitos articulares donde se observa la cilia primaria marcada con anti-tubulina acetilada (verde) y el núcleo marcado con DAPI (azul).* ***B)*** *Micrografía electrónica de barrido de epitelio de oviducto. En la zona central se observa una célula con cilia primaria, mientras que en la periferia se ven células multiciliadas con cilias móviles.* ***C)*** *Micrografía electrónica de un corte transversal de cilia móvil donde se observa su axonema 9+2.* ***D)*** *Micrografía electrónica de un corte transversal de cilia primaria donde se observa su axonema 9+0.* ***E)*** *Representación esquemática de la cilia, donde se observa la organización del esqueleto de microtúbulos (axonema y cuerpo basal). También se distinguen los dos tipos de axonemas: 9+0 en cilias primarias y 9+2 en cilias móviles. Figura adaptada de Irigoín and Badano, 2011; y de Satir and Christensen, 2007.*

tipo de cilias. Normalmente se encuentran de a varias cilias por célula en epitelios especializados, como por ejemplo, en el tracto respiratorio o el aparato reproductor, y su función principal es la de generar movimiento de fluido extra-celular (Mitchison & Valente, 2017).

Por otro lado, las cilias primarias se encuentran de a una sola por célula y en general no son móviles. La configuración de su axonema es de "9+0", ya que carece del par central de microtúbulos (Figura 1). Tampoco poseen muchas de las estructuras accesorias, como los brazos de dineína, y su función es principalmente mecano- y quimio-sensorial (Cardenas-Rodriguez & Badano, 2009; Goetz & Anderson, 2010). Resulta importante destacar que esta clasificación es simplista, ya que existen cilias inmóviles con un axonema "9+2", por ejemplo, en el epitelio olfatorio en humanos, y cilias móviles de axonema "9+0", como en el nodo embrionario del ratón (Moran et al., 1982; Sulik et al., 1994). A su vez, se ha logrado determinar que las cilias móviles también pueden cumplir funciones sensoriales (Bloodgood, 2010; Jain et al., 2012).

En cuanto a su estructura, en las cilias pueden distinguirse varias regiones o dominios. Por un lado, en la región más proximal al cuerpo celular aparece el cuerpo basal, formado por el centriolo madre del centrosoma, es decir el más antiguo, desde donde nace el axonema. El cuerpo basal y el centriolo son en sí el mismo organelo, con la misma estructura en barril formada por nueve tripletes de microtúbulos, que se transforma uno en el otro según la etapa del ciclo celular en el que esté la célula, asociando directamente el proceso de ciliogénesis con el ciclo celular (Irigoín & Badano, 2011; Marshall, 2008). Durante la mitosis la cilia primaria es reabsorbida, liberando el cuerpo basal y permitiendo que el organelo actúe como centriolo formando el centrosoma que ensambla el huso mitótico, mientras que en las fases G0 y G1, el centriolo se mueve hacia la superficie celular para volver a actuar como cuerpo basal (Irigoín & Badano, 2011; Joukov & De Nicolo, 2019).

En el extremo distal del cuerpo basal se encuentran los apéndices fibrosos, estructuras que se extienden desde el cuerpo basal hasta la membrana celular formando las fibras de transición (Figura 2). Los apéndices fibrosos promueven el anclaje y la nucleación de microtúbulos, mientras que las fibras de transición se encargan de anclar el cuerpo basal a la membrana. Al momento no se conoce con exactitud el origen y el proceso de formación de las fibras de transición y es por eso que, mientras hay autores que se lo adjudican al cuerpo basal, hay otros que afirman que es parte de la zona de transición (Marshall, 2008).

La zona de transición (ZT) es la región que se encuentra en la base de la cilia, justo por encima del cuerpo basal (Figura 2) y es la encargada de separar el organelo del resto del citosol. La ZT funciona entonces como una barrera que selecciona los componentes solubles y de membrana que

ingresaran al compartimiento ciliar (Fisch & Dupuis-Williams, 2011; Reiter et al., 2012). Es interesante notar que muchas mutaciones asociadas a ciliopatías ocurren en proteínas que se localizan en la ZT, lo que pone de manifiesto la importancia funcional de esta región (Czarnecki & Shah, 2012). En la ZT también se encuentran las fibras en Y, encargadas de unir el axonema con la membrana ciliar. En definitiva, la ZT cumple una función esencial como es la regulación de la composición de las cilias, función que cumple interactuando con la maquinaria de transporte intraflagelar (IFT, del inglés: *intra flagellar transport*). Las cilias carecen de la maquinaria necesaria para la síntesis proteica y por lo tanto todas las proteínas necesarias para su ensamblado y funcionamiento deben ser sintetizadas previamente en el citosol y luego transportadas hacia la cilia. El IFT es el proceso bidireccional que mueve moléculas hacia el extremo distal y basal de la cilia (movimiento anterógrado y retrógrado, respectivamente), utilizando miembros de las dos grandes familias de motores moleculares basados en microtúbulos: las quinesinas y las dineínas (Hirokawa et al., 1998). Es un mecanismo sumamente regulado en el cual no nos detendremos ya que excede los intereses de este trabajo (por una revisión en el tema ver (Nakayama & Katoh, 2020).

Como mencionamos, la función principal de las cilias móviles es el movimiento. En células móviles, como son los espermatozoides o algunos organismos unicelulares, permite el desplazamiento de las células en un medio líquido. En tejidos, las cilias móviles ayudan a desplazar el fluido que rodea la célula. En este sentido no sorprende que la afectación de este tipo de cilias

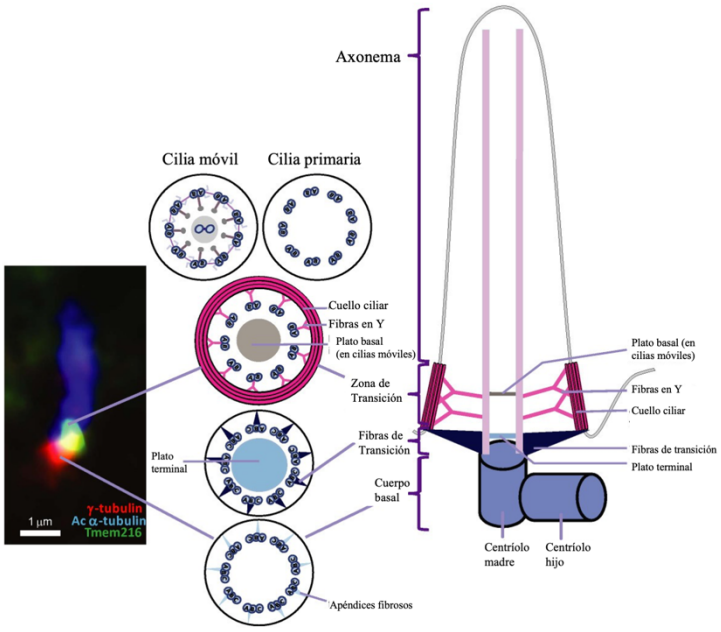


***Figura 2. Esquema de la ultraestructura ciliar y cortes longitudinales de las secciones que la componen.*** *Sobre la izquierda de la figura se observa una inmunofluorescencia de una cilia primaria desde donde se detallan los distintos dominios y su estructura. En azul se marca la tubulina acetilada para identificar el axonema, con rojo se marca la γ tubulina para ver el cuerpo basal y en verde se marca la proteína transmembrana 216 (TMEM216) ubicada en la zona de transición. Figura adaptada de Szymanska, K. and Johnson, C. A., 2012.*

resulte en fenotipos como la infertilidad o problemas respiratorios. Por su parte, las cilias primarias actúan como antena celular monitoreando el medio extracelular y participando en la transducción de señales. En este sentido, se ha demostrado que un importante número de vías de señalización utilizan las cilias primarias. Estas incluyen, por ejemplo, las vías de *Sonic Hedgehog* (Shh), *Wingless* (Wnt), Factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa (PDGFα, del inglés: *platelet derived growth factor*), Diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, del inglés: *Mammalian Target of Rapamycin*), Factor de crecimiento insulínico (IGF, del inglés: *Insulin growth factor*) y varias más (Cardenas-Rodriguez & Badano, 2009; Gerdes & Katsanis, 2008; Zhu et al., 2009). Algunas de estas son de particular importancia para este trabajo y se detallarán más adelante. Es interesante notar lo altamente conservadas en la evolución que están varias de estas vías y en muchos organismos ni siquiera necesitan de las cilias para funcionar: por ejemplo, la vía de Wnt o Shh en *Drosophila* (Kuzhandaivel et al., 2014; Ocbina et al., 2009). El por qué estas vías evolucionaron a utilizar las cilias no está completamente definido. Dado que la relación superficie/volumen en la cilia es significativamente mayor que en el resto de la célula, se piensa que esto permite combinar una gran densidad de receptores señalizando hacia un compartimiento donde las proteínas efectoras están más concentradas, lo que favorecería un proceso de señalización más rápido y eficiente, así como la coordinación cruzada entre vías (Nachury, 2014).

Como se ha desarrollado a lo largo de esta sección, la conservación evolutiva de la cilia, su distribución prácticamente ubicua en los diferentes tipos celulares de mamíferos y su participación en diversas vías de señalización, hacen que la cilia primaria sea un organelo esencial. De hecho, la ausencia de cilias en mamíferos es incompatible con la vida, mientras que defectos en su formación o funcionamiento dan lugar a un gran número de fenotipos, asociados a un conjunto de patologías complejas, denominadas ciliopatías.

## 1.2 Ciliopatías

Las ciliopatías son un grupo de patologías genéticas humanas que comparten un defecto celular común: todas son provocadas por problemas en la formación, mantenimiento o función de las cilias. La afectación de este organelo puede generar un abanico amplio de fenotipos, muchos de ellos comunes a varías de estas patologías. Dentro de las presentaciones clínicas más comunes en mamíferos se encuentran: degeneración de retina, formación de quistes en riñones, hígado y páncreas, polidactilia y anosmia (Bergmann, 2012; Tobin & Beales, 2009) (Tabla 1).

| | PKD | NPHP | MKKS | SLSN | EVC | JATD | OFD | ALMS | JS | BBS | MKS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Malformaciones en el SNC | | | | | • | • | • | • | • | • | • |
| Riñón poliquístico | • | • | | • | | • | • | • | • | • | • |
| Diabetes | | | | | | | | • | | • | |
| Malformaciones gonadales | | | • | | • | | | | | • | • |
| Enfermedad cardíaca | | | • | | • | | | • | | • | |
| Disfunción hepática | • | • | | • | | • | • | • | • | • | • |
| Dificultades en el aprendizaje | | | | | • | • | • | | • | • | • |
| Obesidad | | | | | | | | • | | • | |
| Polidactilia | | | • | | • | • | • | | • | • | • |
| Disfunción pulmonar | | | | | | | | • | | | |
| Degeneración de retina | | | | • | | • | | • | • | • | |
| Situs inversus | | • | | • | | • | | | • | • | • |
| Malformaciones de esqueleto | | | | | • | • | • | | | | |

***Tabla 1. Principales fenotipos observados en ciliopatías.***
*PKD: Poliquistosis renal; NPHP: Nefronoptisis; MKKS: Síndrome de McKusick-Kaufman; SLSN: Síndrome de Senior-Løken; EVC: Ellis Van Creveld; JATD: Displasia torácica asfixiante de Jeune; OFD: Síndrome oral-facial-digital; ALMS: Síndrome de Alström; JS: Síndrome de Joubert; BBS: Síndrome de Bardet-Biedl; MKS: Síndrome de Meckel-Gruber.*

Este solapamiento fenotípico entre diferentes ciliopatías refleja esa base celular común (defectos en las cilias). A su vez, también se observa un alto grado de solapamiento a nivel genético que se refleja en diferentes características. Dado que distintos genes/proteínas cumplen funciones en el ensamblado y función de la cilia, y que muchas veces lo hacen participando en vías comunes o inclusive formando complejos multiproteicos, no debe sorprender que mutaciones en distintos genes puedan dar lugar a fenotipos similares o incluso a una misma ciliopatía. En este sentido, la gran mayoría de las ciliopatías presenta una alta heterogeneidad genética (muchos genes causales). Interesantemente, también se ha observado que un mismo gen puede estar asociado causalmente a

distintas ciliopatías. Esto último puede deberse a una asociación entre diferentes tipos de mutaciones (desde hipomorfas hasta nulas) con efectos más o menos severos sobre la funcionalidad de las proteínas correspondientes. En otras palabras, fenotipos que en la clínica son reconocidos como distintas ciliopatías, serían distintas presentaciones con una base genética en común (Davis & Katsanis, 2012). Por ejemplo, mutaciones en genes MKS que eliminan completamente la proteína resultan en el síndrome de Meckel-Gruber, una de las ciliopatías más severas, siendo generalmente letal a nivel embrionario (Consugar et al., 2007). Sin embargo, mutaciones hipomorfas en estos mismos genes se han visto asociadas causalmente al Síndrome de Bardet-Biedl (BBS) (Leitch et al., 2008).

Por último, observaciones realizadas durante años de estudio de estas patologías permitieron demostrar que, en algunas familias, mutaciones en más de un gen de forma simultánea, pueden colaborar para dar lugar a cambios tanto en la penetrancia como en la expresividad de distintas ciliopatías, incluyendo BBS. De esta manera se puede concluir que, al hablar de las ciliopatías, estamos hablando de un grupo de patologías que, si bien a nivel clínico parecen ser entidades diferentes, a nivel molecular y genético presentan un alto grado de solapamiento.

Si bien la gran mayoría de las ciliopatías han sido históricamente consideradas enfermedades de herencia mendeliana y recesiva, hoy día sabemos que en muchas familias se heredan como un rasgo oligogénico, donde mutaciones en más de un gen colaboran en el desarrollo del fenotipo (Badano & Katsanis, 2002). En este tipo de herencia, se pueden diferenciar genes que muestran una relación causal con la patología y otros que afectan la presentación de la enfermedad, pero no son suficientes para causarla, y por lo tanto son denominados modificadores secundarios. Estos modelos de oligogenicidad se basan en la existencia de sistemas biológicos donde existe redundancia funcional, en los cuales diferentes proteínas o vías pueden suplantar la función de otras, y por lo tanto para afectar la función de una vía o complejo en particular se necesitan mutaciones en más de un gen. Es interesante tener en cuenta que este tipo de contexto aplica perfectamente al caso de las cilias, donde distintos complejos de proteínas y vías participan tanto en la formación y mantenimiento, como en la función del organelo (Cardenas-Rodriguez & Badano, 2009; Gerdes & Katsanis, 2008).

Una de las ciliopatías modelo más interesantes por su compleja manifestación clínica (Tabla 1) y por su herencia oligogénica es el Síndrome de Bardet-Biedl, objeto de estudio del Laboratorio de Genética Molecular Humana del Institut Pasteur de Montevideo (IPMon).

## 1.3 El Síndrome de Bardet-Beidl

El Síndrome de Bardet-Biedl (BBS, del inglés: *Bardet-Biedl Syndrome*; OMIM 209900) fue descrito por primera vez hace más de 100 años por George Bardet y Arthur Biedl, quienes reportaron, de forma independiente, la presencia de pacientes con obesidad, discapacidad visual, dificultades en el aprendizaje, polidactilia e hipogonadismo (Bardet, 1920; Biedl, 1922). Como se vio desde su descubrimiento, es una enfermedad altamente pleiotrópica y de prevalencia baja pero variable según la población que se analice, yendo desde 1:160.000 en poblaciones europeas hasta 1:13.500 en poblaciones más pequeñas y con endogamia, como los beduinos (Slavotinek & Beales, 2011). De todas formas, la incidencia estimada en poblaciones caucásicas es de 1:100.000, y si bien no existen datos de la prevalencia de BBS en el Uruguay, es razonable asumir una incidencia dentro de este rango.

Dada su compleja manifestación clínica (Tabla 1), durante muchos años se diagnosticó bajo un algoritmo que contemplaba la presencia de seis rasgos fenotípicos principales: degeneración de retina, obesidad troncal, hipogonadismo, polidactilia, dificultades en el aprendizaje y disfunciones renales (Forsythe & Beales, 2013), de los cuales cinco ya aparecían en los reportes de Bardet y Biedl (Figura 3). El algoritmo permite hacer un diagnóstico de la enfermedad con la presencia de cuatro características principales o de tres principales más dos características secundarias, como ser ataxia, déficit en el habla, pérdida de audición, anosmia, defectos en el corazón y diabetes, entre otros (Beales et al., 1999). Este algoritmo se continúa utilizando en la clínica hoy en día, pero cada vez toma más fuerza la confirmación molecular, la cual además ha ido evolucionando rápidamente en los últimos años pasando de la búsqueda por secuenciación de las variantes génicas más comunes, a paneles de "*next-generation sequencing*" que incluyen a todos los genes BBS conocidos que a la fecha son 22 (Forsythe et al., 2018).

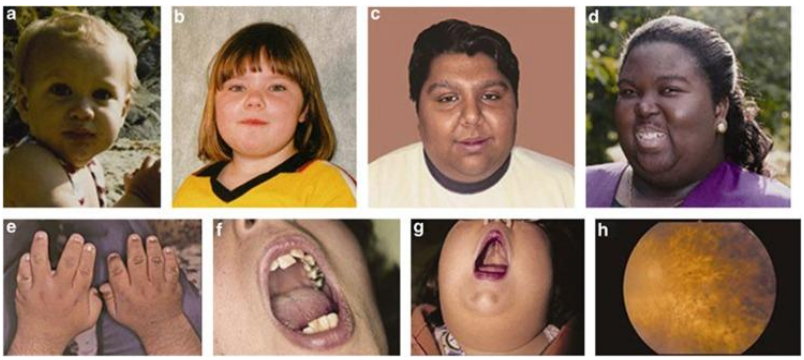


***Figura 3. Rasgos fenotípicos característicos del Síndrome de Bardet-Biedl.***
***A-D)*** *Las características faciales típicas de BBS pueden a veces ser sutiles o hasta pasar inadvertidas.* ***E)****Braquidactilia y cicatrices debido a la escisión de dedos extra.* ***F)*** *Apiñamiento dental.* ***G)*** *Paladar arqueado alto.* ***H)*** *Imagen oftalmoscópica que muestra distrofia de conos rojos. Figura adaptada de: Forsythe, E. and Beales, P.L., 2013*

La esperanza de vida en pacientes con BBS es muy variable y depende de la severidad con la que se presentan los síntomas, así como también del correcto control y manejo clínico. De todas formas, la principal causa de muerte prematura en los pacientes es debido a la nefropatía, combinada con complicaciones derivadas de la obesidad como diabetes tipo II, hipertensión e hipercolesterolemia (Beales et al., 1999).

Como ya se mencionó, un aspecto muy interesante de BBS, y las ciliopatías en general, es que este tipo de patologías genéticas raras desarrollan fenotipos altamente prevalentes en la sociedad, como la obesidad o las dificultades para el aprendizaje. Por esto, constituyen además herramientas muy útiles para modelar y ahondar sobre las bases celulares de patologías con alta prevalencia.

En cuanto a su causa y origen, BBS fue descrita al comienzo como una enfermedad autosómica recesiva que afecta la cilia primaria, aunque actualmente ya es clasificada como una patología genéticamente compleja, en la cual algunas familias presentan herencia oligogénica (Beales et al., 2003; Katsanis et al., 2001). Hasta el momento se conocen 22 genes causales de BBS (*BBS1-BBS22*) y algunos modificadores secundarios, como *CCDC28B* (del inglés: *Coiled coil domain containing protein 28B*) (Badano et al., 2006; Heon et al., 2016; Novas et al., 2015; Zhou et al., 2021). En algunos casos, mutaciones en más de uno de estos genes están presentes en un mismo individuo y pueden modular la penetrancia y la expresividad de la enfermedad aumentando la complejidad a la hora de diagnosticar y caracterizar la presentación clínica del síndrome (Davis & Katsanis, 2012).

La mayoría de las proteínas BBS caracterizadas hasta el momento se

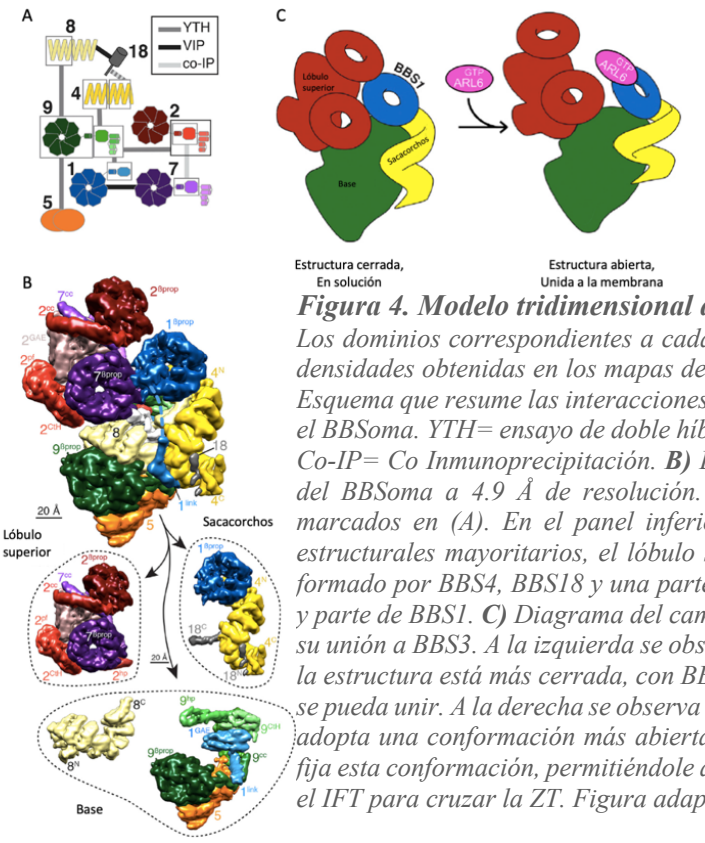


***Figura 4. Modelo tridimensional de la estructura del BBSoma y sus dominios.*** *Los dominios correspondientes a cada subunidad del BBSoma fueron asignados según las densidades obtenidas en los mapas de microscopía crio-electrónica (Chou et al., 2019).* ***A)*** *Esquema que resume las interacciones encontradas entre las distintas proteínas que forman el BBSoma. YTH= ensayo de doble híbrido en levaduras. VIP= Inmunoprecipitación visual. Co-IP= Co Inmunoprecipitación.* ***B)*** *En el panel superior se observa el mapa de densidad del BBSoma a 4.9 Å de resolución. Los colores de cada proteína corresponden a los marcados en (A). En el panel inferior se divide la estructura en sus tres componentes estructurales mayoritarios, el lóbulo superior formado por BBS2 y BBS7, el sacacorchos formado por BBS4, BBS18 y una parte de BBS1, y la base formada por BBS8, BBS5, BBS9 y parte de BBS1.* ***C)*** *Diagrama del cambio conformacional en el BBSoma predicho luego de su unión a BBS3. A la izquierda se observa la conformación en solución del BBSoma, donde la estructura está más cerrada, con BBS1 muy cerca del lóbulo superior evitando que BBS3 se pueda unir. A la derecha se observa la estructura del BBSoma unido a la membrana donde adopta una conformación más abierta, permitiendo la interacción con BBS3, que a la vez fija esta conformación, permitiéndole al BBSoma interactuar además con otras cargas o con el IFT para cruzar la ZT. Figura adaptada de Chou et al, 2019.*

localizan principalmente en el cuerpo basal, centrosoma o axonema de la cilia y todas participan de alguna forma en el ensamblado o funcionamiento de este organelo (Kim et al., 2004; Kim et al., 2005; Nachury et al., 2007). La primera asociación entre BBS y la cilia se dio en 2003 cuando se reportó la localización de BBS8 en el centrosoma y cuerpo basal, interactuando con PCM1 (del inglés: *pericentriolar material 1*), principal componente de la matriz pericentriolar en el centrosoma (Ansley et al., 2003). Otro momento importante en el entendimiento de la función de estas proteínas fue cuando en 2007, Nachury y colaboradores describieron un complejo multiproteico, al cual denominaron BBSoma, que está implicado en el transporte de proteínas hacia y desde la cilia (Nachury et al., 2007). Hoy en día se sabe que son ocho y no siete (como se describió en ese primer reporte) las proteínas que conforman el BBSoma: BBS 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9 y 18 (ver Figura 4), y que al menos parte de su función se da a través de su asociación con las GTPasas Rabin8 y Rab8 (Loktev et al., 2008; Nachury et al., 2007).

Pero no todas las proteínas BBS forman parte del BBSoma. BBS3, por ejemplo, también llamada Arl6 (del inglés: *ADP-ribosylation factor like 6*), se asocia al BBSoma pero sin formar parte de este, para regular la translocación del complejo hacia dentro de la cilia (Jin et al., 2010). En los últimos años esta asociación fue confirmada luego de la resolución de la primera estructura tridimensional del BBSoma por microscopía crioelectrónica. Se observó que la unión del BBSoma con BBS3 es necesaria para que se genere un cambio conformacional en el BBSoma, fundamental para que el complejo se abra y pueda interactuar tanto con su carga como con la membrana en la ZT (Chou et al., 2019). También se demostró que BBS6, BBS10 y BBS12 pertenecen a la familia de chaperoninas de tipo II, colaborando con el ensamblado del BBSoma (Kim et al., 2004; Stoetzel et al., 2006; Stoetzel et al., 2007). Finalmente, también se ha reportado que la ausencia de proteínas BBS, genera problemas en vías de señalización que operan a través de la cilia, como la vía de Shh o Wnt (Gerdes & Katsanis, 2008; Zhang, Seo, et al., 2012).

Además de su rol en el contexto de la cilia también se han descrito roles extra ciliares para algunas proteínas BBS (Novas et al., 2015). Se ha demostrado que algunas participan en el transporte de melanosomas (Yen et al., 2006). Por otro lado, también existen reportes de proteínas BBS participando en el transporte del receptor de leptina (Guo et al., 2016) y del receptor de insulina (Starks et al., 2015) hacia la membrana plasmática. Por último, BBS4 también actúa fuera de la cilia, participando en el tráfico endosomal del receptor de Notch, y del reciclado de este hacia la membrana plasmática (Leitch et al., 2014). Es importante no dejar de lado estas funciones extra-ciliares de las proteínas BBS ya que seguramente aporten a entender en profundidad las consecuencias de su ausencia o mal funcionamiento.

## 1.4 Identificación de CCDC28B: un modificador secundario de BBS

Como mencionamos antes, la gran mayoría de los modelos para explicar patrones de herencia oligogénica se basan en sistemas redundantes e interacciones entre proteínas a nivel de complejos o vías funcionalmente relacionadas. La demostración de este tipo de herencia en BBS, en tiempos donde se conocía la identidad de pocos genes y había poca información funcional, llevó a hipotetizar que la identificación y caracterización de nuevas proteínas que interactúen con las BBS conocidas sería una forma potente de ganar información funcional a la vez que se conseguía identificar nuevos genes capaces de causar o modificar la presentación de la enfermedad.

A partir de ensayos de doble híbrido en levaduras, y utilizando BBS4 como carnada, se identificó a CCDC28B como un interactor, una proteína hasta ese momento de función totalmente desconocida (Badano et al., 2006). Luego de su identificación, se demostró que CCDC28B no sólo interactúa con BBS4, sino que también con todas las proteínas BBS que habían sido identificadas hasta ese momento: BBS1, BBS2, BBS5, BBS6, BBS7 y BBS8. Además, en algunos pacientes BBS se identificó una transversión C-T en la penúltima posición del exón 3 (C430T) de *CCDC28B* (el gen está compuesto por seis exones). La presencia de esta variante en heterocigosis, y en combinación con mutaciones en genes BBS, se correlacionó con una presentación más severa del síndrome (Badano et al., 2006). Interesantemente, si bien el cambio de C-T es un cambio sinónimo (afectando la tercera base de un codón), se demostró que la presencia de una T en esa posición modifica un sitio de unión para la proteína reguladora del *splice* SC35, potenciando su unión y determinando un aumento en la utilización de un sitio aceptor de *splicing* críptico al inicio del exón 3, generando una isoforma con una pérdida de cinco pares de bases que resulta en un cambio del marco abierto de lectura con la generación de un codón de terminación prematuro (Badano et al., 2006) (Figura 5). En definitiva, el efecto final sobre el procesamiento del ARNm determina que la mutación C430T encontrada en pacientes BBS se considere una mutación hipomórfica, ya que disminuye la cantidad de mensajero de *CCDC28B* disponible para traducir una proteína completa. Análisis de esta mutación en cohortes de pacientes BBS y controles confirmaron que la misma, por sí sola, no es capaz de generar la enfermedad, apareciendo C430T en homocigosis en padres sanos de pacientes BBS (Badano et al., 2006). Como ya mencionamos, sí se encontraron familias con dos hermanos enfermos (ambos con la misma mutación en algún gen causal BBS) pero con presentaciones diferentes de la patología y allí se observó que quienes presentaban además la mutación en *CCDC28B* tenían una presentación más severa de la enfermedad (Badano et al., 2006). En suma, estos estudios muestran que *CCDC28B* podría actuar como un modificador secundario de BBS: si bien una mutación

hipomórfica no es suficiente para generar la enfermedad, en un contexto genéticamente sensibilizado por la presencia de otras mutaciones en genes BBS, puede contribuir a una manifestación más severa del síndrome.

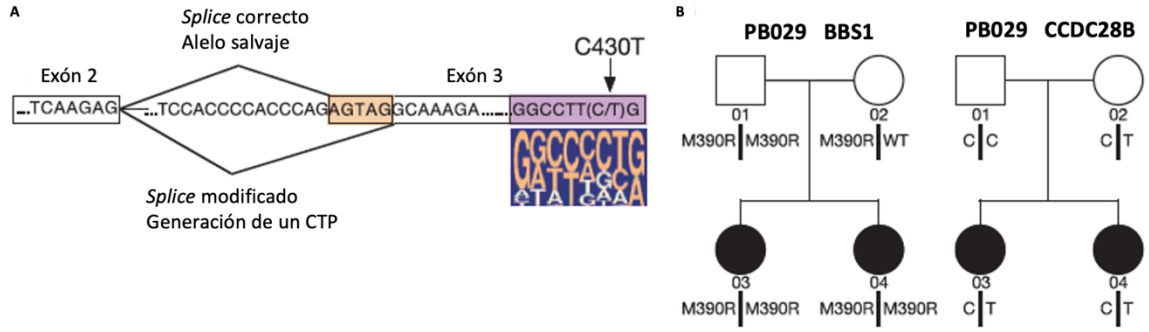


***Figura 5. Modificación del splicing en la variante C430T de CCDC28B y epistasis en su herencia.***
***A)*** *La mutación C430T genera una secuencia de unión para SC35 (marcada en violeta). La unión de esta proteína favorece la deleción de 5 pares de bases (marcados en naranja) y la aparición de un codón de terminación prematuro (CTP).* ***B)*** *En el pedigree PB029 se observa como es el alelo 430T de CCDC28B el que se segrega con un fenotipo penetrante ya que el padre no está afectado pese a ser homocigota mutante para BBS1 (es homocigota salvaje para CCDC28B). Figura adaptada de Badano, J.L. et al, 2006.*

## 1.5 ¿Qué sabemos de la función de CCDC28B?

El gen *CCDC28B*, tanto en humanos como su ortólogo en ratones (Gene ID: 79140 y 66264, respectivamente), está compuesto por seis exones, con un marco abierto de lectura que va desde el exón 2 al 6. Si bien hay reportadas muchas variantes de *splicing* para *CCDC28B* (*Ensembl*ENSG00000160050 y ENSMUSG00000028795) solamente hay dos isoformas que codifican para proteínas completas. Estas son proteínas de 200 y 241 aminoácidos, las cuales difieren solamente en el último exón, y por lo tanto ambas poseen la porción del exón tres que se encontró mutada en pacientes BBS. Actualmente, se ha establecido a la isoforma Q9BUN5-1 (200 aa) como la forma canónica, mientras que la otra sería un producto de la retención de un intrón.

Esta proteína de 200 aminoácidos está conservada en todos los metazoarios ciliados (Cardenas-Rodriguez, Osborn, et al., 2013), no posee homólogos de función conocida y la única información estructural que se tiene hasta el momento es la que fue obtenida durante mi Tesis de Maestría (Caracterización estructural de la proteína CCDC28B, un modificador del síndrome de Bardet-Biedl, PEDECIBA, 2017). Allí, si bien no logramos cristalizar la proteína, mostramos que *in vitro* CCDC28B es capaz de formar dímeros mediados por puentes disulfuro, algo que no sabemos si ocurre *in vivo*. El rol de *CCDC28B* como modificador de BBS comenzó a esclarecerse con trabajos previos de nuestro grupo donde se demostró que cumple un papel importante en el proceso de ciliogénesis. Además, se vio que la proteína participa en la modulación de la vía de mTORC2 a través de su interacción con SIN1 (Cardenas-Rodriguez, Irigoín, et al., 2013). La vía de mTOR es un regulador central de la homeostasis celular, integrando señales intra y extracelulares que la convierten en regulador del metabolismo, crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Laplante & Sabatini, 2009). La vía nuclea a dos importantes complejos multiproteicos: mTORC1 y mTORC2. A diferencia de lo que sucede con el complejo 1, el primero y mejor caracterizado (Laplante & Sabatini, 2009), la regulación y funcionalidad de mTORC2 es menos conocida. Esto es en parte debido a que la deleción de componentes de este complejo en ratones causa letalidad y durante mucho tiempo no se conocían inhibidores específicos del mismo, lo que dificultaba su estudio. Este complejo juega un rol importante en la supervivencia y en la proliferación, participando fundamentalmente en la reorganización del citoesqueleto de actina y en la migración celular (Oh & Jacinto, 2011). Nuestro grupo demostró en 2013, que CCDC28B interactúa con SIN1 y que a través de esta interacción regula la actividad de mTORC2. Utilizando la fosforilación de Akt en su dominio hidrofóbico, en el residuo S473, como reportero de la actividad de mTORC2, se demostró que mientras la disminución de CCDC28B disminuye la actividad del complejo, su sobre expresión la aumenta (Cardenas-Rodriguez,

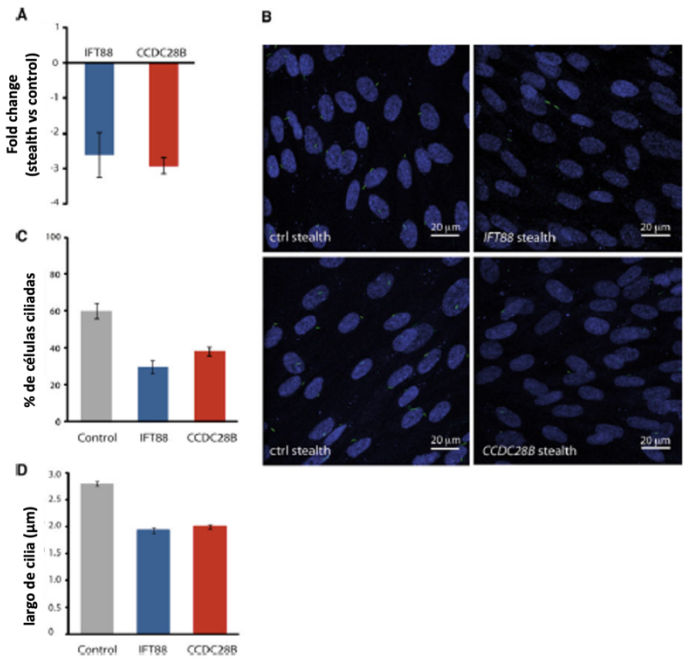


***Figura 6. CCDC28B regula ciliogénesis.***
***A)*** *Eficiencia de los stealh RNA oligo, tanto de IFT88 (utilizado como control) como de CCDC28B, medidos por qRT-PCR. Se utilizó GAPDH para normalizar.* ***B)*** *Imagen confocal de células hTERT-RPE transfectadas con Low GC StealthRNAi control, o con los oligosRNAi para CCDC28B e IFT88. Para visualizar el núcleo y la cilia se utilizaron TOPRO (azul) y tubulina acetilada (verde), respectivamente.* ***C)*** *Porcentaje de células ciliadas luego de la transfección con los Stealth: control, IFT88 y CCDC28B. Se contaron más de 100 núcleos y se calculó el porcentaje contando el número de cilias sobre esos núcleos.* ***D)*** *Se midieron cilias de más de 300 células tanto en el control como en las depletadas para IFT88 y CCDC28B. Figura adaptada de Cardenas.Rodríguez, M. et al 2013b.*

Irigoín, et al., 2013). Además, se mostró que CCDC28B regula ciliogénesis, tanto *in vivo* en pez cebra (*Danio rerio*), como *in vitro* en cultivos celulares (Cardenas-Rodriguez, Irigoín, et al., 2013). En la Figura 6 se muestran parte de los resultados obtenidos por la Dra. Magdalena Cárdenas-Rodríguez donde se ve la disminución, tanto del largo de cilias como del porcentaje de células hTERT-RPE ciliadas, cuando se disminuyen los niveles de CCDC28B (Cardenas-Rodriguez, Osborn, et al., 2013). Además, mediante ensayos de interacción se demostró que el efecto de CCDC28B en la ciliogénesis depende, al menos en parte, de su interacción con SIN1, pero en forma independiente del complejo mTORC2, ya que mientras la disminución de RICTOR (miembro del complejo e interactor de SIN1) o de SIN1 disminuye la actividad de mTORC2, solo la última altera el largo de la cilia (Cardenas-Rodriguez, Irigoín, et al., 2013).

Durante mi tesis de Maestría también logramos obtener una línea estable de células hTERT-RPE donde la actividad de CCDC28B está disminuida. Esta línea posee problemas de ciliogénesis, en particular en la regulación del largo de las cilias, las cuales son significativamente más cortas que en células control. A fin de investigar la función de diferentes regiones de CCDC28B en el proceso de ciliogénesis, utilizamos esta línea celular para sobre expresar mutantes de CCDC28B y evaluar el rescate del fenotipo ciliar. Así, observamos que una forma de CCDC28B carente de su señal de localización nuclear, no logra rescatar el fenotipo de ciliación como sí lo hace la forma salvaje (Tesis de Maestría, datos no publicados, Figura 7). Esto, junto con resultados previos de nuestro grupo (Novas et al., 2018), dejan en claro que es importante la localización nuclear de CCDC28B para su actividad en ciliogénesis.

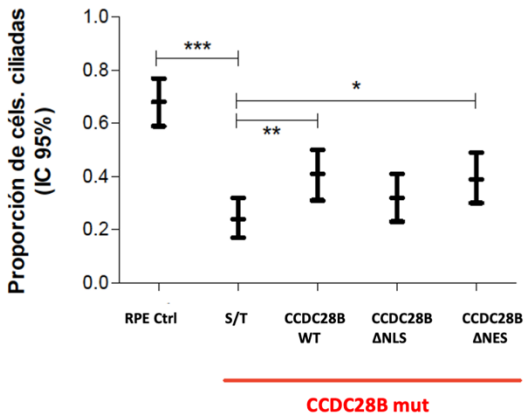


***Figura 7. La participación de CCDC28B en el proceso de ciliogénesis, depende al menos en parte, de la región de localización nuclear de la proteína.***
Cuantificación del porcentaje de ciliación en los diferentes cultivos de células hTERT-RPE control y Ccdc28b mut, donde se sobreexpresan distintas versiones de CCDC28B. S/T = sin trasnfectar, ΔNLS= mutante en la señal de localización nuclear, ΔNES= mutante en la señal de exportación nuclear. Proporción expresadas por el intervalo de confianza (IC) 95%. Los asteriscos señalan las diferencias estadísticamente significativas. *p≤0.05, **p≤0.01 y ***p≤0.001. Figura de Tesis de Maestría, PEDECIBA, Fabregat 2017. (Datos no publicados).

Dado que no logramos obtener más información estructural que nos diera pistas sobre los procesos moleculares detrás de las funciones observadas para CCDC28B, nos propusimos profundizar en la interacción de esta proteína con uno de sus interactores reportados, BBS4. Esta relación es de sumo interés ya que nos ayudaría a entender el efecto modificador de CCDC28B observado en algunos pacientes BBS.

## 1.6 BBS4

BBS4 es una proteína de 519 aa, aproximadamente 58 kDa, que consta de 13 dominios de unión proteína-proteína denominados TPR (del inglés: "*tetra tricopeptide repeat*"; (Kim et al., 2004). Forma parte del BBSoma y es una de las últimas proteínas en incorporarse al complejo (Zhang, Yu, et al., 2012). Estas observaciones sugieren que la proteína podría tener, como uno de sus roles más importantes, interactuar con otras proteínas y, por ende, podría ser importante para seleccionar la carga del BBSoma. La primera conexión directa entre BBS4 y la cilia fue en 2004, cuando se demostró que interactúa con PCM1, el principal componente de los satélites pericentriolares, material que rodea el centrosoma y cuerpo basal. En ese trabajo se mostró además que BBS4 es necesaria para la correcta localización de PCM1 a la región pericentriolar (Kim et al., 2004). Esta región regula la actividad del BBSoma actuando como un reservorio de BBS4, que al comienzo de la ciliogénesis se relocalizaría desde allí al cuerpo basal y la cilia, facilitando tanto la función del BBSoma, como su entrada a la cilia (Novas et al., 2015; Stowe et al., 2012). Pese a esto, la deficiencia de BBS4 no provoca necesariamente la ausencia de cilias en los tejidos (Berbari et al., 2008; Mokrzan et al., 2007), pero sí genera defectos en el transporte de algunos receptores a la membrana ciliar (Berbari et al., 2008; Leitch & Zaghloul, 2014), lo que sirve para recordar que la mera presencia de cilias no asegura que los organelos sean completamente funcionales.

Como mencionamos anteriormente, también se han reportado roles extra ciliares de BBS4. Por un lado, a través del BBSoma, BBS4 media el reciclado del receptor Notch a la membrana plasmática (Leitch et al., 2014) y también participa en el transporte hacia la membrana plasmática del receptor de insulina (Starks et al., 2015). También es importante destacar que, pese a que aún no se conocen detalles del mecanismo, hace ya varios años que se vincula a BBS4 con adipogénesis. En 2006 se encontró una asociación entre algunos polimorfismos en *BBS4*, *BBS2* y *BBS6* con obesidad en la población general (Benzinou et al., 2006). Posteriormente, se vinculó directamente a BBS4 con el proceso de adipogénesis, cuando se observó que el silenciamiento del gen en preadipocitos 3T3/F442A acelera la división celular y genera un fenotipo de menor diferenciación con respecto a los controles sin silenciar (Aksanov et al., 2014).

Estos resultados nos estimularon al estudio más detallado del proceso de adipogénesis, hipotetizando que BBS4 podría estar modulando el mismo a través de su vínculo con la cilia (ver más adelante). Esta idea es aún más atractiva teniendo en cuenta la alta prevalencia del fenotipo de obesidad en pacientes BBS y en modelos murinos KO para proteínas BBS, entre ellos el de BBS4.

## 1.7 Modelo murino *Bbs4 -/-*

El primer reporte de un ratón Bbs4 -/- surge en 2004, cuando el grupo liderado por el Dr. Val Sheffield reporta su creación (Mykytyn et al., 2004). Dos años después el grupo liderado por el Dr. James Lupski reporta la creación de otro modelo murino *Bbs4 -/-* (Eichers et al., 2006). Ambos modelos son KO convencionales, y si bien destacaremos algunos resultados de ambos, nos centraremos en el modelo del grupo del Dr. Sheffield ya que es el que utilizamos durante este trabajo de Doctorado.

La generación de esta línea se realizó sustituyendo los exones 6 al 11 por un casete de resistencia a neomicina, a través de recombinación homóloga (Figura 8). Para esto se electroporaron células madre embrionarias (R1) con la construcción generada (casete de resistencia a neomicina más los fragmentos de homología) y las mismas fueron luego seleccionadas y genotipadas. Las células heterocigotas fueron luego inyectadas en blastocistos C57/BL6 para generar los animales mutados (Mykytyn et al., 2004).

Luego de generada la línea *knockout* se caracterizó el fenotipo de los animales, encontrando que estos muestran varias de las principales características de BBS humano, entre ellas obesidad y degeneración de retina (Mykytyn et al., 2004). También se mostró que los ratones *Bbs4 -/-* desarrollan tanto cilias primarias como cilias móviles, demostrando nuevamente que BBS4 no es indispensable para la formación de la cilia. De todas formas, como mencionamos anteriormente, este modelo desarrolla degeneración de retina, generada por la muerte de los fotorreceptores. Cabe destacar que el segmento externo de los fotorreceptores es una cilia altamente modificada y que se conecta al segmento interno por un remanente de cilia denominado cilio conector. La estructura de esta cilia, así como el transporte de moléculas mediado por IFT a través de ese cilio conector, es crítico para el mantenimiento estructural y funcional del fotorreceptor (Wheway et al., 2014). Otro fenotipo de los ratones *Bbs4 -/-* es que los machos son infértiles por problemas en la formación del

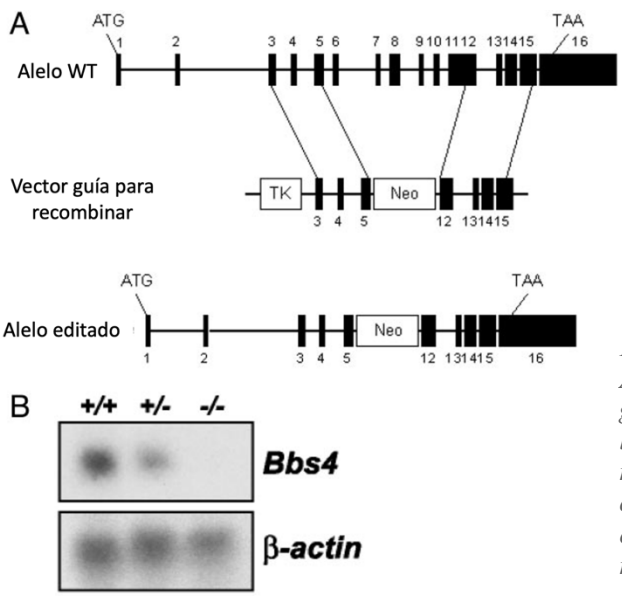


***Figura 8. Construcción del modelo murino Bbs4 -/-.*** *A) Esquemas del alelo WT de Bbs4, el vector construido para generar la recombinación con sus regiones de homología en los exones 3-5 y 12-15, y el alelo editado luego de la recombinación donde se sustituyen los exones 6-11 por el casete de neomicina.* ***B)*** *Análisis por NorthernBlot de la expresión de Bbs4 y de β-actina como control en células de riñón. Figura adaptada de Mykytyn et al., 2004.*

flagelo de los espermatozoides, lo que continúa demostrando que, por un lado, la mera presencia del organelo no asegura su completa funcionalidad, y por otro, la íntima relación que existe entre la función de la cilia y la presencia de BBS4.

Más tarde, en otro trabajo de este mismo grupo, se reportó que los ratones *Bbs4 -/-* son hiperfágicos, tienen una actividad locomotora disminuida, además de ser hiperleptinémicos y resistentes a la leptina (Rahmouni et al., 2008). Allí, los autores concluyen que el desarrollo de obesidad en esta línea es producto de la ingesta aumentada y de la menor movilidad, pero también es posible que la reducción en la movilidad sea secundaria a la obesidad ya que de hecho en el otro modelo *Bbs4 -/-* no observaron diferencias a nivel de locomoción en el ensayo de campo abierto (Eichers et al., 2006). Por otra parte, se observa que los niveles elevados de leptina se dan incluso antes de que los *Bbs4 -/-* se separen de los *Bbs4* +/+ en cuanto al peso. Finalmente, también se reportó allí la presencia de hipertensión, aunque sin problemas en la función cardíaca. Observaron que la hipertensión lograba ser revertida cuando se controlaba la hiperleptinemia mediante el ayuno. La presión arterial elevada también se observa en los pacientes BBS, por lo que los autores concluyen que el modelo constituye una herramienta importante para el estudio de BBS, y que servirá para continuar entendiendo los mecanismos fisiopatológicos de algunas de las enfermedades asociadas como la hipertensión y la obesidad, esta última de gran importancia para nuestro grupo y en la que nos centraremos particularmente.

## 1.8 Obesidad

La obesidad es la condición que se genera cuando hay una acumulación excesiva de grasa corporal, al punto de ser un riesgo para la salud del individuo ("Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health," 1998). Para estimar el contenido de grasa corporal existen métodos precisos, pero también costosos, como ser la resonancia magnética, la tomografía computarizada o la hidrometría, entre otros (Elbers et al., 1997; Machann et al., 2005; Wang et al., 1999). Así mismo, hay métodos de aplicación simple y sin costo, como los basados en medidas antropométricas. De ellas la más utilizada para diagnóstico y estudios epidemiológicos es el Índice de Masa Corporal (IMC) (Bray & Bouchard, 2014).

El IMC se determina a partir de la masa corporal y la estatura de cada individuo según la siguiente fórmula IMC = masa (Kg) / estatura$^2$ (m$^2$). La correlación entre el IMC y el contenido de grasa corporal permitió que se establecieran rangos para categorizar a los individuos según su estado de peso corporal. Valores de IMC menores a 18,5 kg/m$^2$ están asociados a individuos de bajo peso, valores entre 18,5 y 24,9 kg/m$^2$ son considerados de normopeso, entre 25 y 29,9 kg/m$^2$ se asocian con sobrepeso y los mayores a 30 kg/m$^2$ con obesidad (Cornier et al., 2011). Es importante destacar que a la hora de utilizar el IMC como medida de acumulación de grasa este es, generalmente, más preciso en mujeres que en hombres, ya que en individuos con alta masa muscular, la utilización del índice puede generar falsos positivos para sobrepeso (Buss, 2014; Zhang et al., 2019).

Actualmente, la OMS estima que cerca del 40% de la población adulta mundial tiene sobrepeso (IMC > 25) y cerca del 15% obesidad (IMC > 30) y que son más de 340 millones los niños y adolescentes que padecen alguna de estas condiciones (WHO, 2021). Uruguay no está por fuera de esta realidad y al menos hasta hace unos años tenía el mayor índice de crecimiento de la prevalencia de obesidad en todo Sudamérica y el segundo mayor porcentaje de población obesa en la región, solamente por detrás de Argentina (*Obesity ranking by country*, 2016; Severi & Moratorio, 2014).

La obesidad se desarrolla como resultado de un desbalance constante entre la ingesta y el gasto energético, que el organismo almacena en forma de triglicéridos en depósitos de grasa. Es decir, los depósitos de grasa actúan como buffer energético para el cuerpo. El superávit o déficit diario en la ingesta energética, se traduce en un aumento o reducción de los depósitos de grasa (Frayn, 2002). Las causas del desarrollo de obesidad en un individuo pueden deberse a varios factores, genéticos o ambientales, entre los que se incluyen, por ejemplo, la presencia de otras patologías, el consumo de algunos medicamentos, la presencia de determinados hábitos alimenticios y la actividad física. Si bien

se ha mejorado en el entendimiento del metabolismo energético, lo que ha permitido la identificación de factores de riesgo para el desarrollo de obesidad, aún resta mucho por hacer. Sobre todo, en cuanto a los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la obesidad, y entender qué es lo que realmente está sucediendo cuando se genera un ambiente propenso al desarrollo de obesidad, caracterizado por un exceso en la ingesta y por un estilo de vida sedentario, pero del cual sabemos aún poco desde el punto de vista fisiológico.

La ingesta energética se define por la cantidad, calidad y eficiencia energética de los alimentos que uno ingiere. Mientras que la cantidad puede estar asociada a algunos factores biológicos, como la sensación de hambre o saciedad, la calidad se asocia a las preferencias gustativas de cada uno. Pero ambas pueden verse afectadas por factores socio-económicos, como el acceso a los alimentos y la periodicidad en las ingestas. Por su parte, la eficiencia energética de los alimentos está asociada a su composición, es decir, la proporción de proteínas, carbohidratos y grasas que contienen (Bray & Bouchard, 2014).

Por otro lado, el gasto energético del individuo se define por la Tasa Metabólica de Reposo (TMR) y por su actividad física (Ravussin et al., 1986). La TMR la definen los procesos necesarios para que el organismo mantenga su homeostasis, y representa aproximadamente entre el 50 y el 80% del gasto energético total (Ravussin et al., 1986). Esta variación que puede existir entre individuos se debe a que la TMR varía según el sexo, la edad y actividad del sistema nervioso autónomo (Bouchard et al., 1989). Mientras que la actividad física es la suma de la actividad espontánea, producto de los cambios de posición, movimiento de piernas y manos, etc (8-15% del gasto energético total), y la actividad asociada a actividades laborales o recreativas.

Lógicamente, es muy difícil que la ingesta y el gasto energético realizados sean idénticos, y por lo tanto la mayoría de las veces existe un desbalance energético. Cuando el desbalance energético es positivo, se activan procesos compensatorios como el aumento en la sensación de saciedad y un aumento en la TMR (Stock, 1999). Sin embargo, estos procesos pueden no ser suficientes para contrarrestar el excedente energético, generando entonces un aumento en la síntesis de proteínas, mayoritario durante el crecimiento y desarrollo del individuo, o un aumento en el almacenamiento de triglicéridos en los depósitos de grasa corporal, el cual es mayoritario una vez alcanzada la adultez (Frayn, 2002).

Cuando ese desbalance energético es negativo, se activan otros procesos compensatorios que incluyen un aumento en la sensación de hambre, un mayor acoplamiento entre el metabolismo de los nutrientes y la generación de energía a nivel mitocondrial y una reducción en la actividad física

(Redman et al., 2009). Además, cuando este desbalance energético negativo se prolonga en el tiempo, se activa el catabolismo de las reservas energéticas del organismo. Las reservas a corto plazo son las constituidas por carbohidratos. Constituyen una mínima parte de las reservas energéticas totales y están formadas fundamentalmente por el glucógeno muscular y hepático. Mientras el primero es utilizado solamente por el músculo para su funcionamiento, el segundo es el encargado de mantener los niveles de glucosa en sangre dentro del rango fisiológico y de proveer glucosa a otros tejidos en condiciones extremas, fundamentalmente al cerebro (Abbott et al., 1988). Por otro lado, los depósitos de triglicéridos son la reserva de energía más grande del cuerpo y por sí solos son capaces de sobrellevar un balance energético negativo prolongado. En estos casos lo que sucede es la hidrólisis de triglicéridos con la consecuente liberación de ácidos grasos, que pasan al torrente sanguíneo para su posterior oxidación en diferentes órganos como músculo o hígado. En un adulto normo peso, las reservas de triglicéridos en los depósitos de grasa son de aproximadamente entre 10 y 20 kg lo que equivale a las reservas necesarias para sobrellevar un ayuno de entre 60 y 70 días. En individuos obesos ese período se puede extender a 90 o 100 días (Bastard & Fève, 2013). Finalmente, las reservas de proteínas constituyen la menor parte de las reservas energéticas totales y son utilizadas como último recurso (Abbott et al., 1988).

## 1.9 Tejido adiposo

El tejido adiposo de los animales homeotermos se puede dividir en dos grandes categorías, tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo pardo (TAP). El TAB está formado por adipocitos de gran tamaño que acumulan lípidos en forma de triglicéridos en grandes gotas lipídicas. Constituye el depósito más grande de energía del organismo. Por su parte, el TAP es un tejido más denso y vascularizado, lo que junto con el gran número de mitocondrias que tienen sus adipocitos, le da al tejido un color más oscuro (Figura 9). La función primaria del TAP es la disipación de energía mediante termogénesis no tiritante ("Metabolic Basis of Obesity," 2011).

En cuanto a su localización en el ser humano adulto, el TAP está presente fundamentalmente en la región para-aórtica, en el mediastino, en el cuello y en las regiones peri-renal e inter-escapulares (Figura 9). Está compuesto principalmente de adipocitos, vasos sanguíneos y nervios, aunque la heterogeneidad celular de este tejido está mucho menos caracterizada que en el TAB. A diferencia de los adipocitos del TAB, los del TAP son más pequeños (< 20 µm) y acumulan los triglicéridos en múltiples gotas de menor tamaño individual. Estos adipocitos tienen un gran número de mitocondrias que expresan la proteína desacoplante 1 (UCP-1, del inglés: *uncoupling protein 1*), lo que les permite generar calor. Es importante señalar que el TAP es un tejido metabólicamente muy activo, consumiendo incluso más glucosa por gramo que el músculo. De hecho, este nivel de actividad sólo se compara con el del cerebro o los tejidos tumorigénicos ("Metabolic Basis of Obesity," 2011).

Por su parte, el TAB también se puede clasificar según su localización anatómica. Tanto en humanos como en ratones el TAB está distribuido a lo largo de todo el cuerpo, pero mayormente se puede separar en los depósitos subcutáneos, anteriores y posteriores, y los depósitos viscerales: omental, intestinal y peri-renal (Figura 9). El TAB se compone de los adipocitos y de una fracción estromal vascular. En su gran mayoría los adipocitos del TAB son unilobulares, con un diámetro de entre 20 y 200 µm. De todas formas, también pueden existir depósitos de TAB formado por adipocitos más chicos, los que están asociados a una mayor sensibilidad

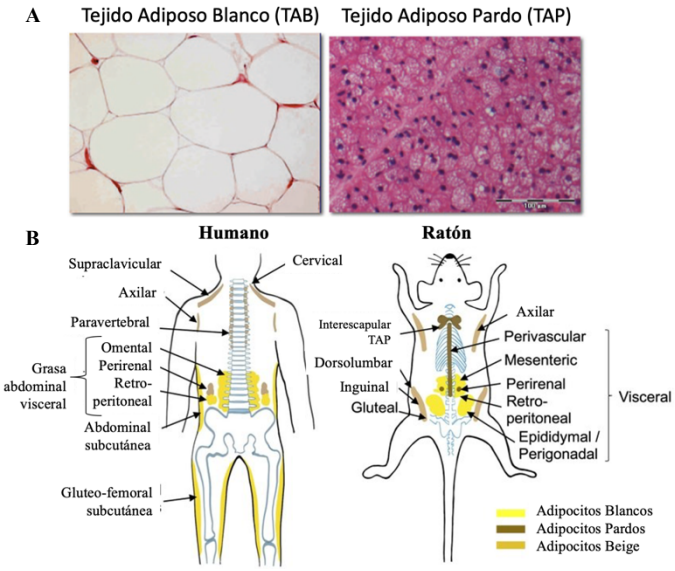


***Figura 9. Organización del tejido adiposo en humano y ratón.***
***A)*** *Cortes de tejido adiposo blanco y pardo teñidos con Hematoxilina-Eosina.* ***B)*** *Clasificación de los depósitos de grasa en humanos y ratones, por tipo y ubicación. Figura adaptada de Metabolic Basis of Obesity, 2011.*

a la insulina. Además, el tipo de lípido almacenado dentro de los adipocitos, independientemente del tamaño de estos, también puede ser importante para regular la función de los mismos ("Metabolic Basis of Obesity," 2011; Virtue & Vidal-Puig, 2008). Los adipocitos son los encargados de llevar a cabo las principales funciones del tejido, tanto las endocrinas como las metabólicas. En cuanto a las funciones metabólicas, los adipocitos son los encargados de la síntesis y el almacenamiento de los triglicéridos, así como también de su metabolización en ácidos grasos libres cuando hay un balance energético negativo (Bastard & Fève, 2013). Por otro lado, las funciones endocrinas de los adipocitos agrupan: la secreción de hormonas, factores de crecimiento y citoquinas como la leptina, adiponectina, resistina, nefastina-1, factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, del inglés: *Pigment epithelium-derived factor*) y la proteína de unión al retinol 4 (RBP4, del inglés: *Retinol binding protein 4*). Es de particular importancia su función secretora de leptina, ya que esta hormona es expresada en exclusividad por los adipocitos, liberándose al torrente sanguíneo en función de la masa de tejido adiposo (Friedman & Halaas, 1998). Tanto en humanos como en ratones las deficiencias en la producción de leptina o de su receptor genera hiperfagia y obesidad, lo que indica el importante papel que esta hormona juega en la homeostasis energética (Picó et al., 2021).

Por otro lado, la fracción estromal vascular está formada por preadipocitos, fibroblastos, células estromales y endoteliales, macrófagos, mastocitos y linfocitos, entre otros tipos celulares, y son los responsables de mantener la homeostasis del tejido adiposo (Mariman & Wang, 2010). En cuanto a la importancia de esta fracción, hay que recordar que la obesidad tiene un fuerte componente inflamatorio, con reclutamiento de células inmunes, proliferación local de estas y liberación de citoquinas, tanto por las poblaciones inmunes residentes e infiltrantes, como por los propios adipocitos. Este contexto inflamatorio se genera cuando el excedente energético es crónico y el tejido adiposo no puede continuar expandiéndose. Allí, la función de los adipocitos está comprometida y el tejido comienza a volverse disfuncional. Esto sucede fundamentalmente debido a un aumento en los macrófagos infiltrantes de tipo I y la expresión de TNFα (del inglés, *Tumor Necrosis Factor Alpha*) e IL-6 (Interleuquina-6). Estas citoquinas son reguladores negativos en la señalización de la insulina ya que participan en la fosforilación de los factores IRS (del inglés, *Insulin Receptor Substrate*) y estimulan la lipólisis (Weisberg et al., 2003). De hecho, se ha visto que terapias anti-inflamatorias, así como la regulación de genes importantes en la respuesta pro-inflamatoria, mejoran la sensibilidad a la insulina en animales obesos (Kim et al., 2001; Yuan et al., 2001).

Hoy en día se cree que el proceso de adipogénesis, a través de la generación de nuevos adipocitos, tiene un rol protector contra las enfermedades metabólicas. Particularmente en humanos se ha observado que la adipogénesis puede continuar siendo protectora frente a las enfermedades

metabólicas siempre que la acumulación de grasa continúe siendo preferencialmente en los depósitos de grasa subcutánea (Naukkarinen et al., 2014; Wildman, 2009). Por otro lado, la acumulación excesiva de TAB visceral está íntimamente relacionada con el desarrollo de resistencia a la insulina, diabetes, dislipidemia y un mayor riesgo de aterosclerosis (Kissebah & Krakower, 1994).

Estas particularidades del tejido adiposo, así como la existencia de un abanico amplio de presentaciones de la obesidad en pacientes, han llamado la atención tanto de clínicos como de científicos en los últimos años. En particular ha llamado la atención un grupo de pacientes donde se observa que la obesidad no necesariamente conlleva al desarrollo de síndrome metabólico, condición que se comenzó a reportar como “obesidad saludable”.

## 1.10 Obesidad saludable

La obesidad está asociada a una reducción en la expectativa de vida, en gran medida debido a que los individuos obesos presentan un aumento en el riesgo a desarrollar Diabetes Tipo 2, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Mokdad et al., 2003). Sin embargo, no todos los individuos que presentan obesidad tienen un mayor riesgo de mortalidad, lo que determina un subgrupo de individuos obesos más saludables, que dan lugar a la llamada "obesidad saludable" (OS) (Phillips, 2013; Stefan et al., 2013).

La OS entonces se caracteriza por la ausencia de fenotipos metabólicamente perjudiciales como dislipidemia, resistencia a la insulina, hipertensión y un elevado perfil inflamatorio (Phillips, 2013; Stefan et al., 2013). Sobre la prevalencia de este fenotipo es difícil hablar de cifras exactas ya que difiere mucho según qué criterio se establezca para el diagnóstico de esta condición. En la Tabla 2 se observan los distintos criterios de diagnóstico según diferentes estudios (Aguilar-Salinas et al., 2008; Expert Panel on Detection, 2001; Karelis et al., 2004; Meigs et al., 2006; Stefan et al., 2008; Wildman et al., 2008). De todas formas, se ha observado que su prevalencia es mayor en mujeres que en hombres y que la misma disminuye en función de la edad (Blüher, 2020; van Vliet-Ostaptchouk et al., 2014).

| Variables | (Meigs et al., 2006) | (Stefan et al., 2008) | (Aguilar-Salinas et al., 2008) | (Karelis et al., 2004) | (Wildman et al., 2008) | (Expert Panel on Detection, 2001) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CC, cm | ≥ 102 (M)<br>≥ 88 (F) | | | | | ≥ 102 (M)<br>≥ 88 (F) |
| PA, mmHg | ≥ 130/85 o en tratamiento | | < 140/90 sin tratamiento | | ≥ 130/85 o en tratamiento | ≥ 130/85 o en tratamiento |
| GA, mg/dl | ≥ 100 o en tratamiento | | < 126 sin tratamiento | | ≥ 100 o en tratamiento | ≥ 100 o en tratamiento |
| TG, mg/dl | ≥ 150 | | | < 150 | ≥ 150 | ≥ 150 |
| HDL, mg/dl | < 40 (M)<br>< 50 (F) | | ≥ 40 | ≥ 50 | < 40 (M)<br>< 50 (F) | < 40 (M)<br>< 50 (F) |
| HOMA-IR | | | | < 1.95 | > percentil 90 | |
| Otros | | WBISI > percentil 75 | | TC < 200 mg/dl LDL < 100 mg/dl | hsCRP> percentil 90 | |
| Criterio para OS | < 3 de las anteriores | Todas las anteriores | Todas las anteriores | ≥ 4 de las anteriores | < 2 de las anteriores | < 3 de las anteriores |
| BMI, kg/m$^2$ | ≥ 30 | ≥ 30 | ≥ 30 | ≥ 30 | ≥ 30 | ≥ 30 |

***Tabla 2. Diferentes criterios utilizados para el diagnóstico de OS.***
*CC, Circunferencia de la cintura; PA, Presión arterial; GA, Glicemia en ayuno; TG, Triglicéridos; HDL, High Density Lipoprotein; HOMA-IR, Homeostasis model assessment of insulin resistance; WBISI, índice de sensibilidad a la insulina (del inglés: whole body insulin sensitivity index); TC, colesterol total; LDL, Low Density Lipoprotein, hsCRP, High sensitivity C-reactive protein. Tabla adaptada de (Jung et al., 2017).*

Un factor para tener en cuenta a la hora de hablar de OS es que, sin importar qué criterio diagnóstico se tome para describirla, todos los modelos hablan de la OS como una condición dinámica. Es decir que al hacer el seguimiento correspondiente, los individuos con OS por lo general evolucionan a una obesidad no saludable (Jung et al., 2017). Justamente por eso es importante tener en cuenta que se ha visto que los individuos con OS en muchos casos ni siquiera son capaces de disminuir su riesgo a desarrollar patologías cardiovasculares y metabólicas relacionadas (Blüher, 2014). Y hasta incluso se cuestiona los beneficios que, en este contexto, intervenciones en el estilo de vida de estos individuos puedan tener (Kantartzis et al., 2011; Perseghin, 2008). De todas formas, lo que sucede en ese período ventana donde se manifiesta la OS es de sumo interés en el campo de la investigación para buscar tratamientos más efectivos contra la obesidad y sus consecuencias deletéreas.

En cuanto a los mecanismos moleculares que subyacen la presentación de la OS se sabe muy poco hasta el momento, aunque hay varias hipótesis al respecto. La mayoría de ellas incluyen la preservación de la sensibilidad a la insulina y una distribución particular de los depósitos de grasa, donde los depósitos de grasa visceral serían comparativamente más pequeños que los depósitos de

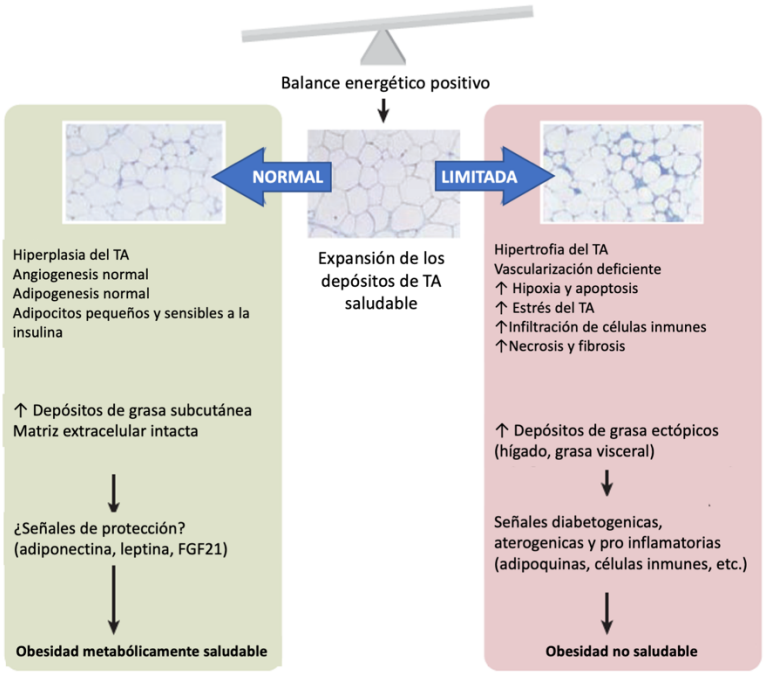


***Figura 10. Estrategias del tejido adiposo para su expansión durante el balance energético positivo.***
*El tejido adiposo es el encargado de almacenar el exceso de energía y lo hace de dos formas: aumentando el número de adipocitos a partir de células precursoras (hiperplasia), o a través de la hipertrófia de los adipocitos ya existentes en el tejido. Cuando los depósitos de grasa subcutánea (asociados a una respuesta saludable) o la capacidad del tejido de responder al exceso de calorías por hiperplasia están comprometidos, se comienza a desarrollar un mal funcionamiento del tejido. Este está caracterizado por la acumulación ectópica de grasa (fundamentalmente en el hígado, músculo y páncreas), mala vascularización, infiltración de células inmunes, apoptosis e hipoxia. El mal funcionamiento desencadena la generación de señales aterogénicas que terminan en el desarrollo de síndrome metabólico. Figura adaptada de Blüher M.,2020.*

grasa subcutánea y también habría una menor acumulación ectópica de lípidos (fundamentalmente en el hígado y músculo) (Blüher, 2014; Jung et al., 2017).

En este punto es importante recordar dos datos que relacionan la fisiología del tejido adiposo con una presentación más o menos saludable de la obesidad. Por un lado, la grasa visceral está más asociada con las patologías metabólicas derivadas de la obesidad que la grasa subcutánea: se ha demostrado una clara relación entre el aumento de los depósitos viscerales y algunos factores de riesgo cardiovascular como la dislipidemia y la hiperinsulinemia (Wajchenberg, 2000). Por otro lado, la expansión hipertrófica del tejido adiposo, es decir, el aumento en tamaño de los adipocitos pre-existentes está relacionada con la disfunción del tejido, fundamentalmente por una mayor lipólisis y liberación de ácidos grasos al medio circulante que genera, entre otras cosas, la activación de los macrófagos residentes del tejido adiposo (Suganami et al., 2009). Además, la hipertrofia puede terminar en un fenotipo necrótico, que junto a otros estímulos pro-inflamatorios desencadenan procesos que terminan en la afectación de todo el tejido por fibrosis e hipoxia. Por el contrario, cuando la expansión del tejido adiposo se produce a través de hiperplasia, es decir el aumento en el número de adipocitos, estos logran mantener su fisiología y su tamaño normal y esto resulta en una estrategia más saludable para almacenar el exceso energético. En la Figura 10 se puede observar gráficamente las características de ambos procesos.

## 1.11 Obesidad en BBS

Creemos importante estudiar más en profundidad el fenotipo de obesidad en BBS por tres motivos principales: en primer lugar, hoy en día hay más genes BBS estudiados y se tiene más información sobre sus funciones; en segundo lugar, porque diferentes reportes indican que la presentación de la obesidad en BBS tendría características particulares; y tercero, porque el estudio de este síndrome podría aportar información sobre procesos celulares y moleculares relevantes para entender la patogénesis de uno de los principales problemas de salud pública de nuestro tiempo.

La obesidad está presente principalmente en dos ciliopatías, BBS y el Síndrome de Alström. En pacientes BBS, así como en los distintos modelos murinos de BBS que han sido reportados, la obesidad aparece como una característica altamente prevalente. Además, es importante destacar que distintos trabajos, tanto en pacientes como en modelos murinos, reportan que el fenotipo de obesidad presentaría una atípica disociación con respecto a otras patologías asociadas como la Diabetes Tipo II (Feuillan et al., 2011; Lodh et al., 2016; Marion et al., 2012). Profundizaremos en este punto más adelante por ser de sumo interés ya que, en conjunto, la particularidad de su presentación y la base genética detrás de la patología, hacen que el estudio de BBS sea una buena oportunidad para continuar ganando información sobre los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de obesidad. En relación con esto, también resultan sumamente interesantes los reportes sobre la relación entre polimorfismos en algunos genes BBS y un aumento en el riesgo a desarrollar obesidad e hipertensión, incluso en individuos no afectados con BBS (Benzinou et al., 2006).

En cuanto a la causa de la obesidad en las ciliopatías, y en particular en BBS, varias líneas de investigación apuntan a un defecto en el sistema nervioso central como un actor principal. Particularmente, un grupo de neuronas del hipotálamo, las neuronas POMC (de Propiomelanocortina) del núcleo arcuato, son las encargadas de regular el estímulo de la ingesta y la saciedad. Se ha observado que problemas en la formación y el funcionamiento de las cilias de estas neuronas resultan en animales hiperfágicos que desarrollan obesidad y desregulación metabólica secundaria, como hiperleptinemia e hiperinsulinemia, entre otras (Davenport et al., 2007). Además, se ha visto que defectos en algunas proteínas BBS resultan en la deslocalización de algunos receptores asociados a proteínas G que también están vinculados a la regulación de la saciedad, como Sstr3, Mhcr1 y NPY2R (Berbari et al., 2008; Loktev & Jackson, 2013). Finalmente, se sabe que las proteínas BBS interactúan con el receptor de leptina participando en su tráfico intracelular (revisado en Novas *et al.*, 2015). Todo esto va en línea con la hipótesis de que un defecto en la regulación de la saciedad a nivel del SNC es el principal responsable de la generación de obesidad en BBS.

Sin embargo, cada vez hay más reportes sobre el importante rol que cumplen tanto la cilia como las proteínas BBS en tejidos periféricos claves para el desarrollo de la obesidad, y en particular el tejido adiposo. Ya se ha descrito la participación de las proteínas BBS en la ciliogénesis durante la diferenciación de adipocitos (Marion et al., 2012) y nuestro grupo también ha hecho aportes importantes en este contexto. Recientemente mostramos que BBS4 interacciona y media la secreción de FSTL1 (del inglés: *Follistatin like 1*), una proteína importante en el proceso de adipogénesis (Prieto-Echagüe et al., 2017). Esta interacción fue reportada por primera vez por nuestro grupo, observando que tanto BBS4 como la cilia regulan los niveles de ARNm de FSTL1, pero que además BBS4 regula la secreción de la proteína (Figura 11). Los datos también mostraron que FSTL1 participa en el proceso de regulación de la ciliogénesis, y que BBS4 y FSTL1 colaboran modulando la diferenciación de adipocitos, y lo hacen, al menos en parte, regulando ciliogénesis (Figura 11).

Los datos de Prieto-Echagüe *et al.* muestran que en el inicio del proceso de diferenciación a adipocitos se necesitan tanto la cilia, como FSTL1 y niveles elevados de BBS4, mientras que las tres son reguladas a la baja a lo largo de los primeros 4-5 días de diferenciación (Figura 11). La importancia de esta regulación fue confirmada reprimiendo la expresión de FSTL1 al inicio del proceso, donde se observó una afectación de la diferenciación. Por otro lado, cuando se mantiene FSTL1 sobre-expresada durante el transcurso de la diferenciación también se afecta el resultado, obteniendo una menor diferenciación en ambos casos. Interesantemente, la necesidad de que se cumpla este "ciclo ciliar" durante la diferenciación se correlaciona con los niveles de actividad de

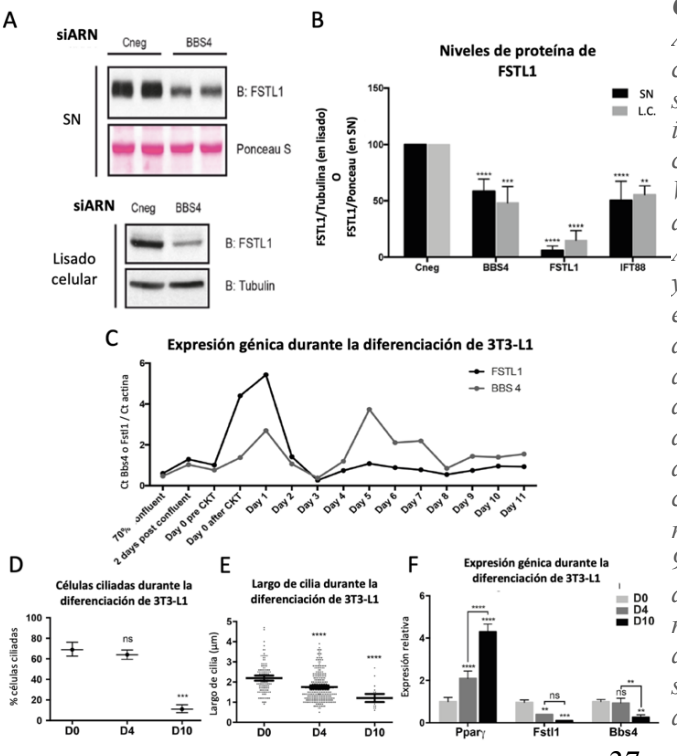


***Figura 11. Regulación del eje BBS4-FSTL1-Cilia.***

***A)****Transfección de células hTERT-RPE1 con siARN control (Cneg) y siARN BBS4 para generar el silenciamiento. Se midieron los niveles secretados e intracelular de FSTL1 analizando el sobrenadante del cultivo (SN) y los lisados celulares, respectivamente por Western Blot.* ***B)*** *Representación cuantitativa de la densitometría correspondiente a los WB observados en A). El silenciamiento de BBS4 reduce la expresión intra y extracelular de FSTL1.* ***C)****Análisis por qRT-PCR de la expresión de Fstl1 y Bbs4 en 3T3-L1 durante la diferenciación hacia adipocitos, desde los días previos a la incubación con el cocktail (CKT) hasta el día 11 de diferenciación.* ***D)*** *Porcentaje de células ciliadas en distintos momentos de la diferenciación: día 0, día 4 y día 10.* ***E)*** *Largo de cilia medido en las mismas condiciones que en D). En D) y E) las medidas están representadas como media ± intervalo de confianza al 95%.* ***F)*** *Niveles de ARNm del marcador de diferenciación Pparγ, Fstl1 y Bbs4 analizados en los mismos momentos que D) y E). En todos los casos los asteriscos señalan las diferencias estadísticamente significativas. *p≤0.05, **p≤0.01 y ***p≤0.001. Figura adaptada de Prieto-Echagüe et al., 2017.*

estímulos pro- (IGF1) y anti- adipogénicos (Shh y Wnt), vías de señalización que usan las cilias como plataforma de señalización.

De esta forma, creemos que el rol de BBS4 en el proceso de adipogénesis puede ser fundamental para entender mejor el desarrollo y la presentación particular de la obesidad en BBS, y esto a la vez puede ser una herramienta útil para entender mejor las bases moleculares y celulares de la obesidad en general.

## 1.12 Diferentes presentaciones de la obesidad en ciliopatías

Una de las razones para prestarle particular atención al fenotipo de obesidad que se desarrolla en los pacientes con BBS es lo diferente que puede llegar a ser con respecto al fenotipo de obesidad presente en otras ciliopatías como el síndrome de Alström. Mientras en esta última la diabetes tipo 2 y el desarrollo de síndrome metabólico se presentan con alta prevalencia, en BBS existe una gran incidencia de pacientes obesos que desarrollan una obesidad saludable (Feuillan et al., 2011).

Un estudio clínico llevado a cabo en 50 pacientes BBS obesos jóvenes (en promedio 15 años) y 100 individuos obesos control (no BBS) pareados por BMI indicó que los pacientes BBS tienen una mayor tolerancia a la glucosa y menores niveles de hemoglobina glicosilada, pese a tener una adiposidad visceral aumentada (Feuillan et al., 2011). Estos datos sugieren que la afectación de genes BBS pese a inducir obesidad, genera un efecto positivo en metabolismo de la glucosa.

Como ya vimos, normalmente existe un vínculo relativamente lineal entre la adiposidad visceral y la resistencia a la insulina en la mayoría de los fenotipos de obesidad estudiados. Sin embargo, la capacidad de los pacientes BBS de mantener la sensibilidad a la insulina y la normo glicemia pese al desarrollo de obesidad e hiperleptinemia, con una adiposidad visceral aumentada, resulta sumamente interesante, pensando en estrategias terapéuticas para combatir estas patologías.

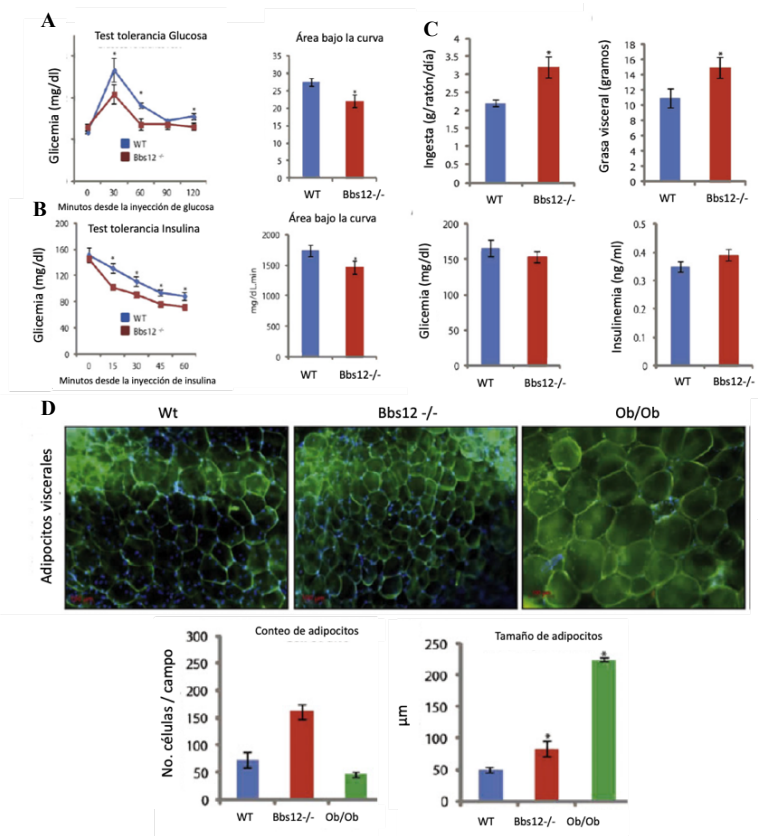


***Figura 12. Caracterización metabólica del modelo murino Bbs12 -/- en machos de 12 semanas de edad.***
*A) Test de tolerancia a la glucosa y su correspondiente área bajo la curva. B) Test de tolerancia a la insulina y su correspondiente área bajo la curva. C) Gráficos de cantidad de alimento consumido por día, peso de los depósitos de grasa visceral, glicemia basal en ayuno e insulinemia basal en ayuno. D) Caracterización de los depósitos de grasa visceral. En la parte superior se observa una tinción con AdipoRed de ratones de 40g en todos los casos. Y en la parte inferior se observa la cuantificación de estos, tanto en número de adipocitos como en tamaño. Figura adaptada de Marion et al., 2012.*

Por otro lado, y yendo al campo de los modelos murinos, un estudio llevado a cabo por Marion y colaboradores (Marion et al., 2012) logró reproducir en ratones *Bbs12 -/-*, uno de los modelos BBS murinos que desarrolla obesidad por hiperfagia, los resultados observados en pacientes BBS. Por un lado, encontraron que si bien los ratones *Bbs12 -/-* adultos son significativamente más pesados y tienen depósitos de grasa visceral más grandes que los *Bbs12 +/+,* no tienen diferencias significativas en los valores de glicemia ni de insulinemia en ayuno. A su vez, los resultados de los tests de tolerancia a la glucosa y a la insulina mostraron, en ambos casos, una mayor sensibilidad por parte de los ratones *Bbs12 -/-*. Todos estos resultados se pueden ver resumidos en la Figura 12, donde queda claro que este modelo, pese a presentar obesidad, muestra una sensibilidad a la insulina aumentada.

Interesantemente, los ratones *Bbs12 -/-* generan un aumento de su adiposidad por hiperplasia, presentando más adipocitos por área que los controles y de un tamaño levemente mayor (Marion et al., 2012). Además, estudios de la médula ósea de estos animales les permitieron concluir que la afectación de proteínas ciliares en las MSC (del inglés: *Mesenchymal Stem Cells*) resulta en la inhibición de procesos anti-adipogénicos y la activación de procesos pro-adipogénicos, favoreciendo la programación de estas células hacia la diferenciación a adipocitos. Todo esto además repercute en un aumento en la incorporación de glucosa y la síntesis de triglicéridos, junto con una disminución en la respuesta inflamatoria local en el tejido adiposo.

En este momento es importante destacar que existen algunas evidencias que permiten catalogar a la obesidad mórbida como una ciliopatía secundaria (Ritter et al., 2018). Esta idea se apoya en datos obtenidos en modelos de Diabetes Mellitus Tipo 2 en ratas (Goto-Kakizaki) y de obesidad en ratones (ob/ob). Si bien ninguno de ellos son modelos de ciliopatías, se observa una reducción significativa del largo de la cilia en células β pancreáticas (Gerdes et al., 2014) y una reducción en la expresión de diversas proteínas ciliares (Keller et al., 2008).

En suma, la singularidad con la que se presenta el fenotipo de obesidad en pacientes BBS y las diferencias que podrían existir entre el modelo murino BBS4 y otros modelos BBS en cuanto a este fenotipo, nos llevaron a centrarnos en el desarrollo de obesidad en animales *BBS4 -/-*, no solo para entender un poco más su biología, sino también para generar nuevas herramientas que permitan continuar dilucidando los procesos moleculares detrás de la obesidad.

# HIPÓTESIS GENERAL

El objetivo original de este trabajo de tesis se focalizó en recapitular la interacción genética entre BBS4 y CCDC28B observada en pacientes. En ese contexto, la hipótesis central fue que la depleción de CCDC28B en ausencia de BBS4 resultaría en un fenotipo más severo o en el desarrollo de otros fenotipos que no están presentes en los mutantes individuales. Si bien no llegamos a poder evaluar esta hipótesis directamente en este trabajo, sí logramos desarrollar los dos grandes bloques necesarios para hacerlo: i) una caracterización profunda del fenotipo de los ratones *Bbs4 -/-*, de manera de poder luego evaluar el efecto modificador de Ccdc28b, y ii) generar y caracterizar una nueva línea murina mutante para Ccdc28b. En este contexto, planteamos hipótesis específicas para estos dos grandes bloques de trabajo.

*Modelo murino Bbs4 -/-*

En función de los antecedentes, hipotetizamos que el desarrollo de obesidad en el modelo *Bbs4 -/-* tendría características particulares producto del rol de Bbs4/cilias en el tejido adiposo. A nivel celular, hipotetizamos que la ausencia de Bbs4, a través de su rol sobre las cilias, resultaría en cambios en el proceso de diferenciación de adipocitos. *In vivo*, pensamos que el rol de Bbs4 en la diferenciación de adipocitos sería importante para modular la tolerancia de este tejido a condiciones de exceso calórico, por ejemplo, favoreciendo la hiperplasia y reduciendo de esta manera la inflamación y la disfuncionalidad del tejido.

*Modelo murino Ccdc28b -/-*

Dado su rol modificador en humanos y nuestros datos en células y pez cebra mostrando que CCDC28B, al igual que las proteínas BBS, participa regulando la biología de las cilias, hipotetizamos que la eliminación de *Ccdc28b* en ratones resultaría en fenotipos similares a los observados con la ausencia de proteínas BBS o al menos generaría un entorno genético sensibilizado para el desarrollo de los mismos.

# OBJETIVO GENERAL

Entender el rol que juegan CCDC28B y BBS4, así como la interacción entre ellas, en la presentación de BBS y en los diferentes niveles de penetrancia y expresividad que la misma presenta cuando se afecta un gen causal y un modificador secundario, particularmente centrándonos en la obesidad y sus patologías asociadas

# OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Caracterizar en profundidad el modelo *Bbs4* -/- en lo que respecta al fenotipo de obesidad y desarrollo de resistencia a la insulina.
2) Generar un modelo murino *Ccdc28b* -/- por edición genómica basada en CRISPR-Cas9 y realizar una caracterización profunda enfocando en fenotipos asociados a BBS y otras ciliopatías.
3) Caracterizar el proceso de adipogénesis en ausencia de BBS4 y de CCDC28B.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 Generación del modelo murino *Ccdc28b -/-* por edición genómica basada en CRIPR-Cas9

Para la generación del modelo murino *Ccdc28b -/-* se utilizó la tecnología de edición genómica basada en CRISPR-Cas9. Este modelo fue realizado en colaboración con la Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio (UBAL) del IPMon.

Si bien los detalles correspondientes al diseño y caracterización del modelo murino *Ccdc28b -/-* se encuentran en el artículo publicado que se adjunta, aquí realizamos una introducción a la metodología de CRISPR-Cas9, fundamental para una gran parte de este trabajo como lo es el diseño y desarrollo del novedoso modelo murino *Ccdc28b -/-*. También realizaremos algunas puntualizaciones sobre el diseño del modelo que, por limitaciones de espacio, no fueron incluidas en el texto del artículo.

### *CRISPR-Cas9*

La tecnología CRISPR-Cas9 (del inglés: *Clustered Regulary Interspaced Short Palindromic Repeats*) refiere a un método de edición genómica específico y simple. Su desarrollo está íntimamente relacionado con el descubrimiento de un sistema de inmunidad procariota que utiliza dicho mecanismo para degradar el material genético de agentes externos (Barrangou et al., 2007; Jinek et al., 2012). Frente a una infección, las células procariotas emplean este sistema para detectar el material genético del virus infectante y generar cortes en la doble hebra que luego desencadenan su destrucción. La endonucleasa Cas9 es la encargada de realizar dichos cortes y el lugar exacto donde los realiza es determinado por pequeños fragmentos de ARN conocidos como ARN guías (ARNg). Utilizando toda esta información, en 2013 el Dr. Zhang fue el primero en reportar una adaptación exitosa del sistema CRISPR-Cas9 a la edición genómica en células eucariotas (Cong et al., 2013).

Los ARNg están conformados por dos moléculas de ARN. Por un lado, el ARN CRISPR (crARN) es el encargado de definir el lugar de corte por homología con la secuencia blanco. En segundo lugar, el ARN trans-activador (tracrARN) es el encargado de funcionar como *scaffold*

uniendo el crARN a la endonucleasa Cas. En la actualidad, y en la mayoría de los sistemas de edición basados en CRISPR-Cas9, estas dos moléculas de ARN se sintetizan fusionadas en un único ARN conocido como sgARN (*single guide* ARN) o simplemente ARNg (ARN guía).

Para su correcto funcionamiento, los crARN deben tener una secuencia de homología de 20 pb con la región que se quiere modificar, la cual además debe tener en su extremo 3´ una secuencia NGG (donde N representa cualquier base) conocida como secuencia PAM (del inglés: *protospacer adjacent motif*). En la Figura 13 se esquematizan los detalles de todo el sistema CRISPR-Cas9 adaptado para la edición genómica.

Para el uso de CRISPR/Cas9 en ingeniería genética un punto clave en el diseño experimental es tener en cuenta la forma de reparación del corte de doble hebra por parte de las células. La reparación puede ocurrir a través de dos vías: i) la unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés: *Non-homologous DNA End Joining*) o ii) la reparación por recombinación homóloga (HDR, del inglés: *Homology directed repair*). La vía de NHEJ es la que ocurre naturalmente y con mayor frecuencia, en particular cuando la célula no tiene un molde de ADN con la homología necesaria para reparar por HDR. Un punto clave antes de re-ligar los extremos no homólogos, es que ocurre un procesamiento de los extremos libres de ADN que puede resultar en la introducción de inserciones o deleciones (Chang et al., 2017). De esta manera la reparación vía NHEJ puede ser utilizada para generar *knockouts* convencionales si los *indels* generados ocurren en un exón codificante generando

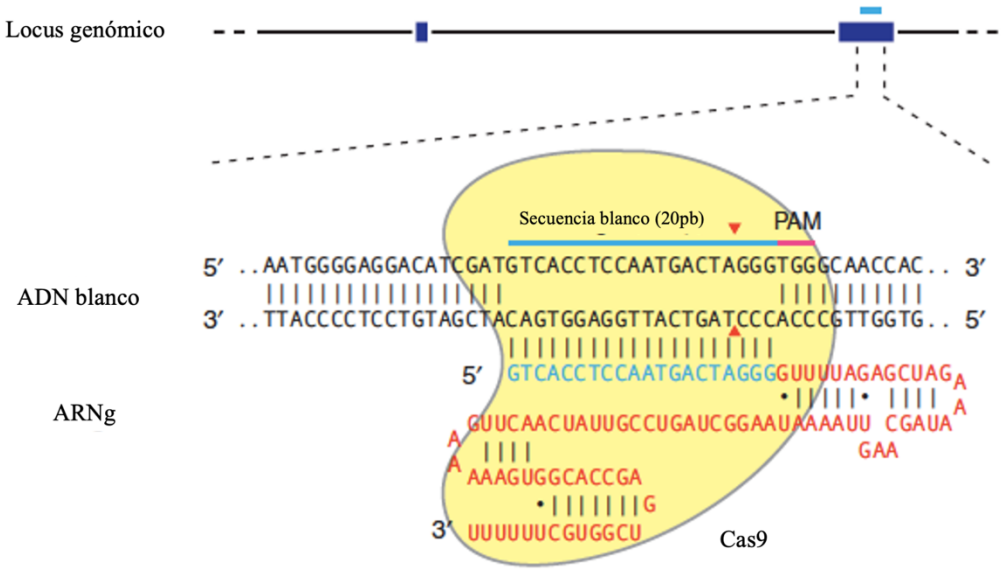


***Figura 13 Esquema del sistema de edición genómica CRISPR-Cas9.***
*La nucleasa Cas9 (en amarillo) está dirigida al ADN blanco (la secuencia observada en la figura es ilustrativa y no corresponde a ningún gen vinculado a la tesis) a través de un ARNg formado por una secuencia guía de 20 bases (en azul) y una secuencia scafffold para unirse a la nucleasa (en rojo). La secuencia guía del ARNg parea con la secuencia blanco del ADN genómico (barra azul) la cual está en el extremo 5´de la secuencia PAM -NGG (barra rosada). El corte por parte de la nucleasa Cas9 se da 3 bases corriente arriba del PAM (flechas rojas).*

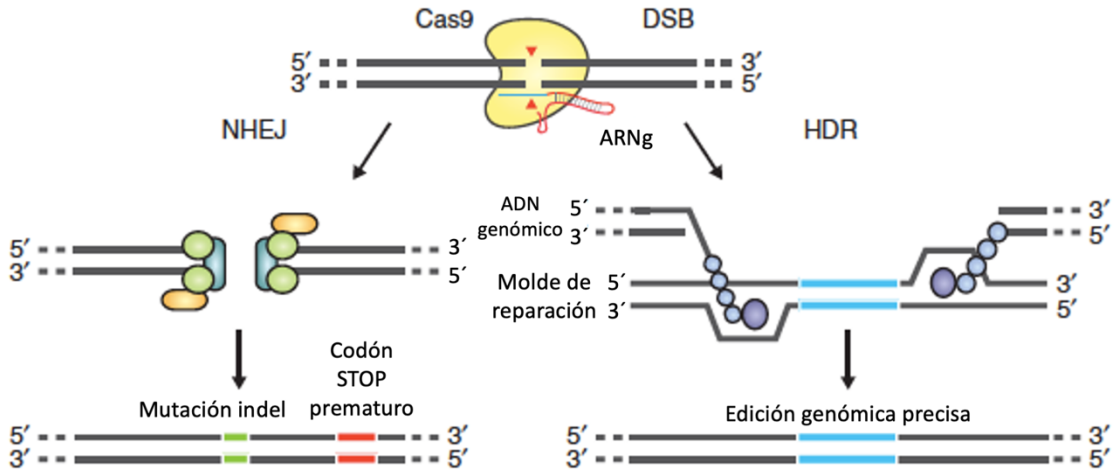


***Figura 14 Mecanismos de reparación del ADN aprovechados por el sistema CRISPR-Cas9 para la edición genómica.***

*El corte de doble hebra generado por la Cas (en amarillo) puede ser reparado básicamente por dos mecanismos. El NHEJ, es susceptible a la generación de errores ya que la maquinaria de reparación del ADN simplemente junta los dos extremos libres pudiendo incorporar alguna deleción o inserción, que de darse en una región codificante puede generar la aparición de codones de terminación prematuros. Por otro lado, la incorporación de un molde para la reparación puede favorecer el sistema de HDR el cual permite una reparación más precisa.*

un cambio de marco abierto de lectura y la introducción de codones de terminación prematuros (Perez et al., 2008).

Por otra parte, la reparación vía HDR ocurre con una frecuencia menor y necesita un molde sobre el cual reparar el daño (Ceccaldi et al., 2016). Este mecanismo permite entonces generar modificaciones definidas y precisas en la secuencia blanco a través de la introducción de un molde para reparar el corte de la doble hebra en la región de interés con la modificación que se desee realizar. En la Figura 14 se muestran detalles de ambos mecanismos. En el diseño experimental para la generación del modelo *Ccdc28b -/-* en este trabajo de doctorado nos centramos únicamente en generar un *knockout* convencional mediante la utilización de ARNg complementarios al extremo 5`del marco abierto de lectura para posteriormente hacer un rastreo de mutaciones generadas por NHEJ y que determinaran la introducción de codones de terminación prematuros.

## *Generación del modelo murino Ccdc28b -/-*

Con el objetivo de obtener un modelo murino *knockout* para *Ccdc28b*, diseñamos ARNg específicos para los primeros exones en la secuencia de *Ccdc28b*. Como mencionábamos, el objetivo de generar el corte allí fue que los errores generados al ocurrir la reparación por NHEJ provoquen un corrimiento del marco abierto de lectura que genere un codón de terminación prematuro y por lo tanto tengamos una mutación nula.

Utilizando la herramienta bioinformática *Knockout Guide Design* de Synthego (https://design.synthego.com/#/) diseñamos dos ARNg dirigidos al exón 3 de la secuencia de *Ccdc28b*. Cabe destacar que *Ccdc28b* está compuesto por 6 exones, el ATG de inicio se encuentra en el exón 2, y todas las isoformas reportadas comparten el exón 3. En la Tabla 3 se observan los detalles de los ARNg diseñados.

| ARNg | Secuencia | Blanco | On Target Score | Off Targets |
|---|---|---|---|---|
| ARNg 1 | UACUUUACCCAGAGCAGGCA | Exón 3 | 0,529 | 0,0,1,7,172 |
| ARNg 2 | AGGCAAGGAGAAAUGCCGAC | Exón 3 | 0,601 | 0,0,1,18,189 |

***Tabla 3. ARNg diseñados a partir del software de Synthego***

Para verificar el funcionamiento de los ARNg se transfectaron células NIH-3T3-Cas9 (células que expresan en forma estable la nucleasa Cas9 bajo inducción con Doxiciclina). Para la transfección se plaquearon las células en placas de 6 pocillos y se transfectaron al llegar al 70% de confluencia. En la mañana previa a la transfección se indujo la expresión de Cas9 agregando Doxiciclina al medio a una concentración final de 1µg/ml.

Para la transfección se utilizó el reactivo Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, 13778075) siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. A las 24 horas de la transfección se cambió el medio agregando nuevamente Doxiciclina en la misma concentración y se incubó por 24 horas más antes de colectar las células.

La extracción de ADN de las células se realizó siguiendo el siguiente protocolo de Extracción de ADN de células en cultivo:

1. Resuspender a las células en 300 µl de amortiguador de lisis: 10mM Tris pH 8,0; 10mM EDTA; 10 mM NaCl; 0,5% SDS y 10 µg/ml Proteinasa K (volumen adecuado para un máximo de 1 millón de células y para trabajar en tubos de 1,5 ml)

2. Incubar al menos 2 horas a 60 °C

3. Agregar al tubo 900 µl de mezcla de precipitación: 150 mM NaCl en 100% EtOH y homogenizar (3x vol. de amortiguador de lisis)

4. Incubar 30 minutos a T.A

5. Homogenizar y centrifugar a 15000 g 15 minutos a 4°C

6. Lavar precipitado con EtOH 70% 1-2 veces centrifugando 5 minutos a máxima velocidad en cada lavado

7. Remover EtOH y dejar secar

8. Resuspender en al menos 50 µl de $H_2O$ (si el resuspendido queda muy concentrado la solución puede quedar muy viscoso, entonces conviene aumentar el volumen de dilución)

Luego de realizada la extracción de ADN, se realizó una reacción de PCR para amplificar el exón 3 de *Ccdc28b* (región a editar) y el producto de dicha reacción fue corrido en un gel de poliacrilamida al 15% en Buffer TBE para evaluar la presencia de mutaciones en esa región por alteraciones en la corrida electroforética producto de la formación de ADN heterodúplex.

Una vez confirmado su funcionamiento, los ARNg fueron microinyectados en zigotos C57/BL6J según el protocolo detallado en los materiales y métodos del artículo: "*Generation and characterization of Ccdc28b mutant mice links the Bardet-Biedl associated gene with mild social behavioral phenotypes*". Nuevamente, esta parte del trabajo fue realizada en la UBAL del IPMon.

## 2.2 Experimentos in vivo en modelos murinos BBS4 -/- y modelo murino CCDC28B -/-

Para los todos los experimentos *in vivo* realizados a lo largo de este trabajo se utilizaron procedimientos y protocolos similares, ya sea con el modelo *Bbs4 -/-* o con el *Ccdc28b -/-*. Por lo tanto, en esta sección se describirán los procedimientos generales utilizados en ambos casos.

### *Mantenimiento de las colonias de ratones*

Durante el desarrollo de este trabajo de doctorado se utilizaron tres colonias de ratones diferentes: la colonia *Bbs4*, la cual se mantiene en heterocigosis y, por ser de fondo genético mezclado, utiliza littermates *Bbs4 +/+* como controles para asegurar el mismo nivel de mestizaje; la colonia *Ccdc28b*, la cual se mantiene en homocigosis en fondo genético C57BL/6J; y la colonia C57BL/6J utilizada para generar los animales controles para los *Ccdc28b -/-*. Además, en la recta final de este trabajo comenzamos a generar una nueva colonia, *Bbs4/Ccdc28b*, mezclando las dos mutaciones trabajadas a lo largo de este doctorado. En este último caso se pretende mantener la colonia con la mutación en *Ccdc28b* en homocigosis y el locus *Bbs4* mutado en heterocigosis.

En todos los casos los ratones utilizados fueron criados y alojados en el bioterio libre de patógenos específicos (SPF, del inglés: *Specific Pathogen Free*) de la UBAL del Institut Pasteur de Montevideo (IPMon). Todos los procedimientos experimentales realizados fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del IPMon y están enmarcados dentro de los protocolos 003-19 (para los ensayos metabólicos) y 007-18 (para los experimentos relativos a la generación de la línea mutante Ccdc28b -/-), cumpliendo con las normativas locales (Ley 18.611) e internacionales ("Guide for the care and use of laboratory animals," 2011) respecto a la experimentación animal.

Los ratones fueron alojados en cajas ventiladas (TecniPlast, Milán, Italia) con chips de viruta (Toplit 6, SAFE, Augy, Francia) en un ambiente controlado a 20 ± 1°C con una humedad relativa de 40-60 % y en un ciclo luz/oscuridad de 14/10 horas. Durante todo el mantenimiento de las colonias, los animales fueron alimentados *ad libitum* con dieta autoclavada (Labdiet 5K67, PMI Nutrition, IN, US) y agua filtrada autoclavada. En los experimentos de HFD se utilizó una dieta rica en grasas (Test Diet, 5TJN, http://www.youngli.com.tw/ezfiles/youngli/img/img/101191/5TJN.pdf) que presenta un

perfil nutricional compuesto por: 18.3 % proteína, 19.9 % grasa, 7 % fibra y 49.5 % carbohidratos.

## *Genotipado de los ratones*

El genotipado de todos los animales se realizó por PCR en tiempo final utilizando como molde el ADN extraído de una biopsia de oreja (la misma que utilizamos para la marcación de los animales) o de cola, realizada a las 3-4 semanas de vida, enseguida luego del destete. Para la extracción de ADN se utilizó el siguiente protocolo de extracción de ADN de tejidos:

1. Digerir 0,5 cm de tejido en 500 µl de buffer de lisis a 37°C durante al menos 16 horas, o a 56°C durante 4 horas:

- Buffer lisis:

10 mM Tris pH 8 (Madre: Tris pH 8, 1 M)

100 mM NaCl (Madre: NaCl 5 M)

10 mM EDTA pH 8 (Madre: EDTA 0.25 M)

0,5 % SDS (Madre: SDS 10 %)

Proteinasa K 500 µg/ml

Preparar un Master Mix de buffer sin la PK.

| | 10 ml | 5ml |
|---|---|---|
| **10 mM Tris pH 8** | 100 µl | 50 µl |
| **100 mM NaCl** | 200 µl | 100 µl |
| **10 mM EDTA pH 8** | 400 µl | 200 µl |
| **0,5 % SDS** | 500 µl | 250 µl |
| **$H_20$ csp** | 8800 µl | 4400 µl |

Agregar 12.5 µl de PK cada 500 µl de buffer de lisis.

2. Agregar 300 µl de NaCl 5 M
3. Incubar 10 minutos a 0°C
4. Centrifugar 10 minutos a 9500 g a temperatura ambiente
5. Traspasar 600 µl de sobrenadante a un tubo limpio y agregar 800 µl de EtOH 100 %
6. Centrifugar 10 minutos a 14000 g.

7. Lavar el pellet 2 veces durante 5 minutos con EtOH 70 %

8. Resuspender en $H_2O$ miliQ estéril o buffer TE 1X (depende el tamaño del pellet entre 30-50 µl).

9. Cuantificar en Nanodrop y llevar todas las muestras a una concentración de 50 ng/µl.

A lo largo de todo este trabajo de doctorado se genotiparon animales correspondientes a las tres colonias mutantes utilizadas: los *Bbs4* -/-, los *Ccdc28b* -/- y los *Bbs4/Ccdc28b*. Durante este trabajo logramos poner a punto un protocolo de PCR que nos permitió utilizarlo para genotipar los alelos mutantes y salvajes de ambos genes y por lo tanto realizar todas las reacciones en una misma corrida facilitando el manejo de las muestras.

| Nombre | Secuencia 5´- 3´ |
|---|---|
| Bbs4KO_Fwd | TTTTCGCCTGGAAGGAAATA |
| Bbs4KO_Rev | CCGGAGAACCTGCGTGCAATCCAT |
| Bbs4WT_Fwd | GCAGCATGATGCAGACTCA |
| Bbs4WT_Rev | AAGTTGATGGCTGCACTGAGA |
| Ccdc28bKO_Fwd | AGAGCAGCAAGGAGAAATGCG |
| Ccdc28bWT_Fwd | AGAGCAGGCAAGGAGAAATGCC |
| Ccdc28b_Rev | TCTCCTGCATCTCCCGAAC |

***Tabla 4. Primers utilizados para el genotipado de los ratones.***
*Todos los primers utilizados en el trabajo fueron encargados a IDT.*

Para todas las reacciones se utilizó como molde una dilución del ADN genómico extraído a una concentración de 100 ng/µl. La secuencia y el diseño de los primers utilizados para el genotipado se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 15.

La reacción de PCR fue realizada en todos los casos en un volumen final de 20 ⌈l utilizando la *Taq* polimerasa de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, 10342053) y mediante la generación de un Master Mix con la siguiente composición para cada reacción:

- 2 µl Buffer 10X
- 0.4 µl dNTPs
- 0.8 µl c/Primer
- 0,16 µl *Taq* polimerasa Invitrogen

- 15.16 µl $H_20$ miliQ

Luego de generado el Master Mix y alicuotado de a 19 µl por tubo se agrega 1 µl del ADN a 100 ng/µl y se realiza la reacción de PCR en un termociclador (en nuestro caso utilizamos un Labnet MultiGene Gradient PCR Thermal Cycler; Merck) utilizando el siguiente programa:

- Desnaturalización inicial: 95ºC 3 minutos
- Desnaturalización: 95ºC 30 segundos
- Hibridación: 67ºC 30 segundos (bajando un grado por ciclo)
- Extensión: 72ºC 30 segundos

x 10 ciclos

- Desnaturalización: 95ºC 30 segundos
- Hibridación: 57ºC 30 segundos
- Extensión: 72ºC 30 segundos

x 30 ciclos

- Extensión final: 72ºC 10 minutos

Una vez culminada la PCR se corren los productos de la reacción en un gel de Agarosa 2%.

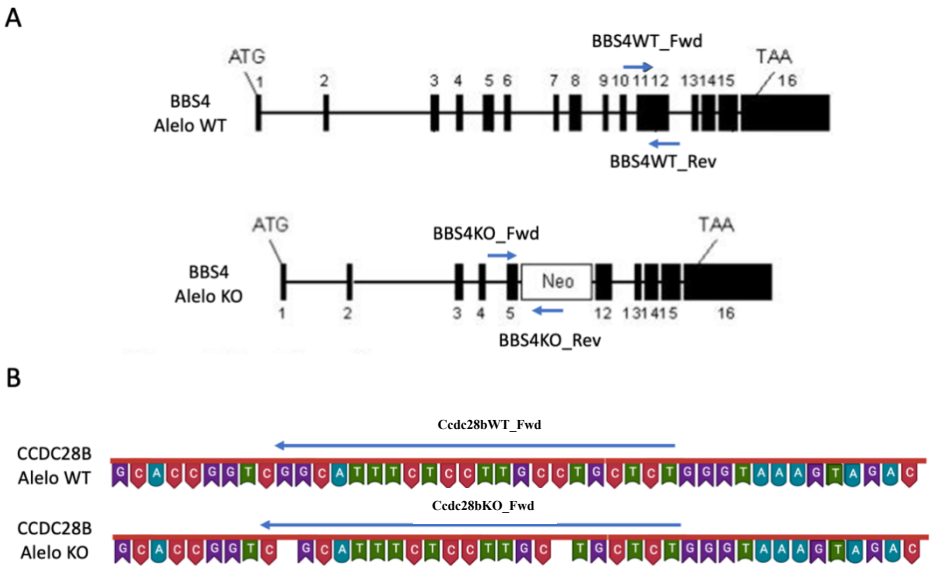


***Figura 15. Diseño de los primers utilizados para genotipar los ratones.***
*A) Se observa el diseño de los primers para el genotipado de BBS4 donde hay un juego de primers específico para cada alelo. B) Diseño de los primers para el genotipado de CCDC28B. Para el genotipado de los dos alelos se utilizó el mismo primer reverso (no aparece en la imagen), pero se utilizó diferentes primers delanteros contemplando las dos deleciones de una base generadas por la mutación.*

## *Ensayos metabólicos in vivo*

En todos los ensayos metabólicos realizados los animales fueron trasladados del bioterio SPF al Bioterio Convencional (BioCo) del IPMon al menos dos semanas antes de iniciar la experimentación. En el BioCo los animales fueron mantenidos en las mismas condiciones que en el SPF, hasta el inicio de los experimentos.

En todos los experimentos el peso de los animales fue registrado semanalmente. Para los experimentos de dieta restringida, los animales fueron alojados en cajas individuales donde se les suministró 3.5 g de dieta por caja a última hora diariamente.

### *Test de tolerancia a la glucosa (GTT) y a la insulina (ITT)*

Previo a la realización de las pruebas, se sometió a los animales a un ayuno de 16 horas o de 6 horas para la GTT o ITT, respectivamente. Luego, antes de la realización del test y teniendo en cuenta este tiempo para el horario de ayuno, los animales fueron trasladados al cuarto de comportamiento del BioCo, dejándolos 1.5 – 2 horas en adaptación e individualizados.

Luego de cumplido el tiempo de adaptación y de ayuno se realizó una única inyección intraperitoneal de Glucosa (1.5 g/kg) o de Insulina (0.5 UI/kg), según el estudio a realizar. Para la inyección se utilizó una solucion madre de 20% Dextrosa y una dilución 1/1000 del stock original de insulina (100U/ml), respectivamente. En ambos casos se midió la glicemia a partir de sangre extraída de la vena de la cola usando un glucómetro manual (AccuChek, Roche).

En ambos tests se realizaron mediciones de la glicemia previo a la inyección y posteriormente a los 20, 30, 60 y 120 minutos. Para el análisis de los resultados, además de graficar la evolución de la glicemia en función del tiempo, se calculó el área bajo la curva de dichas gráficas normalizando en función de la glicemia basal (glicemia previa a la inyección).

### *Estudios en cajas metabólicas*

Para la realización de estos estudios se utilizaron cajas metabólicas (TecniPlast, Milán, Italia) para el alojamiento de ratones de forma individual. Salvo en los casos donde se explicita lo contrario, los ratones fueron alojados en las cajas por 96 horas. El primer día se utilizó como aclimatación y allí no se realizaron medidas. Luego, se cuantificó la ingesta de comida y agua, y la deposición de heces y orina cada 24 horas.

## *Extracción de sangre para hemograma y panel funcional renal-hepático*

Para realizar la extracción de sangre para el hemograma y el panel funcional renal-hepático no es necesario que los animales estén en ayuno. Se utilizó el siguiente protocolo:

1- Previo a entrar al bioterio preparar tubos para hemograma y funcional renal-hepático utilizando los anticoagulantes correspondientes para cada estudio:

a. Wiener (para Hemograma):

- Alicuotar 2 µl en tubos de 0.5 ml (para 18 µl de sangre)

b. Heparina (para Funcional R-H):

- Alicuotar 0,5 µl cada 100 µl de sangre (a 5000 UI/ml)

- Dado que el estudio requiere 130 µl de sangre se alicuotan 0,65 µl de Heparina por tubo de 1.5 ml.

2- Ingresar al Bioterio con: hielo, dos juegos de pipetas, tips y los tubos rotulados con el número de animal y el anticoagulante correspondiente.

3- Antes de sangrar a cada animal, preparar un tip para cada anticoagulante y su respectivo tubo.

4- Sangrar el animal desde la vena submandibular y utilizar la primera gota para pipetear los 130 µl de sangre para el tubo con heparina, y luego los 18 µl para el tubo con anticoagulante Wiener.

5- Luego de sangrados todos los animales dejar los dos juegos de tubos 10 minutos a temperatura ambiente previo a comenzar los análisis.

Para el análisis de sangre (hemograma) se utilizó el Hemato Contador Mindray BC-5000 Vet., mientras que para el análisis de función hepática y renal se utilizó un Analizador de Bioquímica Sanguínea PointcareV3 (MNCHIP). Ambos análisis se realizaron siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes.

## 2.3 Experimentos in vitro en células en cultivo *BBS4 -/-* y *CCDC28B -/-*

El crecimiento y mantenimiento de células fue llevado a cabo en condiciones estándar, en cámara húmeda a 37°C y $CO_2$ al 5 %. A menos que se especifique de otra manera, el medio de cultivo utilizado fue Dulbecco´s Modified Eagle Medium con Glucosa 4.5 g/L (DMEM – Thermo Fisher Scientific, 61965026), suplementado con suero fetal bovino al 10 % (*Fetal Bovine Serum*, FBS, Thermo Fisher Scientific, 16000044), HEPES 10 mM (Thermo Fisher Scientific, 15630080), Penicilina 10000 U/ml y Estreptomicina 10000 µg/ml (Thermo Fisher Scientific, 15140122), y los lavados se realizaron con PBS.

La composición de los medios específicos para los cultivos donde no se utilizó DMEM completo se detalla en el Anexo 1.

### *Extracción de fibroblastos embrionarios (MEFs)*

El aislamiento de MEFs fue realizado utilizando hembras preñadas de entre 13.5 y 14.5 días de gestación. Al momento de colectar los embriones las hembras preñadas fueron eutanizadas por dislocación cervical.

Una vez eutanizadas, se abrió el peritoneo de las hembras preñadas y se realizó la disección del útero, transfiriéndolo luego a un tubo Falcon de 50 ml, con 30 ml de buffer PBS estéril. Para procesar los embriones y obtener MEFs se utilizó el siguiente protocolo:

1. Invertir el tubo Falcon varias veces para permitir que el útero se lave.
2. En cabina de flujo laminar (a partir de aquí trabajar siempre en esterilidad), transferir el útero a una placa de cultivo de 100 milímetros con PBS estéril.
3. Abrir la pared uterina para exponer los embriones individuales.
4. Abrir cada uno de los sacos vitelinos con sumo cuidado intentando disecar cada uno de los fetos íntegramente.
5. Trasladar los fetos a una nueva placa de 100 mm con PBS estéril y sacarle a cada uno la cabeza, hígado y corazón. En el caso de los embriones de BBS4, a los que hay que

genotipar, se utilizó el hígado y el corazón con ese fin, realizando la extracción de ADN con el mismo protocolo detallado en la sección de Genotipado de los ratones.

6. Transferir el resto del embrión a un tubo de 5 ml de boca ancha con 2 ml de tripsina 0,25 % (ThermoFisher, 25200056) por embrión.
7. Disgregar mecánicamente cada embrión con tijeras hasta dejar los trozos lo más pequeños posible y una vez disgregado incubar toda la noche a 4°C con la tripsina.
8. En la mañana siguiente, con cuidado de no levantar el sedimento, remover el sobrenadante de tripsina hasta dejar aproximadamente el equivalente a dos volúmenes de tejido. Luego incubar durante 30 minutos en un baño a 37°C.
9. Luego de la incubación, agregar el mayor volumen posible de medio DMEM completo al tubo y pipetear vigorosamente durante un par de minutos, de forma de romper el tejido digerido por la tripsina y generando una suspensión celular.
10. Dejar sedimentar durante aproximadamente 1 minuto (para que los trozos de tejido no digerido vuelvan a decantar) y luego transferir el sobrenadante que contiene la suspensión celular a un tubo de 50 ml.
11. Para cada embrión procesado llevar el volumen al menos a 30 ml y sembrar en tres placas de 100 mm (pueden ser hasta 5 por embrión, según el rendimiento).
12. Dejar las placas incubando en estufa humidificada a 37°C y con 5% $CO_2$. Considerar pasaje 0 del cultivo cuando se llegue a confluencia (generalmente al día siguiente al sembrado).

### *Extracción de preadipocitos de la fracción estromal vascular*

En todos los experimentos que involucran preadipocitos en este trabajo de doctorado, se utilizaron preadipocitos extraídos de los depósitos anteriores y posteriores de grasa subcutánea. Para esto se siguió el siguiente protocolo:

1. Una vez que el ratón es sacrificado, se abre la piel para exponer los depósitos de grasa subcutánea. Una vez disecados los depósitos subcutáneos se abre el peritoneo para exponer los depósitos de grasa visceral a disecar.
2. El tejido disecado se coloca en un tubo de 5 ml de boca ancha (hasta 1g de tejido por tubo), con PBS estéril. (Nota: Previo a agregar el tejido, el tubo con PBS debe ser

pesado).

3. Luego de agregar el tejido, se vuelve a pesar el tubo para confirmar con exactitud la cantidad de tejido a disgregar.
4. Luego de obtenido el peso del tejido, se aspira el PBS del tubo y se agregan en cada tubo 3 mg de Colagenasa Tipo II (Gibco, 17101-015) por gramo de tejido adiposo y se realiza la disgregación mecánica con las tijeras generando los trozos más pequeños posibles. La Colagenasa Tipo II fue utilizada en una solución 1 mg/ml diluida en medio HBSS (ThermoFisher, 14025076).
5. Una vez que el tejido está disgregado completamente se incuba con la Colagenasa en baño húmedo a 37°C por 30 min vortexeando cada 10 min.
6. Luego de la incubación se realiza una centrifugación a temperatura ambiente durante 10 min a 1200 rpm. Terminada la misma, se aspira en primer lugar la fracción de adipocitos que quedan en la parte superior del tubo (de color blanco y textura viscosa) y la fracción de Colagenasa (de color rojizo y bien liquida) teniendo mucho cuidado de no remover el pellet donde se encuentra la fracción estromal vascular.
7. A continuación, se resuspende el pellet en 3 ml de HBSS, se vuelve a centrifugar y se aspira el sobrenadante.
8. Finalmente, se resuspende el pellet en 10 ml de αMEM + 10% SFB, se siembra en placas de 100 mm y se deja incubando toda la noche en cámara húmeda a 37°C y 5 % de $CO_2$. Este cultivo es el considerado pasaje 0 de la línea.

El primer pasaje se debe realizar cuando el cultivo alcanza una confluencia cercana al 100%, usualmente a las 24 horas de sembradas. Se recomienda en los primeros pasajes, antes de tripsinizar las células, realizar dos lavados con 10 ml de HBSS + Pen/Strep. + Fungizona (Amphotericin B) para evitar contaminaciones.

## *Diferenciación de adipocitos*

Todas las diferenciaciones realizadas en este trabajo de tesis fueron hechas en placas de 6 pocillos, suficiente para obtener muestras tanto para proteínas como para ARN.

1. **Día 0**: Se induce la diferenciación 48 horas después que las células estén al 100 % de confluencia. El día en el que el cultivo alcanza la confluencia se puede tomar como día -2.

Una vez que transcurrieron las 48 horas posteriores a que las células están al 100 % de confluencia, agregar el medio de diferenciación e incubar por 48 horas.

3. **Día 2**: A las 48 horas cambiar el medio de diferenciación por DMEM+10 % FBS+ Insulina

4. **Día 3- 10**: Mantener el cultivo por 10-14 días en total después de la inducción, cambiando el medio cada 2 días y manteniendo siempre la insulina.

Entre el día 3 y 5 se debería empezar a ver acumulación de lípidos. Los marcadores de diferenciación (*Pparγ*, *Cebpα*, *Glut4*) se empiezan a detectar entre los días 4 y 6.

En el transcurso de la diferenciación, las células comienzan a secretar matriz extracelular y lípidos, haciendo que el medio se vuelva viscoso y ácido. Sin embargo, aunque el color del medio quede amarillo, evitar cambiarlo antes de transcurridas las 48 horas.

**IMPORTANTE:** Realizar los cambios de medio utilizando pipeta y con cuidado, dado que a medida que la diferenciación transcurre resulta progresivamente más fácil que la monocapa se despegue.

## *Protocolo de Citometría de flujo*

Para los experimentos de citometría de flujo se utilizaron dos marcadores: el BODIPY 493/503 (Thermo Fisher Scientific, D3922) el cual tiene un espectro de excitación y emisión similar al FITC (Excitación máxima entre 500 nm y 650 nm / Emisión máxima entre 510 nm y 665 nm) y DAPI (Thermo Fisher Scientific, 62248) para evaluar mortalidad.

Para la citometría se utilizó el equipo BD FACSAria Fusion Cell Sorter (BD Biosciences) equipado con láser de 405 nm, el cual se utilizó con un filtro de 450/50 nm para detectar el DAPI, y el láser de 488 nm, con un filtro de 530/30 nm, para detectar el BODIPY. Además, para la adquisición se utilizó una boquilla de 130 µm y en todo momento se mantuvo la temperatura del equipo a 37°C para el procesamiento de las células. Para evitar el daño mecánico de los adipocitos diferenciados, las muestras no se filtraron previo al pasaje por el citómetro, pero si se pipetearon con cuidado para evitar la generación de grumos.

La diferenciación de adipocitos previa al experimento de citometría se realizó siguiendo los protocolos detallados en la sección anterior y en todos los experimentos el análisis por citometría fue realizado entre los días 12 y 14 de diferenciación siguiendo el siguiente protocolo:

1. Realizar las tinciones con los protocolos estipulados por los fabricantes y tripsinizar cada pocillo de la placa de 6 con 200 µl de tripsina. A partir de aquí trabajar siempre a 37°C con el fin de preservar la integridad de los adipocitos.
2. Centrifugar y resuspender el pellet en PBS. Se debe intentar trabajar con una concentración ideal lo más cercana posible a las 8 x $10^6$ cél./ml. Esta concentración es la recomendada por la Unidad de Biología Celular del IPMon para optimizar el funcionamiento del citómetro.
3. Preparar un tubo de adipocitos diferenciados sin marcar, para hacer el ajuste de voltajes previo a pasar la muestra. Se utilizan aproximadamente 5x$10^5$ células en el ajuste de parámetros para el experimento.
4. Luego, preparar los tubos de marca individual de BODIPY y de DAPI, para ajustar los parámetros de detección y marcar las regiones de positividad para cada marcador.
5. Luego de ajustados los voltajes para cada parámetro a medir, se pasan las muestras problema (adipocitos diferenciados con la doble marca de BODIPY y DAPI), contando al menos 50000 eventos de cada condición (genotipo o días de diferenciación).
6. Cuantificar el porcentaje de eventos BODIPY positivos. Además, se realiza una cuantificación del porcentaje de eventos en cada cuadrante del grafico Forward Scatter vs. Side Scatter, el cual brinda información importante sobre las características de tamaño y complejidad de los adipocitos.

## 2.4 Experimentos de Biología Molecular

### *Extracción de ARN y qRT-PCR*

Las extracciones de ARN a partir de cultivos celulares se realizaron siguiendo el siguiente protocolo:

1. Centrifugar las células 5 minutos a 800 g y descartar el sobrenadante (opcionalmente se puede congelar el pellet de células con muy poco medio a -80ºC y continuar después).
2. Resuspender las células en 1 ml de Trizol, pasarlas a un eppendorff e incubar 5min a temperatura ambiente.
3. Agregar 200 µl de cloroformo, agitar fuerte 15 segundos e incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar 15 minutos a 12000 g y 4ºC, y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
5. Agregar 500 µl de isopropanol, mezclar invirtiendo el tubo e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar 10 minutos a 12000 g y 4ºC, y descartar el sobrenadante.
7. Agregar 1 ml de EtOH 75% y resuspender con vórtex.
8. Centrifugar 5 minutos a 7500 g y 4ºC, y descartar el sobrenadante (quitar con pipeta).
9. Dejar secar el pellet al aire por 10 minutos.
10. Disolver con pipeta en 30 µl de $H_2O$ e incubar 10 minutos a 56ºC.
11. Cuantificar con nanodrop.

Por otro lado, las extracciones de ARN a partir de tejidos murinos se realizaron siguiendo el siguiente protocolo:

1. Preparar tubos de 1,5 ml con 600 µl de TRIZOL y una cucharadita de perlas metálicas para el *Bullet Blender* y guardar en hielo.
2. Agregar 100-150 mg de tejido y sumergirlo inmediatamente en el tubo con TRIZOL. Trozar el tejido con tijera en fragmentos lo más pequeños posible. Guardar en hielo hasta el momento de la homogenización.
3. Disgregación mecánica utilizando el *Bullet Blender*. Asegurarse que los tubos están bien cerrados y realizar un pulso de 3 minutos a velocidad 10.

4. Agregar a cada tubo 500 µl de TRIZOL y mezclar bien por inversión.
5. Incubar por 5 minutos a T.A. y luego centrifugar por 5 minutos a 12000 g a 4ºC.
6. Cuidadosamente tomar 1 ml. de la fase liquida, evitando la grasa en la superficie y los restos de tejido entre las perlas metálicas, y pasarlo a un tubo de 2 ml.
7. Agregar 200 µl de cloroformo y vortexear.
8. Centrifugar por 15 minutos a 12000 g a 4ºC.
9. Cuidadosamente tomar la fase acuosa (capa superior, clara) y pasarla a un tubo nuevo. Dejar un pequeño volumen de esa fase acuosa encima de la capa blanquecina que contiene las proteínas y el ADN para evitar contaminación.
10. Agregar 500 µl de isopropanol, vortexear e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
11. Centrifugar por 10 minutos a 12000 g a 4ºC y descartar el sobrenadante.
12. Agregar 1ml de EtOH 75% frio y vortexear.
13. Centrifugar por 15 minutos a 12000 g a 4ºC y descartar el sobrenadante.
14. Realizar 3 lavados con EtOH 75% repitiendo los pasos 12-13.
15. Dejar secar brevemente el pellet y disolver con pipeta en 30 µl de $H_2O$ e incubar 10 minutos a 56ºC.
16. Cuantificar con Nanodrop.

Luego de extraído el ARN, se generó el ADNc por retro transcripción utilizando la SuperScript II RT (Invitrogen) con el protocolo recomendado por el fabricante, y se realizó la qRT-PCR utilizando el Master Mix SYBR FAST Universal 2X qPCR (Kapa) en un termociclador QuantStudio 3 RT-PCR System (ThermoFisher Scientific).

Para el análisis de los resultados, todas las muestras se corrieron por triplicado y el valor del CT fue normalizado para calcular la expresión relativa de cada gen. Se utilizó el método del ΔΔCt para calcular el *fold change* tomando en todos los casos, salvo que se explicite lo contrario, a *Gapdh* como gen de referencia.

## *Western Blot*

Las células fueron lisadas en buffer RIPA (ver Anexo 1) suplementado con inhibidores de proteasas (Sigma, S8830) y la extracción de proteínas realizada según el siguiente protocolo:

1. Preparar Buffer lisis (RIPA + βglicerol fosfato 50 mM + NaF 5 mM + Inhibidores de proteasas).
2. Agregar 500 µl de buffer cada 100-150 mg de tejido.
3. Disgregar mecánicamente utilizando el *Bullet Blender*, con una cucharadita de beads metálicas por tubo (100-150 mg tejido).
4. Asegurarse que los tubos están bien cerrados y realizar pulsos de 1 minuto a velocidad 8, hasta que el tejido esté disgregado (Ej. Riñón 4 pulsos, Testículo 7 pulsos).
5. Luego de disgregado, dejar rotando por 15 minutos a 4ºC.
6. Centrifugar por 15 minutos a 12000 g a 4ºC.
7. Tomar el sobrenadante de la centrifugación y realizar diluciones que permitan cuantificar la muestra (Ej. Para testículo tomar 400 µl y realizar una dilución 1/3, mientras que para Riñón se puede tomar 200 µl y realizar una dilución 1/5).

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 23227) y en todos los casos, salvo que se indique lo contrario, 100 µg de proteína fueron cargados en los geles de SDS-PAGE, luego transferidos a membranas de PVDF y marcados con los anticuerpos primarios correspondientes.

En la Tabla 5 se muestran todos los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo y sus respectivas condiciones de incubación. En todos los casos se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a HRP para realizar el revelado que fue hecho utilizando los kits de quimioluminiscencia Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, 32106) o SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, 34080) y la detección a través del equipo Amersham ImageQuant 800 (GE LifeSciences).

| Anticuerpo Primario | Concentración | Tiempo de incubación |
|---|---|---|
| Anti-CCDC28B (policlonal de conejo, Invitrogen) | 1/1000 | ON a 4°C |
| Anti-CCDC28B (policlonal de conejo, Genscript) | 1/1000 | ON a 4°C |
| Anti-Fstl1 ratón (policlonal de cabra, R&D Systems) | 1/2000 | ON a 4°C |
| **Conjugados** | | |
| Anti-Ig de conejo conjugado a HRP (Sigma) | 1/50000 | 1 hora a TA |
| Anti-Ig de ratón conjugado a HRP (Sigma) | 1/20000 | 1 hora a TA |
| Anti-Ig de cabra conjugado a HRP (Santa Cruz) | 1/10000 | 1 hora a TA |

***Tabla 5. Anticuerpos utilizados para WB a lo largo de este trabajo de tesis.***

### *Inmunofluorescencia y cuantificación de cilia*

Para obtener todas las imágenes de immunofluorescencia de cultivos celulares, las células se crecieron sobre cubre-objetos en placas de 6 pocillos. Luego las células fueron fijadas con PFA y Metanol, en ese orden, manteniendo los epítopes que se desnaturalizan con metanol al mismo tiempo que se mantiene la integridad del centrosoma (que se fija bien con metanol). Este protocolo sirve para visualizar en el mismo preparado tanto la señal de gama tubulina como la de tubulina acetilada.

1. Cubrir el preparado con PFA e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Realizar 2 lavados con PBS.
3. Cubrir con Metanol e incubar por 10 minutos a -20°C.
4. Realizar 2 lavados con PBS.
5. Permeabilizar las células cubriendo con Tritón X-100 0,1% en PBS e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

6. Realizar 2 lavados con PBS.
7. Bloquear cubriendo las células con 5,5 % SFB en PBS e incubando por una hora a temperatura ambiente (se puede incubar hasta el día siguiente a 4ºC).
8. Realizar 2 lavados con PBS.

Posteriormente los preparados fueron incubados con los anticuerpos específicos para realizar la inmunomarcación indirecta (ver diluciones y anticuerpos en Tabla 6). Finalmente, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario, y luego de lavados, se montaron con el medio de montaje ProLong™ Gold Antifade (Invitrogen™, P36930). En todos los casos los núcleos fueron marcados con DAPI (Invitrogen). Las muestras fueron analizadas usando el microscopio confocal Zeiss LSM 880 de la Unidad de Microscopía del IPMon.

En todos los casos, se seleccionaron y analizaron al menos cinco campos al azar, de por lo menos dos preparados diferentes por condición. Allí, el largo de cilia fue cuantificado utilizando la herramienta de selección *freehand ROI* en el software FIJI para procesamiento de imágenes (Schindelin *et al.*, 2012). Además, se calculó la proporción de células ciliadas contando el número de células con señal para gama tubulina y tubulina acetilada sobre el número total de núcleos.

| **Anticuerpo Primario** | **Concentración** | **Tiempo de incubación** |
|---|---|---|
| Anti-tubulina acetilada (monoclonal de ratón, IgG2, Sigma) | 1/1000 | 1 hora a TA |
| Anti–gama tubulina (policlonal de conejo, Sigma o monoclonal de ratón, Sigma) | 1/1000 | 1 hora a TA |
| | | |
| | | |
| **Conjugados** | | |
| Anti-IgG2 de ratón-AF 568 | 1/1000 | 1 hora a TA |
| Anti-IgG1 de ratón-AF 488 | 1/1000 | 1 hora a TA |
| Anti-IgG de conejo-AF 633 | 1/1000 | 1 hora a TA |

***Tabla 6. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia a lo largo de este trabajo de tesis.***

## *Análisis estadísticos*

Todas las gráficas y los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software GaphPad Prism 9.2. Los experimentos *in vitro* fueron realizados con, al menos, duplicados biológicos en por lo menos tres experimentos independientes. El tamaño de población de los experimentos *in vivo* se detalla en cada caso. A menos que se explicite lo contrario, los resultados fueron expresados como la media ± desvío estándar. Para confirmar que las muestras siguieran una distribución normal, se aplicó el análisis de normalidad de Shapiro-Wilk. En los casos en que se pudo demostrar normalidad, el test de Student no pareado fue utilizado para comparar dos grupos independientes. Cuando los grupos no presentaron distribución normal la comparación se realizó utilizando el test de Mann-Whitney. También se realizó el test de *outliers* de ROUT, recomendado por GaphPad Prism 9.2, previo a la comparación de grupos. Para comparaciones múltiples se realizó el análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test post hoc Turkey. Para las comparaciones de proporciones se usó el test exacto de Fisher. En todos los casos, los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos y se nombraron de la siguiente forma *$P$<0,05, **$P$<0,01, ***$P$<0,001, ****$P$<0,0001.

# RESULTADOS

## 3.1 Caracterización del modelo murino *Bbs4 -/-* respecto a su fenotipo de obesidad y desarrollo de resistencia a la insulina.

Como mencionamos anteriormente, nuestro interés original era poder evaluar el efecto modificador de CCDC28B sobre distintos aspectos del fenotipo BBS, modelando la interacción genética entre *CCDC28B* y *BBS4* que se observó originalmente en pacientes. Para esto comenzamos a trabajar en dos aspectos: i) en la generación de un modelo *knock-out* para *Ccdc28b* (ver capítulo 3.2) y ii) la caracterización en profundidad del modelo murino *Bbs4 -/-* descrito previamente por Mykytyn y colaboradores que logramos incorporar a nuestro laboratorio (Mykytyn et al., 2004). Uno de los fenotipos que caracteriza este modelo y es de interés para nuestro grupo, es el desarrollo de obesidad. Por lo tanto, la primera actividad que desarrollamos en este trabajo de tesis fue la caracterización de la obesidad y el desarrollo de resistencia a insulina en ratones *Bbs4 -/-*. Esto nos servirá para tener el fenotipo base sobre el cual posteriormente evaluar modificaciones ante la falta de Ccdc28b u otros estímulos, y además entender de qué forma está impactando la ausencia de Bbs4 en los tejidos periféricos, principalmente en el tejido adiposo, un aspecto poco estudiado en el contexto de obesidad de este modelo y crítico para comprender a fondo la presentación de esta patología en modelos animales y pacientes.

### Modelo *Bbs4 -/-* en fondo genético C57/BL6

La línea murina *Bbs4 -/-* fue traída desde el Laboratorio Jackson, USA, con permiso del Dr. Val Sheffield. En el primer reporte de esta línea, al describir su construcción, Mykytyn et al. se refieren a un fondo genético mezclado, donde la edición génica fue realizada en células madre embrionarias R1 de fondo 129S, y luego estas fueron inyectadas en blastocistos C57BL/6J (Mykytyn et al., 2004), manteniéndose luego el mestizaje a lo largo del desarrollo de la colonia. Además, según se reporta en ese trabajo, la colonia se mantuvo en heterocigosis por infertilidad de los machos homocigotas *Bbs4 -/-*. Sin embargo, el fondo genético de elección para estudios metabólicos es el C57BL/6. El estudio de la respuesta de diferentes cepas de ratón frente a la ingesta de dieta rica en grasa ha mostrado que mientras la cepa C57BL/6 responde desarrollando obesidad y muchas de las características del síndrome metabólico humano en forma dependiente de la edad de los animales

(Bachmanov et al., 2001; Della Vedova et al., 2016), la cepa 129 (129P y 129S) presenta resistencia al desarrollo de obesidad frente al mismo estímulo (Almind & Kahn, 2004; Bachmanov et al., 2001).

Dados estos antecedentes, lo primero que realizamos al momento de incorporar esta línea de ratones fue llevarla a un fondo genético C57BL/6J. Para esto se realizaron 10 retrocruzas por animales salvajes de este fondo y a partir de ese momento se asumió la homogeneidad del mismo. En este fondo genético se intentó mantener la colonia en heterocigosis, tal cual estaba descrito, pero al momento de analizar las camadas se observó un claro desvío en las proporciones mendelianas, y no pudimos obtener animales *Bbs4 -/-*. Se llegaron a genotipar más de 50 crías de estos cruces, obteniendo únicamente animales *Bbs4 +/+* y *Bbs4 +/-*. Ante estas dificultades, nos comunicamos directamente con el Dr. Val Sheffield, quien nos confirmó haber tenido este tipo de problemas trabajando en fondo C57BL/6 puro y que por eso se continuó trabajando en fondo genético mezclado. Es importante destacar que esta información no había sido reportada.

Al no poder obtener animales homocigotas *Bbs4 -/-*, decidimos analizar embriones en E.14. Para esto se realizó un seguimiento de dos hembras preñadas, las cuales fueron sacrificadas a los 14 días de preñez. De 17 embriones en total, obtuvimos 4 *Bbs4 -/-*, 10 *Bbs4 +/-* y 3 *Bbs4 +/+*. Mediante este análisis pudimos concluir que se generaban embriones *Bbs4 -/-* en los porcentajes esperados. Por lo tanto, intentamos determinar si estos animales no llegaban a nacer o si eran eliminados por canibalismo. Para esto, analizamos en detalle los harenes, revisando las cajas una vez por día todos los días desde que observamos el *plug* positivo (tapón que bloquea la vagina, formado por proteínas coaguladas provenientes del fluido seminal del macho luego de la cópula). De esta manera pudimos determinar la existencia de canibalismo por parte de las madres (los machos fueron sacados de las cajas luego de confirmada la preñez). Normalmente, cuando se observa canibalismo sobre las crías, quedan las cabezas de estas en el fondo de la caja, o enterradas en la cama. Realizamos el genotipado de este material mediante la extracción de ADN de las cabezas (utilizando el mismo protocolo de extracción de ADN de tejidos detallado en Materiales y Métodos) y observamos que todas las muestras genotipadas correspondían a crías *Bbs4 -/-*, confirmando que el canibalismo estaba especialmente dirigido hacia este genotipo. Es importante recordar que está descrito que al nacer las crías *Bbs4 -/-* son más pequeñas que las crías salvajes (Mykytyn et al., 2004), lo que podría explicar la elección tan consistente de este genotipo a la hora del canibalismo.

Luego de confirmar el canibalismo, intentamos reducirlo de diferentes formas. En primer lugar, decidimos sacar los machos del harén luego de confirmar la preñez de las hembras. Esto se realizó pensando que podrían ser los propios machos los que realizaran el canibalismo y, por otro

lado, para evitar cualquier tipo de estrés que los machos pudieran generar sobre las hembras posterior al parto y que alterara de alguna forma el comportamiento maternal. También hipotetizamos que el canibalismo podría deberse, al menos en parte, a un estrés energético de las madres generado por la preñez y la lactancia. Para tratar de evitar esta posible situación pasamos nuevas hembras preñadas a una dieta rica en grasas. Ninguna de las aproximaciones realizadas nos permitió obtener crías *Bbs4 -/-*.

En definitiva, al no poder obtener las crías necesarias, decidimos volver a cruzar los individuos *Bbs4 +/-* en fondo C57BL/6J, con animales salvajes 129/S1 para generar nuevamente un fondo mezclado. Dicho esto, utilizando los animales en fondo C57BL/6J, sí logramos obtener fibroblastos embrionarios (MEF: del inglés, *mouse embryonic fibroblast*) a partir de embriones *Bbs4 -/-* en E.14, lo que nos permitió realizar diferenciaciones hacia adipocitos *in vitro* (ver Capitulo 3.3). También decidimos utilizar los animales ya nacidos (*Bbs4 +/+* y *+/-* de fondo genético C57BL/6J puro) para realizar un primer experimento *in vivo* analizando el desarrollo de obesidad y evaluando si los animales heterocigotas presentan alguna predisposición o fenotipo leve.

**Estudios *in vivo* en animales *Bbs4 +/+* y *Bbs4 +/-* en fondo genético C57BL/6J**

Mientras esperábamos obtener los animales en fondo genético mezclado, comenzamos a trabajar con los ratones *Bbs4 +/-* realizando una primera caracterización metabólica para poder determinar si existe una predisposición a desarrollar obesidad en animales portadores de un alelo mutado, en un fondo genéticamente sensible como lo es el C57BL/6J. Para esto, logramos conformar dos grupos de estudio formados por: cinco animales *Bbs4 +/+*, machos de 15 semanas de edad, y ocho machos Bbs4 +/- de la misma edad. Sometimos a estos dos grupos a una caracterización basal manteniéndolos en normo dieta por cinco semanas, controlando semanalmente su peso, y además realizando medidas de glicemia basal y una curva de tolerancia a la glucosa (GTT del inglés *"glucose tolerance test"*; Figura 16).

También, como parte de esta caracterización basal, en la tercera semana introdujimos a los ratones en cajas metabólicas (esto lo hicimos con cinco *Bbs4 +/+* y cinco +/-) durante una semana recolectando orina y materia fecal, y cuantificando la ingesta, tanto de comida como de agua (Figura 17). Si bien no observamos diferencias significativas en ningún caso, los animales *Bbs4 +/-* presentaron un peso levemente superior a los controles, al tiempo que su glicemia basal mostró valores inferiores. Al ser una caracterización inicial realizada en condiciones de normo dieta, esas

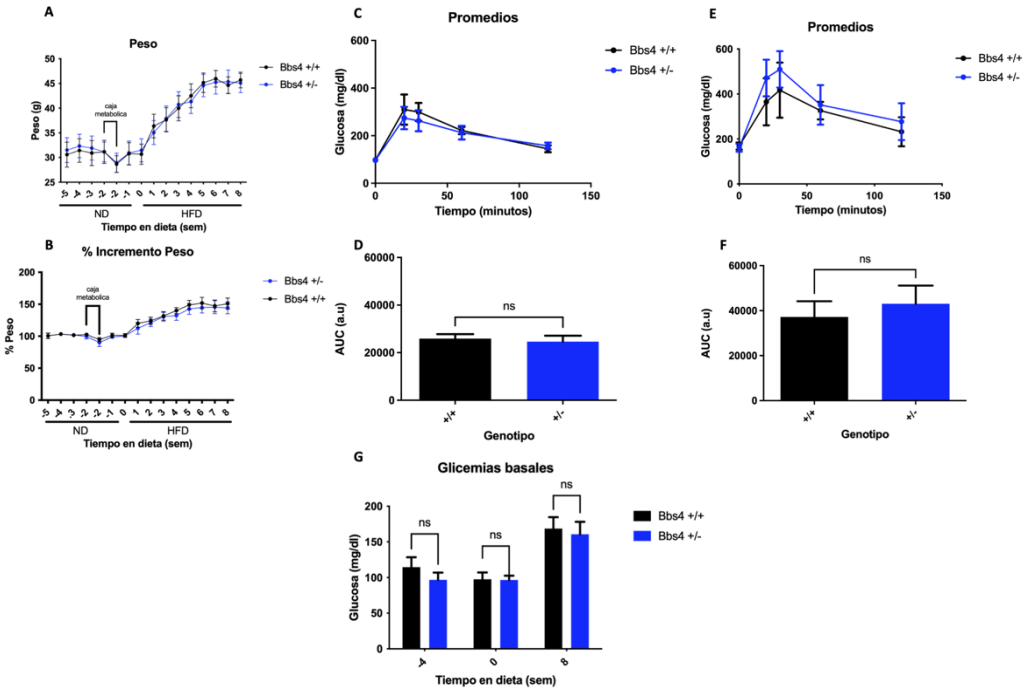


***Figura 16. Caracterización metabólica de los ratones Bbs4 en fondo genético C57BL/6J.***
*A) Curva de crecimiento absoluto de ratones Bbs4 +/- y sus littermates control. Hasta la semana 0 los animales eran alimentados con dieta normal (ND), luego se comenzó con la dieta rica en grasas (HFD). Durante la semana -2 se realizó el ensayo en caja metabólica por lo que hay dos medias de peso, una antes y una después, que muestra la afectación de los dos genotipos por el estrés del ensayo (n = cinco animales por genotipo). B) Curva de crecimiento de ratones Bbs4 +/- y sus controles expresada en incremento de peso, donde el 100% es el peso al inicio del experimento. C) y D) Resultados de la GTT a la semana 0 de tratamiento (20 semanas de edad), previo a iniciar la HFD. En D se muestra el área bajo las curvas de C. E) y F) Resultados de la GTT a la semana 8 de tratamiento con HFD (28 semanas de edad). En F se muestra el área bajo las curvas de E. G) Valores de las glicemias basales en ayuno en diferentes momentos del tratamiento.*

tendencias encontradas nos resultaron interesantes ya que podrían indicar algún tipo de predisposición que pudiera dar lugar a diferencias marcadas en condiciones más desafiantes.

Para evaluar esta posibilidad, procedimos a inducir el desarrollo de obesidad mediante alimentación *ad libitum* por un período de 8 semanas con dieta rica en grasa (HFD, del inglés: *high fat diet*), la cual aporta el 40% de energía en forma de grasas. Durante este tratamiento controlamos el peso de los animales semanalmente, y realizamos medidas de glicemia basal y de GTT luego de las 8 semanas de tratamiento. Con relación a la ganancia de peso, tanto los *Bbs4* +/+ como los *Bbs4* +/- aumentaron su peso en forma significativa llegando, al cabo de las 8 semanas de tratamiento con HFD, a un aumento del 150,94% y de 144,46% con respecto a su peso inicial, respectivamente (Figura 16). Sin embargo, la diferencia observada entre genotipos no fue estadísticamente significativa. Por otra parte, las medidas de glicemia basal tampoco mostraron diferencias significativas, al tiempo que el perfil en la GTT tampoco fue diferente entre genotipos. En este último punto es importante destacar que si bien el área bajo la curva no es estadísticamente diferente entre los *Bbs4* +/+ y los *Bbs4* +/-, sí parece haber una tendencia hacia una menor tolerancia a la glucosa en los ratones *Bbs4* +/- (Figura 16 F). Esto se infiere por los valores de glucosa en sangre a los 20 y 30 minutos luego de la inyección

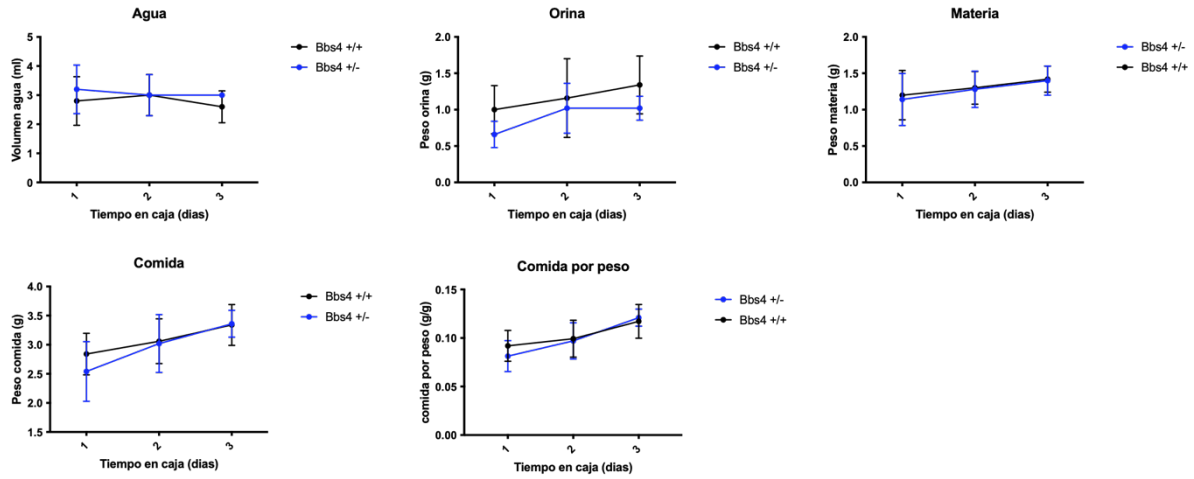


***Figura 17. Cuantificación de parámetros de ingesta y desechos en caja metabólica.***
*En todos los casos la medida correspondiente al día 1 es 48hs después del ingreso del animal a la caja, luego de 24hs de aclimatación. En ningún caso se observan diferencias significativas entre los dos grupos (n = cinco animales por genotipo).*

de dextrosa, los cuales son levemente superiores en los ratones *Bbs4 +/-* (Figura 16 E). En conclusión, no encontramos diferencias significativas entre los ratones *Bbs4 +/-* y los controles, tanto en ND como en HFD. Estos resultados van en concordancia con los reportados en la bibliografía donde no se observaron diferencias fenotípicas entre estos genotipos (Mykytyn et al., 2004).

## Modelo *Bbs4 -/-* en fondo genético 129/BL6

Como mencionamos en la sección anterior, fue necesario volver a introducir el fondo genético 129 en nuestro modelo lo que nos permitió obtener animales *Bbs4 -/-*. Sin embargo, cabe destacar que este genotipo se obtuvo siempre con una frecuencia menor a la esperada (menos del 25% en cruces de animales heterocigotas para la mutación). Esto dificultó por tanto la obtención de grupos grandes de animales *Bbs4 -/-* pareados (en edad y sexo) para realizar experimentos.

Como ya mencionamos, el fondo genético puede afectar significativamente el desarrollo y presentación de fenotipos metabólicos. En este contexto, y dado que el nivel de mezcla de nuestros animales era probablemente diferente al de los animales presentados en trabajos previos, nos propusimos, en primer lugar, evaluar el desarrollo de obesidad en dieta normal. Con las primeras camadas y completando un grupo de 22 hembras (11 *Bbs4 +/+* y 11 *Bbs4 -/-*) y 20 machos (11 *Bbs4 +/+* y 9 *Bbs4 -/-*), hicimos un seguimiento del peso de los animales desde el momento del destete (3 semanas de vida). Nuestros datos muestran que durante la semana 3 y 4 de vida las hembras *Bbs4 -/-* tuvieron menor peso que los controles (los machos se comportaron igual que los *Bbs4 +/+* en ese período), mientras que esta tendencia se revirtió a partir de la semana 4 (Figura 18). Estos resultados van en concordancia con los reportes de la literatura (Eichers et al., 2006; Mykytyn et al., 2004).

Como ya se destacó anteriormente, la bibliografía hasta el momento indica que el principal motor para el desarrollo de obesidad en los ratones *Bbs4 -/-* es la hiperfagia (Berbari et al., 2013; Eichers et al., 2006). Si bien hay consenso en este punto, no hay ningún reporte de estudios en cajas metabólicas realizados en estos animales, simplemente evaluaciones de ingesta pesando diariamente la comida en su misma caja. En este sentido, nos planteamos confirmar si estos ratones efectivamente comían más utilizando cajas metabólicas, para cuantificar no sólo la cantidad de alimento ingerido, sino también el agua y sus desechos. Para nuestra sorpresa, el resultado con respecto a la ingesta de alimento fue precisamente el contrario al esperado (Figura 19). Este ensayo se realizó con tres machos *Bbs4 +/+* y tres machos *Bbs4 -/-* y observamos que, durante los tres días en que se controló la ingesta, los ratones *Bbs4 +/+* comieron significativamente más que los *Bbs4 -/-* (3,37 g vs. 1,7 g en promedio).

De todas formas, consideramos que este resultado pudo deberse a una respuesta diferencial de ambos grupos al estrés que supone el alojamiento en solitario y el entorno de las cajas metabólicas. No es extraño encontrar resultados de este estilo, ya que las condiciones de aislamiento y de poco enriquecimiento que significan las cajas metabólicas puede tener efectos sobre el comportamiento de los animales (Kalliokoski et al., 2013; Zhu et al., 2006). Por otro lado, también es bueno recordar que existen reportes de un perfil comportamental de ansiedad en los ratones *Bbs4 -/-* (Eichers et al., 2006) y esto en conjunto con el estrés agregado por la caja metabólica podría explicar que la ingesta de los

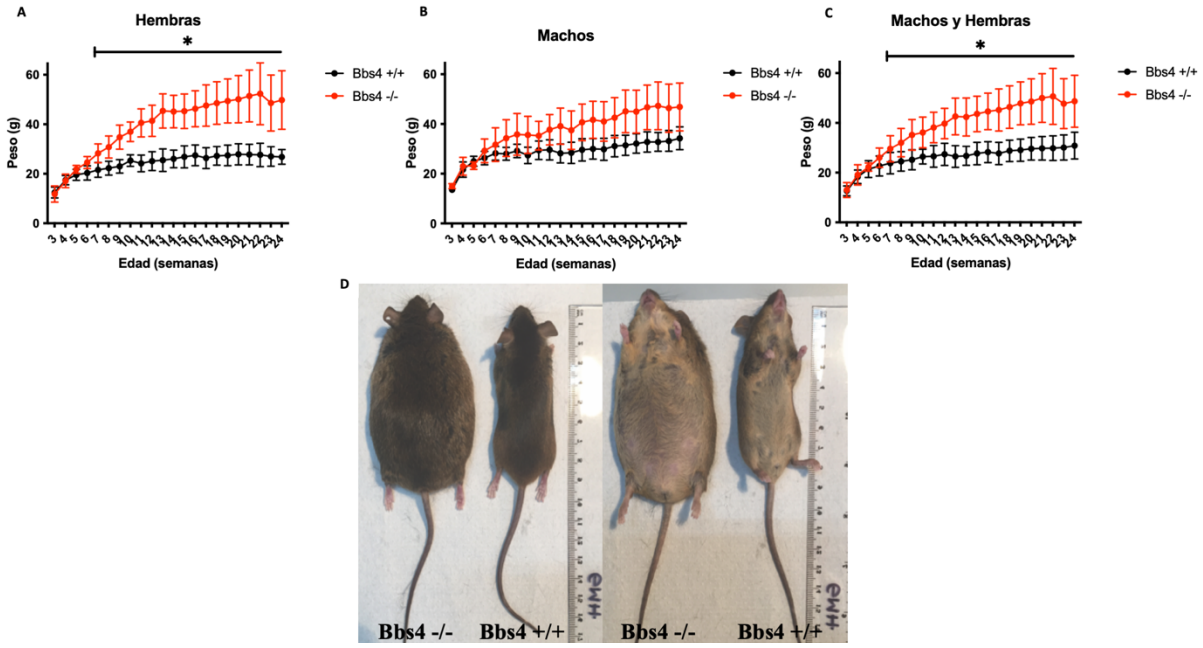


***Figura 18. Curvas de crecimiento de los ratones Bbs4 en fondo genético 129/BL6 y en normo dieta.***
***A)*** *Curva de crecimiento absoluto de hembras Bbs4 -/- y sus littermates control en ND. La significancia estadística comienza en la semana 6 y aumenta progresivamente (n = 22 Bbs4 +/+ - 11 hembras y 11 machos – y 20 Bbs4 -/- - 11 hembras y 9 machos)* ***B)*** *Curva de crecimiento absoluto de machos Bbs4 -/- y sus littermates control en ND. En ningún momento hay significancia estadística.* ***C)*** *Curva de crecimiento absoluto de hembras y machos juntos Bbs4 -/- y sus littermates control en ND. La significancia estadística comienza en la semana 7 y aumenta progresivamente.* ***D)*** *Hembras Bbs4 -/- y control en ND ad libitum a las 24 semanas de edad. * = P < 0.05.*

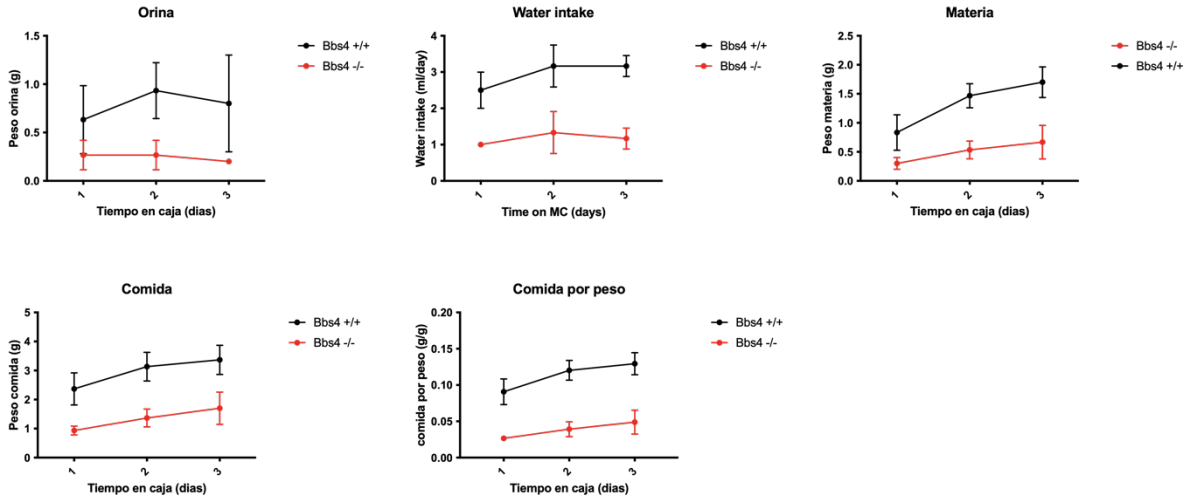


***Figura 19. Cuantificación de parámetros de ingesta y desechos en caja metabólica de ratones Bbs4 +/+ y Bbs4 -/-.***

*En todos los casos la medida correspondiente al día 1 es 48hs después del ingreso del animal a la caja, luego de las 24hs de aclimatación. En ningún caso se observan diferencias significativas entre los dos grupos (n = tres animales por genotipo).*

animales *Bbs4 -/-*, no sólo fue menor que los controles, sino que fue muy por debajo de lo esperado para animales de esa edad (16 semanas).

Dado que nuestro intento por evaluar la ingesta por el método más aceptado arrojó resultados confusos, decidimos volver a cuantificar la ingesta, pero utilizando un método que genere menos estrés en los animales. Para esto, pesamos la comida de cada caja todos los días y así evaluamos cuanto iban comiendo cada día. Lógicamente, esta aproximación no es la más precisa ya que no tiene en cuenta la porción de comida que se hace polvillo y queda en la caja sin ser ingerida, pero de todas formas sirve para tener una estimación. Con esta aproximación sí observamos que en las cajas con animales *Bbs4 -/-* había un consumo estadísticamente más elevado de comida que en las cajas de los controles (Figura 20). Mientras en las cajas de los *Bbs4 +/+* se consumieron en promedio 3,47 g de comida por día, en las cajas de los *Bbs4 -/-* se consumieron 4,46 g. Este dato respalda la hipótesis de la hiperfagia en estos animales.

Luego de confirmar la hiperfagia armamos un primer grupo de animales, (tres machos *Bbs4 +/+* y tres machos *Bbs4 -/-*), para realizar un seguimiento y una caracterización metabólica basal. Comenzamos el seguimiento de este grupo a las 10 semanas de edad, donde nuevamente observamos que los ratones *Bbs4 -/-* eran significativamente más pesados que los *Bbs4 +/+*, teniendo en promedio un peso de 32,13 ± 4.83 g contra 24,83 ± 1.56 g (Figura

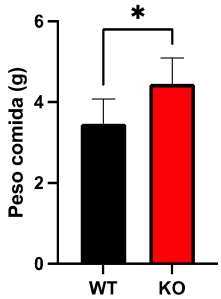


***Figura 20. Cuantificación de la comida en cajas convencionales.***

*Pesado de la comida durante cinco días consecutivos en seis cajas: dos que contenían dos animales Bbs4 +/+ cada una, una que contenía tres animales Bbs4 +/+, dos que contenían dos animales Bbs4 -/- cada una, y una que contenía tres animales Bbs4 -/-. Las cajas de los Bbs4 -/- muestran un consumo estadísticamente mayor al de los Bbs4 +/+, 4,46g vs. 3,47g. * = P < 0.05.*

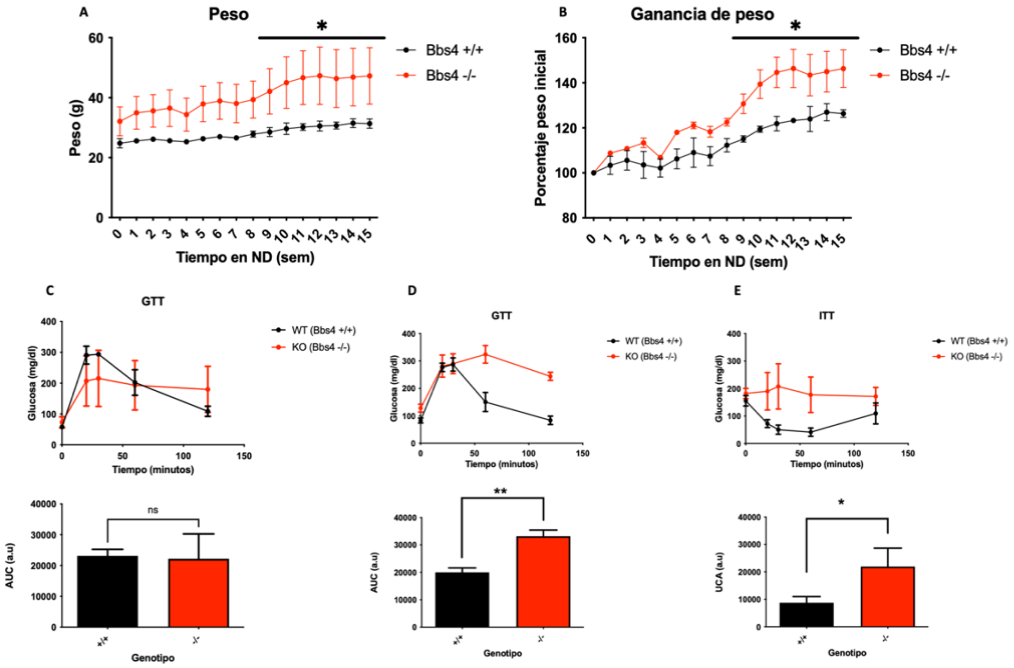


***Figura 21. Caracterización metabólica de ratones Bbs4 -/- en fondo genético 129/BL6.***
*__A)__ Curva de crecimiento absoluto de ratones Bbs4 -/- y sus littermates control (n = tres animales por genotipo) __B)__ Curva de crecimiento de ratones Bbs4 -/- y sus controles expresada en incremento de peso, donde el 100% es el peso al inicio del experimento. __C) y D)__ Resultados de las GTT a la semana 2 de tratamiento (12 semanas de edad, figura C) y a la semana 12 de tratamiento (22 semanas de edad, figura D). En ambos casos se muestra el área bajo la curva en la parte inferior. __E)__ Resultados de la ITT a la semana 15 de tratamiento (25 semanas de edad). En la parte inferior se muestra el área bajo las curvas. * = P < 0.05; ** = P < 0.005.*

21A). Dos semanas más tarde realizamos una GTT, y pese a que no observamos diferencias significativas en el área bajo la curva, el perfil de la curva sí fue distinto: en la de los animales *Bbs4 -/-* no se vio una bajada clara de la glucosa en sangre durante los 120 minutos analizados (Figura 21C). Este experimento se repitió con los mismos ratones a las 22 semanas de edad, donde el peso promedio de los animales era de 47,30 ± 9.58 g en los *Bbs4 -/-* contra 30,60 ± 1.65 g en los *Bbs4 +/+*. En este momento se encontró que no sólo las áreas bajo la curva eran estadísticamente diferentes, sino que, mientras la curva del grupo *Bbs4 +/+* fue similar a la que mostraban estos animales a las 12 semanas, la de los *Bbs4 -/-* era una curva típica de intolerancia a la glucosa, donde se observa un enlentecimiento para volver a los niveles de glicemia previos a la inyección de dextrosa (Figura 21D). Luego de observar estas diferencias en las GTT a las 22 semanas de edad, decidimos realizar una ITT (Test de Tolerancia a la Insulina, del inglés: *Insulin Tolerance Test*), para observar si la intolerancia a la glucosa se debía, al menos en parte, a la existencia de resistencia a la insulina. Dejamos recuperar a los animales luego de la última GTT y realizamos la ITT a las 25 semanas de edad. Allí también observamos diferencias significativas entre los dos grupos: mientras los *Bbs4 +/+* presentaron una curva de respuesta a la insulina normal, los *Bbs4 -/-* se mostraron resistentes a la insulina, ya que prácticamente no responden a la inyección (Figura 21E). Estas diferencias en el perfil de las curvas se traducen también en una diferencia significativa entre las áreas bajo las mismas (Figura 21E). El

conjunto de nuestros resultados indica entonces que los ratones *Bbs4 -/-* en fondo genético mezclado 129/BL6 son hiperfágicos, desarrollan obesidad, y presentan un defecto en el manejo de la glucosa caracterizado por una resistencia a la insulina.

Estos animales fueron sacrificados a las 25 semanas de edad, luego de realizada la ITT, y se realizaron disecciones de los depósitos de tejido adiposo (subcutáneo inguinal y visceral perirrenal) y del hígado. Si bien no tuvimos diferencias significativas dado el bajo número de animales por grupo, observamos una tendencia clara en el análisis del tamaño del hígado: los ratones *Bbs4 -/-* presentaron hígados más grandes con respecto al de los controles (2,92 g vs. 1,31 g) (Figura 22). A su vez, los hígados de los *Bbs4 -/-* presentaron un color más claro que los hígados *Bbs4 +/+* (Figura 22A), indicativo de hígado graso. En cuanto al tejido adiposo, disecamos los diferentes depósitos del lado derecho del animal (Figura 22B). La cuantificación del peso de dichos depósitos mostró que, tanto en grasa visceral como subcutánea, los depósitos de ratones *Bbs4 -/-* son más grandes que los de los *Bbs4 +/+* (grasa subcutánea = 1,75 g *Bbs4 -/-* vs. 0,45 g *Bbs4 +/+*; grasa visceral = 1,52 g *Bbs4 -/-* vs. 0,43 g *Bbs4 +/+*). Además, normalizamos los tamaños de cada depósito con respecto al peso total del animal y nuevamente encontramos que los de los *Bbs4 -/-* son mayores que los controles (grasa subcutánea= 0,035 g/ g tot. en *Bbs4 -/-* vs. 0,014 g/g tot. en *Bbs4 +/+*; grasa visceral = 0,029 g/g tot. en *Bbs4 -/-* vs. 0,013 g/g tot. en *Bbs4 +/+*). Nuevamente, dado el *n* pequeño en este experimento las diferencias solamente fueron estadísticamente significativas en el caso de la grasa subcutánea, aunque en la grasa visceral la tendencia también es clara.

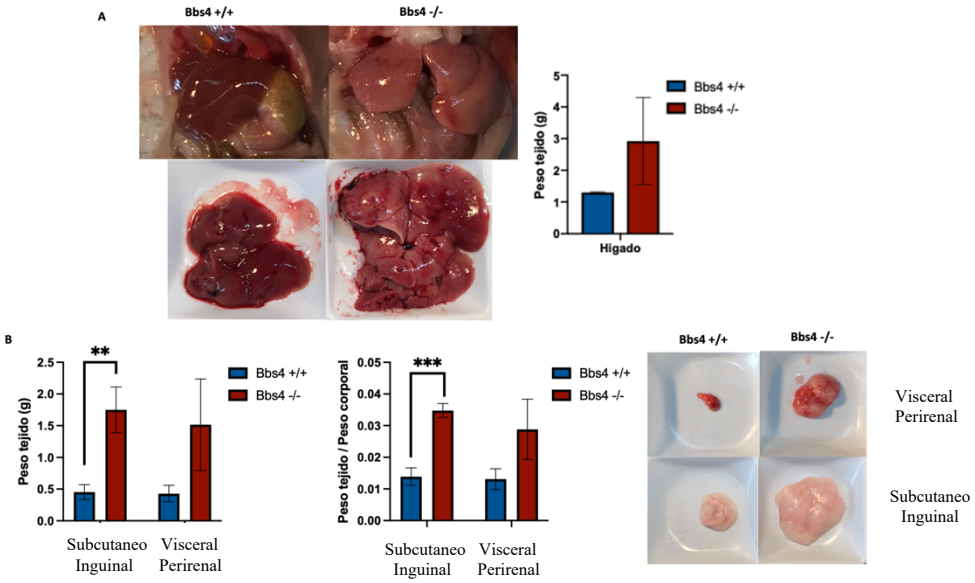


***Figura 22. Biopsias de tejidos relevantes de ratones Bbs4 -/- y controles a las 25 semanas de edad.***
***A)*** *En la izquierda de la imagen se observan imágenes de los hígados, previo y posterior a ser disecados completamente. En la gráfica de la derecha se observa la cuantificación del peso de estos.* ***B)*** *A la derecha se observan imágenes de los dos depósitos de tejido adiposo A la izquierda están las gráficas de cuantificación del peso, absoluto y normalizado por el peso total del animal. ** = P < 0.005; *** = P < 0.001*

Finalmente, en colaboración con el Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina de la UdelaR, analizamos la histología del tejido adiposo visceral y subcutáneo. Recordemos que, ante situaciones de exceso energético, como la que significa una situación de hiperfagia, el tejido adiposo puede responder fundamentalmente de dos formas: aumentando el tamaño de los adipocitos preexistentes (hipertrofia), o a través del aumento del número de adipocitos (hiperplasia). Para evaluar estas dos posibilidades, cuantificamos el área de los adipocitos y pudimos observar que, tanto para los depósitos subcutáneos como para los viscerales, el área de los adipocitos *Bbs4 -/-* es mayor a la de los adipocitos *Bbs4 +/+* (Figura 23), lo que demuestra la existencia de un componente hipertrófico en el crecimiento de los mismos.

De todas formas, si bien la diferencia es estadísticamente significativa, la misma es menor a la que esperaríamos en un tejido adiposo completamente hipertrófico, característico de patologías metabólicas. En estos casos, los adipocitos son cerca de tres veces más grandes que los controles (Marion et al., 2012; Wang et al., 2017) y Figura 12), mientras que en nuestro caso esa diferencia es de poco más del 50% (Figura 23).

Estos resultados sugieren la existencia de un componente de hipertrofia en el tejido adiposo de los ratones *Bbs4 -/-*, pero que puede no estar explicar completamente la diferencia que encontramos en el peso de los animales y en el peso de sus depósitos de grasa (Figuras 21 y 22). Interesantemente, y como ya mencionamos, la expansión del tejido adiposo por hiperplasia se asocia con un tejido adiposo que puede mantener funcionalidad, a diferencia de lo que esperaríamos en ratones obesos que desarrollen síndrome metabólico.

De todas formas, a las 25 semanas de edad los *Bbs4 -/-* presentaron todas las características de una disfunción metabólica, mientras que los controles, al no ser obesos, se mantuvieron saludables.

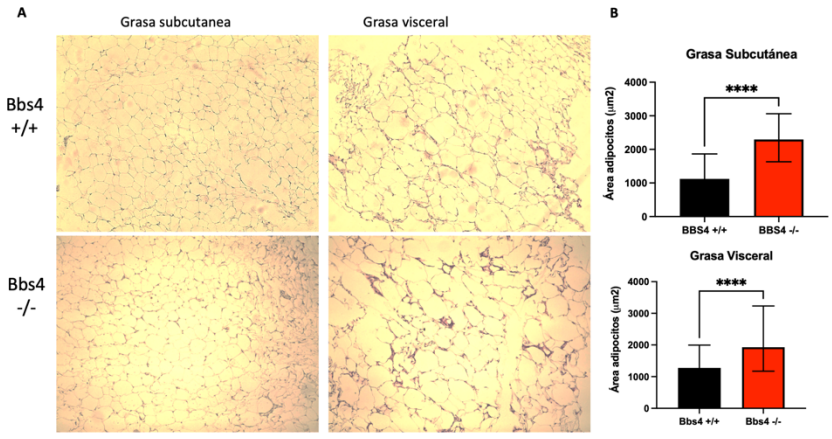


***Figura 23. Caracterización de los adipocitos de ratones de 25 semanas de edad, Bbs4 -/- y controles.***
*A) Cortes histológicos de tejido adiposo subcutáneo y visceral teñidos con Hematoxilina y Eosina. B) Cuantificación del área de los adipocitos en ambos depósitos de grasa. **** = P < 0.0001*

En este punto cabe destacar una dificultad importante a la hora de analizar e interpretar estos resultados: los animales *Bbs4 -/-* desarrollan obesidad por ser hiperfágicos, inclusive cuando son alimentados con dieta normal. Esto provocó que a la hora de trabajar con individuos adultos tuvimos que comparar ratones *Bbs4 -/-* obesos con animales *Bbs4 +/+* de normo peso, lo cual no nos permitió sacar conclusiones sobre cómo manejan la obesidad los animales *Bbs4 -/-* respecto a controles obesos.

Por lo tanto, nos propusimos evaluar el desarrollo de obesidad en un contexto donde pudiéramos tener ratones *Bbs4 +/+* y *Bbs4 -/-* de peso comparable, para lo cual optamos por administrar dieta obesogénica pero en cantidades controladas para minimizar la influencia de la hiperfagia.

## Modelo *Bbs4 -/-* en fondo genético 129/BL6 con dieta controlada

Como se mencionó en la sección anterior, el objetivo en este punto era obtener ratones *Bbs4 -/-* y controles obesos y de pesos comparables, que además nos permitieran definir cuán importante es la hiperfagia en el desarrollo de obesidad de los animales *Bbs4 -/-*. Para esto primero pusimos a punto un protocolo de control de dieta. Evaluamos un grupo de cuatro machos *Bbs4 -/-* y cuatro machos *Bbs4 +/+*, de 12 semanas de edad, en cajas individuales a efectos de evitar la dominancia y que haya algún animal que acapare todo el alimento. Alimentamos a los ratones con 3 - 3,5 g de dieta normal por día, cantidad que habíamos determinado previamente consume un animal control (Figura 19). Con este protocolo, logramos que durante las 11 semanas en las que se hizo el seguimiento, los dos grupos de animales se mantuvieran en el mismo rango de peso (Figura 24). Una vez establecido el protocolo, el siguiente paso fue repetir este régimen de alimentación con un número mayor de animales y además sustituyendo la dieta normal por HFD, de manera de estimular el aumento de peso y el desarrollo de obesidad a la par en los dos grupos y así poder estudiar como respondían a nivel metabólico.

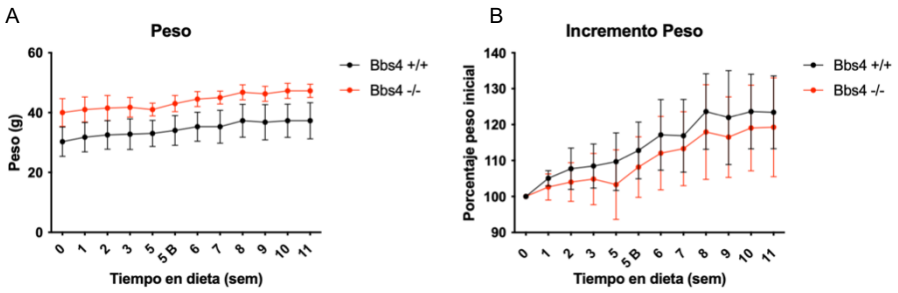


***Figura 24. Curvas de crecimiento de los ratones Bbs4 en normo dieta controlada.***
***A)*** *Curva de crecimiento absoluto de machos Bbs4 -/- y sus littermates control en una ND controlada (n = cuatro animales por genotipo)* ***B)*** *Curva de crecimiento de los mismos grupos expresada en incremento de peso, donde el 100% es el peso al inicio del experimento. A la semana 0 de tratamiento los animales tenían 12 semanas de edad.*

Dadas las dificultades para obtener un número grande de animales *Bbs4 -/-* en cada camada, realizamos este experimento con dos grupos de animales desfasados en el tiempo. El primer grupo consintió en seis machos *Bbs4 +/+* y seis machos *Bbs4 -/-*, y el segundo grupo consistió en siete machos de cada genotipo. Luego de haber culminado los experimentos en los dos grupos por separado, se analizaron los resultados en conjunto.

*Ganancia de peso en dieta controlada*

En los dos grupos se controló el peso de los individuos semanalmente y se realizó una GTT por mes. Al analizar los pesos de los animales sometidos a una HFD de 3 g por día por ratón, los resultados muestran que se logró mantener a los dos grupos en pesos comparables a lo largo de todo el experimento. No solo esto, sino que en los dos grupos se ve una ganancia de peso sostenida a lo largo del tiempo (Figura 25). Vale destacar que, como la idea detrás de este experimento era tener pesos comparables entre los dos grupos y tuvimos que realizar el mismo en dos tandas, buscamos partir de pesos similares en ambos casos. En el primer grupo (seis *Bbs4 +/+* vs. seis *Bbs4 -/-*) la dieta se comenzó cuando los animales tenían aproximadamente 12 semanas de edad y se mantuvo durante 24 semanas, mientras que en el segundo grupo (siete *Bbs4 +/+* vs. siete *Bbs4 -/-*) se comenzó aproximadamente a las 15 semanas de edad, cuando estos tenían pesos similares a los del primer

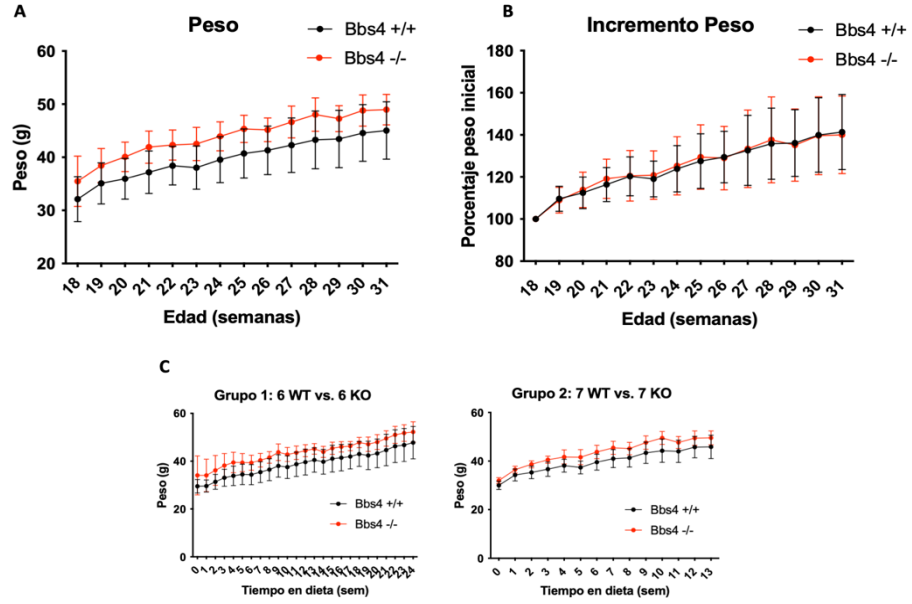


***Figura 25. Curvas de crecimiento de los ratones Bbs4 en HFD controlada.***
***A)*** *Curva de crecimiento absoluto de Bbs4 -/- y sus littermates control en una HFD controlada graficada por edad de los animales. En esta sección se muestran todos los animales juntos (n= 13 animales por genotipo)* ***B)*** *Curva de crecimiento de los mismos grupos expresada en incremento de peso, donde el 100% es el peso a la semana 18 de edad, donde comienza el análisis.* ***C)*** *Curvas de crecimiento absoluto de los dos grupos analizados por separado y graficados en función de las semanas de tratamiento con la HFD controlada. En el Grupo 1 al inicio del tratamiento los animales tenían 12 semanas de edad, mientras que en el Grupo 2 tenían 15 semanas.*

grupo y se mantuvo por 15 semanas. Por este motivo en la Figura 25 se muestra el seguimiento del peso en ambos grupos por separado, desde que se comenzó el tratamiento en cada uno de ellos y también una gráfica de crecimiento por edad de todos los animales, en el lapso en el que los dos grupos se superponen (Figura 25). Los resultados muestran que los *Bbs4 -/-*, al alimentarse con 3g por día de HFD no se diferencian en peso de los *Bbs4 +/+* alimentados en las mismas condiciones (Figura 25B).

*Manejo sistémico de la glucosa*

Por otro lado, las GTT realizadas a lo largo del tratamiento solamente mostraron diferencias significativas entre los dos grupos en el primer punto, es decir, la realizada a las 15 semanas de edad, al inicio de la HFD (ver Figura 26). Este resultado nos resultó interesante porque mostró que, pese a que los dos grupos no eran diferentes en cuanto al peso, el manejo de la glucosa al inicio de la HFD sí fue menos eficiente en los Bbs4 -/- que en los controles. Esta diferencia inicial se perdió luego en el transcurso del experimento y hasta la semana 30 de edad (aproximadamente la semana 15 de tratamiento), donde ambos grupos comienzan a tener problemas en el manejo de la glucosa. Luego de 15 semanas de alimentación con HFD observamos que, si bien la GTT no mostró diferencias

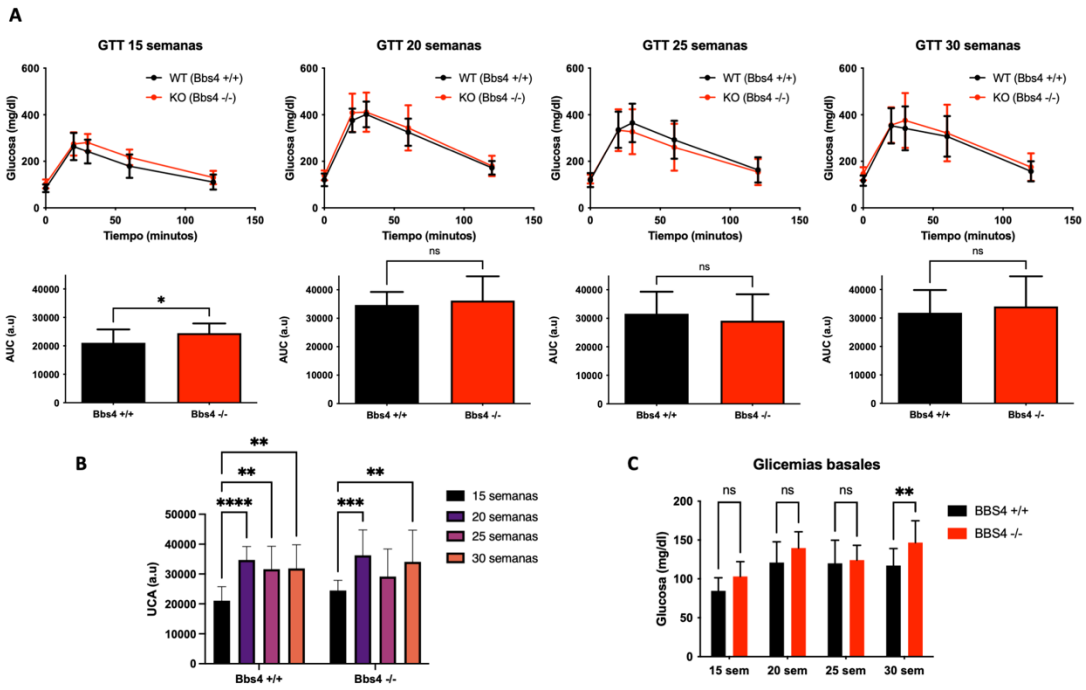


***Figura 26. Caracterización metabólica de la respuesta de ratones Bbs4 -/- a una HFD controlada.***
***A)*** *Resultados de las distintas GTTs realizadas a lo largo del tratamiento. La primera GTT a las 15 semanas de edad de los animales corresponde al inicio del tratamiento con la HFD controlada. En todos los casos se muestra el área bajo la curva en el grafico inferior.* ***B)*** *Se muestran todas las áreas bajo la curva de las GTT juntas, separadas por genotipo lo que permite ver más fácilmente la evolución de cada grupo a lo largo de la dieta.* ***C)*** *Valores de las glicemias basales en ayuno en diferentes momentos del tratamiento. * = P < 0.05; ** = P < 0.005; *** = P < 0.001; **** = P < 0.0001*

significativas entre los grupos, los animales *Bbs4 -/-* presentaron la glicemia basal significativamente elevada con respecto a los *Bbs4 +/+* (Figura 26C). Un aspecto que nos resultó interesante fue que, si analizamos la respuesta de cada grupo por separado a lo largo del tiempo, en ambos casos vemos que luego de cinco semanas de HFD controlada, el área bajo la curva de la GTT ya aumenta significativamente, diferencia que en los ratones *Bbs4 +/+* se mantiene a lo largo de todo el experimento. Sin embargo, en los animales *Bbs4 -/-* observamos una mejoría transitoria a las 25 semanas de edad, luego de 12 semanas de HFD (Figura 26B). En definitiva, podemos concluir que los animales *Bbs4 -/-* tienen una peor respuesta a la glucosa previo al inicio del tratamiento, aunque luego no empeora tanto como la de los animales *Bbs4 +/+*. Incluso a las 30 semanas de edad, cuando la glicemia basal es estadísticamente mayor en los *Bbs4 -/-*, la respuesta a la GTT es igual.

Una particularidad que nos llamó la atención en todos los experimentos *in vivo* y que resulta interesante destacar, es que mientras los animales control se comportan como un grupo homogéneo y con poca dispersión en todos los parámetros analizados, en el grupo *Bbs4 -/-* ocurre todo lo contrario. En la Figura 27 ponemos algunos ejemplos de esto. Si tomamos la GTT realizada a las 20 semanas, donde se observa que el promedio de los grupos *Bbs4 -/-* y *Bbs4 +/+* es prácticamente idéntico, y graficamos la curva de respuesta de cada individuo, observamos que los *Bbs4 -/-* tienen

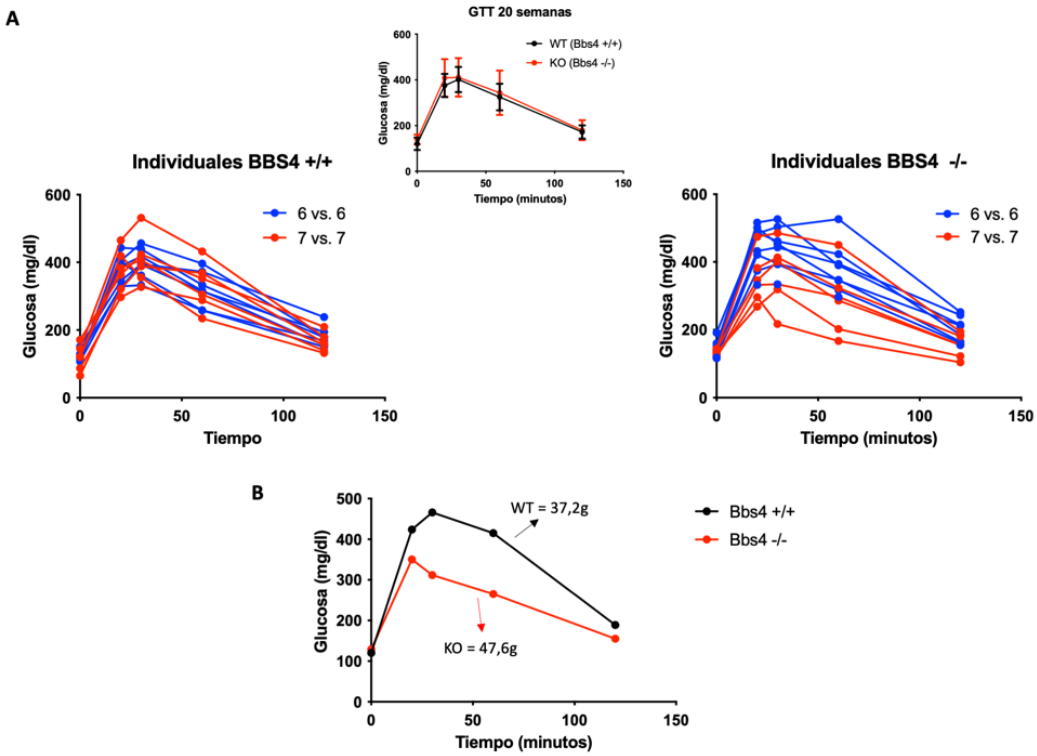


***Figura 27. En fondo genético 129/BL6 los ratones Bbs4 -/- se comportan con una gran variabilidad.***
***A)*** *Graficas de las GTTs realizadas a las 20 semanas de edad. En la gráfica superior se muestran los promedios de los dos grupos donde estos parecen comportarse de la misma forma. En las gráficas inferiores se ven las curvas de respuesta de cada individuo, donde queda en evidencia la mayor dispersión del grupo Bbs4 -/-.* ***B)*** *Un ejemplo de los casos particulares que existen dentro del grupo Bbs4 -/- donde se observa la curva de tolerancia a la glucosa de un animal Bbs4-/- de 47,6g comparado con un Bbs4 +/+ de la misma edad, pero de 37,2g.*

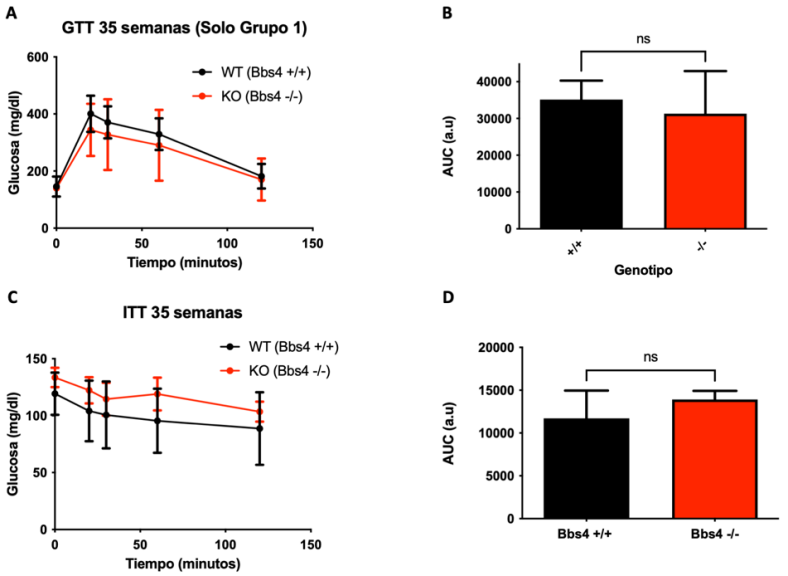


***Figura 28. Test de tolerancia a la glucosa y a la insulina de ratones Bbs4 -/- a las 35 semanas de edad luego de una HFD controlada.***
*A) Resultado de la GTT* ***B)*** *Área bajo la curva de la GTT* ***C)*** *Resultado de la ITT* ***D)*** *Área bajo la curva de la ITT.*

una mayor dispersión, mostrando que hay algunos animales con tolerancia a la glucosa y otros ya resistentes. En este contexto, resulta interesante que algunos individuos que son significativamente más pesados que el promedio, o que los propios animales *Bbs4* +/+, sin embargo responden a la glucosa.

Habiendo detectado algunas diferencias leves en el manejo sistémico de la glucosa, a continuación nos enfocamos en analizar marcadores relevantes al desarrollo de obesidad y tejido adiposo. Decidimos entonces finalizar el segundo grupo (siete *Bbs4* +/+ vs siete *Bbs4* -/-) a las 30 semanas de edad y 15 semanas de dieta. Esta decisión se basó en los resultados obtenidos con el primer grupo (seis *Bbs4* +/+ vs. seis *Bbs4* -/-), el cual había continuado en dieta HFD controlada hasta las 36 semanas de edad, momento en el que se realizó una GTT y una ITT (Figura 28). No se observaron diferencias en la GTT con las medidas anteriores (Figuras 26 y 28) y la ITT mostró que ninguno de los dos grupos respondió activamente a la inyección de insulina (Figura 28 C y D). En suma, luego de 24 semanas de tratamiento con HFD controlada los animales eran intolerantes a la glucosa y también resistentes a la insulina, por lo que ya presentaban todas las características de un síndrome metabólico. Teniendo en cuenta esto y la ventana temporal de mejora por parte de los *Bbs4* -/- observada previamente, decidimos que 30 semanas de edad y 15 de dieta era un punto interesante para terminar el experimento y analizar los tejidos.

*Análisis de tejido adiposo*

Al momento de sacrificar los animales realizamos la disección de varios órganos de interés, incluidos los depósitos de tejido adiposo (subcutáneo y visceral), para estudiar el tamaño de los adipocitos. Además, realizamos una extracción de sangre previa al sacrificio para poder medir algunos metabolitos relevantes en plasma.

En cuanto al tamaño de los adipocitos, no observamos diferencias significativas en las células provenientes de los depósitos de grasa visceral entre animales *Bbs4 -/-* y *Bbs4 +/+*. No solo el tamaño promedio de los adipocitos fue igual en ambos grupos, sino que la distribución de los diferentes tamaños también fue similar (Figura 29). Por su parte, en la grasa subcutánea observamos que los adipocitos *Bbs4 -/-* eran significativamente más grandes que los de los animales control. También observamos un cambio en el perfil de distribución de los tamaños: en los ratones *Bbs4 -/-* se vio un aumento en la cantidad de adipocitos de mayor tamaño (Figura 29B).

Por lo tanto, si bien en este experimento controlamos la dieta, los animales *Bbs4 -/-* terminaron siendo más pesados que los controles. Esta diferencia podría ser explicada, al menos en parte, por un aumento en los depósitos de grasa subcutánea (Figura 29A). Además, en estos mismos depósitos observamos un aumento en el tamaño de los adipocitos, lo que sería un indicio de hipertrofia. En este

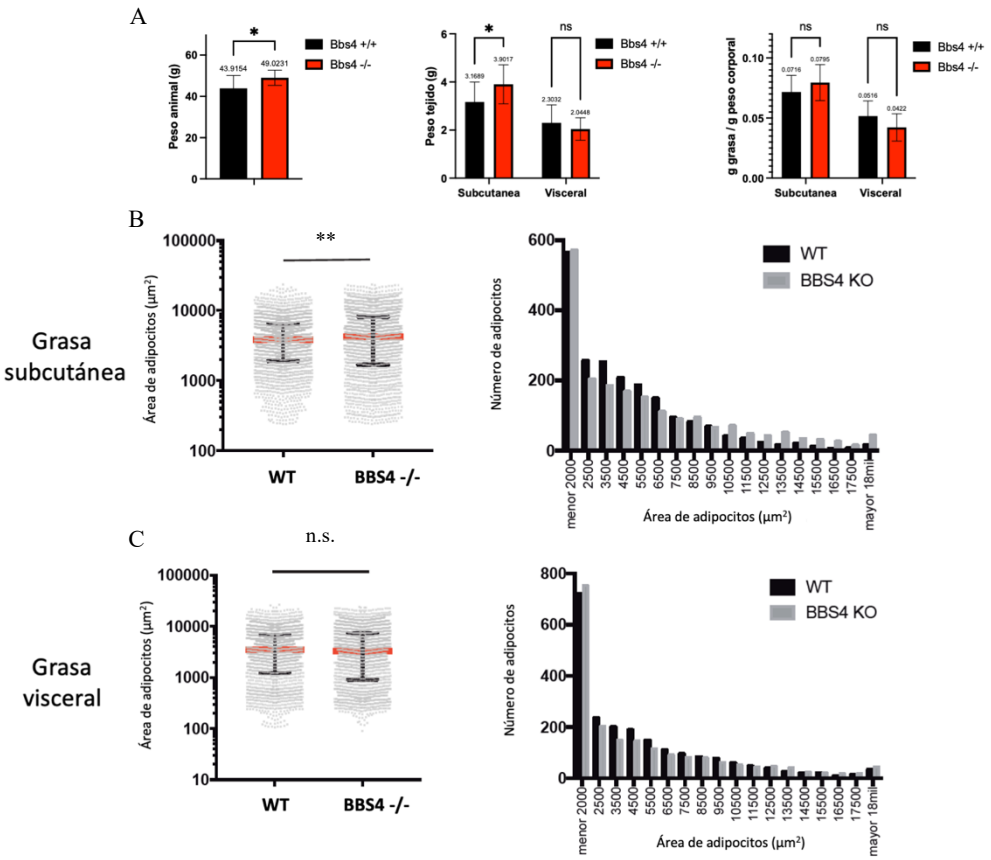


***Figura 29. Caracterización de los adipocitos de ratones Bbs4 -/- y controles de 36 semanas de edad luego de 24 semanas de tratamiento con HFD controlada.***

***A)*** *Cuantificación del peso de los animales y de los depósitos de grasa subcutánea y visceral. La cuantificación del peso de los depósitos se hizo solamente con un depósito de cada animal: subcutáneo posterior y visceral perirenal, en ambos casos solamente del lado derecho. Para esta cuantificación solo está contabilizado el primer grupo de animales (seis Bbs4 +/+ y seis Bbs4 -/-) que son los únicos que llegaron a las 36 semanas de edad.* ***B)*** *Cuantificación del área de los adipocitos en los depósitos de grasa pesados en A y distribución de los diferentes tamaños. * = P < 0.05; ** = P < 0.005*

punto vale recordar que la expansión de la grasa subcutánea está asociada con una mejor funcionalidad del tejido adiposo, en comparación con la acumulación de grasa visceral.

*Análisis de marcadores en sangre*

Finalmente, utilizamos el plasma de los animales para medir insulina, leptina y ácidos grasos libres. En primer lugar, si bien no se encontraron diferencias significativas en la concentración de insulina en plasma (Figura 30A), observamos una clara tendencia hacia mayores niveles en los animales *Bbs4 -/-* respecto a los controles. Por otro lado, los niveles de leptina en plasma no mostraron ninguna diferencia entre los dos grupos (Figura 30B), a diferencia de lo que ocurre en otro modelo murino de BBS cuando no se controla la hiperfagia (Marion et al., 2012). Finalmente, encontramos una diferencia significativa en los niveles de ácidos grasos libres en plasma, donde los ratones *Bbs4 -/-* mostraron una disminución en los niveles de ácidos grasos volcados al torrente sanguíneo (Figura 30C) respecto a los controles. Esto es sumamente interesante, ya que es característico de un perfil más saludable, aún cuando al momento del sacrificio los animales *Bbs4 -/-* eran más pesados (Figura 29A) y presentaban una glicemia basal más elevada (Figura 16C) que los *Bbs4 +/+*.

Como conclusión de estos experimentos vemos que, sometiendo a los dos grupos de animales a una HFD controlada de 3 g por día por ratón, logramos que ambos desarrollen obesidad a la par en lo que respecta a ganancia de peso, y que, a punto final, los dos grupos mostraran características de síndrome metabólico. Sin embargo, observamos algunos parámetros atribuibles a una presentación más saludable de la obesidad en los ratones *Bbs4 -/-*. Es posible que estas diferencias sean transitorias, o quizás puedan exacerbarse ante un estímulo metabólicamente más demandante. Por eso decidimos realizar otro experimento sometiendo a animales a una HFD *ad libitum* pero por un corto período de tiempo, de forma de evaluar y comparar la respuesta sistémica y del tejido adiposo.

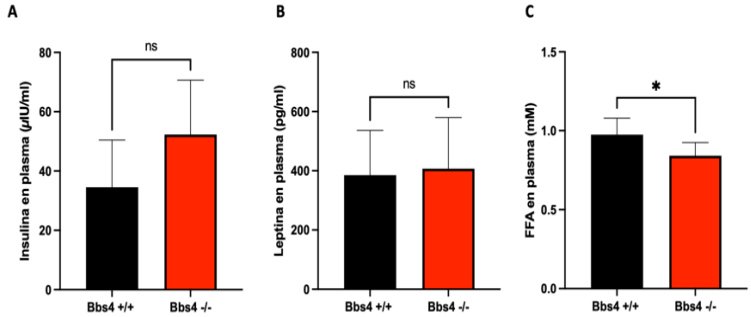


***Figura 30. Determinación de metabolitos en plasma sanguíneo.***
*Medidas de Insulina **A)**, Leptina **B)** y Ácidos Grasos Libres **C)** en plasma sanguíneo obtenido de los animales sacrificados a las 36 semanas de edad luego de 24 semanas de HFD controlada. *= P 0.05*

## Modelo *Bbs4 -/-* en fondo genético 129/BL6 con HFD *ad libitum*

Por último, hipotetizando que un mayor estrés metabólico podría dejar en evidencia diferencias entre controles y animales *Bbs4 -/-*, realizamos un último experimento sometiendo a los dos grupos a una HFD *ad libitum*, para estimular de forma aguda el desarrollo de obesidad. En este caso, generamos un nuevo grupo de 15 animales *Bbs4 -/-* y 17 *Bbs4 +/+* con la particularidad de que esta vez utilizamos tanto hembras como machos (ocho hembras de cada genotipo, nueve machos *Bbs4 +/+* y siete machos *Bbs4 -/-*). Esta estrategia nos permitirá analizar la diferencia entre sexos, de la cual teníamos indicios provenientes de la primera caracterización. En dicho experimento observamos una mayor ganancia de peso en las hembras en comparación con los machos (Figura 18). Al igual que en el experimento de HFD controlada, este se realizó en dos grupos separados en el tiempo, pero los resultados se analizaron de forma conjunta.

### *Ganancia de peso en HFD ad libitum*

Esta vez comenzamos a pesar a los animales semanalmente enseguida que se fueron conformando los grupos, para detectar el momento donde los animales control dejan de aumentar de peso producto del crecimiento y allí comenzar la HFD. Esto fue, en promedio, a las 11 semanas de edad tanto para los animales *Bbs4 +/+* como para los *Bbs4 -/-* (Semana 0 en la Figura 31). En ese momento a todos los animales se los sometió a un panel de análisis metabólico, que consistió en una GTT y un sangrado sub-mandibular para la realización de un hemograma y un test funcional hepático

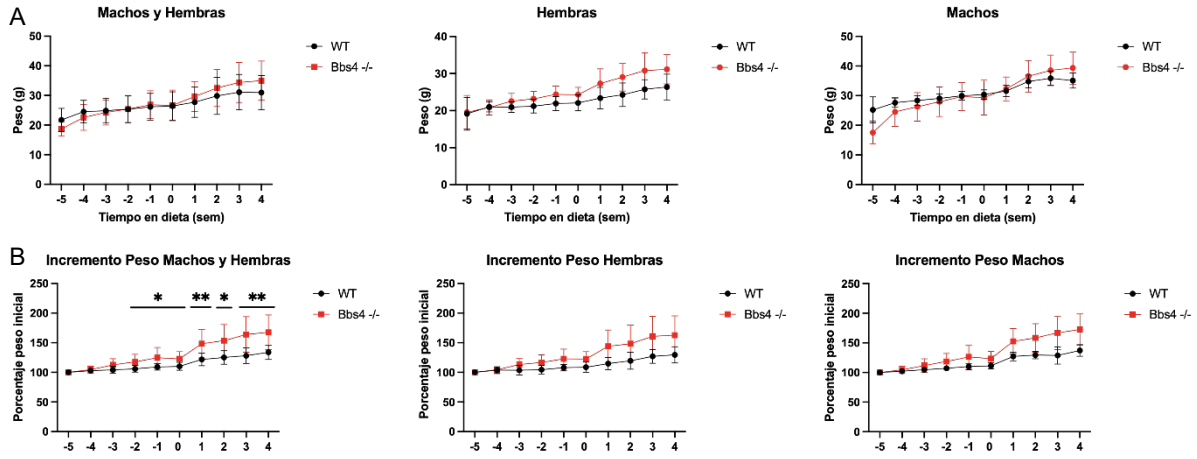


***Figura 31. Curvas de crecimiento de los ratones Bbs4 en fondo genético 129/BL6 en HFD ad libitum.***
***A)*** *Curvas de crecimiento absoluto de ratones Bbs4 -/- y sus littermates control. Se detallan también las gráficas diferenciadas por sexo (n= 17 animales Bbs4 +/+ - ocho hembras y nueve machos – y 15 animales Bbs4 -/- -ocho hembras y siete machos-)* ***B)*** *Curva de crecimiento de ratones Bbs4 -/- y sus controles expresada en incremento de peso, donde el 100% es el peso al inicio del experimento. Únicamente observamos significancia estadística cuando juntamos los dos sexos, y la misma comienza incluso antes de iniciar la HFD, en la semana -2. * = P < 0.05; ** = P < 0.005*

y renal. Luego se continuó la dieta HFD por cuatro semanas, repitiendo íntegramente el panel de análisis metabólico a las dos y a las cuatro semanas, momento en el que se sacrificó a los animales.

El registro semanal del peso (Figura 31) mostró nuevamente que los animales *Bbs4 -/-* tienen mayor aumento de peso que los *Bbs4 +/+* al ser sometidos a una dieta *ad libitum*. Pese a que las diferencias son significativas solamente en el incremento de peso con todos los animales juntos, se ven las tendencias también cuando separamos por sexo. Es importante destacar que debido a la hiperfagia de los ratones *Bbs4 -/-* estos se comienzan a separar en peso incluso antes de comenzar la HFD, aunque dicha separación se hace más pronunciada luego de comenzar la dieta.

*Manejo sistémico de la glucosa y análisis de marcadores en sangre*

En cuanto a los paneles metabólicos, las GTTs (Figura 32 A y B) no arrojaron diferencias significativas en ningún caso. Si bien nuevamente observamos una tendencia hacia una menor sensibilidad a la glucosa por parte de los ratones *Bbs4 -/-* previo a iniciar la HFD, esta diferencia con los *Bbs4 +/+* pareció mantenerse a lo largo del experimento. Por otro lado, el análisis de leucocitos en sangre realizado a través del hemograma (Figura 32 C) evidenció, previo al inicio de la HFD, un

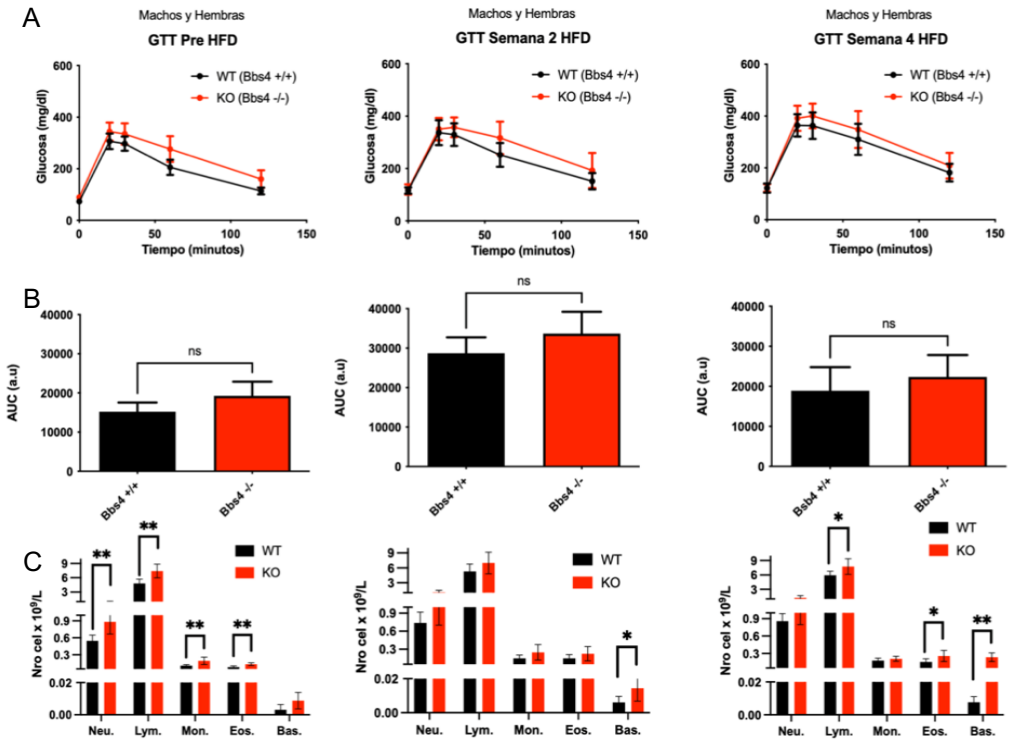


***Figura 32. Caracterización metabólica de los animales Bbs4 +/+ y Bbs4 -/- sometidos a una HFD ad libitum.***

*__A)__ Resultados de las distintas GTTs realizadas a lo largo del tratamiento. La primera GTT aproximadamente a las 11 semanas de edad de los animales corresponde a la previa a iniciar el tratamiento con la HFD ad libitum. __B)__ Se muestran todas las áreas bajo la curva de las GTT, separadas por genotipo lo que permite ver más fácilmente la evolución de cada grupo a lo largo de la dieta. __C)__ Hemograma realizado de sangre periférica obtenida por sangrado submandibular donde se observan el número de leucocitos en sangre. * = P < 0.05; ** = P < 0.005*

mayor número de células inmunes, incluyendo neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos en animales *Bbs4 -/-* respecto a los *Bbs4 +/+*.

Luego, durante la HFD y como respuesta a la injuria producida por la misma, los números de leucocitos comenzaron a aumentar y las diferencias observadas entre los dos genotipos comenzaron a disminuir. Pero esta disminución también mostró algunas particularidades ya que, si bien a las dos semanas de HFD todos los tipos celulares en los que se observaban diferencias habían perdido su significancia estadística, los basófilos se mostraron claramente elevados en los *Bbs4 -/-*. Por su parte, a las cuatro semanas de HFD y con la inflamación crónica estéril asociada al proceso de obesidad aún en desarrollo, los *Bbs4 -/-* nuevamente se separaron de los Bbs4 +/+, mostrando significativamente más linfocitos, eosinófilos y basófilos en sangre (Figura 32).

Por otro lado, también evaluamos algunos parámetros de funcionamiento hepático y renal (Tabla 7) donde si bien no observamos grandes afectaciones en ninguno de los dos órganos, algunos valores parecen elevarse más rápidamente, sobre todo en el hígado, en los animales *Bbs4 -/-* a lo largo del tratamiento con HFD. En particular, observamos que las enzimas hepáticas aumentaron más rápidamente en respuesta a la HFD en los ratones *Bbs4 -/-*. Las aminotransferasas hepáticas son las enzimas encargadas de catalizar la transferencia del grupo alfa-amino desde un amino acido en particular (según que enzima sea) hacia un alfa-cetoácido y sus niveles en sangre son utilizados con frecuencia, y con gran confianza, como marcadores de daño hepático. Los niveles en sangre de estas

| PANEL HEPÁTICO | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Pre HFD | | | Semana 2 HFD | | | Semana 4 HFD | | |
| | Bbs4 WT Mean ± SEM | Bbs4 -/- Mean ± SEM | P = | Bbs4 WT Mean ± SEM | Bbs4 -/- Mean ± SEM | P = | Bbs4 WT Mean ± SEM | Bbs4 -/- Mean ± SEM | P = |
| Proteína Total (g/L) | 58,28 ± 0,70 | 58,13 ± 0,89 | 0,89 | 55,43 ± 1,21 | 58,48 ± 0,90 | 0,07 | 59,84 ± 1,52 | 57,99 ± 2,43 | 0,51 |
| Albumina (g/L) | 36,37 ± 0,57 | 36,54 ± 0,65 | 0,99 | 33,34 ± 0,57 | 33,92 ± 1,19 | 0,93 | 35,64 ± 0,49 | 36,98 ± 0,88 | 0,21 |
| Globulina (g/L) | 21,90 ± 0,63 | 21,59 ± 0,74 | 0,69 | 22,67 ± 1,31 | 25,42 ± 0,90 | 0,12 | 25,66 ± 0,89 | 21,02 ± 2,53 | 0,11 |
| ALB/GLO ratio | 1,69 ± 0,06 | 1,72 ± 0,08 | 0,99 | 1,49 ± 0,10 | 1,34 ± 0,08 | 0,29 | 1,39 ± 0,05 | 1,57 ± 0,12 | 0,33 |
| Bilirrubina Total (µM) | 3,68 ± 0,27 | 3,57 ± 0,23 | 0,77 | 4,15 ± 0,39 | 3,88 ± 0,42 | 0,65 | 3,93 ± 0,28 | 3,59 ± 0,33 | 0,42 |
| Alanina Aminotransferasa (U/L) | 37,11 ± 3,45 | 45,82 ± 3,14 | 0,07 | 39,88 ± 2,20 | 54,31 ± 4,85 | 0,01 (**) | 33,82 ± 2,01 | 51,58 ± 5,45 | 0,01 (**) |
| Aspartato Aminotransferasa (U/L) | 91,78 ± 11,64 | 93,72 ± 6,65 | 0,89 | 116,60 ± 14,91 | 126,60 ± 13,21 | 0,63 | 78,93 ± 4,85 | 121,30 ± 22,32 | 0,05 (*) |
| Gamma glutamil transferasa (U/L) | 1,18 ± 0,14 | 1,17 ± 0,15 | 0,83 | 0,66 ± 0,14 | 1,25 ± 0,17 | 0,02 (*) | 1,24 ± 0,17 | 1,13 ± 0,20 | 0,71 |
| PANEL RENAL | | | | | | | | | |
| | Pre HFD | | | Semana 2 HFD | | | Semana 4 HFD | | |
| | Bbs4 WT Mean ± SEM | Bbs4 -/- Mean ± SEM | P = | Bbs4 WT Mean ± SEM | Bbs4 -/- Mean ± SEM | P = | Bbs4 WT Mean ± SEM | Bbs4 -/- Mean ± SEM | P = |
| Nitrógeno ureico en sangre (mM) | 9,01 ± 0,33 | 9,81 ± 0,31 | 0,08 | 7,03 ± 0,23 | 8,39 ± 0,44 | 0,01 (**) | 6,88 ± 0,15 | 6,85 ± 0,40 | 0,94 |

***Tabla 7. Parámetros hepáticos y renales medidos en sangre de ratones Bbs4 -/- y +/+ alimentados mediante una HFD ad libitum.***

enzimas intracelulares se ven incrementados cuando el daño hepático compromete las membranas celulares y las enzimas son liberadas (Sookoian & Pirola, 2015).

En este caso, observamos que la alanina aminotransferasa aumentó significativamente en los ratones *Bbs4 -/-* a partir de las dos semanas de HFD, mientras que la aspartato aminotransferasa mostró un aumento significativo en los *Bbs4 -/-* a las cuatro semanas (Tabla 7).

En cuanto a la función renal, observamos un aumento en el nitrógeno ureico, es decir el nitrógeno en sangre que proviene de la urea, en los *Bbs4 -/-* a las dos semanas de HFD, pero esa significancia estadística se perdió a las cuatro semanas de dieta.

*Evaluación por sexo de la respuesta a la HFD ad libitum*

Finalmente, como destacamos anteriormente, uno de los objetivos de este último experimento era evaluar si existían diferencias en algunos de los parámetros metabólicos estudiados entre hembras y machos. En ese sentido, cuando observamos la glicemia basal en ayuno de estos animales (Figura 33) vemos que solamente aparecen diferencias significativas entre genotipos en los machos en las medidas tomadas previo al inicio de la HFD.

Estas diferencias encontradas en la glicemia basal de los machos son concordantes con los resultados que observamos si separamos por sexo las curvas de tolerancia a la glucosa en los tres puntos analizados del tratamiento (Figura 34). Aquí se observa que los machos, tanto previo al inicio

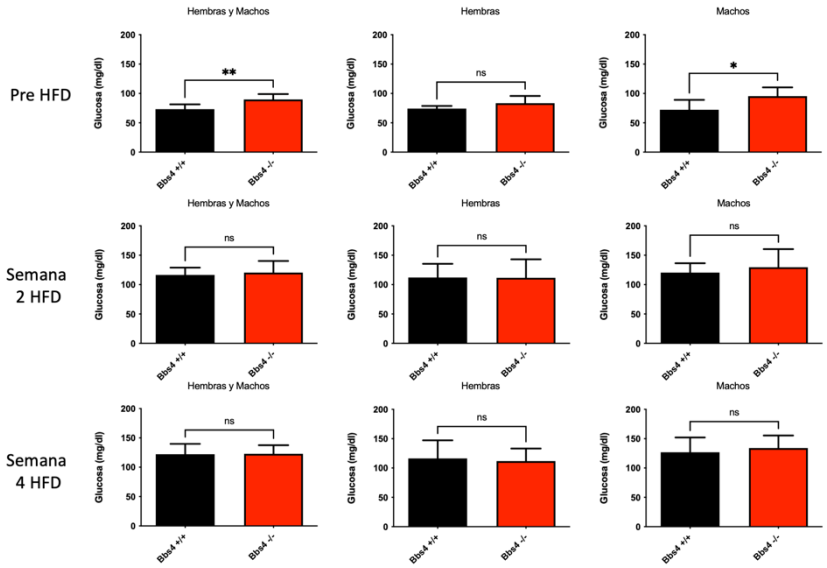


***Figura 33. Glicemia basal en ayuno de los animales Bbs4 -/- y Bbs4 +/+ previo y durante el tratamiento con HFD ad libitum.***

*Se observan los valores de glicemia en sangre extraída de la vena de la cola luego de un ayuno de 16 hs *= P 0.05; **= P 0.005*

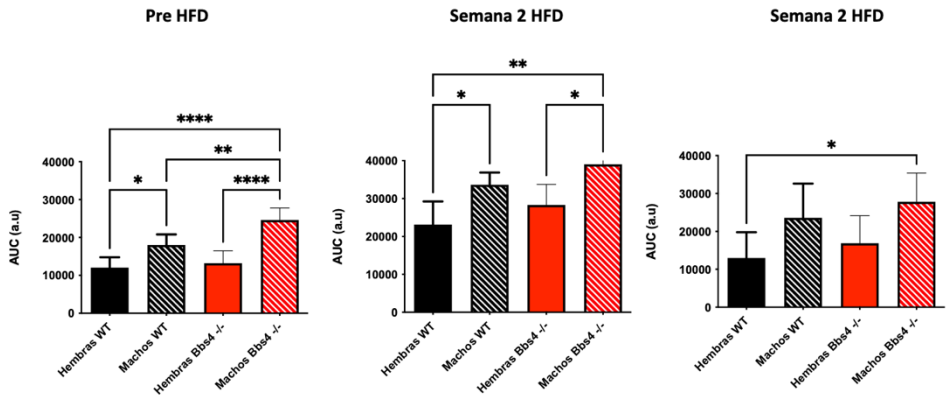


***Figura 34. Test de tolerancia a la glucosa en machos y hembras Bbs4 -/- y Bbs4 +/+ sometidos a una HFD ad libitum.***

*Áreas bajo la curva correspondientes a los test de tolerancia a la glucosa. *= P 0.05; **= P 0.005; ****= P 0.0001*

de la HFD como a las dos semanas de tratamiento tienen una peor respuesta a la glucosa que las hembras, para los dos genotipos.

Finalmente, si separamos por sexo los resultados de los hemogramas realizados (Figura 35) observamos que previo al inicio de la HFD los machos muestran un mayor número de leucocitos en los Bbs4 -/- con respecto a los controles, mientras que en las hembras esto es cierto solamente para los linfocitos. Por otro lado, la dieta lo único que parece provocar es que se pierda esa diferencia en linfocitos en las hembras y un aumento de basófilos en los machos Bbs4 -/- respecto a los controles. (Figura 35).

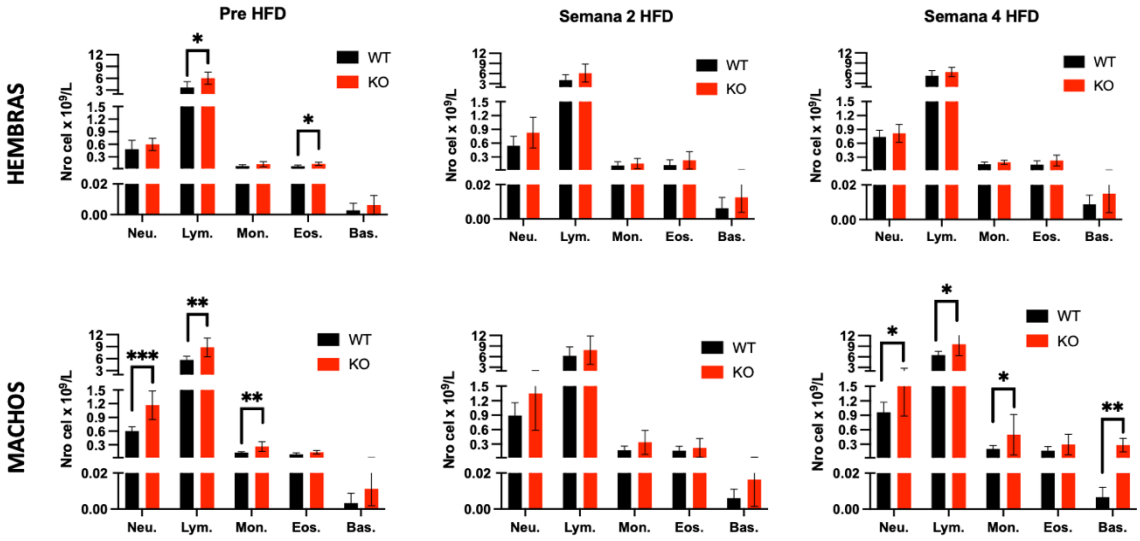


***Figura 35. Hemograma realizado de sangre periférica obtenida por sangrado submandibular donde se observan el número de leucocitos en sangre.***

*Resultados del hemograma observado en la Figura 18C separados en hembras y machos. *= P 0.05; **= P 0.005; ***= P 0.001*

## 3.2 Generación de un modelo murino Ccdc28b -/- por edición genómica basada en CRISPR/CAS9.

Uno de los objetivos principales de esta tesis fue generar un modelo murino deficiente en *Ccdc28b*. La generación de este modelo era importante por diferentes motivos. En primer lugar, para continuar con la caracterización del rol biológico de este gen y dado que fue originalmente descrito como un modificador secundario, también poder contestar la pregunta de si la ausencia de *Ccdc28b* es suficiente para generar un fenotipo de ciliopatía. En segundo lugar, la obtención de este modelo nos daría la posibilidad de generar además una nueva línea, *Bbs4 -/- / Ccdc28b -/-*, que recapitule lo que sucede en algunos pacientes BBS, donde interaccionan la mutación de un gen causal, en este caso *BBS4*, con la alteración de un modificador secundario, en este caso *CCDC28B*. Esto, sumado a la caracterización de la línea murina *Bbs4 -/-* presentada antes, nos permitiría analizar si esta interacción génica resulta en una presentación más severa de los fenotipos característicos de los ratones *Bbs4 -/-* , en particular centrados en el desarrollo de obesidad.

Si bien los tiempos de la tesis no permitieron generar y analizar los animales *Bbs4 -/- / Ccdc28b -/-*, la generación de la línea *Ccdc28b -/-* se logró y permitió la publicación de un artículo científico. En el siguiente segmento de esta tesis se adjunta dicha publicación, luego de la cual describimos algunos resultados complementarios de los cuales se mencionó muy poco en la publicación.

***Generación y caracterización del modelo murino mutante en Ccdc28b genera un vinculo entre este gen asociado al Síndrome de Bardet-Biedl y algunos fenotipos de comportamiento social.***

PLOS GENETICS

RESEARCH ARTICLE

# Generation and characterization of *Ccdc28b* mutant mice links the Bardet-Biedl associated gene with mild social behavioral phenotypes

**Matías Fabregat[1,2], Sofía Niño-Rivero[3], Sabrina Pose[4], Magdalena Cárdenas-Rodríguez[1,2], Mariana Bresque[2,5], Karina Hernández[6], Victoria Prieto-Echagüe[1,2], Geraldine Schlapp[7], Martina Crispo[7], Patricia Lagos[3], Natalia Lago[4], Carlos Escande[2,5], Florencia Irigoín[1,2,6]*, Jose L. Badano[1,2]***

**1** Human Molecular Genetics Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, **2** INDICyO Institutional Program, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, **3** Departamento de Fisiología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, **4** Neuroinflammation and Gene Therapy Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, **5** Metabolic Diseases and Aging Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, **6** Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, **7** Laboratory Animal Biotechnology Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

* firigoin@fmed.edu.uy (FI); jbadano@pasteur.edu.uy (JLB)

Check for updates

OPEN ACCESS

**Citation:** Fabregat M, Niño-Rivero S, Pose S, Cárdenas-Rodríguez M, Bresque M, Hernández K, et al. (2022) Generation and characterization of *Ccdc28b* mutant mice links the Bardet-Biedl associated gene with mild social behavioral phenotypes. PLoS Genet 18(6): e1009896. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009896

**Editor:** J. Robert Manak, University of Iowa, UNITED STATES

**Received:** October 20, 2021

**Accepted:** May 9, 2022

**Published:** June 2, 2022

**Copyright:** © 2022 Fabregat et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** This study was supported by: Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) and Sistema Nacional de Investigadores- Agenica Nacional de Investigación e Innovación (ANII) to MF, SN, MC-R, MB, VP-E, MC, PL, NL, CE, FI and JLB; CSIC I+D 2016-557 (Universidad de la República, Uruguay) to FI and

## Abstract

CCDC28B (coiled-coil domain-containing protein 28B) was identified as a modifier in the ciliopathy Bardet-Biedl syndrome (BBS). Our previous work in cells and zebrafish showed that CCDC28B plays a role regulating cilia length in a mechanism that is not completely understood. Here we report the generation of a *Ccdc28b* mutant mouse using CRISPR/Cas9 (*Ccdc28b mut*). Depletion of CCDC28B resulted in a mild phenotype. *Ccdc28b mut* animals *i)* do not present clear structural cilia affectation, although we did observe mild defects in cilia density and cilia length in some tissues, *ii)* reproduce normally, and *iii)* do not develop retinal degeneration or obesity, two hallmark features of reported BBS murine models. In contrast, *Ccdc28b mut* mice did show clear social interaction defects as well as stereotypical behaviors. This finding is indeed relevant regarding *CCDC28B* as a modifier of BBS since behavioral phenotypes have been documented in BBS. Overall, this work reports a novel mouse model that will be key to continue evaluating genetic interactions in BBS, deciphering the contribution of *CCDC28B* to modulate the presentation of BBS phenotypes. In addition, our data underscores a novel link between *CCDC28B* and behavioral defects, providing a novel opportunity to further our understanding of the genetic, cellular, and molecular basis of these complex phenotypes.

## Author summary

BBS is caused by mutations in any one of 22 genes known to date. In some families, BBS can be inherited as an oligogenic trait whereby mutations in more than one BBS gene collaborate in the presentation of the syndrome. In addition, *CCDC28B* was originally

JLB; Comisión Académica de Posgrados (CAP-UdelaR) to MF, SN; FOCEM – Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (COF 03/11). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

identified as a modifier of BBS, whereby a reduction in CCDC28B levels was associated with a more severe presentation of the syndrome. Different mechanisms, all relying on functional redundancy, have been proposed to explain these genetic interactions. The characterization of BBS proteins supported this functional redundancy hypothesis: BBS proteins play a role in cilia maintenance/function and subsets of BBS proteins can even interact directly in multiprotein complexes.

We have previously shown that CCDC28B also participates in cilia biology regulating the length of the organelle: knockdown of *CCDC28B* in cells results in cilia shortening and targeting *ccdc28b* in zebrafish also results in early embryonic phenotypes characteristic of other cilia mutants. In this work, we generated a *Ccdc28b* mutant mouse to determine whether abrogating *Ccdc28b* function would be sufficient to cause a ciliopathy phenotype in mammals, and to generate a tool to continue dissecting its modifying role in the context of BBS. Overall, *Ccdc28b* mutant mice presented a mild phenotype, a finding fully compatible with its role as a modifier, rather than a causal BBS gene. In addition, we found that *Ccdc28b* mutants showed behavioral phenotypes, similar to the deficits observed in rodent autism spectrum disorder (ASD) models. Thus, our results underscore a novel causal link between *CCDC28B* and behavioral phenotypes in mice.

## Introduction

Bardet-Biedl syndrome (BBS; OMIM 209900) is a rare disorder characterized by retinal degeneration, polydactyly, intellectual disability, gonadal/renal malformations and obesity among other features [1]. BBS is a genetically heterogeneous condition with 22 genes known to cause the disease to date (*BBS1*-*BBS22*; [2,3] and references within). All BBS-causing genes encode proteins important for the formation/maintenance of primary cilia [4–14], complex organelles that have been shown to function as hubs for signaling (see for example [15,16]). Therefore, BBS is a ciliopathy, a term used to group several human conditions that are caused by ciliary dysfunction and share, to different degrees, a set of characteristic phenotypes [17,18]. While in most families BBS is inherited in an autosomal recessive manner, genetic interactions between BBS genes, modulating both penetrance and expressivity, also support an oligogenic model of inheritance [19–28].

The functional characterization of BBS proteins has provided a cellular/molecular explanation to the oligogenicity observed in BBS, a phenomenon that typically relies on the presence of complementary pathways, complexes and/or some degree of functional redundancy [29]. In this context, BBS proteins present a significant functional overlap and can even interact directly forming multiprotein complexes. Eight BBS proteins form the BBSome, a complex that mediates traffic of ciliary components [6,10,13,30–33]. Another group of BBS proteins (BBS6, BBS10 and BBS12) have a chaperone activity critical for BBSome assembly [34], while others are important for BBSome recruitment to membranes [6] or to regulate the movement of the complex in and out of cilia [35]. Moreover, cilia are composed of more than 1000 proteins with at least four main functional complexes including the BBSome, the transition zone, and two intraflagellar complexes for anterograde and retrograde transport respectively. Thus, mutations in different genes and ciliary modules can contribute to cilia dysfunction and therefore to the pathogenesis of different ciliopathies (reviewed in for example [15,36]).

As mentioned, oligogenicity is typically caused by some degree of functional redundancy. Thus, the identification of proteins that could physically/functionally interact with the BBS proteins was used both to gain insight on the cellular basis of BBS and to identify novel

candidates that could contribute to the pathogenesis of the syndrome. In that context, CCDC28B (coiled-coil domain-containing protein 28B), a protein of unknown function at the time, was identified as an interactor of both BBS4 and other known BBS proteins (BBS1, BBS2, BBS5, BBS6, BBS7 and BBS8) [37]. Importantly, a sequencing screen looking for *CCDC28B* mutations in a BBS patient cohort identified a synonymous single base change at the penultimate base of exon 3 (the gene is composed of 6 exons). A minigene analysis demonstrated that this change affected exon 3 definition on the 5' end favoring the production of an aberrant mRNA lacking the first 5 bases of exon 3, which results in a frameshift and the introduction of a premature stop codon (PTC). Thus, the net result of this mutation was shown to be a decrease (but not elimination) in *CCDC28B* mRNA levels. Importantly, while this mutation was not sufficient to cause BBS, it was shown that the resulting reduction in CCDC28B levels, in a genetic background with mutations in *bona fide* BBS genes, correlated with a more severe presentation of the syndrome [37]. Overall, the data showed that this gene could play a modifier role in BBS, at least in some patient cohorts [21,37–39].

Since that original work, we have shown that CCDC28B also plays a role in cilia. Knockdown of *CCDC28B* in hTERT-RPE cells results in shortened cilia and a reduction in the percentage of ciliated cells. Targeting *ccdc28b* in zebrafish results in a distinct external phenotype characterized by a shortened body axis, increased body curvature, craniofacial and pigmentation defects and smaller eyes, phenotypes that have been described in other cilia zebrafish mutants, including BBS mutants ([40,41] and references within). Furthermore, the analysis of different ciliated tissues in zebrafish morphant embryos showed a clear reduction in both the number and length of cilia [40–42]. While the mechanism by which CCDC28B modulates cilia is still not completely understood, we have uncovered relevant protein-protein interactions. We were able to show that CCDC28B modulates cilia length, at least in part, through an interaction with SIN1, a member of mTORC2, independently of the mTOR complex [42]. More recently, we showed that the molecular motor kinesin 1 is also involved in cilia length regulation by controlling CCDC28B sub-cellular localization [41]. Altogether our data provided insight into the cellular basis of the CCDC28B modifier effect: a reduction in CCDC28B levels, as reported in patients, could affect cilia at least to some extent, thus contributing to BBS pathogenesis when present in a BBS mutant genetic background. However, the data also raised the question of whether other types of mutations (i.e. null mutations) in *CCDC28B* could be sufficient to cause a ciliopathy.

In this work we aimed to generate a *Ccdc28b* knockout mouse that would i) allow us to determine whether loss of function of this gene is sufficient to cause cilia dysfunction and associated phenotypes in mammals, and ii) serve as a tool to continue studying its modifier effect in the context of BBS. We therefore targeted *Ccdc28b* in mice using CRISPR/Cas9 and performed an in-depth phenotypic characterization of mutant animals (*Ccdc28b mut*). We focused on phenotypes that have been described for BBS mouse mutant lines, which include the development of obesity driven by hyperphagia, and retinal degeneration. We show that depletion of CCDC28B is not sufficient to cause overt ciliary defects in cells or tissues, although a trend towards presenting a reduction in the percentage of cilia and mild cilia length defects were seen in a subset of the analyzed tissues. In agreement with this observation, *Ccdc28b mut* animals are viable, reproduce at mendelian rates and do not develop obesity or show signs of photoreceptor loss. However, *Ccdc28b mut* mice show social behavior defects, phenotypes that are being documented in both BBS patients and animal models (see for example [43–49]). Our work generated a novel genetic model that recapitulates certain phenotypes observed in BBS patients, and that will allow further dissection of the genetic, cellular, and molecular basis of complex behavioral phenotypes.

## Results

### Generation of a Ccdc28b mouse model

The mouse *Ccdc28b* gene (Gene ID 66264) is located on chromosome 4 and is composed of six exons with an open reading frame spanning from exon 2 to exon 6. Although several splicing isoforms have been reported (*Ensembl* ENSMUSG00000028795), as in humans, only two transcripts are predicted to encode full length proteins in mice. These are proteins of 200 and 205 amino acids respectively, differing in their C-terminal regions (Fig 1A). To generate a knockout *Ccdc28b* murine line we choose to target exon 3, which is shared by all reported transcripts and coding isoforms, and is the exon affected by the mutation described in humans [37]. We designed two gRNAs to target the 5'end of exon 3 (Fig 1B) and verified their efficiency in targeting *Ccdc28b* by transiently transfecting a murine NIH3T3 cell line stably expressing CAS9 and performing a heteroduplex analysis. We then injected 294 zygotes with *Cas9* mRNA and our two gRNAs. Upon analysis of 12 animals by PCR amplification of exon 3 from genomic DNA and sequencing, we were able to identify several mutations in six mice (50% mutation rate). We crossed two of those founder mice with C57BL/6J females (Jackson Lab stock # 000664) to segregate the mutations, and finally, we chose to continue our work with a mutation consisting of two one base pair deletions at the 5' end of exon 3, thus predicted to result in a frameshift and a PTC (Fig 1B). This mutated *Ccdc28b* transcript could potentially encode an 88 amino acid protein composed of the first 56 amino acids of CCDC28B followed by 32 novel residues, although mutant mRNA is expected to be targeted by nonsense-mediated decay (NMD) due to the PTC (Fig 1B). We crossed a male mouse carrying the selected mutation with C57BL/6J females to start the colony and performed two rounds of crossing before starting the characterization of the line, which from that point onwards we maintained by crossing homozygous mutant animals.

As a first step we aimed to confirm that the expression of *Ccdc28b* was abrogated. As mentioned, the mutation introduces a PTC likely targeting the mRNA for NMD. We therefore performed qRT-PCR using *Ccdc28b* specific primers and cDNA obtained from different tissues (*Ccdc28b* is widely expressed; [50]). As expected, we observed a significant reduction in *Ccdc28b* mRNA levels (Fig 1C), although at different degrees between muscle and kidney likely reflecting reported differences in NMD efficiency between tissues [51]. We also PCR-amplified *Ccdc28b* from cDNA of E14 embryos (both *Ccdc28b mut* and C57BL/6J *wt*) with primers located at the far most 5' and 3' ends of the reported isoforms and sequenced the PCR products using Oxford Nanopore technology taking advantage of its long-read sequencing. We detected the expected mutations and did not find any evidence of novel alternative transcripts in *Ccdc28b mut* samples (S1 Fig). Next, we evaluated CCDC28B at the protein level by western blot: the expected ~22 KDa CCDC28B band was absent in the *Ccdc28b mut* samples (Figs 1D; S2 for full gels and muscle blot). Thus, our results indicate that we were able to generate a mutant *Ccdc28b* mouse line (*Ccdc28b mut*).

### Depletion of CCDC28B does not result in overt ciliary defects but may modulate cilia length in a tissue dependent manner

To begin the characterization of the mutant line we first focus on the known function of CCDC28B. As previously mentioned, our work in hTERT-RPE cells and zebrafish uncovered a role for CCDC28B in cilia whereby its depletion resulted in a reduction in ciliary length as well as a reduction in the percentage of ciliated cells [40–42]. We first focused on measuring cilia length and quantifying the proportion of cilia in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) obtained from both *Ccdc28b mut* and C57BL/6J (*wt*) E14 embryos. We quantified the

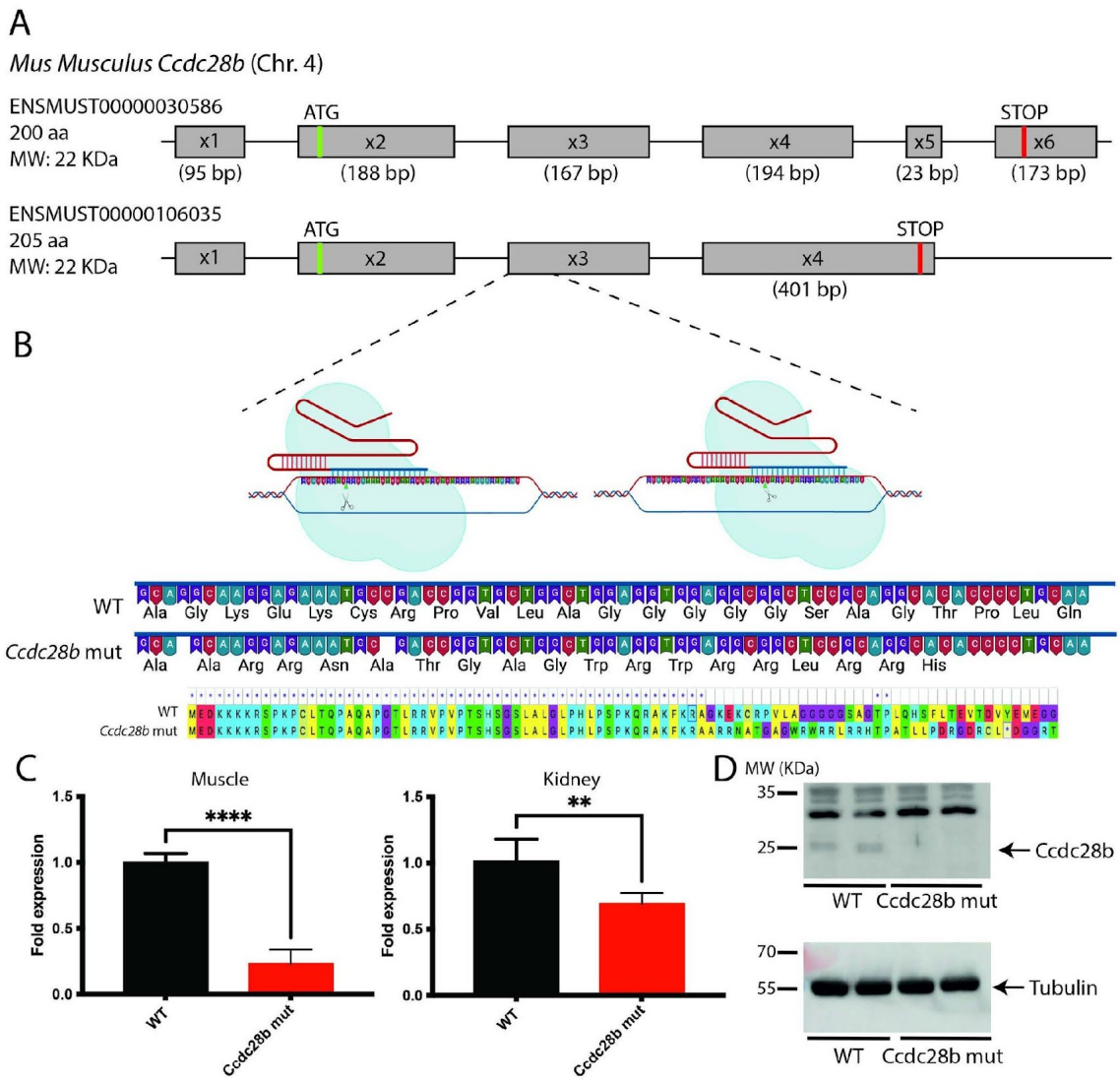


**Fig 1. Targeting *Ccdc28b* in the mouse. A)** Schematic representation of murine *Ccdc28b* genomic structure, showing exon distribution and the two main reported protein coding ORFs that encode two isoforms differing in their C-terminal sequences. **B)** Graphic representation showing the two gRNAs used in this study targeting the 5' end of exon 3. The selected mutation comprises two single base deletions leading to a frameshift and the introduction of a PTC. **C)** Real-time quantitative PCR was used to show a significant reduction in *Ccdc28b* mRNA levels, likely due to NMD-mediated degradation of PTC containing mRNA. One adult male and one adult female of each genotype were used, and each sample was run in triplicates. Expression of *Gapdh* was used for normalization. Results are shown as fold change compared to *wt* control animals. ** = $P < 0.01$ and *** = $P < 0.001$. **D)** Western blot analysis of adult female muscles showing that a band corresponding to the CCDC28B expected molecular weight (aprox. 22 kDa) is depleted in *Ccdc28b mut* animals. Full gels are shown in S2 Fig

https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009896.g001

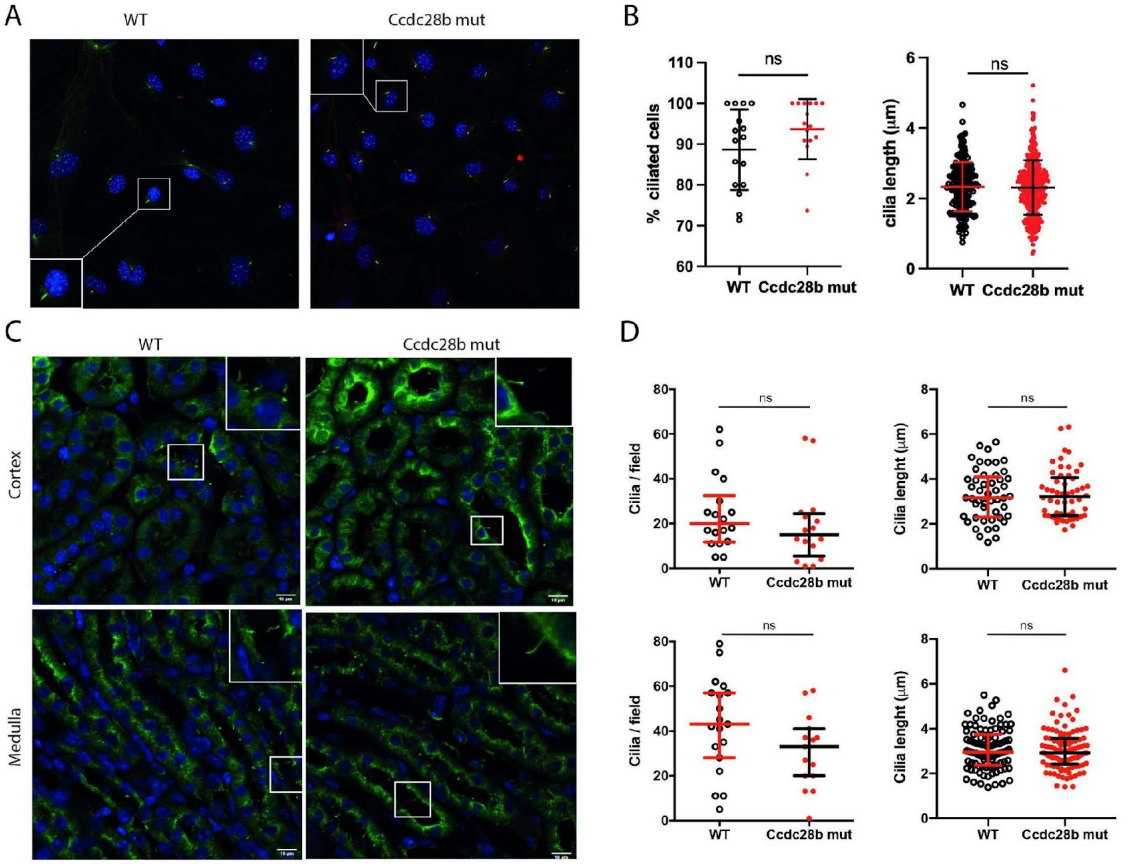


**Fig 2. Characterization of cilia in *Ccdc28b mut* cells and tissue. A)** Confocal images of *wt* and *Ccdc28b mut* MEFs. DAPI (blue), acetylated tubulin (green) and γ-tubulin (red) were used to visualize nuclei, ciliary axoneme and basal body, respectively. **B)** Cilia length was measured in more than 190 cilia from *wt* and *Ccdc28b mut* MEFs. Data are presented as individual values plus mean ± SD. **C)** Confocal images of *wt* and *Ccdc28b mut* kidneys (adult females were used). The upper panels correspond to kidney cortex, and the lower panels correspond to kidney medulla. DAPI (blue) and anti-acetylated tubulin (green) were used to visualize nuclei and cilia respectively. **D)** Quantification of number of cilia per field and cilia length. Data did not have normal distribution and are shown as individual values plus median with interquartile range. Despite no significant differences were found there is a trend towards a reduction in cilia density in both regions in *Ccdc28b mut* kidneys. ns: not significant.

https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009896.g002

proportion of ciliated cells by counting nuclei and cilia per field, using anti γ-tubulin and anti-acetylated tubulin antibodies to visualize the basal body and ciliary axoneme respectively. We measured cilia length by analyzing at least eight randomly selected fields from each of *Ccdc28b mut* and *wt* MEFs. Our data showed that depletion of CCDC28B did not result in shortened cilia nor affected ciliation in these cells: the median cilia length of *wt* MEFs was 2.33 ± 0.70 μm compared to 2.31 ± 0.78 μm in *Ccdc28b mut* cells ($P = 0.6522$; Fig 2A and 2B).

*Ccdc28b mut* mice reproduce normally although when measuring weeks at first mating *Ccdc28b mut* females showed a delay (approximately 14 weeks) compared to C57BL/6J females (approximately 7 weeks). We then evaluated cilia in the kidney, a tissue where cilia are readily

observed. Kidneys from both *wt* control and *Ccdc28b mut* animals of 36 weeks of age were processed for immunofluorescence as described in the methods section. No major anatomical or histological differences were observed between *Ccdc28b mut* and *wt* animals and cilia were readily observed projecting into the lumen of tubules in both genotypes. We quantified the number of cilia per field (assessing areas of comparable cell density) and cilia length. Although we could not find statistically significant differences neither in cilia number or length, we did observe a trend towards a reduction in cilia density in *Ccdc28b mut* preparations, both in the kidney cortex and medulla, compared to *wt* mice (Fig 2C and 2D). We also analyzed cilia in the brain. We evaluated amygdala, hippocampus CA1, dentate gyrus (S3 Fig) and performed an in-depth quantification of both cilia density and length in the striatum (Fig 3A and 3B). Cilia density was comparable between *Ccdc28b mut* and *wt* controls (Fig 3B). Unexpectedly however, we observed a mild, albeit statistically significant, difference in cilia length whereby cilia in *Ccdc28b mut* animals were longer than *wt* controls: 10.16 ± 2.67 μm and 9.38 ± 2.40 μm respectively ($P = 0.0022$; Fig 3B). Depletion of BBS proteins has been shown to result in impaired cilia localization of different receptors (see for example [52]). We analyzed the localization of melanin-concentrating hormone receptor 1 (Mchr1) in the hippocampus CA1 region. Mchr1 was readily observed in cilia both in *wt* control and *Ccdc28b mut* animals (S4 Fig). Thus, our results show that depletion of CCDC28B does not result in a global cilia defect but can provoke cilia length changes at least in some tissues or cell types.

## Ccdc28b mut animals do not develop retinal degeneration or obesity

To continue the characterization of *Ccdc28b mut* mice we focused on assessing two phenotypes that have been shown to be highly penetrant in both BBS patients [1] and different BBS mouse models (for example see [46, 48, 53, 54]): retinal degeneration and obesity. In different models (*Bbs2*, *Bbs4* and *Bbs12*) retinal degeneration has been shown to be progressive, first evident as a thinning of the outer nuclear layer (photoreceptors) by as early as 6 weeks of age and characterized by complete loss of the outer segment in older animals (7 months old in *Bbs4* KO animals; [54]). In contrast, *Ccdc28b mut* retinas in both 12 weeks and 9 months old animals presented normal structure including the photoreceptor layer (Fig 3C; 9-month-old retinas are shown).

*Bbs2*, *Bbs4*, *Bbs6*, and *Bbs12* KOs, as well as a $Bbs1^{M390R/M390R}$ knock-in animals, develop obesity driven by hyperphagia [46–48,53–55]. To assess whether our *Ccdc28b mut* animals presented similar phenotypes we measured i) weight gain on normal diet, ii) weight gain on high fat diet (HFD), iii) food consumption and iv) systemic glucose handling (Fig 4). BBS mutant animals have been reported to be runted at birth and then rapidly start gaining weight at an increased rate. *Ccdc28b mut* animals presented a normal appearance at birth and gained weight at comparable rates to *wt* control animals when fed *ad libitum* on a normal diet. Mice were followed up to 21 weeks of age (Fig 4A). Next, we generated two groups of animals (n = 7 per genotype) for a HFD treatment. On average, *wt* controls and *Ccdc28b muts* were 15 and 17 weeks old respectively at the start of the experiment (week -2; Fig 4B), which likely explains a subtle (non-significant) initial weight difference (Fig 4B). Importantly, this difference remained constant along the duration of the HFD treatment (Fig 4B). In agreement with this, weight gain, analyzed as percentage of weight compared to the value at week -2 as 100%, was indistinguishable between the two genotypes (Fig 4C). Therefore, we did not observe significant weight differences between *Ccdc28b mut* and *wt* control animals either in normal diet or HFD (Fig 4A–4C). Accordingly, studying our mice in metabolic cages did not reveal any signs of increased food intake (Fig 4D and 4E). We also evaluated systemic glucose management by measuring glucose blood levels (basal glycemia) after 16 hours of starvation and performing

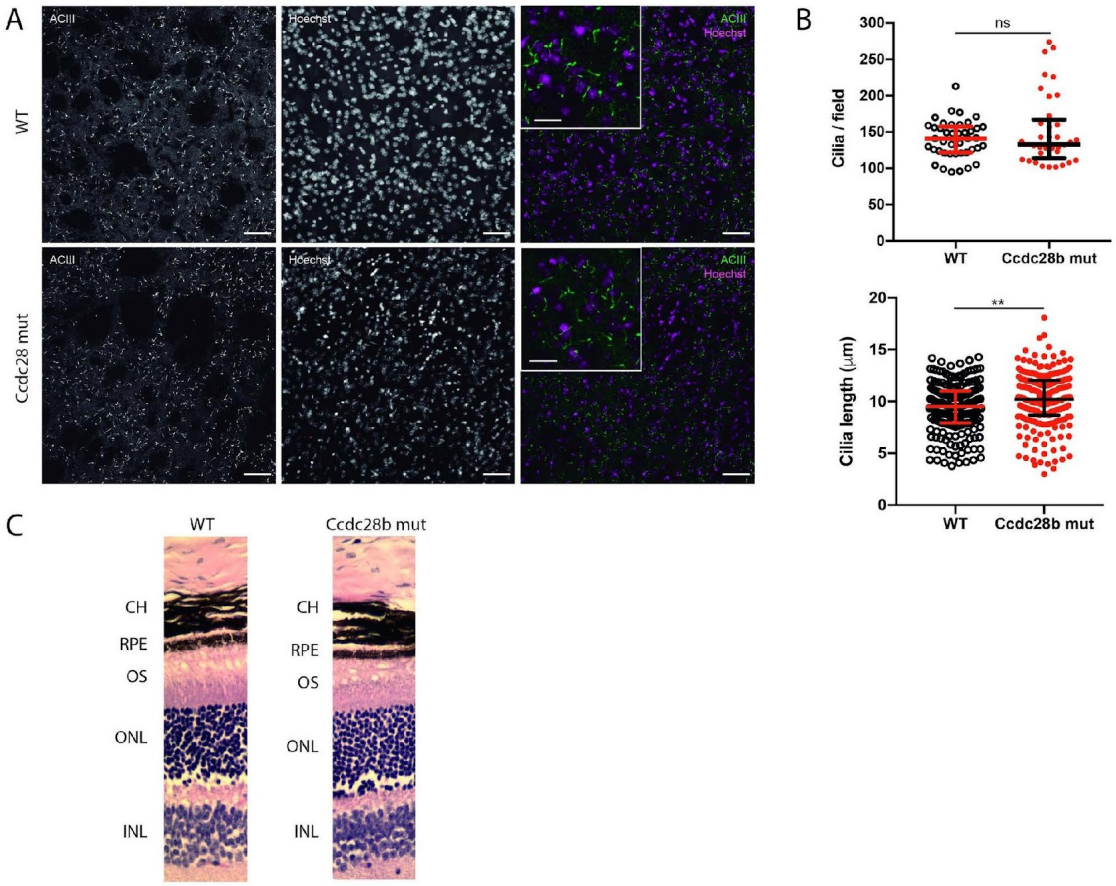


**Fig 3. Analysis of brain cilia and the retina in *Ccdc28b mut* animals. A)** Confocal images showing cilia in the brain striatum. DAPI (magenta) and anti-Type III adenylyl cyclase (ACIII, green) were used to visualize nuclei and ciliary axoneme respectively. Bars in main pictures and insets correspond to 50 and 20 microns respectively. Representative images are shown. **B)** Quantification of number of cilia per field (at least three pictures per animal, and three animals per genotype) and cilia length (one picture per animal, three animals per genotype) in striatum. One male and one female were used for initial assessment (not shown) and three females were then used for quantification. Results are represented as individual values plus median with interquartile range. ** = $P < 0.005$. **C)** Hematoxylin and eosin-stained retinal sections of *wt* control and *Ccdc28b mut* mice (adult females were used in the analysis). No structural differences were observed in the photoreceptor layer. INL = inner nuclear layer; ONL = outer nuclear layer; OS = Outer segment; RPE = retinal pigment epithelium; CH = choroid.

https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009896.g003

glucose tolerance tests (GTT) before starting the HFD and at two time points during the treatment (7 and 11 weeks in HFD respectively). *Ccdc28b mut* mice showed significantly elevated basal glucose levels after 7 weeks on HFD (Fig 4F). By 11 weeks of HFD the difference was lost but mainly due to an increase in the glucose basal levels in *wt* control animals (Figs 4F and S5). In the GTTs we did not observe statistically significant differences although *Ccdc28b mut* mice showed a trend towards an impaired GTT response, particularly after 11 weeks on HFD (Fig 4G–4I). Overall, our results show that *Ccdc28b mut* animals do not present hyperphagia or obesity but show a mild phenotype related to systemic glucose management.

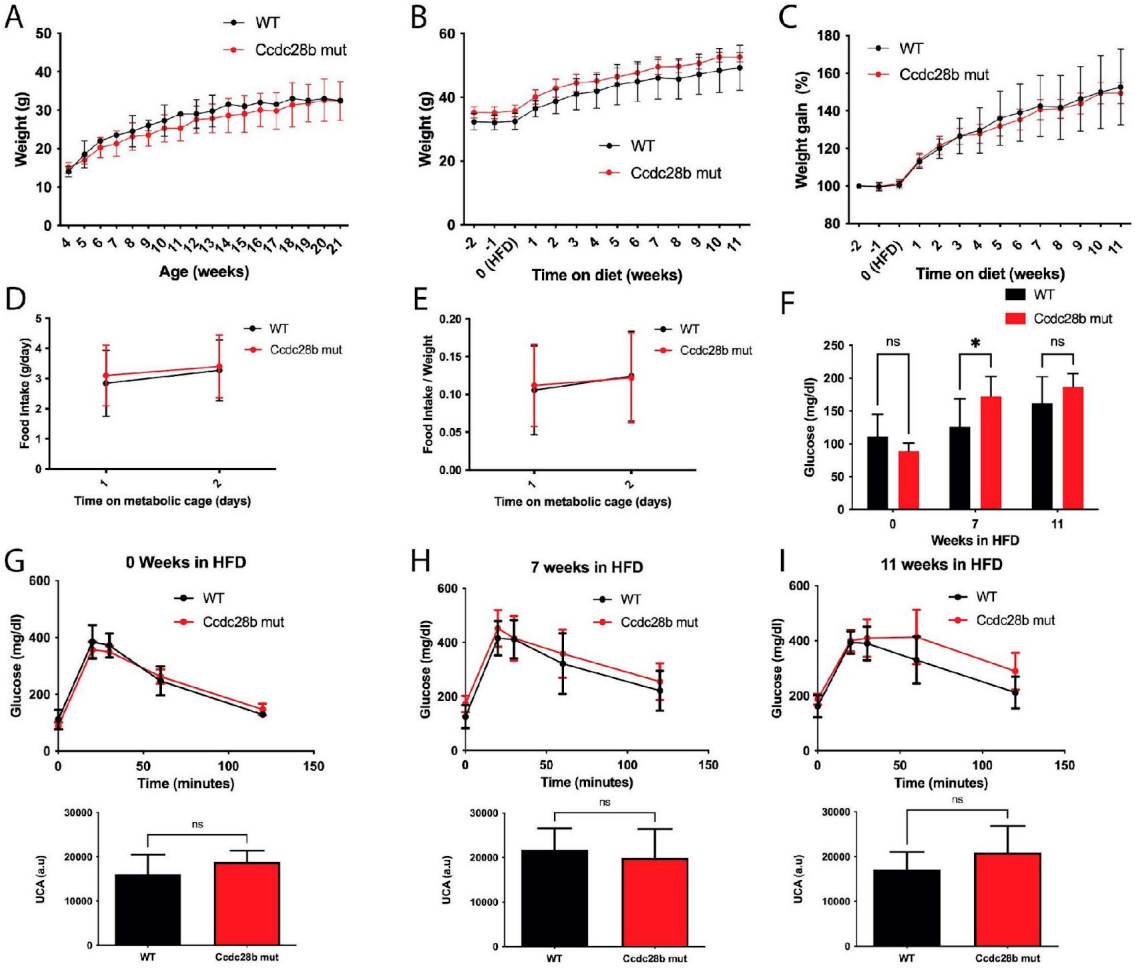


**Fig 4. Metabolic characterization of *Ccdc28b mut* mice. A)** Growth curve of *Ccdc28b mut* and *wt* control animals during a ND *ad libitum*. Both males and females were included in the analysis. **B)** Growth curve of *Ccdc28b mut* and *wt* controls during a HFD *ad libitum*. Both groups included seven males and at week -2 *wt* controls and *Ccdc28b muts* were on average 15 and 17 weeks old respectively. **C)** Weight gain curve of animals shown in B. Weight is normalized to the value at week -2. **D)** Food intake measured in metabolic cages. **E)** Food intake showed in D normalized to body weight. In all sections error bars correspond to mean and SD. **F)** Basal glycemia obtained from the corresponding GTT tests (panels G-I) measured at 8 weeks of age (normal diet), and after 7 and 11 weeks of HFD respectively. * = $P < 0.05$. **G-I)** GTT results for *Ccdc28b mut* and *wt* controls at 8 weeks of age (normal diet) (G), after 7 weeks of HFD (H) and after 11 weeks of HFD (I). Both glucose level curves and the quantification of the area under the curve are shown as mean ± SD of the analyzed animals.

https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009896.g004

## Ccdc28b mut animals present autism-like behavioral phenotypes

Behavioral phenotypes have been reported in BBS patients [1,56]. In agreement with these documented observations, social dominance defects and anxiety related responses have been well documented in different BBS mouse models using standardized tests such as open field, light-dark box test and social dominance tube test [46–49]. Compulsive obsessive behavior

and phenotypes similar to autistic spectrum disorder (ASD) have also been observed in BBS patients [1,56] but have been less studied in mouse models. Importantly, Kerr and colleagues assessed the behavioral phenotypes in a cohort of twenty-four confirmed BBS patients, demonstrating a high incidence of symptoms associated with autism [44]. In this context, we asked whether *Ccdc28b mut* mice displayed behaviors that could be relevant to BBS.

We started our analysis of *Ccdc28b mut* animals performing an open field test to assess exploratory activity and overall movement. We analyzed both female and male animals and did not find significant differences in total distance traveled between *Ccdc28b mut* and *wt* mice (Fig 5A). We also evaluated time freezing and time in the periphery versus center of the field where we did not find significant differences between genotypes on either females or males (Fig 5B–5C). Next, we evaluated anxiety directly by performing the elevated plus maze

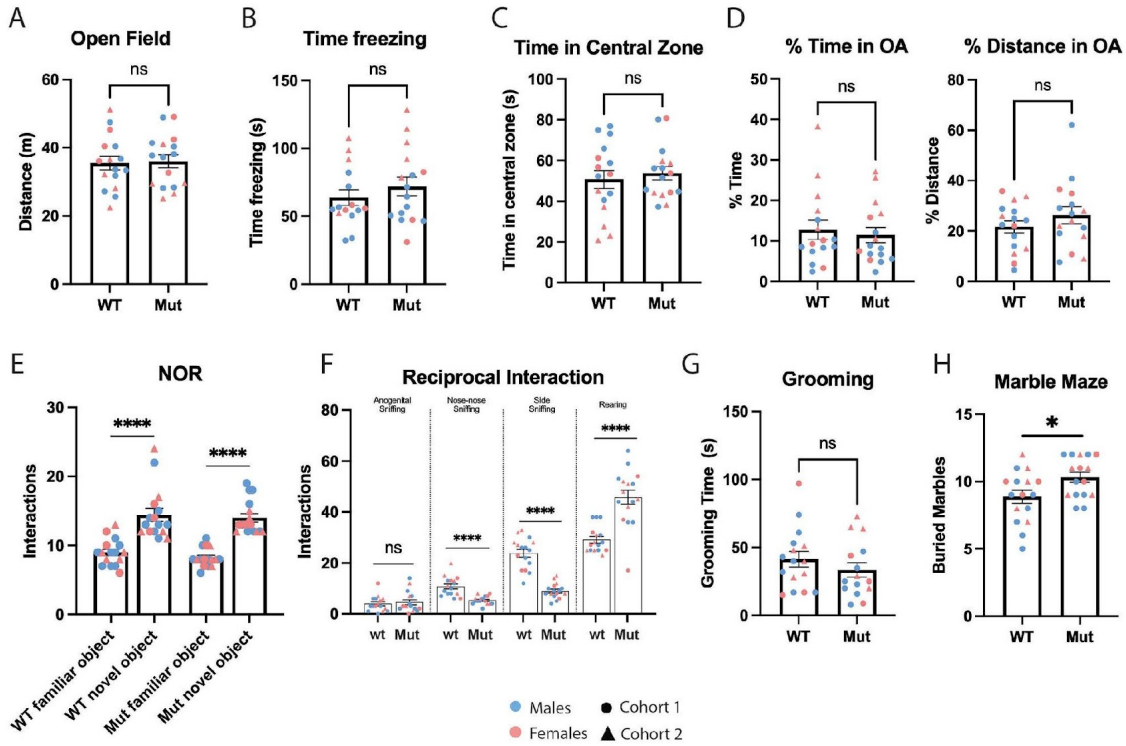


**Fig 5. Evaluation of behavioral and social phenotypes in *Ccdc28b mut* mice.** An open-field test was performed, and different parameters were scored: **(A)** total distance traveled, **(B)** time freezing and **(C)** time in the periphery *vs* center of the field. No differences were observed between *wt* and *Ccdc28b mut* mice. **D)** Results from elevated plus maze test showed no signs of anxiety as *wt* and *Ccdc28b mut* mice spent comparable amounts of time, and traveled comparable distances, in the open arms. **E)** The Novel Object Recognition test showed that there is no alteration in memory in *Ccdc28b mut* mice, as they presented an equally higher number of interactions with novel objects when compared to *wt* mice. **F)** Reciprocal Social Interaction Test resulted in significant differences in nose-nose, side sniffing, and rearing, consistent with an ASD-related phenotype, while no differences were found in anogenital sniffing. **G)** No differences were observed in grooming time between *Ccdc28b mut* and *wt* control animals. **H)** Marble burying test showing that *Ccdc28b mut* buried more marbles than *wt* animals, a behavior consistent with an obsessive-compulsive phenotype. In all graphs female and male mice are shown together: light blue indicates males and light red shows females. Triangles were used to indicate the five females analyzed in the second cohort (see Methods). All error bars correspond to mean and SEM. * = $P < 0.05$; **** = $P < 0.0001$.

https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009896.g005

test (EPM). *Ccdc28b mut* animals spent comparable amounts of time, and traveled comparable distances, in the open arms as *wt* control animals (Fig 5D). To directly test for alterations in hippocampal functions we performed a Novel Object Recognition (NOR) test. In this assay we evaluated memory by presenting individual animals with two objects for 10 min, and 24 hours later exchanging one known object for a novel one: the number of interactions of each mouse with each object (known *vs* novel) was quantified as described in methods. Both *Ccdc28b mut* and *wt* controls showed a significantly higher number of interactions with the novel object (Fig 5E).

Next, to study the impact of *Ccdc28b* in ASD behaviors often observed in mouse models of ASD [57], we performed a reciprocal social interaction test, a social dyadic test where the interrogated animal is presented with a previously unknown mouse to then quantify natural social behaviors. In this assay we evaluated anogenital, nose-nose and side sniffing, as well as grooming and rearing, measuring the number (frequency) of such behaviors in a period of 10 minutes. While *Ccdc28b mut* and *wt* controls did not differ in the frequency of anogenital sniffing or grooming, significant differences were readily observed for the other parameters: *Ccdc28b mut* animals presented a significant reduction in nose-nose and side sniffing and, in agreement with those results, also increased rearing (Fig 5F). Finally, we assessed stereotypical behaviors. Whereas *Ccdc28b mut* animals did not show differences in grooming when compared to *wt* controls (Fig 5G), *Ccdc28b mut* animals consistently buried more marbles than *wt* control animals in the marble burying test, a phenotype that was clearly observed both in males and females (Fig 5H). Altogether, our results show that while *Ccdc28b mut* mice neither present defects related to movement, grooming, nor signs of memory loss, they do show obsessive compulsive and mild social behavioral phenotypes.

## Discussion

*CCDC28B* was first identified as a second site modifier of BBS whereby a reduction in its levels, in conjunction with mutations in *bona fide* BBS genes, was shown to result in a more severe presentation of the syndrome in some families [37]. Also, we have shown previously that CCDC28B participates in the regulation of cilia in both cells and *in vivo* in zebrafish: depletion of *ccdc28b* resulted in cilia shortening and defective ciliogenesis in different zebrafish tissues and organs [40–42]. Consequently, knockdown of *ccdc28b* in the fish using primarily a morpholino approach resulted in several phenotypes that are characteristic of BBS and other ciliary mutants, such as a curved body axis, pigmentation defects, craniofacial malformations, and hydrocephaly ([40, 41] and references within). Therefore, while our previous results provided important functional information to understand CCDC28B biological role, they also led us to hypothesize that null mutations in *CCDC28B* could be sufficient to cause a ciliopathy such as BBS, or even the more severe Meckel-Gruber syndrome (MKS), two conditions with a high degree of genetic overlap [25, 40]. Importantly, the mutation described in patients, and shown to modify the presentation of the syndrome, is likely a hypomorphic mutation caused by a synonymous change affecting *CCDC28B* mRNA splicing thus resulting in reduced, but not abolished, CCDC28B levels [37].

We therefore decided to target *Ccdc28b* in the mouse and performed a characterization directing our attention to different phenotypes that have been reported previously for this gene (effect on cilia) and for BBS models. Overall, our data indicate that targeting *Ccdc28b* in the mouse is not sufficient to cause a strong ciliary defect and accordingly, does not cause phenotypes that are highly penetrant in different mouse BBS models, such as retinal degeneration or obesity. Thus, we did not obtain evidence to support a causal role for *CCDC28B* in BBS. We cannot rule out at this point the possibility of *Ccdc28b mut* animals presenting a predisposition

to develop BBS like phenotypes. Older animals (we assessed mice up to 9 month of age) will have to be evaluated to test this possibility.

Our results however are fully compatible with a second site modifier role for *CCDC28B*. *Ccdc28b mut* mice did not show signs of retinopathy and did not develop obesity at least up to nine months of age. Moreover, using metabolic cages we were able to show that *Ccdc28b muts* are not hyperphagic. Interestingly however, when animals were fed on HFD, *Ccdc28b mut* mice show both a trend towards presenting a worst performance than *wt* controls in the GTTs and presented significantly higher glucose basal levels after 7 weeks on HFD. Thus, our results suggest a mild phenotype related to glucose handling. Interestingly, the consequences of BBS gene mutations on systemic glucose management are still not entirely clear. For example, while *Bbs4* KO animals have been shown to present impaired glucose handling, mainly due to defective insulin secretion [58], *Bbs12* KO animals have been shown to present an improved glucose metabolism [53]. Likewise, reports are showing that some BBS patients could present a dissociation between obesity and the development of type II diabetes [53,59]. Thus, it will be interesting to study whether variants in genes such as *CCDC28B* could contribute to modulating the presentation of obesity in BBS. Crossing this new *Ccdc28b mut* mouse line with available BBS mutants will allow us to start tackling this issue.

This work also underscores differences with our previous data working on cells and zebrafish where we observed clear ciliary phenotypes. Besides differences in models (culture cells *vs* zebrafish *vs* mouse), one possibility is that our *Ccdc28b mut* animals are not complete knockouts. We believe this to be unlikely considering our qRT-PCR, sequencing, and western blot results. Also, the mutant *Ccdc28b* mRNA could encode an 88 amino acid polypeptide which would only include the first 56 amino acids of CCDC28B. We favor a second scenario which relies on genetic compensation, a mechanism that has been shown to be particularly important to understand differences between targeting genes at the mRNA level versus at the genomic level [60,61]. This phenomenon has been well documented in zebrafish and other model organisms where the same gene has been targeted, for example, using morpholinos to block mRNA splicing/translation, and through genome editing, highlighting the complexity and plasticity of the genome. Oftentimes the phenotype of morphants is significantly more severe than that of genomic mutants and different mechanisms have been shown to explain these differences. For example, CRISPR-Cas9 mutant lines have been shown to present altered mRNA splicing thus bypassing the mutated residue/exon [62]. As mentioned, we could not find any evidence for alternative splicing in our mice. Importantly however, the compensation can also occur by rescuing the cellular function rather than a particular gene. For example, *egfl7* (endothelial extracellular matrix gene) genomic mutants, but not morphants, upregulate genes that are functionally related to *egfl7* [61]. Similarly, while targeting *CEP290* (*NPHP6*), a ciliopathy gene linked to BBS, in zebrafish at the mRNA level resulted in severe cilia-related phenotypes, only a mild defect restricted to photoreceptors was observed in genomic mutants. Interestingly, the authors found that the mild presentation of the later was associated with the upregulation of several genes associated to ciliary function [63]. Importantly, it has been shown that upregulation of compensatory genes is triggered by mutations that introduce a PTC in a mechanism that relies on NMD [64,65]. Complete deletion of *Ccdc28b* will be required to determine if this is the case in our model. However, rather than a weakness of this *Ccdc28b mut* mouse model, its mild phenotype could be seen as an opportunity to perform transcriptomic/proteomic studies attempting to dissect this compensation mechanism. Such data will likely shed important insight to understand the biological role of CCDC28B and the cellular/molecular pathways involved in cilia regulation.

Finally, we observed behavioral defects in our *Ccdc28b mut* animals and further work will be required to fully dissect this phenotype. For example, neonatal social interactions can have

long lasting effects shaping the development of behavioral phenotypes (for some examples and a comprehensive review see [66–69]). In our experimental setup, *Ccdc28b mut* pups were raised by mutant mothers while *wt* controls were raised by *wt* mothers. Thus, the behavioral phenotype of *Ccdc28b mut* mice might be at least partially dependent on a maternal behavioral defect. Importantly, finding a maternal effect will not necessarily undermine the results presented here but rather expand them, given that the genotype will still likely contribute significantly to the phenotype in adult mice, and because it will indicate that *Ccdc28b mut* females present a social interaction maternal phenotype. Different breeding schemes as well as cross-fostering experiments [70] will be needed to complement the studies presented here and continue dissecting the role of *Ccdc28b* in behavior.

Anxiety, social dominance and associative learning defects, have been reported in different BBS mouse models [46–49]. For example, it was shown that BBS mice present problems in context fear conditioning due to impaired neurogenesis [49]. Our *Ccdc28b mut* animals did not show differences with *wt* controls in the open field, the EPM, or the NOR tests, thus ruling out significant locomotor, anxiety, and memory dysfunctions. *Ccdc28b mut* animals however did show social interaction defects as well as stereotypical phenotypes often observed in mouse ASD models. Interestingly, ASD-like behaviors have been described in BBS patients (see for example [43–45]). Moreover, although historically reported as a rare presentation, a comprehensive study of behavioral phenotypes in twenty-four BBS patients determined that autism related symptoms were present in 77% of cases [44]. Thus, it is tempting to speculate that decreased CCDC28B function could contribute to modulate the penetrance, the expressivity, or both, of ASD-like phenotypes in BBS patients, a possibility that will require further studies. In addition, one *de novo* mutation and several inherited missense variants in *CCDC28B* have been reported in the Simons Simplex autism cohort [71,72]. While it is difficult to dissect the individual contribution of CCDC28B towards autism features in these individuals, additional studies in larger cohorts, as well as functional evaluation of missense changes will be required to address the intriguing possibility of *CCDC28B* contributing to ASD behavioral features in humans.

Our *Ccdc28b mut* mouse model could provide an opportunity to study cellular/molecular aspects of ASD-like phenotypes. While our results in mice demonstrate a direct link between *Ccdc28b* and the development of behavioral phenotypes, whether these phenotypes are caused by a CCDC28B-dependent cilia defect and/or CCDC28B extra-ciliary functions is still not known. For example, it was shown recently that CCDC28B plays a role in immune synapse assembly by regulating T-cell antigen receptor, importantly, by affecting actin polymerization and endosomal trafficking, cellular processes that might prove relevant in the context of neuronal homeostasis [73]. In our analysis of the brain striatum, we observed that cilia were longer in mutants than controls. While this elongation was subtle, the difference was statistically significant. Two points regarding this cilia phenotype. First, all our previous data have clearly shown that CCDC28B plays a pro-ciliogenic role, whereby its depletion results in shortened cilia. Thus, one possibility is that the observation of longer cilia in striatum could be underscoring differences between cell types. It is tempting to speculate however that this slightly elongated cilia could be an indirect consequence of genetic compensation and the upregulation of pro-ciliogenic genes in the absence of CCDC28B. Further studies will be required to test this possibility and dissect whether depletion of CCDC28B may also affect the function of cilia directly. The second point relates to the potential physiological relevance of this finding. Wang and colleagues recently published a work using induced pluripotent stem cell-derived (iPSC) neurons obtained from both BBS patients and controls where they show that mutations in BBS genes affect neurite outgrowth and neuronal energy homeostasis. Interestingly, BBS mutant iPSC-derived neurons presented elongated cilia [74]. Observing elongated cilia in a

region of the brain that has been linked to the development of ASD conditions, like the striatum [75, 76], suggests the possibility of cilia playing an active role in the development of these conditions. Further work will be needed to determine whether this is the case. The mouse line presented here, together with other already available models, will likely contribute to further our still incomplete understanding of cilia in neuronal homeostasis, brain development, the establishment of neuronal circuitry and its impact on behavior [77–79], thus providing important insight to understand complex behavioral phenotypes.

## Methods

### Ethics statement

All experimental protocols were opportunely approved by the Institutional Animal Ethics Committee (protocol number 007–18), in accordance with national law 18.611 and international animal care guidelines (Guide for the Care and Use of Laboratory Animal; [80]) regarding laboratory animal's protocols.

### Animals

All animal procedures to generate the mutant line were performed at the SPF animal facility of the Laboratory Animal Biotechnology Unit of Institut Pasteur de Montevideo. Mice were housed on individually ventilated cages (Tecniplast, Milan, Italy) containing chip bedding (Toplit 6, SAFE, Augy, France), in a controlled environment at 20 ± 1˚C with a relative humidity of 40–60%, in a 14/10 h light-dark cycle. Autoclaved food (Labdiet 5K67, PMI Nutrition, IN, US) and autoclaved filtered water were administered *ad libitum*. A C57BL/6J mouse colony was bred and maintained in our institutional facility and was used to both obtain zygotes for genome editing and to generate *wt* control animals. Both *wt* controls and *Ccdc28b mut* animals were housed in the same conditions and in the same room of the facility, thus minimizing environmental differences.

Cytoplasmic microinjection was performed in C57BL/6J zygotes using a mix of 30 ng/μl Cas9 mRNA (Synthego, Menlo Park, CA, US), and 15 ng/μl of each sgRNA (2 guides were used) (Synthego), diluted in standard microinjection buffer. Viable embryos were transferred into the oviduct of B6D2F1 0.5 days post coitum (dpc) pseudo-pregnant females (25 embryos/female in average), following surgical procedures established in our animal facility [81]. For surgery, recipient females were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg, Pharmaservice, Ripoll Vet, Montevideo, Uruguay) and xylazine (10 mg/kg, Seton 2%; Calier, Montevideo, Uruguay). Tolfenamic acid was administered subcutaneously (1 mg/kg, Tolfedine, Vetoquinol, Madrid, Spain) to provide analgesia and anti-inflammatory effects [82]. Pregnancy diagnosis was determined by visual inspection by an experienced animal caretaker two weeks after embryo transfer, and litter size was recorded on day 7 after birth. Pups were tail-biopsied and genotyped 21 days after birth, and mutant animals were maintained as founders. *Ccdc28b mut* animals are fertile and thus the colony was maintained by crossing homozygous mutant animals.

### RNA Isolation and qRT-PCR

Tissues were homogenized in TRIzol (Invitrogen) for RNA extraction according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription was done using SuperScript II RT (Invitrogen) and qRT-PCR was performed using SYBR FAST Universal 2X qPCR Master Mix (Kapa) on a QuantStudio 3 RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific). All samples were run in triplicate and the CT value was normalized to calculate relative expression of each gene. The fold expression was calculated using the ΔΔCt method with *Gapdh* as a reference gene.

## Western blotting

Tissues were lysed using RIPA buffer (25mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma). Protein concentrations were determined using the BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) and 100μg of total protein were loaded into SDS-PAGE gels, transferred to PVDF membranes and probed with anti-CCDC28B (Invitrogen, 1/1000) overnight at 4˚C. HRP-conjugated secondary antibody was used.

## Cell culture and immunofluorescence

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were obtained from E13.5-E14.5 following standard procedures and maintained sub-confluent in DMEM Glutamax with 10% FBS, Hepes 10mM, penicillin 10000 U/mL and streptomycin 10000 μg/mL (Maintenance Medium, MM) under controlled conditions at 37˚ C with 5% $CO_2$. For immunofluorescence studies cells were cultured on glass coverslips and at 80% confluency, MM was replaced with medium containing 0.5% FBS for 24 h to stimulate ciliation. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS), permeabilized with 0.1% Triton-X100, blocked with 5.5% FBS and stained with anti-gamma and anti-acetylated tubulin primary antibodies (Sigma) followed by the corresponding secondary antibodies conjugated to AF488 or TMRM (Invitrogen). Nuclei were stained with DAPI (Invitrogen). Images were taken in a Zeiss LSM 880 confocal microscopy. Eight randomly selected confocal fields from cultured MEFs from at least two *Ccdc28b mut* and two *wt* embryos were analyzed. Cilia length was measured using the freehand ROI selection tool of the FIJI image processing package [83]. The proportion of ciliated cells was calculated by counting the number of cells showing γ-tubulin and anti-acetylated tubulin staining over the total number of nuclei.

## Brain, kidney and eye histological and immunofluorescence analysis

The perfusion of the mice was performed during the light (resting) phase of the sleep-wake cycle (between 12:00 and 16:00 h, lights on at 7:00). The animals were anaesthetized with ketamine/xylacine (90 and 14 mg/kg, respectively) and perfused with PBS followed by 4% PFA. Brains, kidneys and eyes were immediately dissected out and fixed by immersion in 4% PFA overnight (ON). Thereafter, the brains were cryoprotected in 30% sucrose solution in 0.1 M PBS for 48 h and frozen. Coronal sections (30 μm) were obtained by a cryostat (Leica CM 1900, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Sections containing, hippocampus, amygdala and striatum (based on The mouse brain atlas; Paxinos & Franklin 2000) were collected and stored in an anti-freeze solution at −20˚C until immunostaining procedures were performed. Kidneys and eyes were embedded in paraffin and cut into 6 micron slices. Eye sections were dewaxed, rehydrated and stained with Hematoxilin and Eosin following standard procedures.

Cilia were detected in brain and kidney sections by immunofluorescence. Renal cilia were stained as previously described [84], using boiling in 10 mM citrate buffer, pH6, for antigen retrieval and anti-acetylated tubulin (Sigma) 1/300 in PBS containing 0.5% of normal goat serum and 0.05% Tween20, for cilia detection. Goat anti-mouse Ig coupled to AF488 (Thermo) 1/1000 was used as secondary antibody and DAPI (Thermo) 1/5000 for nuclear staining. Cilia staining in brain sections was performed by detecting Type III adenylyl cyclase (AC-III). Briefly, free-floating sections were incubated with rabbit anti-AC-III primary antibodies 1/500 (Santa Cruz Biotechnologies) in PBS plus 0.3% Triton (PBS-T) and normal donkey serum (NDS) 1.5% for 48 h at 4˚C. Then, the sections were incubated with biotinylated donkey anti-rabbit (DAR) 1/600 (Jackson ImmunoResearch) in PBS-T and NDS 3% for 90 min. Afterward, they were incubated with streptavidin-Alexa fluor 555 conjugate 1/2000

(Molecular Probes) in PBS for 2 h. Finally, the sections were mounted in Superfrost Plus slides with Vectashield (Vector Labs) and Hoechst was included to visualize nuclei. Negative controls consisted of omission of the primary antibodies. We obtained three 20x microphotographs of each region of interest. The level of ciliation was quantified assessing number of cilia per field comparing fields of similar cell density. Mchr1 localization was studied by immunofluorescence using a similar protocol and using a rabbit anti-Mchr1 monoclonal antibody (ThermoFisher Scientific). Images were obtained in a confocal microscopy Zeiss LSM 880.

## *In vivo* metabolic studies

The animals used in this study were raised and maintained according to standard protocols that were approved by the ethical committee at the Institut Pasteur de Montevideo (protocol number 003–19). Mice were fed *ad libitum*, first with a normal control diet (ND, Labdiet 5K67, PMI Nutrition, IN, US) and then with a high-fat diet (HFD, Test Diet 5TJN). Body weight was recorded weekly. For the weight gain control in ND a group of 4 *wt* (2 males and 2 females), and 7 *Ccdc28b mut* (4 males and 3 females) mice were followed up from week 4 to week 21. For weight gain in HFD a group of 7 *wt* and 7 *Ccdc28b mut* (all male) from 15–17 weeks of age were used to start the experiment (week -2), then changed to HFD (week 0) and maintained in that diet for 11 weeks when all mice were euthanized. For glucose tolerance testing, mice were starved for 16 h before receiving a single intraperitoneal glucose injection (1,5 g/kg). Glycemia was measured from tail vein blood using a hand-held glucometer (Accu-Chek, Roche). For food intake measurements, mice were transferred to metabolic cages, and after 24 h of adaptation, food was weighed every 24 h for three consecutive days.

## Behavioral analyses

Behavioral assays were conducted in a total of 32 mice, all between 11 and 13 weeks old, divided as follows: 8 *wt* males, 8 *Ccdc28b mut* males, 8 *wt* females and 8 *Ccdc28b mut* females. Cohort 1 consisted of all 16 males and 3 females of each group, while cohort 2 consisted of 5 females of each group. All assays were recorded using Any-maze software, except the marble maze test, and for all assays where automatization was not possible, videos were scored by investigators blinded to genotype.

## Open field

Locomotor activity was assayed in an open field opaque white plexiglass chamber (39 x60x50 cm), where animals were left for 6 min sessions to explore freely and afterwards were returned to their home cages. Any-maze software was used to measure total distance, time freezing and time in central area.

## Marble maze

Marble maze test can be used to assess repetitive, compulsive-like behaviors [85]. Briefly, each individual mouse was placed in an arena (15x27x20 cm) for 30 min, with a 5 cm layer of clean bedding, where 12 opaque glass marbles were distributed evenly. To be scored as buried, marbles had to be at least 50% covered by bedding.

## Grooming

Grooming can be used as a repetitive behavior assay [86]. Cages were left without bedding to eliminate digging, which can be a competing behavior [87]. Mice were placed individually in standard mouse cages (15x27x13 cm). Sessions lasted 20 min, with the first 10 min being

unscored as a habituation period. During the second 10 min of the session, cumulative time spent grooming was scored manually by an investigator uninformed of genotype.

### Reciprocal interaction

The reciprocal interaction test was used to assess social behaviors and interactions towards an age- and sex matched partner. To this end, mice were placed in standard mouse cages (15x27x13 cm), and interactions were recorded for 10 min, which is the period during which most social interactions happen [87]. The test was recorded using any-maze software and scored manually. Parameters of social behaviors measured were anogenital sniffing, nose-nose sniffing, side sniffing, self-grooming, and rearing [88,89].

### Elevated plus maze

The Elevated Plus-Maze test is used as a model of anxiety [90,91]. The apparatus consists of four arms (29x7 cm), two of them with walls 16 cm high (closed arms), and the other two have no walls, the open arms, the center that connects them is 8x8 cm. This maze was placed 50 cm from the floor, and mice were placed in the middle, facing an open arm and left to explore freely for 5 min. Time and distance spent in open arms was scored using Any-maze software.

### Novel object recognition

This test is constructed to assess the mouse's ability to recognize a novel object in the environment, and is divided in three phases: habituation, familiarization, and test phase [92]. Briefly, on the first day, for the habituation period, animals were placed in an empty arena (25x25x35 cm) and left to explore for 5 min before returning to their home cages. 24 h later, the familiarization phase was performed, in which two identical objects were placed in the arena, and each mouse was allowed to explore for 10 min. Finally, on the third day, the test phase consisted of the mouse in the same arena for 10 min, where one of the objects was switched for a novel object, previously unseen to the animal. During the last two phases, objects were placed in opposite and symmetrical corners of the arena [92, 93]. Behavior was scored for the first 2 min of the test phase, or until the mouse had interacted with both objects a total of 20 times.

### Statistical analyses

All data were analyzed using GraphPad Prism 9. Unpaired t-test was used to compare the fold expression in the qRT-PCR analysis. For GTT analysis, the area under the curve was calculated in GraphPad Prism 9, and then compared between both groups using the unpaired t-test. Basal glucose between both groups at different times was compared with the 2-way ANOVA with multiple comparisons. The proportion of cilia positive cells was calculated by counting the number of cilia with clear acetylated-tubulin signal over the total number of nuclei and the comparison between the different samples was performed using a test of Hypothesis specific for comparison of two proportions (hypothesis test for proportions). For the analysis of cilia length, and number of cilia per field, we first tested the data sets for normal distribution, using the Shapiro-Wilk test. If normal distribution was proved, unpaired t-test was used for comparison, and if data did not have a normal distribution, comparisons were performed using the Mann-Whitney test. In all behavioral analysis (OF, MM, GR, RI and NOR) we first tested the datasets for normal distribution, using the Shapiro-Wilk test and identified outliers. After normal distribution was probed and outliers excluded, unpaired t-test was used to compare the two groups. In all cases, differences were considered significant when $P$ values were smaller than 0.05.

## Supporting information

**S1 Fig. Nanopore sequence alignments to the genomic *Ccdc28b* region.**
(PDF)

**S2 Fig. Full length western blot gels assessing the levels of CCDC28B in brain and muscle.**
(PDF)

**S3 Fig. Brain cilia analysis.** Confocal images showing A) amygdala (bar = 50 μm), B) hippocampal CA1 (bar = 50 μm), C) dentate gyrus (bar = 50 μm). DAPI (magenta) and anti-ACIII antibody (green) were used for nucleus and cilia visualization respectively.
(PDF)

**S4 Fig. MCHR1 localization in the pyramidal layer of CA1 region of the hippocampus.** Three animals per genotype and two photos per animal were analyzed. The number of cilia per field was quantified.
(PDF)

**S5 Fig. Comparison of basal glycemia at three timepoints during the HFD experiment for each genotype (*Ccdc28b mut* and *wt*).**
(PDF)

## Acknowledgments

We thank Gabriel Anessetti (Dpto. de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, UdelaR) for help with the immunofluorescence of renal tissues, Lucilla Pizzo, Santhosh Girirajan, and Corrine Smolen for help with searching published reports and available datasets on autism cohorts and for advice on the manuscript, Paola Contreras for her help with statistics, and Paola Lepanto for her help with image processing. The authors gratefully acknowledge the Advanced Bioimaging Unit at the Institut Pasteur Montevideo for their support and assistance in the present work.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Patricia Lagos, Natalia Lago, Carlos Escande, Florencia Irigoín, Jose L. Badano.

**Formal analysis:** Matías Fabregat, Magdalena Cárdenas-Rodríguez, Jose L. Badano.

**Funding acquisition:** Florencia Irigoín, Jose L. Badano.

**Investigation:** Matías Fabregat, Sofía Niño-Rivero, Sabrina Pose, Magdalena Cárdenas-Rodríguez, Mariana Bresque, Karina Hernández, Victoria Prieto-Echagüe, Geraldine Schlapp, Martina Crispo, Patricia Lagos, Natalia Lago, Florencia Irigoín.

**Methodology:** Matías Fabregat, Geraldine Schlapp, Martina Crispo.

**Resources:** Carlos Escande.

**Supervision:** Jose L. Badano.

**Visualization:** Jose L. Badano.

**Writing – original draft:** Matías Fabregat, Jose L. Badano.

**Writing – review & editing:** Patricia Lagos, Natalia Lago, Florencia Irigoín, Jose L. Badano.

## References

1. Forsythe E, Beales PL. Bardet-Biedl syndrome. Eur J Hum Genet. 2013; 21(1):8–13. https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.115 PMID: 22713813; PubMed Central PMCID: PMC3522196.
2. Heon E, Kim G, Qin S, Garrison JE, Tavares E, Vincent A, et al. Mutations in C8ORF37 cause Bardet Biedl syndrome (BBS21). Hum Mol Genet. 2016; 25(11):2283–94. https://doi.org/10.1093/hmg/ddw096 PMID: 27008867; PubMed Central PMCID: PMC5081059.
3. Zhou Z, Qiu H, Castro-Araya RF, Takei R, Nakayama K, Katoh Y. Impaired cooperation between IFT74/BBS22-IFT81 and IFT25-IFT27/BBS19 causes Bardet-Biedl syndrome. Hum Mol Genet. 2021. Epub 20211209. https://doi.org/10.1093/hmg/ddab354 PMID: 34888642.
4. Ansley SJ, Badano JL, Blacque OE, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, et al. Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. Nature. 2003; 425:628–33. https://doi.org/10.1038/nature02030 PMID: 14520415
5. Fan Y, Esmail MA, Ansley SJ, Blacque OE, Boroevich K, Ross AJ, et al. Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. Nat Genet. 2004; 36:989–93. https://doi.org/10.1038/ng1414 PMID: 15314642
6. Jin H, White SR, Shida T, Schulz S, Aguiar M, Gygi SP, et al. The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. Cell. 2010; 141:1208–19. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.015 PMID: 20603001
7. Kim JC, Badano JL, Sibold S, Esmail MA, Hill J, Hoskins BE, et al. The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. Nat Genet. 2004; 36:462–70. https://doi.org/10.1038/ng1352 PMID: 15107855
8. Kim JC, Ou YY, Badano JL, Esmail MA, Leitch CC, Fiedrich E, et al. MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis. J Cell Sci. 2005; 118:1007–20. https://doi.org/10.1242/jcs.01676 PMID: 15731008
9. Li JB, Gerdes JM, Haycraft CJ, Fan Y, Teslovich TM, May-Simera H, et al. Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. Cell. 2004; 117(4):541–52. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00450-7 PMID: 15137946.
10. Loktev AV, Zhang Q, Beck JS, Searby CC, Scheetz TE, Bazan JF, et al. A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation. Dev Cell. 2008; 15:854–65. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.11.001 PMID: 19081074
11. Marion V, Stoetzel C, Schlicht D, Messaddeq N, Koch M, Flori E, et al. Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 10:1820–5. https://doi.org/10.1073/pnas.0812518106 PMID: 19190184
12. May-Simera HL, Ross A, Rix S, Forge A, Beales PL, Jagger DJ. Patterns of expression of Bardet-Biedl syndrome proteins in the mammalian cochlea suggest noncentrosomal functions. J Comp Neurol. 2009; 514:174–88. https://doi.org/10.1002/cne.22001 PMID: 19396898
13. Nachury MV, Loktev AV, Zhang Q, Westlake CJ, Peranen J, Merdes A, et al. A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. Cell. 2007; 129(6):1201–13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.053 PMID: 17574030.
14. Prieto-Echague V, Lodh S, Colman L, Bobba N, Santos L, Katsanis N, et al. BBS4 regulates the expression and secretion of FSTL1, a protein that participates in ciliogenesis and the differentiation of 3T3-L1.. Sci Rep. 2017; 7. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10330-0 PMID: 28852127
15. Cardenas-Rodriguez M, Badano JL. Ciliary Biology: Understanding the Cellular and Genetic Basis of Human Ciliopathies. Am J Med Genet Part C Semin Med Genet. 2009; 151C:263–80. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30227 PMID: 19876935
16. Veland IR, Awan A, Pedersen LB, Yoder BK, Christensen ST. Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. Nephron Physiol. 2009; 111:39–53. https://doi.org/10.1159/000208212 PMID: 19276629
17. Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N. The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2006; 22:125–48. https://doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115610 PMID: 16722803
18. Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N. Ciliopathies. N Engl J Med. 2011; 364(16):1533–43. https://doi.org/10.1056/NEJMra1010172 PMID: 21506742; PubMed Central PMCID: PMC3640822.
19. Badano JL, Kim JC, Hoskins BE, Lewis RA, Ansley SJ, Cutler DJ, et al. Heterozygous mutations in *BBS1*, *BBS2* and *BBS6* have a potential epistatic effect on Bardet-Biedl patients with two mutations at a second BBS locus. Hum Mol Genet. 2003; 12:1651–9. https://doi.org/10.1093/hmg/ddg188 PMID: 12837689

20. Beales PL, Badano JL, Ross AJ, Ansley SJ, Hoskins BE, Kirsten B, et al. Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. Am J Hum Genet. 2003; 72:1187–99. https://doi.org/10.1086/375178 PMID: 12677556

21. Bin J, Madhavan J, Ferrini W, Mok CA, Billingsley G, Heon E. BBS7 and TTC8 (BBS8) mutations play a minor role in the mutational load of Bardet-Biedl syndrome in a multiethnic population. Hum Mutat. 2009; 30(7):E737–46. https://doi.org/10.1002/humu.21040 PMID: 19402160.

22. Katsanis N. The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. Hum Mol Genet. 2004; 13(Review issue 1):R65–R71. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh092 PMID: 14976158

23. Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, et al. Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a mendelian recessive disorder. Science. 2001; 293:2256–9. https://doi.org/10.1126/science.1063525 PMID: 11567139

24. Katsanis N, Eichers ER, Ansley SJ, Lewis RA, Kayserili H, Hoskins BE, et al. BBS4 is a minor contributor to Bardet-Biedl syndrome and may also participate in triallelic inheritance. Am J Hum Genet. 2002; 71:22–9. https://doi.org/10.1086/341031 PMID: 12016587

25. Leitch CC, Zaghloul NA, Davis EE, Stoetzel C, Diaz-Font A, Rix S, et al. Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. Nat Genet. 2008; 40:443–8. https://doi.org/10.1038/ng.97 PMID: 18327255

26. Lindstrand A, Frangakis S, Carvalho CM, Richardson EB, McFadden KA, Willer JR, et al. Copy-Number Variation Contributes to the Mutational Load of Bardet-Biedl Syndrome. Am J Hum Genet. 2016; 99 (2):318–36. Epub 2016/08/04. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.04.023 PMID: 27486776; PubMed Central PMCID: PMC4974085.

27. Manara E, Paolacci S, D'Esposito F, Abeshi A, Ziccardi L, Falsini B, et al. Mutation profile of BBS genes in patients with Bardet-Biedl syndrome: an Italian study. Ital J Pediatr. 2019; 45(1):72. Epub 2019/06/15. https://doi.org/10.1186/s13052-019-0659-1 PMID: 31196119; PubMed Central PMCID: PMC6567512.

28. Stoetzel C, Laurier V, Davis EE, Muller J, Rix S, Badano JL, et al. BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. Nat Genet. 2006; 38:521–4. https://doi.org/10.1038/ng1771 PMID: 16582908

29. Badano JL, Katsanis N. Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. Nat Rev Genet. 2002; 3:779–89. https://doi.org/10.1038/nrg910 PMID: 12360236

30. Chou HT, Apelt L, Farrell DP, White SR, Woodsmith J, Svetlov V, et al. The Molecular Architecture of Native BBSome Obtained by an Integrated Structural Approach. Structure. 2019. Epub 2019/07/16. https://doi.org/10.1016/j.str.2019.06.006 PMID: 31303482.

31. Liew GM, Ye F, Nager AR, Murphy JP, Lee JS, Aguiar M, et al. The intraflagellar transport protein IFT27 promotes BBSome exit from cilia through the GTPase ARL6/BBS3. Dev Cell. 2014; 31(3):265–78. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.09.004 PMID: 25443296; PubMed Central PMCID: PMC4255629.

32. Liu P, Lechtreck KF. The Bardet-Biedl syndrome protein complex is an adapter expanding the cargo range of intraflagellar transport trains for ciliary export. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018; 115(5):E934–E43. Epub 2018/01/18. https://doi.org/10.1073/pnas.1713226115 PMID: 29339469; PubMed Central PMCID: PMC5798339.

33. Veleri S, Bishop K, Dalle Nogare DE, English MA, Foskett TJ, Chitnis A, et al. Knockdown of Bardet-Biedl syndrome gene BBS9/PTHB1 leads to cilia defects. PLoS One. 2012; 7:e34389. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034389 PMID: 22479622

34. Seo S, Baye LM, Schulz NP, Beck JS, Zhang Q, Slusarski DC, et al. BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107:1488–93. https://doi.org/10.1073/pnas.0910268107 PMID: 20080638

35. Seo S, Zhang Q, Bugge K, Breslow DK, Searby CC, Nachury MV, et al. A novel protein LZTFL1 regulates ciliary trafficking of the BBSome and Smoothened. PLoS genetics. 2011; 7(11):e1002358. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002358 PMID: 22072986; PubMed Central PMCID: PMC3207910.

36. Zaghloul NA, Katsanis N. Functional modules, mutational load and human genetic disease. Trends Genet. 2010; 26(4):168–76. https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.01.006 PMID: 20226561; PubMed Central PMCID: PMC3740181.

37. Badano JL, Leitch CC, Ansley SJ, May-Simera H, Lawson S, Lewis RA, et al. Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. Nature. 2006; 439:326–30. https://doi.org/10.1038/nature04370 PMID: 16327777

38. Abu-Safieh L, Al-Anazi S, Al-Abdi L, Hashem M, Alkuraya H, Alamr M, et al. In search of triallelism in Bardet-Biedl syndrome. Eur J Hum Genet. 2012; 20:420–7. https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.205 PMID: 22353939

39. Redin C, Le Gras S, Mhamdi O, Geoffroy V, Stoetzel C, Vincent MC, et al. Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alstrom syndromes. J Med Genet. 2012; 49(8):502–12. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100875 PMID: 22773737; PubMed Central PMCID: PMC3436454.

40. Cardenas-Rodriguez M, Osborn DP, Irigoin F, Grana M, Romero H, Beales PL, et al. Characterization of CCDC28B reveals its role in ciliogenesis and provides insight to understand its modifier effect on Bardet-Biedl syndrome. Hum Genet. 2013; 132(1):91–105. https://doi.org/10.1007/s00439-012-1228-5 PMID: 23015189.

41. Novas R, Cardenas-Rodriguez M, Lepanto P, Fabregat M, Rodao M, Fariello MI, et al. Kinesin 1 regulates cilia length through an interaction with the Bardet-Biedl syndrome related protein CCDC28B. Sci Rep. 2018; 8(1):3019. Epub 2018/02/16. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21329-6 PMID: 29445114; PubMed Central PMCID: PMC5813027.

42. Cardenas-Rodriguez M, Irigoin F, Osborn DP, Gascue C, Katsanis N, Beales PL, et al. The Bardet-Biedl syndrome-related protein CCDC28B modulates mTORC2 function and interacts with SIN1 to control cilia length independently of the mTOR complex. Hum Mol Genet. 2013; 22(20):4031–42. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt253 PMID: 23727834; PubMed Central PMCID: PMC3781634.

43. Chatterjee SS, Guha P, Talukdar A, Dasgupta G. Autism: a rare presentation of Bardet-Biedl syndrome. BMJ Case Rep. 2014; 2014. Epub 2014/06/06. https://doi.org/10.1136/bcr-2014-203882 PMID: 24899006; PubMed Central PMCID: PMC4054480.

44. Kerr EN, Bhan A, Heon E. Exploration of the cognitive, adaptive and behavioral functioning of patients affected with Bardet-Biedl syndrome. Clin Genet. 2016; 89(4):426–33. Epub 2015/05/20. https://doi.org/10.1111/cge.12614 PMID: 25988237.

45. Aleman TS, O'Neil EC, O'Connor K, Jiang YY, Aleman IA, Bennett J, et al. Bardet-Biedl syndrome-7 (BBS7) shows treatment potential and a cone-rod dystrophy phenotype that recapitulates the non-human primate model. Ophthalmic Genet. 2021; 42(3):252–65. Epub 2021/03/18. https://doi.org/10.1080/13816810.2021.1888132 PMID: 33729075.

46. Eichers ER, Abd-El-Barr MM, Paylor R, Lewis RA, Bi W, Lin X, et al. Phenotypic characterization of Bbs4 null mice reveals age-dependent penetrance and variable expressivity. Hum Genet. 2006; 120(2):211–26. https://doi.org/10.1007/s00439-006-0197-y PMID: 16794820.

47. Fath MA, Mullins RF, Searby C, Nishimura DY, Wei J, Rahmouni K, et al. Mkks-null mice have a phenotype resembling Bardet-Biedl syndrome. Hum Mol Genet. 2005; 14:1109–18. https://doi.org/10.1093/hmg/ddi123 PMID: 15772095

48. Nishimura DY, Fath M, Mullins RF, Searby C, Andrews M, Davis R, et al. Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101:16588–93. https://doi.org/10.1073/pnas.0405496101 PMID: 15539463

49. Pak TK, Carter CS, Zhang Q, Huang SC, Searby C, Hsu Y, et al. A mouse model of Bardet-Biedl Syndrome has impaired fear memory, which is rescued by lithium treatment. PLoS genetics. 2021; 17(4):e1009484. Epub 2021/04/23. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009484 PMID: 33886537; PubMed Central PMCID: PMC8061871.

50. Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, et al. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. Nature. 2014; 515(7527):355–64. Epub 2014/11/21. https://doi.org/10.1038/nature13992 PMID: 25409824; PubMed Central PMCID: PMC4266106.

51. Zetoune AB, Fontaniere S, Magnin D, Anczukow O, Buisson M, Zhang CX, et al. Comparison of nonsense-mediated mRNA decay efficiency in various murine tissues. BMC Genet. 2008; 9:83. Epub 20081205. https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-83 PMID: 19061508; PubMed Central PMCID: PMC2607305.

52. Berbari NF, Lewis JS, Bishop GA, Askwith CC, Mykytyn K. Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105:4242–6. https://doi.org/10.1073/pnas.0711027105 PMID: 18334641

53. Marion V, Mockel A, De Melo C, Obringer C, Claussmann A, Simon A, et al. BBS-induced ciliary defect enhances adipogenesis, causing paradoxical higher-insulin sensitivity, glucose usage, and decreased inflammatory response. Cell metabolism. 2012; 16(3):363–77. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.005 PMID: 22958920.

54. Mykytyn K, Mullins RF, Andrews M, Chiang AP, Swiderski RE, Yang B, et al. Bardet-Biedl syndrome type 4 (BBS4)-null mice implicate Bbs4 in flagella formation but not global cilia assembly. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(23):8664–9. Epub 2004/06/03. https://doi.org/10.1073/pnas.0402354101 PMID: 15173597; PubMed Central PMCID: PMC423252.

55. Davis RE, Swiderski RE, Rahmouni K, Nishimura DY, Mullins RF, Agassandian K, et al. A knockin mouse model of the Bardet-Biedl syndrome 1 M390R mutation has cilia defects, ventriculomegaly,

retinopathy, and obesity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(49):19422–7. https://doi.org/10.1073/pnas.0708571104 PMID: 18032602; PubMed Central PMCID: PMC2148305.

56. Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, Parker D, Flinter FA. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. J Med Genet. 1999; 36:437–46. PMID: 10874630

57. Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. Nat Rev Neurosci. 2010; 11(7):490–502. https://doi.org/10.1038/nrn2851 PMID: 20559336; PubMed Central PMCID: PMC3087436.

58. Gerdes JM, Christou-Savina S, Xiong Y, Moede T, Moruzzi N, Karlsson-Edlund P, et al. Ciliary dysfunction impairs beta-cell insulin secretion and promotes development of type 2 diabetes in rodents. Nature communications. 2014; 5:5308. https://doi.org/10.1038/ncomms6308 PMID: 25374274.

59. Feuillan PP, Ng D, Han JC, Sapp JC, Wetsch K, Spaulding E, et al. Patients with Bardet-Biedl syndrome have hyperleptinemia suggestive of leptin resistance. J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96(3):E528–35. https://doi.org/10.1210/jc.2010-2290 PMID: 21209035; PubMed Central PMCID: PMC3047221.

60. El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. PLoS genetics. 2017; 13(7):e1006780. Epub 2017/07/14. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006780 PMID: 28704371; PubMed Central PMCID: PMC5509088.

61. Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Holper S, Kruger M, et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. Nature. 2015; 524(7564):230–3. Epub 2015/07/15. https://doi.org/10.1038/nature14580 PMID: 26168398.

62. Anderson JL, Mulligan TS, Shen MC, Wang H, Scahill CM, Tan FJ, et al. mRNA processing in mutant zebrafish lines generated by chemical and CRISPR-mediated mutagenesis produces unexpected transcripts that escape nonsense-mediated decay. PLoS genetics. 2017; 13(11):e1007105. Epub 2017/11/22. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007105 PMID: 29161261; PubMed Central PMCID: PMC5716581.

63. Cardenas-Rodriguez M, Austin-Tse C, Bergboer JGM, Molinari E, Sugano Y, Bachmann-Gagescu R, et al. Genetic compensation for cilia defects in cep290 mutants by upregulation of cilia-associated small GTPases. J Cell Sci. 2021; 134(14). Epub 2021/06/23. https://doi.org/10.1242/jcs.258568 PMID: 34155518; PubMed Central PMCID: PMC8325957.

64. El-Brolosy MA, Kontarakis Z, Rossi A, Kuenne C, Gunther S, Fukuda N, et al. Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. Nature. 2019; 568(7751):193–7. Epub 2019/04/05. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1064-z PMID: 30944477; PubMed Central PMCID: PMC6707827.

65. Ma Z, Zhu P, Shi H, Guo L, Zhang Q, Chen Y, et al. PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components. Nature. 2019; 568(7751):259–63. Epub 2019/04/05. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1057-y PMID: 30944473.

66. Curley JP, Champagne FA. Influence of maternal care on the developing brain: Mechanisms, temporal dynamics and sensitive periods. Front Neuroendocrinol. 2016; 40:52–66. Epub 20151123. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.11.001 PMID: 26616341; PubMed Central PMCID: PMC4783284.

67. Pedersen CA, Vadlamudi S, Boccia ML, Moy SS. Variations in Maternal Behavior in C57BL/6J Mice: Behavioral Comparisons between Adult Offspring of High and Low Pup-Licking Mothers. Front Psychiatry. 2011; 2:42. Epub 20110711. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2011.00042 PMID: 21808624; PubMed Central PMCID: PMC3135877.

68. Takahashi T, Okabe S, Broin PO, Nishi A, Ye K, Beckert MV, et al. Structure and function of neonatal social communication in a genetic mouse model of autism. Mol Psychiatry. 2016; 21(9):1208–14. Epub 20151215. https://doi.org/10.1038/mp.2015.190 PMID: 26666205; PubMed Central PMCID: PMC4909589.

69. Uriarte N, Breigeiron MK, Benetti F, Rosa XF, Lucion AB. Effects of maternal care on the development, emotionality, and reproductive functions in male and female rats. Dev Psychobiol. 2007; 49(5):451–62. https://doi.org/10.1002/dev.20241 PMID: 17577226.

70. McCarty R. Cross-fostering: Elucidating the effects of genexenvironment interactions on phenotypic development. Neurosci Biobehav Rev. 2017; 73:219–54. Epub 20161226. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.025 PMID: 28034661.

71. Fischbach GD, Lord C. The Simons Simplex Collection: a resource for identification of autism genetic risk factors. Neuron. 2010; 68(2):192–5. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.006 PMID: 20955926.

72. Krumm N, Turner TN, Baker C, Vives L, Mohajeri K, Witherspoon K, et al. Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. Nat Genet. 2015; 47(6):582–8. Epub 20150511. https://doi.org/10.1038/ng.3303 PMID: 25961944; PubMed Central PMCID: PMC4449286.

73. Capitani N, Onnis A, Finetti F, Cassioli C, Plebani A, Brunetti J, et al. A CVID-associated variant in the ciliogenesis protein CCDC28B disrupts immune synapse assembly. Cell Death Differ. 2022; 29(1):65–81. Epub 20210722. https://doi.org/10.1038/s41418-021-00837-5 PMID: 34294890.

74. Wang L, Liu Y, Stratigopoulos G, Panigrahi S, Sui L, Zhang Y, et al. Bardet-Biedl syndrome proteins regulate intracellular signaling and neuronal function in patient-specific iPSC-derived neurons. The Journal of clinical investigation. 2021; 131(8). Epub 2021/02/26. https://doi.org/10.1172/JCI146287 PMID: 33630762; PubMed Central PMCID: PMC8262481.

75. Amaral DG, Schumann CM, Nordahl CW. Neuroanatomy of autism. Trends Neurosci. 2008; 31(3):137–45. Epub 2008/02/09. https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.12.005 PMID: 18258309.

76. Rothwell PE, Fuccillo MV, Maxeiner S, Hayton SJ, Gokce O, Lim BK, et al. Autism-associated neuroligin-3 mutations commonly impair striatal circuits to boost repetitive behaviors. Cell. 2014; 158(1):198–212. Epub 2014/07/06. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.045 PMID: 24995986; PubMed Central PMCID: PMC4120877.

77. Guo J, Otis JM, Higginbotham H, Monckton C, Cheng J, Asokan A, et al. Primary Cilia Signaling Shapes the Development of Interneuronal Connectivity. Dev Cell. 2017; 42(3):286–300 e4. Epub 2017/08/09. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.010 PMID: 28787594; PubMed Central PMCID: PMC5571900.

78. Lepanto P, Badano JL, Zolessi FR. Neuron's little helper: The role of the primary cilium in neurogenesis. Neurogenesis. 2016; 3(1):e1253363. https://doi.org/10.1080/23262133.2016.1253363 PMID: 28090545

79. Park SM, Jang HJ, Lee JH. Roles of Primary Cilia in the Developing Brain. Front Cell Neurosci. 2019; 13:218. Epub 2019/05/30. https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00218 PMID: 31139054; PubMed Central PMCID: PMC6527876.

80. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. PMID: 21595115.

81. Meikle MN, Schlapp G, Menchaca A, Crispo M. Minimum volume Spatula MVD vitrification method improves embryo survival compared to traditional slow freezing, both for in vivo and in vitro produced mice embryos. Cryobiology. 2018; 84:77–81. Epub 2018/07/25. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.07.005 PMID: 30040919.

82. Schlapp G, Goyeneche L, Fernandez G, Menchaca A, Crispo M. Administration of the nonsteroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid at embryo transfer improves maintenance of pregnancy and embryo survival in recipient mice. J Assist Reprod Genet. 2015; 32(2):271–5. Epub 2015/01/07. https://doi.org/10.1007/s10815-014-0378-x PMID: 25561155; PubMed Central PMCID: PMC4354194.

83. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods. 2012; 9(7):676–82. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019 PMID: 22743772; PubMed Central PMCID: PMC3855844.

84. Deane JA, Verghese E, Martelotto LG, Cain JE, Galtseva A, Rosenblum ND, et al. Visualizing renal primary cilia. Nephrology (Carlton). 2013; 18(3):161–8. Epub 2012/12/18. https://doi.org/10.1111/nep.12022 PMID: 23240784.

85. Angoa-Perez M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. J Vis Exp. 2013;(82):50978. Epub 2014/01/17. https://doi.org/10.3791/50978 PMID: 24429507; PubMed Central PMCID: PMC4108161.

86. Arakawa H. Implication of the social function of excessive self-grooming behavior in BTBR T(+)ltpr3(tf)/J mice as an idiopathic model of autism. Physiol Behav. 2021; 237:113432. Epub 2021/04/27. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113432 PMID: 33901528.

87. Dhamne SC, Silverman JL, Super CE, Lammers SHT, Hameed MQ, Modi ME, et al. Replicable in vivo physiological and behavioral phenotypes of the Shank3B null mutant mouse model of autism. Mol Autism. 2017; 8:26. Epub 2017/06/24. https://doi.org/10.1186/s13229-017-0142-z PMID: 28638591; PubMed Central PMCID: PMC5472997.

88. Chang YC, Cole TB, Costa LG. Behavioral Phenotyping for Autism Spectrum Disorders in Mice. Curr Protoc Toxicol. 2017; 72:11 22 1–11 22 1. Epub 2017/05/04. https://doi.org/10.1002/cptx.19 PMID: 28463420; PubMed Central PMCID: PMC5494990.

89. Crawley JN. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. Brain Pathol. 2007; 17(4):448–59. Epub 2007/10/09. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00096.x PMID: 17919130.

90. Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. Neurosci Biobehav Rev. 1997; 21(6):801–10. Epub 1998/01/07. https://doi.org/10.1016/s0149-7634(96)00058-9 PMID: 9415905.

91. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nat Protoc. 2007; 2(2):322–8. Epub 2007/04/05. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44 PMID: 17406592; PubMed Central PMCID: PMC3623971.

92. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cogn Process. 2012; 13(2):93–110. Epub 2011/12/14. https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z PMID: 22160349; PubMed Central PMCID: PMC3332351.

93. Lueptow LM. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. J Vis Exp. 2017;(126). Epub 2017/09/12. https://doi.org/10.3791/55718 PMID: 28892027; PubMed Central PMCID: PMC5614391.

***Sobre la generación del modelo murino mutante en Ccdc28b***

Un dato importante para mencionar sobre el diseño del modelo, y que no aparece en la publicación, es que previo a la utilización de los ARNg que terminaron funcionando para generar la mutación, se diseñaron una primera tanda de ARNg dirigidos al exón 2 (primer exón codificante), no al exón 3 como finalmente se hizo, y que fueron encargados a la compañía IDT. Estos guías fueron probados en células de ratón (NIH/3T3) que expresan Cas9 en forma constitutiva y se analizó por PCR la región del genoma a editar sin obtener resultados positivos. De todas formas, se micro-inyectaron embriones con los guías y luego de genotipar 33 animales nacidos de dichas inyecciones, no se identificó ninguna mutación en el gen *Ccdc28b*.

Luego de obtener estos resultados negativos, diseñamos una nueva serie de ARNg, esta vez dirigidos al exón 3 y encargados a Synthego. Estos son los guías que finalmente funcionaron y que se detallan en la publicación. En la Figura 36 se observan los resultados de las pruebas realizadas en células en cultivo utilizando estos guías, que se realizaron de la misma manera que con la primera tanda de guías: luego de 72 horas post-transfección se aisló el ADN genómico, se amplificó por PCR el exón 3 y se corrió en un gel de poliacrilamida luego de realizar rondas de desnaturalización e hibridación. A diferencia de las células control que mostraron la amplificación de una única banda del tamaño esperado, las células tratadas con los guías mostraron un conjunto de bandas, sugiriendo la presencia de modificaciones en el exón 3 (Figura 36). Luego de obtenidos estos resultados, en colaboración con la UBAL, se procedió a inyectar embriones con los guías tal cual se describe en la publicación. Vale destacar que luego de obtenidas las primeras camadas de ratones microinyectados, los cuales podían tener mutaciones diferentes, realizamos también un análisis de heteroduplex en gel de poliacrilamida (Figura 36B).

Posteriormente, se secuenciaron los animales que presentaban un patrón de bandas más complejo en el heteroduplex y analizando dichas secuencias se eligió una mutación que generara

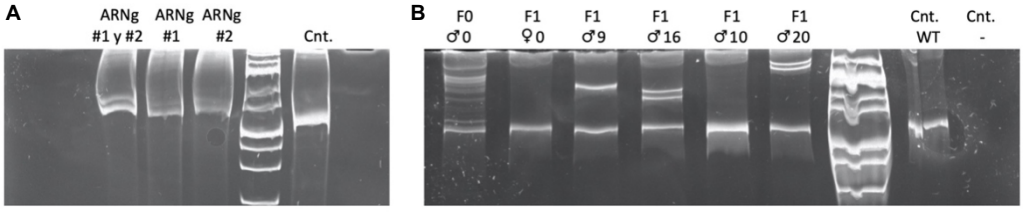


***Figura 36. Análisis de formación de heterodúplex por PAGE en Ccdc28b.***
*Amplicones correspondientes al marco abierto de lectura de Ccdc28b se sometieron a una rápida desnaturalización y luego se dejaron a TA para que rehibridaran formando, de haber mutaciónes, heteroduplex.* ***A)*** *Resultados obtenidos en células NIH/3T3 que expresan la nucleasa Cas9 luego de la transfección con los dos ARNg en simultaneo (ARNg #1 y #2) o con cada uno de ellos por separado.****B)*** *Resultados del genotipado de algunos animales de las dos primeras camadas, F0 y F1, respectivamente, luego de la microinyección con los dos ARNg en simultaneo.*

codones de terminación prematuros. Como se detalla en Fabregat et al, 2022, terminamos eligiendo una doble deleción de una base.

## ***Secuenciado de diferentes muestras provenientes del modelo murino mutante para Ccdc28b utilizando la tecnología de Nanopore***

Como se mencionó brevemente en la publicación, una de las aproximaciones que se realizó para caracterizar en mayor profundidad la mutación generada en el gen *Ccdc28b*, fue la secuenciación utilizando la tecnología de Nanopore. La secuenciación de algunas muestras provenientes de los ratones tuvo dos objetivos. En primer lugar, secuenciar amplicones correspondientes al marco abierto de lectura de *Ccdc28b* para evaluar la presencia de la mutación que nosotros generamos por CRISPR, así como detectar posibles isoformas que pudieran no incluir la región codificante. Segundo, realizar un experimento de transcriptómica (RNAseq) para evaluar la existencia de patrones de expresión génica diferentes entre animales *Ccdc28b* +/+ y *Ccdc28b* -/-, lo que posibilitaría la identificación de vías afectadas en nuestro modelo. Es importante destacar que estos experimentos, así como el análisis posterior de los datos, fueron realizados en colaboración con el Dr. Gregorio Iraola y la MSc. Cecilia Salazar del Laboratorio de Genómica Microbiana, y el Dr. Juan Pablo Tosar del Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo.

En el primer experimento se analizaron por secuenciación muestras provenientes de hígado y musculo de animales *Ccdc28b* +/+ y animales *Ccdc28b* -/-. Aquí se amplificó por PCR el marco abierto de lectura del gen *Ccdc28b* utilizando los primers más externos posibles y luego se secuenciaron estos amplicones con el objetivo de evaluar si existen transcriptos que por *splicing* alternativo sean capaces de saltearse la mutación, aprovechando la capacidad de Nanopore para secuenciar productos largos. Es importante señalar que en ninguna de las lecturas encontradas en las muestras provenientes tanto del músculo como del hígado de los ratones *Ccdc28b* -/- se evidenció la presencia de una isoforma nueva, diferente a las ya descritas (Fabregat et al 2022, ver figura suplementaria S1).

Luego se realizó un experimento de transcriptómica utilizando como material de partida las cabezas de los embriones utilizados para realizar la extracción de MEFs. Se utilizó este material ya que está reportado que uno de los tejidos donde más se expresa la proteína en ratón es el cerebro de embriones de 18 días (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/66264) y si bien los embriones utilizados son de 14 días es un material que de todas formas se habría descartado y nos fue útil como primera aproximación. También vale la pena destacar que la extracción de ARN se realizó partiendo de la

cabeza de los embriones y no exclusivamente del cerebro, por lo tanto, si bien la muestra está enriquecida en ARN provenientes del cerebro, no es exclusivamente del mismo.

Analizando los datos de transcriptómica con el programa de Expresión Diferencial de la plataforma Galaxy, no encontramos diferencias en el conjunto de cDNAs presentes en las muestras de animales *Ccdc28b* +/+ y *Ccdc28b* -/-. Vale destacar que la plataforma de secuenciación de Nanopore está en pleno desarrollo y aún hay pocas herramientas informáticas que permitan un análisis automatizado/estandarizado de este tipo de datos para expresión diferencial. De todas formas, en el proceso logramos observar que en todas las muestras secuenciadas aparecen lecturas correspondientes a mensajeros de *Ccdc28b* y que en todas las lecturas observadas en las muestras provenientes de los *Ccdc28b -/-* se encontraban presentes las dos deleciones de una base. Además, observamos un número menor de lecturas en las muestras provenientes de los animales *Ccdc28b -/-* (18, 5 y 5 lecturas por animal) que en los provenientes de los *Ccdc28b* +/+ (22, 52 y 49 lecturas por animal).

## 3.3 Caracterización de la adipogénesis en ausencia de BBS4 y de CCDC28B.

Dado que *BBS4* y *CCDC28B* interaccionan genéticamente, la hipótesis es que las proteínas codificadas por ambos genes deberían participar en procesos celulares similares o complementarios. En este sentido, se ha demostrado que tanto BBS4 como CCDC28B juegan un rol importante a nivel de las cilias. A su vez, trabajos previos relacionan a Bbs4 con la diferenciación de preadipocitos, al menos en líneas celulares, vínculo potencialmente relevante para entender el desarrollo de obesidad en nuestro modelo y los pacientes BBS. En preadipocitos 3T3/-L1 se mostró que la disminución de Bbs4 afecta la capacidad de diferenciación (Aksanov et al., 2014), aumentando la tasa de replicación, expresando menos marcadores de diferenciación, pero acumulando más triglicéridos en gotas lipídicas más chicas. Como decíamos, estos resultados son de gran importancia dado su potencial impacto sobre el desarrollo de tejido adiposo y, por tanto, la obesidad. Sin embargo, no existían reportes de alteraciones en la diferenciación de adipocitos en los modelos *Bbs4 -/-* existentes. En este trabajo de tesis nos planteamos entonces la caracterización del proceso de diferenciación *in vitro* de preadipocitos provenientes de ratones *Bbs4 -/-,* para luego evaluar si existe una interacción con Ccdc28b.

### *Adipogénesis in vitro a partir de MEFs Bbs4 -/- en fondo genético C57/BL6*

Como ya fue mencionado, no fue posible obtener animales *Bbs4 -/-* en un fondo genético C57BL/6. Sin embargo, analizando embriones en E.14 sí observamos los tres genotipos, lo que nos permitió obtener MEFs y generar cultivos primarios de estas células que son capaces de diferenciar a adipocitos ante un estímulo adecuado (Al-Sayegh et al., 2021).

Indujimos adipogénesis en MEFs *Bbs4* +/+, +/- y -/- y analizamos la diferenciación midiendo acumulación de lípidos, así como la expresión de marcadores de diferenciación. Nuestros resultados mostraron que la ausencia de Bbs4 resultó en cambios significativos en la diferenciación: las MEFs *Bbs4 -/-* presentaron mayor expresión de marcadores de diferenciación a adipocitos como *Pparγ*, *Fabp4*, *Glut 4*, *Cebp A* y *Scd1*, medidos por RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR), así como un patrón diferente de tinción con el colorante lipofílico Oil Red O (ORO), mostrando células teñidas distribuidas en grupos de mayor tamaño que las células control (Figura 37). En suma, los datos de qRT-PCR estarían mostrando una mayor activación de la diferenciación en ausencia de Bbs4, mientras que la tinción con ORO demostró, al menos, cambios significativos en la acumulación de lípidos.

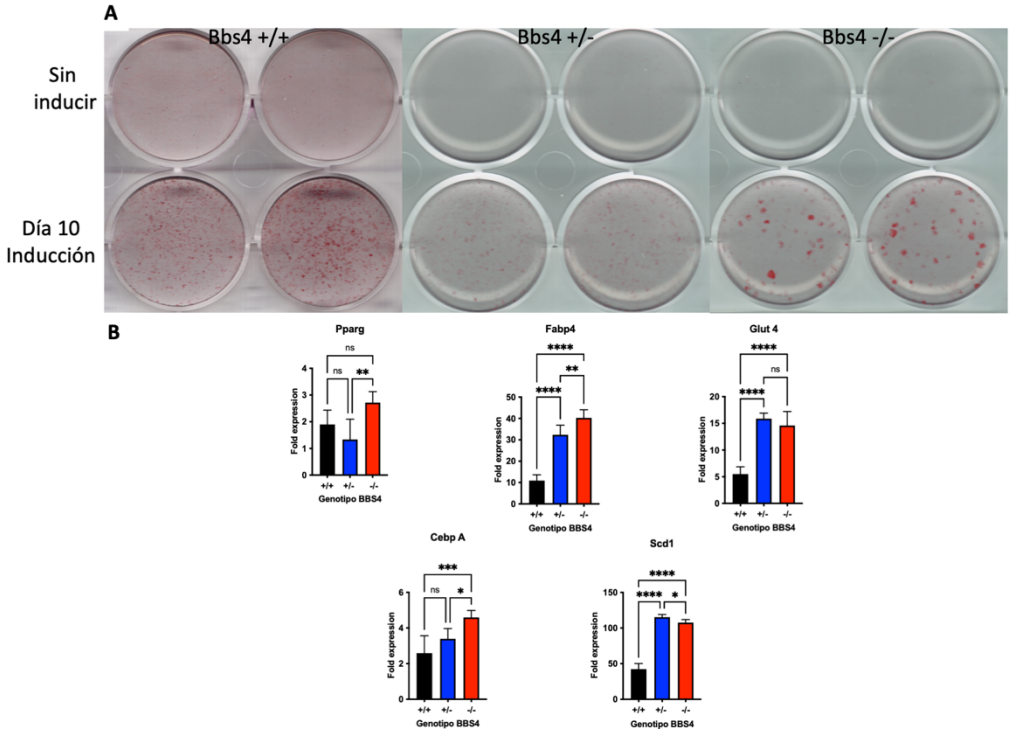


***Figura 37. Diferenciación de MEFs Bbs4 -/- .***
***A)*** *Comparación de la acumulación de lípidos luego de 10 días de diferenciación a través de la tinción con ORO.* ***B)*** *Análisis de marcadores de diferenciación por qRT-PCR al día 10 de diferenciación. Los datos están representados como media DS y muestran la expresión relativa a Gapdh normalizada por la expresión de cada gen en las células sin inducir. *= P 0.05; **= P 0.005; ***= P 0.001; ****= P 0.0001*

## ***Adipogénesis in vitro en MEFs y SVCs Bbs4 -/- en fondo genético 129/BL6***

Una vez obtenidos los animales *Bbs4 -/-* en fondo 129/BL6 logramos aislar preadipocitos de la fracción estromal vascular (SVC, del inglés: *stromal vascular cells*), tanto de los depósitos de grasa visceral como subcutánea. De acuerdo con lo que está reportado (Baglioni et al., 2012; Tchoukalova et al., 2010), los preadipocitos de grasa visceral diferenciaron muy poco *in vitro*. Intentamos en varias oportunidades realizar diferenciaciones de estas células, pero nunca obtuvimos buenos resultados. Con los preadipocitos aislados de tejidos adiposo subcutáneo la diferenciación sí ocurrió con alta eficiencia. Allí observamos que la diferenciación de las células *Bbs4 -/-* fue mayor que la de las células de animales *Bbs4 +/+* (Figura 38).

El procedimiento de diferenciación y la forma en que la analizamos y cuantificamos fue el mismo que utilizamos en el ensayo con MEFs. Luego de 10 días de diferenciación se tiñó el cultivo con el colorante lipofílico ORO y además se procedió a la extracción de ARNm para analizar la expresión de marcadores de diferenciación como *Pparγ*, *Cebp A* y *Scd1*, entre otros. En este caso, nuestros resultados mostraron una adipogénesis aumentada en las células provenientes de ratones *Bbs4 -/-*, observándose no solo un aumento en la tinción con ORO sino también un aumento en los marcadores de diferenciación.

Como conclusión de estos experimentos de diferenciación *in vitro*, donde intentamos analizar el potencial de diferenciación de células progenitoras de adipocitos (MEFs y SVCs), observamos una mayor diferenciación en las células *Bbs4 -/-* cuando analizamos los niveles de marcadores de diferenciación. Es importante destacar que el patrón de expresión de los marcadores es diferente en los dos tipos celulares. Mientras que en las MEFs todos los marcadores analizados muestran una mayor expresión en las células *Bbs4 -/-* (aunque la diferencia en *Pparγ* no es significativa), en las SVCs la expresión de *Fabp4* es mayor en las células *Bbs4 +/+* y la de *Glut4* es igual en los dos genotipos. También es importante destacar que en estos experimentos encontramos dificultades para cuantificar la acumulación de lípidos tiñendo con el colorante lipofílico Oil Red O. Además, este análisis no permite realizar una caracterización profunda de los adipocitos que permitan evidenciar diferencias, por ejemplo, de tamaño o número de gotas lipídicas. Para avanzar en este sentido trabajamos en la puesta a punto de un protocolo de citometría de flujo que nos permitiera caracterizar la población de adipocitos diferenciados. Este trabajo fue realizado en colaboración con la Dra. Victoria Prieto y la Unidad de Biología Celular del IPMon.

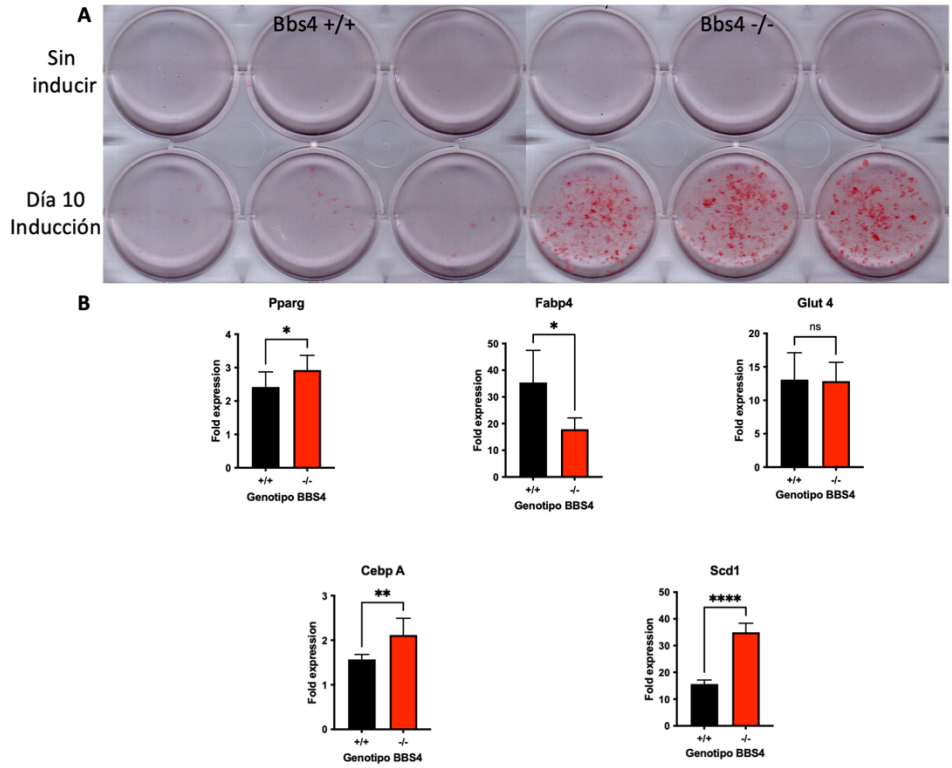


***Figura 38. Diferenciación de SVCs obtenidos de grasa subcutánea Bbs4 -/- y Bbs4 +/+ en fondo genético 129/BL6.***

***A)*** *Comparación de la acumulación de lípidos luego de 10 días de diferenciación a través de la tinción con ORO.* ***B)*** *Análisis de marcadores de diferenciación por qRT-PCR al día 10 de diferenciación. Los datos están representados como media  DS y muestran la expresión relativa a Gapdh normalizada por la expresión de cada gen en las células sin inducir. *= P  0.05; **= P  0.005; ***= P  0.001; ****= P  0.0001*

## ***Caracterización del proceso de diferenciación por citometría de flujo***

El análisis de la acumulación de lípidos a través de la tinción con ORO nos permitió una caracterización fenotípica macroscópica, sin poder cuantificar los niveles de tinción ni la acumulación de lípidos por célula. Además, dado que tanto las MEFs como las SVCs son poblaciones heterogéneas de células, se alcanzan niveles de diferenciación variables, inclusive dentro de una misma placa, o de un experimento al otro. Por estos motivos nos propusimos poner a punto un protocolo de citometría de flujo que nos permitiera obtener información precisa sobre el proceso de diferenciación en las diferentes condiciones. El objetivo era lograr separar la población efectivamente diferenciada a adipocitos a través de la utilización de marcadores fluorescentes vitales que se unen a lípidos como BODIPY o Nile Red. Esperábamos entonces poder determinar el porcentaje de células diferenciadas (células positivas a la tinción), la acumulación de lípidos por célula (intensidad de fluorescencia por célula), y la granulosidad celular (*side scatter*) que es proporcional a la cantidad de gotas lipídicas por célula. Además de lograr separar poblaciones, podríamos minimizar el ruido generado por la mezcla de poblaciones celulares diferenciadas y sin diferenciar.

Pusimos a punto el protocolo de citometría de flujo utilizando células NIH/3T3/L1 a diferentes días de diferenciación, logrando identificar diferentes poblaciones de adipocitos. En dicho protocolo utilizamos BODIPY 493/503 como colorante que tiñe lípidos, membranas y otros componentes

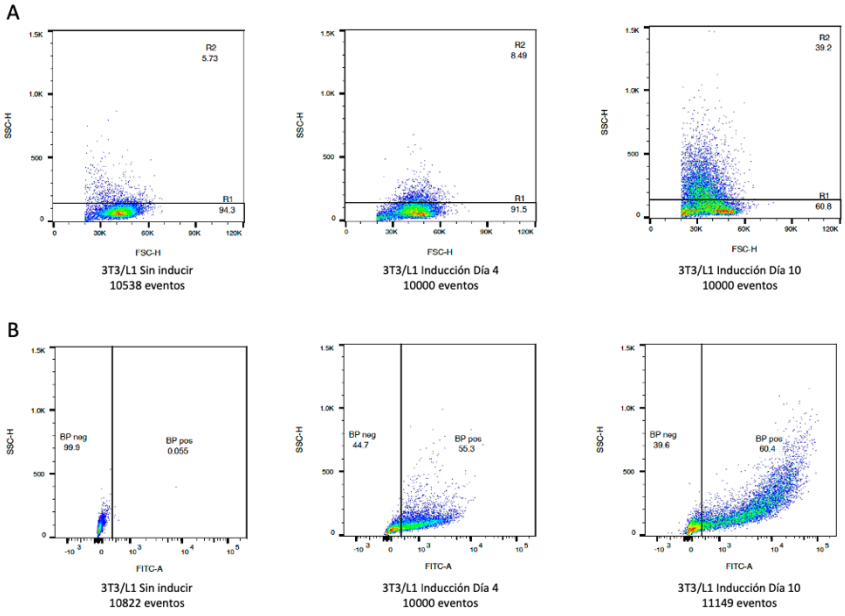


***Figura 39. Puesta a punto del protocolo de caracterización de la diferenciación por citometría de flujo.*** *Análisis de preadipocitos NIH 3T3/L1 diferenciados in vitro durante cuatro y diez días.* ***A)*** *Dot plot donde evaluamos forward scatter (tamaño celular) y side scatter (granulosidad) para la tres poblaciones de células.* ***B)*** *Dot plot donde evaluamos fluoresencia en FITC (longitud de onda correspondiente para BODIPY) en función de side scatter (granulosidad). Utilizando la población de células sin inducir determinamos la población BODIPY positiva (BP pos) de forma tal que no hubiera más de un 1% de las células en este grupo.*

lipofílicos, y logramos marcar las gotas lipídicas que se generan durante la diferenciación. Mientras que con las células de 4 días de diferenciación encontramos una población de poca granulosidad, en los adipocitos de 14 días de diferenciación la población celular, pese a no aumentar significativamente en tamaño, sí presentó una mayor granulosidad (Figura 39).

Luego de poner a punto el protocolo con 3T3/L1, analizamos MEFs. En un experimento preliminar utilizando dicho protocolo logramos ver diferencias en la población de adipocitos provenientes de MEFs *Bbs4* +/+ con respecto a las MEFs *Bbs4* -/-, encontrando que estas últimas eran más chicas y más granulosas que las de las células *Bbs4* +/+ a los 14 días de diferenciación. Por otro lado, la tinción con BODIPY también fue menor en las MEFs *Bbs4* -/- diferenciadas. Nos resta definir si esta menor tinción está directamente relacionada con el menor tamaño de las gotas lipídicas o si lo podemos tomar como una medida de menos lípidos totales acumulados (Figura 40). Si bien en la discusión se profundizará sobre este punto, es importante decir que estos primeros resultados de citometría parecerían contradecir los resultados obtenidos en diferenciaciones *in vitro* anteriores (Figuras 37 y 38).

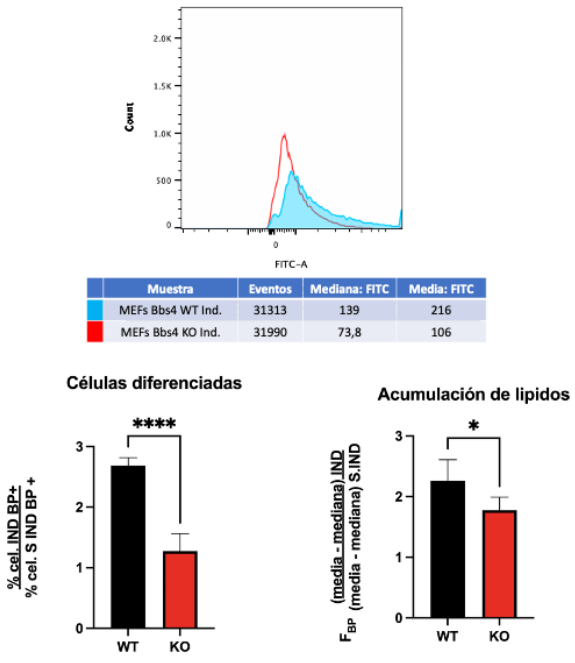


***Figura 40. Evaluación de la diferenciación de MEFs Bbs4 +/+ y Bbs4 -/- por citometría de flujo.*** *Procesamiento de MEFs diferenciados a adipocitos por diez días mediante citometría de flujo.* ***A)*** *Histograma de distribución de la intensidad de fluorescencia en el canal FITC, correspondiente a BODIPY.* ***B)*** *Cuantificación de los niveles de diferenciación. En la gráfica de la izquierda se observa el número de células diferenciadas, BODIPY positivas, utilizando el mismo umbral que utilizamos en la Figura 21B. En la gráfica de la derecha cuantificamos la asimetría en la distribución de la fluorescencia, Figura 22A, observando que la relación media – mediana es significativamente mayor en los Bbs4 +/+ que en los Bbs4 -/-, mostrando que en los Bbs4 +/+ hay un mayor número de adipocitos más fluorescentes.*

## ***Adipogénesis in vitro a partir de MEFs Ccdc28b -/-***

Es importante destacar que dentro del marco de este trabajo de doctorado también realizamos ensayos preliminares de diferenciación de MEFs *Ccdc28b* +/+ y *Ccdc28b* -/-. Evaluamos los mismos parámetros que para las diferenciaciones de células *Bbs4 -/-,* no encontrando diferencias entre células mutantes y controles. Estos resultados son concordantes con lo observado *in vivo* en los ratones *Ccdc28b* -/- (Fabregat et al., 2022), donde no detectamos diferencias en el aumento de peso con respecto a los ratones *Ccdc28b* +/+.

En conjunto, nuestros resultados *in vitro* e *in vivo,* resaltan la relevancia de analizar el doble mutante. Será muy importante determinar si la ausencia de CCDC28B en presencia de mutaciones en *Bbs4* afecta la presentación de la obesidad, la capacidad de diferenciación de los preadipocitos, así como la expresividad de otros fenotipos característicos de los mutantes BBS, como por ejemplo, y de particular interés, el fenotipo comportamental.

# DISCUSIÓN

En el transcurso de este trabajo de doctorado nos planteamos entender en mayor profundidad el rol que *CCDC28B* tiene como modificador secundario de BBS, particularmente en el contexto de obesidad. Con el objetivo de cumplir estos cometidos, durante el desarrollo de esta tesis logramos avanzar en dos grandes líneas: i) la caracterización de la obesidad y tejido adiposo en los ratones *Bbs4* -/-, y ii) la generación y caracterización de una nueva cepa murina mutante para *Ccdc28b*. La caracterización fenotípica de esta línea nos permitió descubrir un fenotipo de tipo comportamental, con rasgos asociados a un comportamiento del espectro autista, que seguramente será relevante para entender la aparición de fenotipos de comportamiento en BBS. Además, esta nueva herramienta nos posibilitará generar un modelo murino que recapitule de mejor forma lo que sucede en algunos pacientes BBS, obteniendo un doble mutante para un gen BBS causal y un modificador secundario.

## ***Los ratones Bbs4 -/- no recapitulan en su globalidad el fenotipo de obesidad saludable propuesto para otras proteínas BBS.***

En esta sección, nos centraremos en analizar los resultados obtenidos en ratones *Bbs4 -/-* en el fondo genético mezclado 129/BL6. Si bien realizamos algunos experimentos en fondo C57BL/6J puro, comparando animales *Bbs4 +/-* con *Bbs4 +/+*, no encontramos ninguna diferencia entre esos grupos que amerite una discusión (Figuras 16 y 17). El conjunto de nuestros resultados por lo tanto se puede dividir en tres aproximaciones complementarias: i) animales en dieta normal *ad libitum* (Figuras 18 a 23), ii) dieta rica en grasa *ad libitum* (Figuras 31 a 35), y iii) dieta rica en grasa controlada (Figuras 25 a 30).

Como fue mencionado en la introducción, distintas líneas de evidencia han demostrado que la obesidad en las ciliopatías, y en BBS en particular, tiene dos componentes principales. En primer lugar, existe un problema a nivel del sistema nervioso central, en la señalización mediada por cilias en neuronas hipotalámicas, que resulta en una incapacidad (o capacidad alterada) de regular la saciedad. Como consecuencia, tanto los pacientes BBS, como los distintos modelos murinos generados eliminando genes *Bbs* presentan hiperfagia. En este contexto, nuestros resultados con la línea *Bbs4* apoyan este modelo ya que fuimos capaces de inhibir la presentación de obesidad limitando la ingesta a la cantidad de comida que consumen los controles.

Por otro lado, cada vez queda más claro que existe un aporte importante de los tejidos periféricos, que si bien no necesariamente afectan la penetrancia del fenotipo principal (no determina si hay o no obesidad), sí parece influir de forma significativa sobre la expresividad del mismo, o en otras palabras, la manera en que se presenta la obesidad. Como también fue mencionado en la introducción, la obesidad, como patología compleja que es, puede presentarse de distintas formas. Para este trabajo es de particular interés la llamada presentación saludable de la obesidad, donde el aumento de peso parece disociarse de los efectos sistémicos negativos que normalmente aparecen como co-morbilidades, tales como el desarrollo de diabetes, hipertensión, y otros.

Distintos reportes, tanto en pacientes como en líneas murinas, indican que este fenotipo sería particularmente importante para BBS. El modelo murino quizás más estudiado desde este punto de vista ha sido el *Bbs12 -/-*. En estos animales se observó, utilizando solamente machos, que pese a desarrollar obesidad muestran una mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina, además de menores niveles de inflamación en el tejido adiposo (Marion et al., 2012; Marion et al., 2009). Nuestros resultados con ratones *Bbs4 -/-* no son tan claros en este contexto. En condiciones estándar, alimentando los animales con dieta normal *ad libitum*, los *Bbs4 -/-* a las 25 semanas de edad, en comparación con los controles, mostraron un desbalance metabólico que se tradujo en un fenotipo sistémico, caracterizado por obesidad, desarrollo de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Figura 21). Gerdes y colaboradores reportaron que en los ratones *Bbs4 -/-*, a las cuatro semanas de edad, previo al desarrollo de obesidad, la disfunción de la cilia primaria afecta la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas. Este defecto se observó en respuesta a la inyección de glucosa en los ensayos de GTT, donde los ratones *Bbs4 -/-* muestran una respuesta alterada producto de una menor secreción de insulina frente al estímulo. Esto difiere de lo que sucede en ayuno, donde los niveles de insulina no mostraron diferencias entre los grupos (Gerdes et al., 2014). Una pregunta importante que surge en este punto es determinar si los problemas en el manejo de la glucosa serían consecuencia o independientes al desarrollo de obesidad, tal y como sugiere el reporte de Gerdes. Nuestros resultados en ese sentido también aportan a la discusión y muestran que las dos situaciones pueden estar colaborando al fenotipo final. Por un lado, el deterioro metabólico no se observó en ratones en dieta controlada que mantuvieron un peso comparable a los animales *Bbs4* +/+. Sin embargo, durante el seguimiento de los ratones bajo una dieta normal observamos que, a las 12 semanas de edad, cuando la diferencia de peso entre los dos grupos aún no era significativa (aunque los *Bbs4 -/-* ya eran más pesados que los *Bbs4* +/+), el perfil de la curva de respuesta a la GTT de los *Bbs4 -/-* coincidió con una curva de intolerancia a la glucosa.

Normalmente, en un test de tolerancia a la glucosa en un ratón sano, la glicemia aumenta rápidamente llegando a su pico aproximadamente a los 20 minutos luego de la inyección intraperitoneal de glucosa. Los niveles de insulina basales del ratón pueden jugar un papel importante en la determinación de qué tan alto es este pico. Luego de alcanzar el pico se produce una rápida disminución de la glicemia, producto de la incorporación de la glucosa por parte del músculo y de la inhibición de la gluconeogénesis (principalmente en el hígado) por parte de la insulina. En el tramo final de la GTT se observa una disminución más lenta de la glicemia donde comienzan a actuar tanto el hígado como el tejido adiposo, volviendo a los valores de glicemia basales aproximadamente a los 90 minutos. Por lo tanto, para el análisis de los resultados es importante recordar que el aumento del AUC de la GTT es un indicativo de intolerancia a la glucosa sistémica (ya que a lo largo de toda la curva participan varios tejidos en la respuesta), pero donde el músculo esquelético ocupa un rol preponderante. No obstante, el análisis punto por punto de la curva también nos brinda información metabólica de los animales, por ejemplo, el aumento en el pico inicial de glucosa, entre 15 y 30 minutos, es un buen indicador de una falla en las células β pancreáticas (Heikkinen et al., 2007).

Nuestros resultados muestran que a las 12 semanas de edad los animales mutantes no consiguieron bajar la glicemia a niveles basales, durante el período de duración del ensayo (Figura 21C). Por otro lado, también resulta interesante destacar que el área bajo la curva no fue diferente entre los grupos debido a que el pico inicial de la glicemia luego de la inyección de glucosa fue menor en los *Bbs4 -/-*. Esto sería diferente, pero no necesariamente contradictorio a lo reportado por Gerdes y colaboradores, ya que ellos también observan una curva de intolerancia a la glucosa pero con un primer pico en la glicemia más elevado que en los controles. Es importante destacar que esto podría ser un fenómeno transitorio observado a las 12 semanas. Teniendo esto en cuenta, una hipótesis interesante podría ser que las células β pancreáticas de los *Bbs4 -/-* estén funcionando correctamente en este momento, incluso mejor de lo que se esperaría para animales de ese peso y de esa forma explicar la disminución de ese primer pico de glicemia.

Es importante resaltar que el rol de las proteínas BBS a nivel pancreático todavía no está claro y existen reportes *a priori* contradictorios. En línea con nuestra observación, se ha reportado que en zebrafish mutaciones en genes BBS, entre ellos Bbs4, generan un aumento en la masa total de células β comparado con animales *Bbs4 +/+* (Lodh et al., 2016). En acuerdo, en *C. elegans* se ha reportado un aumento en la secreción de insulina en mutantes para otras proteínas BBS (Lee et al., 2011). En este sentido, será importante estudiar en mayor profundidad el páncreas y la regulación de la insulina en nuestros ratones, midiendo sus niveles en simultáneo con los niveles de glucosa, así como también realizando una ITT.

Por otro lado, existe la posibilidad de que el resultado de la GTT pueda ser independiente, al menos en parte, de la acción de la insulina. De hecho, existen reportes mostrando que en condiciones normales la curva de respuesta a una GTT en ratones no necesita de la acción de la insulina y depende de la efectividad de la glucosa (Bruce et al., 2021; Virtue & Vidal-Puig, 2021). Este fenómeno se da debido a que el transporte de glucosa es pasivo y ocurre a favor de su gradiente de concentración, incluso inhibiendo su exportación desde el hígado y favoreciendo su incorporación al músculo. Este proceso es facilitado por los transportadores de glucosa (proteínas GLUT, todas miembros de la familia Slc2a, del inglés: *Solute Carrier Family 2*). En humanos sanos se estima que la efectividad de la glucosa es la responsable de aproximadamente el 40% de la respuesta durante una GTT (Bergman, 1989) y como decíamos, en ratones se cree que no se necesita acción alguna de la insulina. Lo que sí puede suceder es que la respuesta a la GTT se vea acelerada por la ayuda de la acción de la insulina, ya sea por un aumento en la funcionalidad de las células β pancreáticas, o por un aumento en la sensibilidad a la misma.

Un problema de este modelo para analizar parámetros metabólicos y poder evaluar si existe un fenotipo de obesidad saludable es justamente el hecho de que la obesidad se desarrolle por hiperfagia. Esto dificulta poder comparar ratones *Bbs4 -/-* y *Bbs4 +/+* de pesos similares. Para minimizar este problema, uno de nuestros protocolos de investigación se basó en limitar la ingesta, pero utilizando una dieta rica en grasa de manera de generar un aumento de peso a la vez de ejercer un estrés metabólico. Es importante destacar que si bien a lo largo de todo el tratamiento de dieta controlada no se detectaron diferencias significativas de peso entre ratones *Bbs4 -/-* y *Bbs4 +/+,* a tiempo final los ratones mutantes igualmente mostraron mayor peso. Esta diferencia de peso, puede deberse a una limitante técnica a la hora de cuantificar la ingesta. La medida fue realizada según los resultados de la caja metabólica para los ratones *Bbs4 +/+* (Figura 19), pero si por ejemplo estos ratones tienen una mayor actividad de forrajeo que los *Bbs4 -/-* (esto no fue cuantificado), quizás estemos sobreestimando lo que comen los controles y por ende dando más comida a los *Bbs4 -/-*.

Nuestros resultados, con esta aproximación de control de la ingesta, tampoco mostraron un perfil de obesidad saludable claro en los ratones *Bbs4 -/-*, de todas formas algunas observaciones podrían indicar la presencia de características particulares de la obesidad por ausencia de *Bbs4*. Luego de comenzado el tratamiento prácticamente no se observaron diferencias entre los animales *Bbs4 -/-* y *Bbs4 +/+*. Tanto el perfil de las GTTs, así como las áreas bajo la curva, fueron comparables entre ambos genotipos (Figura 26). Además, en estos animales los niveles de insulina y leptina en plasma medidos a tiempo final no mostraron diferencias significativas, aunque se observa una clara tendencia al aumento en la insulinemia de los *Bbs4 -/-* (Figura 30). Los resultados obtenidos sobre los niveles

de leptina son concordantes con reportes previos. Si bien el modelo murino *Bbs4 -/-*, así como los pacientes BBS, han sido descritos como hiperleptinémicos (Feuillan et al., 2011; Rahmouni et al., 2008), existen reportes de que esa hiperleptinemia, aunque no así la resistencia a la acción de la leptina, es corregida controlando la dieta (Seo et al., 2009). Si recordamos que los niveles de leptina se correlacionan directa y linealmente con la masa de tejido adiposo (Lönnqvist et al., 1997), tiene sentido que se pierdan las diferencias en niveles de leptina cuando corregimos el peso.

Como mencionamos, si bien nuestros resultados no indican que la presentación de la obesidad en los ratones *Bbs4 -/-* pueda considerarse saludable, al menos al nivel mostrado por Marion y colaboradores para *Bbs12-/-*, sí obtuvimos algunos resultados interesantes que podrían sugerir al menos una presentación atípica de la obesidad. Quizás el más llamativo fue encontrar una disminución en la cantidad de ácidos grasos libres en sangre en los ratones *Bbs4 -/-*, incluso cuando estos animales tienen mayor peso corporal y de los depósitos de grasa subcutánea que los animales control. Frente a estos datos surgen dos posibilidades. Por un lado, que en los depósitos de grasa de los animales *Bbs4 -/-* haya menor lipólisis, y por lo tanto directamente se liberen menos ácidos grasos al torrente sanguíneo. Esta hipótesis implicaría una mayor capacidad de almacenamiento de los depósitos de los animales *Bbs4 -/-*, lo que podría considerarse una característica de un perfil más saludable. Otra hipótesis posible es que, ante la eventual liberación equitativa de ácidos grasos al torrente sanguíneo en los dos grupos, los individuos *Bbs4 -/-* los utilicen preferencialmente para la generación de energía por sobre la glucosa. Estudios donde se analizaron los efectos de la infusión de lípidos en los niveles de glucosa basal, mostraron que conforme se incrementa la velocidad de infusión de lípidos, ocurre una menor caída de la glicemia. Estos resultados permitieron afirmar que los ácidos grasos disminuyen de manera importante el metabolismo de glucosa en el músculo, órgano que consume la mayor proporción de glucosa en el organismo (hasta el 85%) (DeFronzo, 1988). Si recordamos nuestros resultados mostrando una mayor glicemia basal de los *Bbs4 -/-* junto a la menor presencia de ácidos grasos en sangre, ambos podrían respaldar esta última hipótesis. A futuro, será interesante analizar más en profundidad esta posibilidad, evaluando por ejemplo los niveles de glucógeno, o analizando el cociente respiratorio (RER, del inglés: *Respiratory exchange ratio*) para poder analizar si estos animales tienen alguna preferencia en el uso de carbohidratos o lípidos para la obtención de energía.

Otro aspecto sumamente interesante fue la observación de que en todos los experimentos *in vivo*, mientras los animales *Bbs4 +/+* se comportan como un grupo homogéneo y con poca dispersión en los parámetros analizados, en el grupo *Bbs4 -/-* ocurre todo lo contrario. Esta observación está de acuerdo con lo presentado en la caracterización de otro modelo *Bbs4 -/-*, similar al estudiado aquí,

donde se planteó que los distintos fenotipos tienen una penetrancia variable (Eichers et al., 2006). De hecho, la penetrancia incompleta y la expresividad variable tampoco son fenómenos extraños en enfermedades genéticamente complejas como BBS, o en patologías complejas como la obesidad. Existen reportes en humanos mostrando que pacientes obesos agrupados por IMC presentan importantes variaciones en cuanto a comorbilidades asociadas y factores de riesgo (Neeland et al., 2019). Si bien esta variabilidad tiende a minimizarse con el uso de cepas de ratones genéticamente homogéneos, criados en condiciones controladas, nuestro modelo se basa en un *background* genético mezclado por lo que esta variabilidad podría indicar la existencia de factores genéticos asociados. Los resultados de esta tesis fueron obtenidos utilizando ratones en un fondo genético mezclado (129/BL6) donde la deriva genética puede influir y donde por lo tanto, la penetrancia de los fenotipos se puede ver afectada (Montagutelli, 2000; Selman & Swindell, 2018). Dicho esto, esta variabilidad en la presentación del fenotipo metabólico podría esconder algunos casos individuales de aparente obesidad saludable. Por ejemplo, dentro de los ratones *Bbs4 -/-*, el segundo animal con mayor peso a tiempo final (50.3 g) mostró una mejor respuesta en la última GTT realizada (a las 15 semanas de HFD) comparado con el ratón *Bbs4* +/+ más flaco (37.2 g), con áreas bajo a la curva de 40045 ua y 41225 ua, respectivamente. Este tipo de casos se observó en cada uno de los grupos experimentales realizados. A futuro será interesante poder hacer foco en estas diferencias, intentando individualizar las respuestas dentro del grupo *Bbs4 -/-* para identificar, agrupar y caracterizar individuos que presentan respuestas metabólicamente interesantes.

***Glicemia basal en los ratones Bbs4 -/-.***

Una de las diferencias más consistentes observadas entre animales *Bbs4 -/-* y controles a lo largo de los distintos tratamientos fue en la glicemia basal. Por ejemplo, en el experimento de HFD controlada, la glicemia basal en ayuno en todas las medidas fue más elevada en los *Bbs4 -/-* que en los controles, llegando a su máxima diferencia a las 30 semanas de edad (15 semanas en HFD), donde esta diferencia comenzó a ser estadísticamente significativa (Figura 26C). Esto ocurrió incluso aunque la respuesta en la GTT fue igual que la de los animales control. Esto es algo similar a lo que observamos en la dieta normal *ad libitum*, donde la glicemia basal siempre fue más elevada en los *Bbs4 -/-,* aunque alcanzó significancia estadística solamente en el punto final del tratamiento. Finalmente, previo a iniciar la HFD *ad libitum* en el último grupo, nuevamente volvimos a observar que los machos *Bbs4 -/-* (los grupos antes mencionados estaban solamente formados por machos) tenían la glicemia basal elevada. Como mencionamos, una posible explicación para esta diferencia

en la glicemia basal es que los *Bbs4 -/-* tengan problemas con la respuesta o la secreción de insulina. En los dos experimentos donde sometimos a los ratones a HFD medimos insulina en sangre a tiempo final y en ambos casos observamos una tendencia a mayores niveles en los *Bbs4 -/-*. Es importante destacar que en los dos grupos, al momento de evaluar la insulina en sangre, las diferencias en la glicemia ya no eran significativas, aunque seguramente esto sea producto de que los animales *Bbs4 +/+* en ese punto ya estaban metabólicamente afectados por la HFD. Nuevamente, esto realza la importancia de cuantificar la insulina a tiempo real, por ejemplo, durante la GTT, como habíamos señalado anteriormente. Estos resultados de glicemia e insulinemia elevados condicen no sólo con reportes anteriores para los ratones *Bbs4 -/-,* sino también para otras cepas murinas BBS donde se observan resultados comparables (Starks et al., 2015). Allí los autores encontraron que ratones *Bbs2 -/-*, *Bbs4 -/-*, y *Bbs6 -/-*, presentan hiperglucemia e hiperinsulinemia.

Un detalle interesante a tener en cuenta es que si en animales adultos se elimina la función de proteínas esenciales para la ciliogénesis (Ift88 y Kif3a) los animales desarrollan un fenotipo de obesidad inducida por hiperfagia con aumento en los niveles de leptina, glucosa e insulina (Davenport et al., 2007). Este mismo reporte muestra que esos mutantes en dieta controlada, ingiriendo lo mismo que los controles, no se diferencian en ninguna de las variables estudiadas. Esto sugiere que los defectos estructurales en la cilia alteran el metabolismo energético de los animales principalmente a través de afectar el comportamiento a la hora de alimentarse. En este contexto, la glicemia basal elevada que persiste en los animales *Bbs4 -/-* pese a el control de la dieta*,* podría estar evidenciando funciones extra ciliares de Bbs4, ya que si fuera a través de la cilia se debería corregir con el control de la dieta como en el reporte de Davenport y colaboradores.

***Las consecuencias metabólicas de la ausencia de Bbs4 son al menos en parte dependientes del sexo.***

La importancia de tener en cuenta el sexo en la investigación biológica ha cobrado notoria relevancia en los últimos años, y este aspecto es particularmente relevante en el estudio de fenotipos metabólicos (Camporez et al., 2019; Gannon et al., 2018; Pucci et al., 2017). En el estudio de modelos como los ratones *Bbs4 -/-* sin embargo, el estudio de la variable sexo no ha sido abordado en profundidad, a pesar de que un aspecto crítico del fenotipo, como lo es la ganancia de peso, muestra diferencias significativas entre ratones machos y hembras: las hembras *Bbs4 -/-* ganan más peso que los machos (ver Figura 18). En este contexto, tanto en la caracterización basal de nuestra línea como en el último grupo experimental analizado (dieta HFD *ad libitum*) incluimos ratones de ambos sexos.

En particular para este último experimento cabe recordar que decidimos evaluar a los animales en un período corto de tiempo. La decisión de este protocolo de trabajo se basó en que habíamos determinado que, a tiempos largos, tanto los animales *Bbs4 -/-* como los controles, desarrollan rasgos de síndrome metabólico. A su vez, la HFD es un fuerte estrés metabólico. Por estos motivos, pensamos que quizás un tiempo menor nos permitiría ver diferencias en la presentación/evolución de la obesidad en nuestro modelo.

Uno de los resultados más importantes que arrojó este análisis fue que los cambios observados en el metabolismo de la glucosa en los animales *Bbs4 -/-*, como una glicemia basal aumentada y el área bajo la curva de respuesta a la GTT elevada previo al inicio de la HFD, parecen ser un fenotipo exclusivo de los machos. Por un lado, observamos que, pese a no ver grandes diferencias en la glicemia basal entre machos y hembras, si comparamos por sexo los individuos de los dos genotipos, solamente los machos muestran diferencias significativas entre *Bbs4 -/-* y *Bbs4 +/+* (Figura 33). Estos resultados son coherentes con los obtenidos en los experimentos anteriores, cuando solamente habíamos utilizado machos. Además, es importante destacar que esta diferencia es significativa solamente en la primera medida, previo a iniciar la HFD, perdiéndose luego durante el tratamiento. Con los resultados de las GTTs pasó algo similar; observamos diferencias entre los *Bbs4-/-* y *Bbs4 +/+* solamente en los machos y previo a iniciar la HFD (Figura 34). Interesantemente, si hacemos la comparación por sexo para cada genotipo, en todas las medidas menos en la última (luego de 4 semanas de HFD), los machos presentaron un área bajo la curva mayor a la de las hembras. Estas observaciones resultan sumamente interesantes, tanto en lo que respecta a la diferencia de presentación del fenotipo entre sexos, así como a una posible disociación entre la homeostasis de la glucosa y la ganancia de peso: las hembras muestran un mejor manejo sistémico de la glucosa a pesar de presentar una mayor ganancia de peso. Estos resultados están de acuerdo con distintas líneas de evidencia, tanto en ratones como en humanos, mostrando que la presentación del síndrome metabólico y las patologías asociadas a la obesidad son siempre más leves en hembras (pre-menopáusicas) que en machos (Brooks et al., 2016; Pucci et al., 2017; Pérez-Torres et al., 2011).

Como se mencionó en la introducción, otro aspecto a valorar en el marco de un fenotipo de obesidad es el desarrollo de una inflamación crónica, factor crítico para modular la presentación del fenotipo y el desarrollo de algunas patologías asociadas (Kawai et al., 2021; Koh et al., 2005; Weisberg et al., 2003). Como una primera aproximación en este sentido, en nuestro trabajo cuantificamos los leucocitos en sangre durante el tratamiento con HFD, una variable que nos sirve como reportero para evaluar procesos inflamatorios asociados al desarrollo de obesidad (Dixon & O' Brien, 2006). Interesantemente, encontramos diferencias estadísticamente significativas en distintas

poblaciones leucocitarias entre los *Bbs4 -/-* y *Bbs4 +/+* solamente en los machos. Nuevamente, esto resulta aún más llamativo teniendo en cuenta que las hembras ganan peso más rápidamente que los machos, por lo que esperábamos que el proceso de obesidad y la inflamación asociada evolucionaran más rápidamente en hembras que en machos. En este punto es importante destacar que, así como sucede para el manejo de la glucosa, la inflamación producto de la obesidad inducida por dieta también está influenciada por el sexo. Está reportado que las hormonas sexuales juegan un rol fundamental en la respuesta inflamatoria del tejido adiposo (Varghese et al., 2021). En particular, se sabe que los estrógenos tienen un rol de protección en la función metabólica, particularmente reduciendo los niveles de citoquinas proinflamatorias y manteniendo los niveles de sensibilidad a la insulina durante la obesidad (Varghese et al., 2021; Vieira Potter et al., 2012). Por lo tanto, no es de extrañar que las hembras, pese a las diferencias en peso observadas, no muestren diferencias en ningún caso. De hecho, es una posibilidad que ese efecto protectivo de los estrógenos en la funcionalidad del tejido adiposo enmascare el efecto que la ausencia de Bbs4 pueda tener. En suma, el conjunto de nuestros resultados deja en evidencia que la ausencia de Bbs4 resulta en un fenotipo metabólico donde al menos algunos aspectos muestran una penetrancia dependiente del sexo, resaltando la importancia de incluir esta variable en futuros análisis. Por ejemplo, dado que los fenotipos asociados a una peor presentación a la obesidad se observan en los machos, será interesante confirmar si esto se debe a una protección mediada por estrógenos en las hembras, o a una susceptibilidad particular de los machos. Para esto se podría evaluar si hembras *Bbs4 -/-* a las que se les realice una ovariectomía, recapitulan los fenotipos observados en machos. Además, también será interesante analizar la expansión del tejido adiposo y la distribución de la grasa entre los depósitos subcutáneos y viscerales en las hembras, para confirmar si existe una correlación con la presentación menos severa de la obesidad.

***El patrón de distribución de lípidos indicaría un contexto más saludable del tejido adiposo en los ratones Bbs4 -/-***

En humanos, la expansión del tejido adiposo por hiperplasia, en particular del tejido subcutáneo, está asociado a una presentación más saludable de la obesidad (Ghaben & Scherer, 2019). Sin embargo, en ratones la situación es un poco más confusa. Si bien hay unanimidad sobre la asociación del crecimiento hiperplásico de la grasa visceral con una presentación más saludable de la obesidad, en cuanto a la grasa subcutánea la situación es diferente. Mientras existen reportes de que el tejido adiposo subcutáneo de los ratones solamente puede crecer por hipertrofia (Wang et al., 2013),

otros hablan de que solamente en hembras puede crecer por hiperplasia (Jeffery et al., 2016), y otros muestran el desarrollo de hiperplasia también en machos (Bilal et al., 2021; Lu et al., 2014). Finalmente, también es importante destacar que si bien existen modelos murinos de obesidad saludable con crecimiento hiperplásico del tejido adiposo asociado (Escande et al., 2015), al menos en ratones de fondo genético C57BL/6J la hiperplasia del tejido subcutáneo no es fácilmente observable y su ocurrencia es aún tema de debate (Ghaben & Scherer, 2019; Vishvanath & Gupta, 2019). Más allá de estos reportes, existe consenso en que cualquier evento de crecimiento hiperplásico del tejido adiposo, sea en el depósito que sea, está más asociado con un efecto saludable que una expansión hipertrófica. En suma, el tejido adiposo aparece como un buen reportero de salud metabólica estudiando dónde y de qué manera se está acumulando la grasa.

Con el objetivo de caracterizar la presentación de la obesidad en nuestro modelo nos resultó entonces importante avanzar en este sentido, analizando las consecuencias de la ausencia de Bbs4 en tejido adiposo. Interesantemente, si bien la obesidad en los ratones *Bbs4 -/-* posee consecuencias deletéreas a nivel sistémico, como fue discutido antes, cuando analizamos el estado del tejido adiposo surgieron algunas particularidades interesantes. Por ejemplo, en el análisis de los animales en dieta normal *ad libitum*, donde los animales *Bbs4 -/-* eran significativamente más pesados que los controles, si bien el tamaño de los adipocitos (Figura 23) fue mayor en los ratones *Bbs4 -/-* que en los *Bbs4 +/+*, la diferencia de tamaño fue aproximadamente del 50%. Esto contrasta con lo observado en otros modelos murinos que presentan síndrome metabólico y donde el aumento de masa de tejido adiposo se da principalmente por hipertrofia, en donde la diferencia de tamaño llega a ser del 300% (Marion et al., 2012; Wang et al., 2017). Esto podría estar mostrando que el aumento del tejido adiposo en los ratones *Bbs4 -/-* no ocurre solamente por hipertrofia, sino que también podría existir un componente de hiperplasia. Durante este trabajo no evaluamos directamente la hiperplasia, algo que será importante realizar a futuro. Para ello se podrían utilizar ensayos de incorporación de Bromodesoxiuridina (BrdU) en la fracción estromal vascular o en el propio tejido adiposo, de manera de poder analizar la capacidad replicativa de los preadipocitos. Otro parámetro a evaluar en este contexto sería el número de preadipocitos en la fracción estromal vascular del tejido adiposo mediante el uso de los marcadores adecuados (esto será discutido en la próxima sección).

Otra observación interesante surgió cuando realizamos el experimento de HFD controlada. A tiempo final, los animales *Bbs4 -/-* fueron más pesados que los *Bbs4 +/+*, aunque la diferencia de peso fue menor que la observada con la dieta *ad libitum*. Interesantemente, en este caso la diferencia de peso se explicó por una mayor masa de los depósitos subcutáneos en los *Bbs4 -/-*. Los depósitos viscerales no sólo no mostraron diferencias estadísticas, sino que presentaron una tendencia a ser más

chicos en los *Bbs4 -/-* con respecto a los *Bbs4 +/+*. Concordantemente, cuando cuantificamos el tamaño de los adipocitos en cada uno de los depósitos se observó el mismo patrón descrito anteriormente para la dieta *ad libitum* (Figura 29). En conjunto, estos resultados son de gran importancia ya que se sabe que la expansión del tejido subcutáneo está asociada con una presentación más saludable de la obesidad.

Por último, diversos trabajos han demostrado que el aumento en la lipólisis de la grasa subcutánea es la principal causa de la acumulación ectópica de lípidos y por eso su correcto funcionamiento es fundamental para una presentación más saludable de la obesidad (Naukkarinen et al., 2014; Smith, 2015). En particular, el tejido adiposo cumple un rol fundamental en prevenir el desarrollo del hígado graso no alcohólico, ya que por lo general este se manifiesta cuando el tejido adiposo supera su capacidad para almacenar lípidos, y estos comienzan a almacenarse en otros tejidos, siendo el hígado uno de los primeros afectados (Qureshi, 2007). En el caso de los ratones *Bbs4 -/-* en HFD controlada, el aumento de tamaño de los adipocitos del depósito subcutáneo con respecto al tamaño de los adipocitos control, junto a la tendencia a adipocitos viscerales más pequeños y la disminución en los niveles de ácidos grasos libres en sangre, parecen sugerir un aumento en la capacidad de almacenamiento de lípidos en depósitos subcutáneos, sin embargo, en contraposición a lo previamente expuesto, observamos también una importante acumulación de lípidos ectópicos en el hígado, que fue más evidente en los ratones *Bbs4 -/-*. Una posible explicación es que las consecuencias observadas en el hígado no estén directamente relacionadas a lo que sucede en el tejido adiposo y se deban a una afectación particular que el órgano sufre dada la ausencia de Bbs4. En ese sentido, sería interesante a futuro estudiar en mayor profundidad el estado y funcionamiento del hígado, prestando particular atención a su desarrollo y función durante la evolución de la obesidad en el modelo.

***La ausencia de Bbs4 resulta en cambios a nivel de adipogénesis.***

Un aspecto que incide directamente sobre la capacidad de expandir la masa de tejido adiposo por hiperplasia es la capacidad de diferenciación de los preadipocitos. En este contexto, estudiamos el proceso de adipogénesis en diferentes líneas celulares *Bbs4 -/-,* con el objetivo de determinar si este proceso se veía afectado. Nuestros resultados mostraron algunas diferencias que además de ser coherentes con los resultados encontrados *in vivo*, también abren varias posibilidades para seguir estudiando. En primer lugar, nuestros resultados muestran que el potencial de diferenciación hacia adipocitos maduros está aumentado en las células *Bbs4 -/-*. Esto lo observamos claramente para las

SVCs, mientras que, para las MEFs, si bien el patrón de tinción con Oil Red no nos permite concluir que hay más diferenciación, sí vemos que el proceso es diferente. Vale destacar también que los resultados los observamos indistintamente del fondo genético de los animales, ya sean C57BL/6J o fondo mezclado B6/129. Como mencionamos en la introducción (Capítulo 1.11), la cilia junto a las proteínas BBS, en particular Bbs4 y su efector Fstl1 cumplirían un rol importante en la diferenciación a adipocitos (Prieto-Echagüe et al., 2017). Para el inicio del proceso de diferenciación las cilias deben estar presentes y Fstl1 y Bbs4 se encuentran en niveles elevados. Una vez comenzada la diferenciación, por el contrario, las cilias deben reabsorberse y sabemos que los niveles de Fstl1 y Bbs4 disminuyen. La hipótesis es que este "ciclo ciliar" permite mediar positivamente sobre vías proadipogénicas como IGF1, al inicio del proceso, mientras que luego permite inhibir vías antiadipogénicas como Shh o Wnt una vez que el proceso de diferenciación inició. En ese contexto en Prieto-Echague *et al* se hipotetizó que ante una ausencia de Bbs4 que no impida la primera fase de la diferenciación, la segunda fase podría estar facilitada, favoreciendo la reabsorción de la cilia y generando un aumento en la adipogénesis.

Es importante en este punto marcar una clara diferencia entre los dos tipos celulares estudiados en este trabajo. En las MEFs observamos una clara diferencia en la acumulación de lípidos y un aumento en los marcadores de diferenciación (Figura 37). Sin embargo, con la información conseguida hasta el momento no podemos concluir en cuanto a la acumulación global de lípidos o la capacidad adipogénica general. En contraste, los resultados con las SVCs sí muestran un claro aumento en el número de adipocitos diferenciados con la ausencia de Bbs4 (Figura 38). Al respecto hay que decir que, a diferencia de las MEFs, las SVCs son una población heterogénea de células, que puede traer como consecuencia diferencias de partida en el número de preadipocitos según el genotipo. Este fenotipo deja entonces una pregunta abierta pensando en su contexto fisiológico: ¿es esta diferenciación aumentada de las líneas celulares *Bbs4 -/-* consecuencia de una mayor capacidad de diferenciación de los preadipocitos existentes, una mayor capacidad de acumulación de lípidos por parte de los mismos, ambas cosas, o a la presencia de un mayor número de preadipocitos en el tejido? Especulando sobre estas posibilidades, más allá de que pudiera haber diferencias en el número de preadipocitos en el tejido al inicio del cultivo, estas diferencias seguramente se deberían ir diluyendo con el correr de los pasajes en cultivo, sobre todo si los preadipocitos son las principales células proliferantes y el protocolo se basa en iniciar la diferenciación con números comparables de células entre condiciones. Sin embargo, será igualmente importante poder evaluar el número de preadipocitos en el tejido adiposo. Esto presenta algunas dificultades, ya que, a diferencia de otros tipos celulares, al momento no se ha identificado un marcador específico de preadipocitos. De todas maneras, en los

últimos años se ha descrito la utilización de una combinación de marcadores mediante la cual se podría abordar esta problemática utilizando citometría de flujo para identificar, cuantificar y hasta separar las poblaciones de preadipocitos de la fracción estromal vascular y así poder comparar los mismos entre los distintos genotipos (Cawthorn et al., 2012).

Finalmente es importante recordar que para otros modelos BBS, como lo es el modelo *Bbs12 -/-*, ya está reportada la presencia de adipocitos más grandes y en un mayor número por área respecto a animales control. Si bien con nuestros resultados no podemos asegurar que el número de adipocitos por área sea mayor en los *Bbs4 -/-*, sí tenemos adipocitos de mayor tamaño. Además, las diferencias de tamaño observadas por nosotros y por Marion en el modelo *Bbs12* son muy parecidas, poco menos del doble de tamaño que los adipocitos control (Figuras 12 y 23). En este caso es importante destacar que Marion y sus colaboradores terminan concluyendo que pese a que los *Bbs12 -/-* tienen adipocitos más grandes, en ese modelo hay un favorecimiento del crecimiento hiperplásico del tejido adiposo, debido a que la ausencia de Bbs12 genera un aumento en el proceso de adipogénesis en la médula ósea, lo que termina repercutiendo en un mayor reclutamiento de preadipocitos hacia el tejido adiposo y el posterior crecimiento hiperplásico del mismo (Marion et al., 2012). Teniendo en cuenta estos datos, será muy interesante evaluar esta posibilidad en nuestro modelo y contar con los marcadores para citometría de flujo anteriormente mencionados, podría permitir la realización de este análisis.

***Sobre el fenotipo de obesidad de los ratones Bbs4 -/- en comparación con los Bbs12 -/-.***

En suma, nuestros resultados con el modelo *Bbs4 -/-* aparecen, al menos en algunos aspectos, como contrarios a los reportados para el modelo murino *Bbs12 -/-*. Marion y colaboradores mostraron, utilizando solamente machos, que pese a desarrollar obesidad y a tener una capacidad adipogénica aumentada, los ratones *Bbs12 -/-* muestran una mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina, y además menores niveles de inflamación en el tejido adiposo (Marion et al., 2012; Marion et al., 2009). Por lo tanto, si bien Bbs12 y Bbs4 parecen generar el mismo efecto en cuanto a la capacidad adipogénica y al desarrollo de obesidad, las consecuencias de su ausencia en cuanto al metabolismo de la glucosa y al reclutamiento de células inflamatorias al torrente sanguíneo sería diferente. A la hora de realizar esta comparación es bueno destacar que no sabemos con exactitud el fondo genético de los ratones *Bbs12 -/-* ya que únicamente fueron reportados como de "fondo genético mezclado". Por otro lado, en los reportes de Marion los animales son alimentados en todo momento con HFD *ad libitum* y los resultados de las GTT y de los metabolitos en sangre son de animales de 12 semanas de edad, mientras que las medidas de adipocitos corresponden a animales de 6 meses de

edad. Si bien alguna de estas diferencias en las aproximaciones metodológicas puede ser la causa de estos resultados contradictorios, otra posibilidad es que la función de proteínas BBS individuales, tanto en el contexto de la cilia como independientes del organelo, puedan ser diferentes. A esto se suma la posibilidad de que exista redundancia funcional que puede variar entre proteínas BBS. Por último, nuestro trabajo, así como otros reportados en la literatura, realzan la importancia de continuar disecando el rol de este grupo de proteínas en tejidos periféricos que pueden influenciar directamente el desarrollo y la presentación de la obesidad, tales como el tejido adiposo o el músculo, entre otros.

***Los ratones Bbs4 -/- presentan alteraciones en el comportamiento que exceden a la hiperfagia.***

Antes de culminar la discusión de los resultados *in vivo* del modelo *Bbs4 -/-* es importante destacar que los mismos presentan un fenotipo comportamental que va más allá de la hiperfagia. Por razones de tiempo y de objetivos de este trabajo, no fue posible profundizar en ellos, pero cobran particular relevancia dado los resultados obtenidos con el modelo *Ccdc28b -/-*.

En primer lugar, hay algunas particularidades que observamos en el modelo *Bbs4 -/-* cuando intentamos llevar la línea a un fondo genético C57BL/6J puro. En este caso observamos un comportamiento maternal de canibalismo específicamente con las crías *Bbs4 -/-*. Este comportamiento posiblemente pueda estar estimulado por el fenotipo neonatal de las crías *Bbs4 -/-,* caracterizado por un tamaño reducido en comparación a las crías *Bbs4 +/+*. Sin embargo, es importante destacar que cuando generamos la línea en fondo genético mezclado B6/129, las crías *Bbs4 -/-* también presentan ese menor tamaño luego del nacimiento, pero en este caso las madres no las canibalizan, al menos no en la misma proporción. Esto sugiere la existencia de otros factores incidiendo en el comportamiento maternal y/o la relación entre madre-cría. Los datos indican por lo tanto que el fenotipo observado en el fondo genético C57BL/J6 no se debe exclusivamente a la mutación en *Bbs4* sino que se debe a esa mutación en un fondo genético particular. Vale la pena destacar que en el fondo genético mezclado, las proporciones genotípicas de las crías igual se alejan de las esperadas (menos del 25% de *Bbs4 -/-* en la cruza entre heterocigotas), pero en este caso no evaluamos en profundidad si había canibalismo o no, por lo que no podemos concluir al respecto.

Por otro lado, y ya trabajando con animales en fondo genético mezclado (B6/129), cuando realizamos el estudio en cajas metabólicas de los ratones *Bbs4 -/-* y *Bbs4 +/+*, encontramos que los primeros comieron menos (Figura 19), resultado contradictorio con lo reportado para el modelo y con el fenotipo de obesidad que caracteriza a estos ratones. Una explicación posible en este contexto es que este resultado haya sido consecuencia de un problema de ansiedad/estrés. De hecho, en la

caracterización inicial del modelo Eichers y colaboradores mostraron que los animales *Bbs4 -/-* presentan un fenotipo de ansiedad caracterizado por pasar menos tiempo en la zona central en el Test de Campo Abierto y un mayor tiempo en la zona oscura del Test Luz-Oscuridad (Eichers et al., 2006). Sin embargo, el posible estrés observado en este experimento no se puede explicar exclusivamente por el aislamiento en solitario de los animales en las cajas, ya que más adelante, cuando realizamos el experimento de restricción de dieta, también alojamos a los ratones de forma individual y en ese caso los mismos se comportaron con normalidad. Una diferencia entre estos dos experimentos fue la utilización de dos tipos diferentes de cajas.

En líneas generales nuestras observaciones, sumado a lo ya reportado, muestran que los animales *Bbs4 -/-* tendrían un fenotipo comportamental que excede lo descrito en cuanto a la hiperfagia. Esto realza la posibilidad de utilizar los ratones *Bbs4 -/-* como una herramienta valiosa para estudiar las bases celulares/moleculares de fenotipos complejos como son los comportamentales. De hecho, existen reportes que han permitido vincular la disfunción de las cilias como un agente causal de este tipo de patologías en el comportamiento. Por ejemplo, en un artículo publicado en el 2014 por Agassandian y colaboradores se muestra que la afectación de las cilias en el modelo *Bbs4 -/-* se da en regiones específicas del cerebro. En este trabajo demostraron que, comparando con otras áreas del cerebro que hasta el momento no han sido asociadas a ningún fenotipo en BBS, las regiones del cerebro responsables del aprendizaje y de la memoria, como la amígdala y el hipocampo, presentan una menor marcación con Adenilato ciclasa III (ACIII, un marcador exclusivo de cilias primarias neuronales), así como defectos estructurales de las cilias detectadas por microscopía electrónica (Agassandian et al., 2014). Continuar evaluando el componente comportamental del fenotipo de los ratones Bbs4, así como estudiar en profundidad la función de las proteínas BBS y las cilias en distintos tipos neuronales seguramente brindará pistas importantes para entender procesos biológicos relevantes en el desarrollo de patologías cognitivas. Finalmente, nuestros resultados con el ratón *Ccdc28b* hacen que caracterizar el componente comportamental del fenotipo de los ratones *Bbs4 -/-* sea crítico a la hora de caracterizar la interacción entre estos genes.

***El modelo murino Ccdc28b -/- se caracteriza por un fenotipo comportamental.***

La discusión general de los resultados correspondientes al modelo *Ccdc28b -/-* aparece en el capítulo 3.2, en Fabregat *et al* 2022. De todas formas, a continuación resaltamos algunos puntos que creemos de gran importancia sobre la identificación del vínculo, hasta ahora desconocido, entre *Ccdc28b* y alteraciones comportamentales.

En primer lugar, demostramos que la disminución de los niveles de Ccdc28b no causan grandes defectos en el largo o distribución de las cilias primarias, así como tampoco causan los fenotipos más penetrantes en las ciliopatías, como son la obesidad o la degeneración de retina. Esto fue algo inesperado teniendo en cuenta los resultados previos de nuestro propio grupo en otros modelos, donde la disminución de la proteína tanto en células en cultivo como en *zebrafish* sí genera fenotipos ciliares severos (Cardenas-Rodriguez, Osborn, et al., 2013). En el artículo discutimos distintas posibilidades que pueden estar causando esta aparente contradicción. Más allá de entender porque la falta de Ccdc28b no es suficiente para afectar las cilias *in vivo* en ratón, los resultados tienen una implicancia interesante: los fenotipos observados en este modelo podrían estar relacionados con alguna función extra ciliar de Ccdc28b, hasta el momento desconocida. Por otro lado, también es importante recordar que ya se ha puesto en evidencia que la mera presencia de la cilia primaria no es perfectamente equivalente a un correcto funcionamiento de dicho organelo. En otras palabras, la ausencia de defectos estructurales en la cilia no es sinónimo de un correcto funcionamiento. Esta puede ser otra posibilidad, que en ratones, la ausencia de Ccdc28b no afecte directamente la formación o estructura de la cilia pero sí su funcionalidad, generando los fenotipos observados en el modelo.

Además del fenotipo comportamental, nuestros resultados no mostraron un fenotipo metabólico evidente en los *Ccdc28b -/-*, si bien se vieron algunas tendencias mostrando niveles de glucosa basal más elevados o una peor respuesta en la GTT. Por lo tanto, no podemos descartar que los animales *Ccdc28b -/-* por sí solos tengan una predisposición a desarrollar fenotipos asociados a BBS. Por ejemplo, será importante analizar animales de mayor edad (en este trabajo se evaluaron animales de hasta 9 meses de edad como máximo). También sería interesante introducir la mutación en *Ccdc28b* en diferentes contextos, tanto en lo que respecta a *backgrounds* genéticos así como interaccionando con mutaciones en otros genes BBS además de *Bbs4.*

Por otro lado, como se dijo anteriormente logramos caracterizar alteraciones en la conducta, consistentes con lo esperado para un fenotipo dentro del espectro autista (Silverman et al., 2010). En particular, las diferencias encontradas en los test de interacción recíproca y de enterramiento de bolitas (Figura 5, Fabregat *et al* 2022), son una clara muestra de estos fenotipos. Sobre estos resultados es importante destacar que son respaldados por el hecho de que no observamos afectaciones locomotoras o fenotipos de ansiedad. Estos fueron evaluados mediante el test de Campo Abierto, donde los *Ccdc28b -/-* se comportaron de la misma forma que los *Ccdc28b +/+*. Lo mismo sucedió en el test de Laberinto en Cruz Elevado, donde no observamos diferencias en el tiempo que los ratones de los dos grupos pasan por el brazo abierto del mismo. El hecho de que estos dos últimos

test no hayan mostrado diferencias, realza la importancia de los resultados obtenidos en los otros, ya que no pueden ser explicados simplemente como una consecuencia de un problema de ansiedad o movilidad.

Analizando las implicancias que estos resultados pueden tener es importante notar que hasta la fecha existen varios reportes asociando trastornos comportamentales del espectro autista con pacientes BBS, incluyendo algunos que describen hasta un 77% de pacientes BBS que desarrollan algún comportamiento de este tipo (Aleman et al., 2021; Chatterjee et al., 2014; Kerr et al., 2016). Por otro lado, en ratones solamente han sido reportados algunos defectos asociados al aprendizaje, la dominancia o ansiedad, y eran los únicos estudios comportamentales en modelos BBS hasta la fecha (Eichers et al., 2006; Fath et al., 2005; Nishimura et al., 2004; Pak et al., 2021). Es decir que aparte de ser novedosos, los resultados obtenidos con nuestro modelo muestran un vínculo directo entre una mutación en un gen asociado a BBS y trastornos del comportamiento del espectro autista. Esto puede servir no sólo para continuar estudiando el vínculo entre estas dos patologías, sino que también genera una nueva herramienta para estudiar en profundidad este tipo de comportamientos y sus bases moleculares.

Cabe destacar que, durante la elaboración del artículo, y en colaboración con el Dr. Girirajan de la Universidad de Penn State, se realizó un análisis preliminar en la base de datos correspondiente a la cohorte *Simon Simplex* de pacientes con autismo y allí se detectaron un número de mutaciones en *CCDC28B* que es mayor que el presente en una población control. Esto podría sugerir una contribución de *CCDC28B* a la generación de fenotipos de este tipo en humanos. De todas formas, estos resultados son preliminares y se deberán estudiar más a fondo, analizando en profundidad por ejemplo la prevalencia de estas mutaciones en la población, la segregación en familias afectadas con autismo y el efecto de las mutaciones sobre la función de CCDC28B. Esto último es relevante especialmente para mutaciones que son de cambio de sentido (cambio de un aminoácido), y cuya interpretación clínica puede ser difícil.

La generación de este modelo deficiente en un modificador secundario de BBS, sin dudas es una de las claves de este trabajo de doctorado, y que deja abiertas distintas posibilidades que permitirá continuar evaluando y disecando con mayor profundidad las interacciones genéticas en una enfermedad compleja como lo es BBS. Como ya hemos destacado a lo largo de la tesis, tener dos cepas murinas mutantes, una en una proteína BBS causal y otra en un modificador secundario, se presenta como una gran oportunidad para generar un modelo murino de BBS que recapitule la presentación de la enfermedad observada en algunos pacientes. Además, su generación será un pilar

importante para entender mejor la interacción funcional entre las dos proteínas en cuestión, prestando particular atención a los nuevos fenotipos que la doble mutación pueda generar. De particular relevancia será el aspecto comportamental. Si bien las alteraciones del comportamiento observadas en los dos modelos no son las mismas, la presencia de ellas podría evidenciar que la función de las cilias en el Sistema Nervioso Central pueda ser más susceptible a alteraciones que en otros tejidos, incluso en casos donde el organelo no está estructuralmente afectado.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como se ha desarrollado a lo largo del texto, los resultados obtenidos durante este doctorado aportan información novedosa y relevante sobre la forma en la que se presenta la obesidad en el modelo *Bbs4 -/-*, así como las consecuencias de eliminar la función de Ccdc28b *in vivo*. Por otro lado, el desarrollo de esta tesis permitió poner a punto diferentes herramientas que aportarán a futuras investigaciones en estas líneas. Durante esta última sección de la tesis, pretendemos comentar algunas dificultades que nos obligaron a priorizar algunos experimentos sobre otros, así como algunas de las perspectivas que se han generado con la información recolectada en el presente trabajo.

### ***Dificultades y cambios de aproximaciones.***

Antes de terminar, me parece importante destacar algunas dificultades que se generaron y que de alguna forma no permitieron completar alguno de los objetivos propuestos originalmente. Por ejemplo, para entender en mayor medida la interacción Bbs4-Ccdc28b pretendíamos analizar el rol de Ccdc28b en dos aspectos donde sabíamos Bbs4 cumplía un rol importante: adipogénesis y la regulación de la secreción de Fstl1.

El trabajo previo de nuestro grupo mostró que Bbs4 es capaz de regular la expresión y secreción de Fstl1. A su vez, se mostró que Fstl1 es un efector de Bbs4 relevante en el proceso de diferenciación de adipocitos (Prieto-Echagüe et al., 2017). En este contexto, pretendíamos analizar si el rol de Bbs4 en la regulación de Fstl1 depende en alguna medida de Ccdc28b. En ese marco comenzamos evaluando la expresión y secreción de Fstl1 en MEFs *Bbs4 -/-*, confirmando que, al igual que lo observado en células NIH/3T3L1, la ausencia de Bbs4 afecta los niveles de Fstl1. Cuando intentamos analizar los niveles de Fstl1 en ausencia de Ccdc28b no contábamos con el modelo murino *Ccdc28b -/-*. Por lo tanto, solo pudimos disminuir la expresión de Ccdc28b utilizando ARNi. Intentamos realizar un *knockdown* de *Ccdc28b* tanto en células murinas como humanas, pero no

logramos ver cambios en los niveles de Fstl1. Dado que la eficiencia del *knockdown* de *Ccdc28b* no fue del 100% en ningún caso, será importante retomar estos experimentos utilizando células provenientes de los ratones *Ccdc28b -/-*. Algo similar ocurrió con la evaluación del proceso de adipogénesis. La falta de un ARNi que disminuyera eficientemente los niveles de ARNm de *Ccdc28b* nos impidió corroborar si los fenotipos observados en la diferenciación hacia adipocitos de células *Bbs4 -/-* era modificados de alguna forma por una intervención en *Ccdc28b*. Como ya fue mencionado, en las primeras diferenciaciones realizadas utilizando MEFs provenientes de los ratones *Ccdc28b -/-*, no observamos diferencias en los niveles de diferenciación comparando con MEFs *Ccdc28b +/+*. Será interesante evaluar si utilizando preadipocitos de estos mismos ratones se observan los mismos resultados. A futuro además, será importante evaluar si los niveles de Ccdc28b pueden modular el fenotipo de diferenciación causado por la ausencia de Bbs4. Para eso será importante contar con una colonia de ratones *Bbs4 -/- / Ccdc28b -/-* o *Bbs4 -/- / Ccdc28b +/-*. Generar estos dobles mutantes permitirá lograr un modelo murino genéticamente similar a lo que se ha reportado en algunos pacientes BBS, donde se demostró que una bajada en los niveles de CCDC28B afecta la penetrancia y expresividad de distintos fenotipos. El trabajo de caracterización en profundidad de los modelos murinos individuales (*Bbs4 -/-* y *Ccdc28b -/-*) resultará fundamental para poder analizar un posible efecto modificador de Ccdc28b. De esta manera, si bien durante este trabajo no llegamos a obtener información directa del vínculo funcional de Bbs4 y Ccdc28b en el desarrollo de los fenotipos estudiados, conseguimos generar herramientas que permitirán obtener esas respuestas.

***Perspectivas generales.***

Por un lado, y ante resultados *a priori* contradictorios en cuanto a la presentación o no de un fenotipo saludable de obesidad en el modelo *Bbs4 -/-*, surge como posibilidad el evaluar alternativas para los cambios metabólicos observados en estos ratones. Por ejemplo, será interesante estudiar en profundidad el gasto energético. Sabemos que el gasto energético del individuo se define por la Tasa Metabólica de Reposo (TMR) y por su actividad física. Esta última sabemos, por reportes previos, que es igual en *Bbs4 -/-* y *Bbs4 +/+* (Rahmouni et al., 2008). Nos falta sin embargo información sobre la Tasa Metabólica de Reposo, la cual con la infraestructura adecuada sería interesante estudiar. En este sentido es bueno aclarar que de forma muy preliminar, y con un *n* reducido, se tomaron fotos térmicas tanto de animales *Bbs4 -/-* como *Bbs4 +/+* donde no se observaron grandes diferencias. También quisiera destacar la importancia de los experimentos de citometría de flujo planteados

previamente. Tanto las MEFs como las SVCs son poblaciones heterogéneas de células, y por lo tanto pueden alcanzar niveles de diferenciación variables, inclusive dentro de una misma placa, o de un experimento a otro. Esto hace que potencialmente se pierda información (o se minimicen cambios) al analizar cada placa de cultivo como si fuera una población uniforme. Al extraer ARN o proteínas de esa placa, lo hacemos del total de células, diferenciadas en distinto grado e inclusive no diferenciadas. Por esto es por lo que nos propusimos poner a punto el trabajo con adipocitos diferenciados utilizando citometría de flujo a través del cual conseguimos llegar a un protocolo que permitirá, no solo estudiar más en detalle el proceso de diferenciación, caracterizando morfológicamente a los adipocitos maduros, sino también seleccionar esas poblaciones para poder compararlas entre los diferentes genotipos con la certeza de estar comparando la misma población de células.

A través de una colaboración con el Dr. Leonel Malacrida (Depto. De Fisiopatología, UMAB, Facultad de Medicina) y la Dra. Belén Torrado (Laboratory for Fluorescence Dynamics, Universidad de California, Irvine), se podrá realizar por microscopía una caracterización de las gotas lipídicas en la diferenciación hacia adipocitos de las células *Bbs4 -/-*. La idea detrás de esta colaboración es lograr cuantificar el número y tamaño de gotas lipídicas en cada célula diferenciada mediante medidas de tercer armónico utilizando un microscopio DIVER (*Deep Imaging Via Emission Recovery*). En el marco de esta tesis se obtuvieron algunos resultados preliminares, correspondientes a MEFs diferenciadas (*Bbs4 -/-* y *Bbs4 +/+*), que muestran que las MEFs *Bbs4 -/-* presentan gotas lipídicas más grandes que las MEFs *Bbs4 +/+*. De todas formas, este es un primer resultado preliminar que deberá repetirse y confirmarse a futuro.

Finalmente, ya se encuentra en desarrollo la colonia *Bbs4 +/-* / *Ccdc28b -/-* en la UBAL del IPMon. La obtención de este modelo permitirá finalizar los estudios concernientes a la interacción entre *Bbs4-Ccdc28b in vivo*. Si bien el cruce de ambas colonias no pudo ser abarcado en este trabajo, creemos que se logró avanzar significativamente en el conocimiento y caracterización de cada una de las cepas individuales, resultados que serán críticos para analizar los resultados en el doble mutante.

## ***Conclusiones finales.***

Durante el desarrollo de esta tesis, logramos generar un modelo animal nuevo para el gen *Ccdc28b*, para el cual no existen modelos alternativos. Así mismo, pudimos hacer una caracterización fenotípica profunda, identificando un vínculo previamente desconocido entre este gen y el desarrollo de fenotipos comportamentales del espectro autista (Fabregat et al., 2022). En referencia al modelo

*Bbs4 -/-*, que ya había sido descrito previamente, logramos establecerlo en nuestro instituto, y caracterizarlo en lo que respecta al fenotipo de obesidad. Fruto de estos análisis, hemos confirmado algunas características ya descritas, y hemos profundizado en el conocimiento del modelo reportando diferencias en el manejo de la glucosa, el proceso de adipogénesis y la penetrancia con la que estos fenotipos se presentan según el sexo.

Este trabajo nos ha permitido abordar ambos modelos con amplitud de técnicas, desde moleculares, hasta comportamentales, lo cual ha enriquecido las herramientas del laboratorio a la hora de responder preguntas científicas, ha fortalecido colaboraciones científicas y ha ampliado nuestra visión sobre el abanico de fenotipos que caracterizan a las ciliopatías

# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerles a José y a Florencia. Ellos confiaron en mí y me abrieron las puertas del laboratorio hace exactamente nueve años en un momento muy particular de mi vida y de mi vínculo con la ciencia. Si no fuera por ellos seguramente hoy mi vida correría por otro camino y les estaré siempre agradecidos. Me devolvieron el gusto por hacer ciencia, contagiando su pasión por la vocación en cada reunión y en cada charla. Siempre fueron ese motor que uno necesita para continuar superándose, aprendiendo cosas nuevas y planteándose nuevos desafíos, cuando no fue la cristalografía, fue el manejo de animales y luego el desafió de un postdoc fuera del país. Siempre apoyando, siempre aconsejando y transmitiendo la confianza necesaria para encarar cada desafío.

Como jefes de grupo siempre pusieron por delante lo humano y como consecuencia lograron formar un grupo de trabajo hermoso a quienes también quiero agradecer muchísimo. De todas me llevo algo. Rossina, Belén, Male, Pao, Victoria, Maru, Lucía e Ilieana, todas aportaron algo, no solo a este trabajo, sino también a mí en lo personal para seguir creciendo y ser, o intentar ser al menos, un poquito mejor de lo que era allá por el 2013 cuando llegué a GMH.

A todo el laboratorio de PME, en especial a Carlos, Karina, Leo y Laura. Ellos fueron parte fundamental de este trabajo. Fueron el faro de GMH en este camino hacia el trabajo con animales de experimentación, algo en lo que el laboratorio no tenía mucha experiencia hasta ese momento.

A la salita y todos los compañeros de PME y LIRI que la forman. Ese espacio de trabajo y catarsis comunitaria en el que se celebraron tantos logros en conjunto como se le echó bronca a los malos resultados… bueno, probablemente bastante más de los últimos, pero ¡qué importante es no sentirse solo en esos momentos!

A todos los laboratorios y todos los compañeros del IP a quienes no quiero nombrar por miedo a olvidar a alguno. Creo que en algún momento de este trabajo pase por todos o casi todos los laboratorios del Instituto, al menos a pedir un reactivo.

A todos los compañeros de las áreas de apoyo del IP, fundamentales para que el instituto funcione de la manera que lo hace y nosotros podamos trabajar con todas las comodidades posibles.

A Los Galácticos y todos los miembros del Fútbol 5 de los miércoles. Ese espacio tan hermoso de pertenencia y de inclusión dentro del instituto, donde no hubo ni una sola área, ni un solo escalafón jerárquico del IP que no estuviera representado. El cable a tierra de todas las semanas.

A mi actual jefe, Andrea, quien también apostó por mí en un desafió enorme como lo es para su nuevo laboratorio y para mí la primera salida del país para hacer ciencia. Además de apoyarme, cuando no tenía por qué hacerlo, de todas las maneras que pudo para que cerrara este capítulo de mi vida de la mejor forma posible.

Al tribunal, los doctores Adriana Cassina, Paola Contreras y Sergio Gradilone, por tomarse el tiempo y el trabajo de corregir esta tesis.

A mis amigos: en especial a Dani, Gonza, los QDR y la generación dorada del atletismo de Sporting, así como son parte de mi vida, son parte de esto también. Entendiendo más o entendiendo menos sobre lo que hago, siempre se toman su tiempo para preguntar, felicitar o apoyar en cada desafío. Los quiero… y los extraño más de lo que se los digo.

A mis padres, mi hermana y a mi abuela, sin demerito a los antes mencionados, los más culpables de que hoy sea lo que soy. En Uruguay, en Canadá o ahora en Estados Unidos, donde sea y desde siempre me inculcaron la pasión por pelear por lo que quiero, sin miedo a lo que pase o a lo que digan.

A Marian, quien apareció para mostrarme que no me las se todas y que eso está bien. La mejor compañera que podía haber elegido para esta aventura. Además de hacerme mejor persona, me hacés mejor científico.

Finalmente, agradecer también a las agencias financiadoras que me apoyaron durante este trabajo: la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y la Comisión Académica de Posgrados (CAP), con becas de Doctorado y de Finalización de Doctorado, respectivamente.

A todos ustedes, muchas gracias.

# BIBLIOGRAFÍA


Abbott, W. G., Howard, B. V., Christin, L., Freymond, D., Lillioja, S., Boyce, V. L., . . . Ravussin, E. (1988). Short-term energy balance: relationship with protein, carbohydrate, and fat balances. *Am J Physiol*, *255*(3 Pt 1), E332-337. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1988.255.3.E332

Agassandian, K., Patel, M., Agassandian, M., Steren, K. E., Rahmouni, K., Sheffield, V. C., & Card, J. P. (2014). Ciliopathy Is Differentially Distributed in the Brain of a Bardet-Biedl Syndrome Mouse Model. *PLoS ONE*, *9*(4), e93484. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093484

Aguilar-Salinas, C. A., García, E. G., Robles, L., Riaño, D., Ruiz-Gomez, D. G., García-Ulloa, A. C., . . . Gómez-Pérez, F. J. (2008). High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*, *93*(10), 4075-4079. https://doi.org/10.1210/jc.2007-2724

Aksanov, O., Green, P., & Birk, R. Z. (2014). BBS4 directly affects proliferation and differentiation of adipocytes. *Cell Mol Life Sci*, *71*(17), 3381-3392. https://doi.org/10.1007/s00018-014-1571-x

Al-Sayegh, M., Ali, H., Jamal, M. H., Elgindi, M., Chanyong, T., Al-Awadi, K., & Abu-Farha, M. (2021). Mouse Embryonic Fibroblast Adipogenic Potential: A Comprehensive Transcriptome Analysis. *Adipocyte*, *10*(1), 1-20. https://doi.org/10.1080/21623945.2020.1859789

Aleman, T. S., Miller, A. J., Maguire, K. H., Aleman, E. M., Serrano, L. W., O'Connor, K. B., . . . Bennett, J. (2021). A Virtual Reality Orientation and Mobility Test for Inherited Retinal Degenerations: Testing a Proof-of-Concept After Gene Therapy. *Clin Ophthalmol*, *15*, 939-952. https://doi.org/10.2147/OPTH.S292527

Almind, K., & Kahn, C. R. (2004). Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes*, *53*(12), 3274-3285. https://doi.org/10.2337/diabetes.53.12.3274

Ansley, S. J., Badano, J. L., Blacque, O. E., Hill, J., Hoskins, B. E., Leitch, C. C., . . . Katsanis, N. (2003). Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature*, *425*(6958), 628-633. https://doi.org/10.1038/nature02030

Bachmanov, A. A., Reed, D. R., Tordoff, M. G., Price, R. A., & Beauchamp, G. K. (2001). Nutrient preference and diet-induced adiposity in C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *Physiol Behav*, *72*(4), 603-613.

Badano, J. L., & Katsanis, N. (2002). Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. *Nat Rev Genet*, *3*(10), 779-789. https://doi.org/10.1038/nrg910

Badano, J. L., Leitch, C. C., Ansley, S. J., May-Simera, H., Lawson, S., Lewis, R. A., . . . Katsanis, N. (2006). Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature*, *439*(7074), 326-330. https://doi.org/10.1038/nature04370

Baglioni, S., Cantini, G., Poli, G., Francalanci, M., Squecco, R., Di Franco, A., . . . Luconi, M. (2012). Functional Differences in Visceral and Subcutaneous Fat Pads Originate from Differences in the Adipose Stem Cell. *PLoS ONE*, *7*(5), e36569. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036569

Bardet, G. (1920). *Sur un syndrome d'obestie infantile avec polydactylie et rétinite pigmentaire (contribution a l'étude des formes cliniques de l'obésité hypophysaire).* Sorbonne University of Paris]. Paris.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., . . . Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. https://doi.org/10.1126/science.1138140

Bastard, J. P., & Fève, B. (2013). *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue*. Springer, Paris. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0343-2

Beales, P. L., Badano, J. L., Ross, A. J., Ansley, S. J., Hoskins, B. E., Kirsten, B., . . . Katsanis, N. (2003). Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *American journal of human genetics*, *72*(5). https://doi.org/10.1086/375178

Beales, P. L., Elcioglu, N., Woolf, A. S., Parker, D., & Flinter, F. A. (1999). New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *Journal of medical genetics*, *36*(6).

Benzinou, M., Walley, A., Lobbens, S., Charles, M. A., Jouret, B., Fumeron, F., . . . Froguel, P. (2006). Bardet-Biedl syndrome gene variants are associated with both childhood and adult common obesity in French Caucasians. *Diabetes*, *55*(10), 2876-2882. https://doi.org/10.2337/db06-0337

Berbari, N. F., Lewis, J. S., Bishop, G. A., Askwith, C. C., & Mykytyn, K. (2008). Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(11), 4242-4246. https://doi.org/10.1073/pnas.0711027105

Berbari, N. F., Pasek, R. C., Malarkey, E. B., Yazdi, S. M. Z., Mcnair, A. D., Lewis, W. R., . . . Yoder, B. K. (2013). Leptin resistance is a secondary consequence of the obesity in ciliopathy mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(19), 7796-7801. https://doi.org/10.1073/pnas.1210192110

Bergman, R. N. (1989). Lilly lecture 1989. Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. *Diabetes*, *38*(12), 1512-1527. https://doi.org/10.2337/diab.38.12.1512

Bergmann, C. (2012). Ciliopathies. *European Journal of Pediatrics*, *171*(9), 1285-1300. https://doi.org/10.1007/s00431-011-1553-z

Biedl, A. (1922). Ein geschwisterpaar mit adiposo-genitaler dystrophie. *Deutsch Med Wochenschr*, *48*(1630).

Bilal, M., Nawaz, A., Kado, T., Aslam, M. R., Igarashi, Y., Nishimura, A., . . . Tobe, K. (2021). Fate of adipocyte progenitors during adipogenesis in mice fed a high-fat diet. *Mol Metab*, *54*, 101328. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101328

Bloodgood, R. A. (2010). Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia. *J Cell Sci*, *123*(Pt 4), 505-509. https://doi.org/10.1242/jcs.066308

Blüher, M. (2014). Are metabolically healthy obese individuals really healthy? *Eur J Endocrinol*, *171*(6), R209-219. https://doi.org/10.1530/EJE-14-0540

Blüher, M. (2020). Metabolically Healthy Obesity. *Endocr Rev*, *41*(3). https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa004

Bouchard, C., Tremblay, A., Nadeau, A., Després, J. P., Thériault, G., Boulay, M. R., . . . Fournier, G. (1989). Genetic effect in resting and exercise metabolic rates. *Metabolism*, *38*(4), 364-370. https://doi.org/10.1016/0026-0495(89)90126-1

Bray, G. A., & Bouchard, C. (2014). *Handbook of Obesity: Epidemiology, Etiology and Physiopathology.* CRC Press.

Brooks, H. L., Pollow, D. P., & Hoyer, P. B. (2016). The VCD Mouse Model of Menopause and Perimenopause for the Study of Sex Differences in Cardiovascular Disease and the Metabolic Syndrome. *Physiology*, *31*(4), 250-257. https://doi.org/10.1152/physiol.00057.2014

Bruce, C. R., Hamley, S., Ang, T., Howlett, K. F., Shaw, C. S., & Kowalski, G. M. (2021). Translating glucose tolerance data from mice to humans: Insights from stable isotope labelled glucose tolerance tests. *Mol Metab*, *53*, 101281. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101281

Buss, J. (2014). Limitations of Body Mass Index to Assess Body Fat. *Workplace Health & Safety*, *62*(6), 264-264. https://doi.org/10.1177/216507991406200608

Camporez, J. P., Lyu, K., Goldberg, E. L., Zhang, D., Cline, G. W., Jurczak, M. J., . . . Shulman, G. I. (2019). Anti-inflammatory effects of oestrogen mediate the sexual dimorphic response to lipid-induced insulin resistance. *The Journal of Physiology*, *597*(15), 3885-3903. https://doi.org/10.1113/jp277270

Cardenas-Rodriguez, M., & Badano, J. L. (2009). Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, *151C*(4), 263-280. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30227

Cardenas-Rodriguez, M., Irigoín, F., Osborn, D. P., Gascue, C., Katsanis, N., Beales, P. L., & Badano, J. L. (2013). The Bardet-Biedl syndrome-related protein CCDC28B modulates mTORC2 function and interacts with SIN1 to control cilia length independently of the mTOR complex. *Hum Mol Genet*, *22*(20), 4031-4042. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt253

Cardenas-Rodriguez, M., Osborn, D. P., Irigoín, F., Graña, M., Romero, H., Beales, P. L., & Badano, J. L. (2013). Characterization of CCDC28B reveals its role in ciliogenesis and provides insight to understand its modifier effect on Bardet-Biedl syndrome. *Hum Genet*, *132*(1), 91-105. https://doi.org/10.1007/s00439-012-1228-5

Cawthorn, W. P., Scheller, E. L., & MacDougald, O. A. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res*, *53*(2), 227-246. https://doi.org/10.1194/jlr.R021089

Ceccaldi, R., Rondinelli, B., & D'Andrea, A. D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol*, *26*(1), 52-64. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009

Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., & Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *18*(8), 495-506. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48

Chatterjee, S. S., Guha, P., Talukdar, A., & Dasgupta, G. (2014). Autism: a rare presentation of Bardet-Biedl syndrome. *BMJ Case Rep*, *2014*. https://doi.org/10.1136/bcr-2014-203882

Chou, H. T., Apelt, L., Farrell, D. P., White, S. R., Woodsmith, J., Svetlov, V., . . . Walz, T. (2019). The Molecular Architecture of Native BBSome Obtained by an Integrated Structural Approach. *Structure*, *27*(9), 1384-1394.e1384. https://doi.org/10.1016/j.str.2019.06.006

Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. (1998). *Obes Res*, *6 Suppl 2*, 51S-209S.

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., . . . Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6121). https://doi.org/10.1126/science.1231143

Consugar, M. B., Kubly, V. J., Lager, D. J., Hommerding, C. J., Wong, W. C., Bakker, E., . . . Harris, P. C. (2007). Molecular diagnostics of Meckel-Gruber syndrome highlights phenotypic differences between MKS1 and MKS3. *Hum Genet*, *121*(5), 591-599. https://doi.org/10.1007/s00439-007-0341-3

Cornier, M. A., Després, J. P., Davis, N., Grossniklaus, D. A., Klein, S., Lamarche, B., . . . Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, a. S. C. (2011). Assessing adiposity: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, *124*(18), 1996-2019. https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e318233bc6a

Czarnecki, P. G., & Shah, J. V. (2012). The ciliary transition zone: from morphology and molecules to medicine. *Trends Cell Biol*, *22*(4), 201-210. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.02.001

Davenport, J. R., Watts, A. J., Roper, V. C., Croyle, M. J., van Groen, T., Wyss, J. M., . . . Yoder, B. K. (2007). Disruption of Intraflagellar Transport in Adult Mice Leads to Obesity and Slow-Onset Cystic Kidney Disease. *Current biology : CB*, *17*(18). https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.034

Davis, E. E., & Katsanis, N. (2012). The ciliopathies: a transitional model into systems biology of human genetic disease. *Current opinion in genetics & development*, *22*(3). https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.04.006

DeFronzo, R. A. (1988). Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*, *37*(6), 667-687. https://doi.org/10.2337/diab.37.6.667

Della Vedova, M. C., Muñoz, M. D., Santillan, L. D., Plateo-Pignatari, M. G., Germanó, M. J., Rinaldi Tosi, M. E., . . . Ramirez, D. C. (2016). A Mouse Model of Diet-Induced Obesity Resembling Most Features of Human Metabolic Syndrome. *Nutr Metab Insights*, *9*, 93-102. https://doi.org/10.4137/NMI.S32907

Dixon, J., & O' Brien, P. (2006). Obesity and the White Blood Cell Count: Changes with Sustained Weight Loss. *Obesity Surgery*, *16*(3), 251-257. https://doi.org/10.1381/096089206776116453

Eichers, E. R., Abd-El-Barr, M. M., Paylor, R., Lewis, R. A., Bi, W., Lin, X., . . . Lupski, J. R. (2006). Phenotypic characterization of Bbs4 null mice reveals age-dependent penetrance and variable expressivity. *Hum Genet*, *120*(2), 211-226. https://doi.org/10.1007/s00439-006-0197-y

Elbers, J. M., Haumann, G., Asscheman, H., Seidell, J. C., & Gooren, L. J. (1997). Reproducibility of fat area measurements in young, non-obese subjects by computerized analysis of magnetic resonance images. *Int J Obes Relat Metab Disord*, *21*(12), 1121-1129. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800525

Escande, C., Nin, V., Pirtskhalava, T., Chini, C. C., Tchkonia, T., Kirkland, J. L., & Chini, E. N. (2015). Deleted in breast cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype. *Diabetes*, *64*(1), 12-22. https://doi.org/10.2337/db14-0192

Expert Panel on Detection, E. a., and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. (2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, *285*(19), 2486-2497. https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486

Fabregat, M., Niño-Rivero, S., Pose, S., Cárdenas-Rodríguez, M., Bresque, M., Hernández, K., . . . Badano, J. L. (2022). Generation and characterization of Ccdc28b mutant mice links the Bardet-Biedl associated gene with mild social behavioral phenotypes. *PLoS Genet*, *18*(6), e1009896. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009896

Fath, M. A., Mullins, R. F., Searby, C., Nishimura, D. Y., Wei, J., Rahmouni, K., . . . Sheffield, V. C. (2005). Mkks-null mice have a phenotype resembling Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet*, *14*(9), 1109-1118. https://doi.org/10.1093/hmg/ddi123

Feuillan, P. P., Ng, D., Han, J. C., Sapp, J. C., Wetsch, K., Spaulding, E., . . . Biesecker, L. G. (2011). Patients with Bardet-Biedl syndrome have hyperleptinemia suggestive of leptin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, *96*(3), E528-535. https://doi.org/10.1210/jc.2010-2290

Fisch, C., & Dupuis-Williams, P. (2011). Ultrastructure of cilia and flagella - back to the future! *Biol Cell*, *103*(6), 249-270. https://doi.org/10.1042/BC20100139

Forsythe, E., & Beales, P. L. (2013). Bardet-Biedl syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*, *21*(1). https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.115

Forsythe, E., Kenny, J., Bacchelli, C., & Beales, P. L. (2018). Managing Bardet-Biedl Syndrome-Now and in the Future. *Front Pediatr*, *6*, 23. https://doi.org/10.3389/fped.2018.00023

Frayn, K. N. (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia*, *45*(9), 1201-1210. https://doi.org/10.1007/s00125-002-0873-y

Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, *395*(6704), 763-770. https://doi.org/10.1038/27376

Gannon, M., Kulkarni, R. N., Tse, H. M., & Mauvais-Jarvis, F. (2018). Sex differences underlying pancreatic islet biology and its dysfunction. *Mol Metab*, *15*, 82-91. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.017

Gerdes, J. M., Christou-Savina, S., Xiong, Y., Moede, T., Moruzzi, N., Karlsson-Edlund, P., . . . Berggren, P. O. (2014). Ciliary dysfunction impairs beta-cell insulin secretion and promotes development of type 2 diabetes in rodents. *Nat Commun*, *5*, 5308. https://doi.org/10.1038/ncomms6308

Gerdes, J. M., & Katsanis, N. (2008). Ciliary function and Wnt signal modulation. *Curr Top Dev Biol*, *85*, 175-195. https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00807-7

Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(4), 242-258. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z

Goetz, S. C., & Anderson, K. V. (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet*, *11*(5), 331-344. https://doi.org/10.1038/nrg2774

Guide for the care and use of laboratory animals. (2011). In N. A. Press (Ed.), (8th ed.). Washington DC, United States of America: National Academies Press.

Guo, D. F., Cui, H., Zhang, Q., Morgan, D. A., Thedens, D. R., Nishimura, D., . . . Rahmouni, K. (2016). The BBSome Controls Energy Homeostasis by Mediating the Transport of the Leptin Receptor to the Plasma Membrane. *PLoS Genet*, *12*(2), e1005890. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005890

Heikkinen, S., Argmann, C. A., Champy, M. F., & Auwerx, J. (2007). Evaluation of Glucose Homeostasis. *Current Protocols in Molecular Biology*, *77*(1). https://doi.org/10.1002/0471142727.mb29b03s77

Heon, E., Kim, G., Qin, S., Garrison, J. E., Tavares, E., Vincent, A., . . . Sheffield, V. C. (2016). Mutations in C8ORF37 Cause Bardet Biedl Syndrome (BBS21). *Human molecular genetics*, *25*(11). https://doi.org/10.1093/hmg/ddw096

Hirokawa, N., Noda, Y., & Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr Opin Cell Biol*, *10*(1), 60-73. https://doi.org/10.1016/s0955-0674(98)80087-2

Irigoín, F., & Badano, J. L. (2011). Keeping the balance between proliferation and differentiation: the primary cilium. *Curr Genomics*, *12*(4), 285-297. https://doi.org/10.2174/138920211795860134

Jain, R., Javidan-Nejad, C., Alexander-Brett, J., Horani, A., Cabellon, M. C., Walter, M. J., & Brody, S. L. (2012). Sensory functions of motile cilia and implication for bronchiectasis. *Front Biosci (Schol Ed)*, *4*(3), 1088-1098. https://doi.org/10.2741/s320

Jeffery, E., Wing, A., Holtrup, B., Sebo, Z., Kaplan, J. L., Saavedra-Peña, R., . . . Rodeheffer, M. S. (2016). The Adipose Tissue Microenvironment Regulates Depot-Specific Adipogenesis in Obesity. *Cell Metab*, *24*(1), 142-150. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.012

Jin, H., White, S. R., Shida, T., Schulz, S., Aguiar, M., Gygi, S. P., . . . Nachury, M. V. (2010). The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. *Cell*, *141*(7), 1208-1219. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.015

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable dual-RNA-guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (New York, N.Y.)*, *337*(6096). https://doi.org/10.1126/science.1225829

Joukov, V., & De Nicolo, A. (2019). The Centrosome and the Primary Cilium: The Yin and Yang of a Hybrid Organelle. *Cells*, *8*(7). https://doi.org/10.3390/cells8070701
Jung, C. H., Lee, W. J., & Song, K. H. (2017). Metabolically healthy obesity: a friend or foe? *Korean J Intern Med*, *32*(4), 611-621. https://doi.org/10.3904/kjim.2016.259
Kalliokoski, O., Jacobsen, K. R., Darusman, H. S., Henriksen, T., Weimann, A., Poulsen, H. E., . . . Abelson, K. S. P. (2013). Mice Do Not Habituate to Metabolism Cage Housing–A Three Week Study of Male BALB/c Mice. *PLoS ONE*, *8*(3), e58460. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058460
Kantartzis, K., Machann, J., Schick, F., Rittig, K., Machicao, F., Fritsche, A., . . . Stefan, N. (2011). Effects of a lifestyle intervention in metabolically benign and malign obesity. *Diabetologia*, *54*(4), 864-868. https://doi.org/10.1007/s00125-010-2006-3
Karelis, A. D., Brochu, M., & Rabasa-Lhoret, R. (2004). Can we identify metabolically healthy but obese individuals (MHO)? *Diabetes Metab*, *30*(6), 569-572. https://doi.org/10.1016/s1262-3636(07)70156-8
Katsanis, N., Lupski, J. R., & Beales, P. L. (2001). Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Human molecular genetics*, *10*(20). https://doi.org/10.1093/hmg/10.20.2293
Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*, *320*(3), C375-C391. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020
Keller, M. P., Choi, Y., Wang, P., Davis, D. B., Rabaglia, M. E., Oler, A. T., . . . Attie, A. D. (2008). A gene expression network model of type 2 diabetes links cell cycle regulation in islets with diabetes susceptibility. *Genome Res*, *18*(5), 706-716. https://doi.org/10.1101/gr.074914.107
Kerr, E. N., Bhan, A., & Héon, E. (2016). Exploration of the cognitive, adaptive and behavioral functioning of patients affected with Bardet-Biedl syndrome. *Clin Genet*, *89*(4), 426-433. https://doi.org/10.1111/cge.12614
Kim, J. C., Badano, J. L., Sibold, S., Esmail, M. A., Hill, J., Hoskins, B. E., . . . Beales, P. L. (2004). The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet*, *36*(5), 462-470. https://doi.org/10.1038/ng1352
Kim, J. C., Ou, Y. Y., Badano, J. L., Esmail, M. A., Leitch, C. C., Fiedrich, E., . . . Leroux, M. R. (2005). MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis. *J Cell Sci*, *118*(Pt 5), 1007-1020. https://doi.org/10.1242/jcs.01676
Kim, J. K., Kim, Y. J., Fillmore, J. J., Chen, Y., Moore, I., Lee, J., . . . Shulman, G. I. (2001). Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest*, *108*(3), 437-446. https://doi.org/10.1172/JCI11559
Kissebah, A. H., & Krakower, G. R. (1994). Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev*, *74*(4), 761-811. https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.4.761
Koh, K. K., Han, S. H., & Quon, M. J. (2005). Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol*, *46*(11), 1978-1985. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.06.082
Kuzhandaivel, A., Schultz, S. W., Alkhori, L., & Alenius, M. (2014). Cilia-mediated hedgehog signaling in Drosophila. *Cell Rep*, *7*(3), 672-680. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.052
Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*, *122*(Pt 20), 3589-3594. https://doi.org/10.1242/jcs.051011
Lee, B. H., Liu, J., Wong, D., Srinivasan, S., & Ashrafi, K. (2011). Hyperactive Neuroendocrine Secretion Causes Size, Feeding, and Metabolic Defects of C. elegans Bardet-Biedl

Syndrome Mutants. *PLoS Biology*, *9*(12), e1001219. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001219
Leitch, C. C., Lodh, S., Prieto-Echagüe, V., Badano, J. L., & Zaghloul, N. A. (2014). Basal body proteins regulate Notch signaling through endosomal trafficking. *J Cell Sci*, *127*(Pt 11), 2407-2419. https://doi.org/10.1242/jcs.130344
Leitch, C. C., & Zaghloul, N. A. (2014). BBS4 is necessary for ciliary localization of TrkB receptor and activation by BDNF. *PLoS One*, *9*(5), e98687. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098687
Leitch, C. C., Zaghloul, N. A., Davis, E. E., Stoetzel, C., Diaz-Font, A., Rix, S., . . . Katsanis, N. (2008). Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet*, *40*(4), 443-448. https://doi.org/10.1038/ng.97
Lodh, S., Hostelley, T. L., Leitch, C. C., O'Hare, E. A., & Zaghloul, N. A. (2016). Differential effects on β-cell mass by disruption of Bardet-Biedl syndrome or Alstrom syndrome genes. *Hum Mol Genet*, *25*(1), 57-68. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv447
Loktev, A. V., & Jackson, P. K. (2013). Neuropeptide Y family receptors traffic via the Bardet-Biedl syndrome pathway to signal in neuronal primary cilia. *Cell Rep*, *5*(5), 1316-1329. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.011
Loktev, A. V., Zhang, Q., Beck, J. S., Searby, C. C., Scheetz, T. E., Bazan, J. F., . . . Nachury, M. V. (2008). A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation. *Dev Cell*, *15*(6), 854-865. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.11.001
Lu, Q., Li, M., Zou, Y., & Cao, T. (2014). Induction of adipocyte hyperplasia in subcutaneous fat depot alleviated type 2 diabetes symptoms in obese mice. *Obesity*, *22*(7), 1623-1631. https://doi.org/10.1002/oby.20705
Lönnqvist, F., Nordfors, L., Jansson, M., Thörne, A., Schalling, M., & Arner, P. (1997). Leptin secretion from adipose tissue in women. Relationship to plasma levels and gene expression. *J Clin Invest*, *99*(10), 2398-2404. https://doi.org/10.1172/JCI119422
Machann, J., Thamer, C., Schnoedt, B., Haap, M., Haring, H. U., Claussen, C. D., . . . Schick, F. (2005). Standardized assessment of whole body adipose tissue topography by MRI. *J Magn Reson Imaging*, *21*(4), 455-462. https://doi.org/10.1002/jmri.20292
Mariman, E. C., & Wang, P. (2010). Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci*, *67*(8), 1277-1292. https://doi.org/10.1007/s00018-010-0263-4
Marion, V., Mockel, A., De Melo, C., Obringer, C., Claussmann, A., Simon, A., . . . Dollfus, H. (2012). BBS-induced ciliary defect enhances adipogenesis, causing paradoxical higher-insulin sensitivity, glucose usage, and decreased inflammatory response. *Cell Metab*, *16*(3), 363-377. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.005
Marion, V., Stoetzel, C., Schlicht, D., Messaddeq, N., Koch, M., Flori, E., . . . Dollfus, H. (2009). Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation. In *Proc Natl Acad Sci U S A* (Vol. 106, pp. 1820-1825). https://doi.org/10.1073/pnas.0812518106
Marshall, W. F. (2008). Basal bodies platforms for building cilia. *Curr Top Dev Biol*, *85*, 1-22. https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00801-6
Meigs, J. B., Wilson, P. W., Fox, C. S., Vasan, R. S., Nathan, D. M., Sullivan, L. M., & D'Agostino, R. B. (2006). Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*, *91*(8), 2906-2912. https://doi.org/10.1210/jc.2006-0594
Metabolic Basis of Obesity. (2011). In (pp. XIV, 391). New York, NY: Springer
Mitchison, H. M., & Valente, E. M. (2017). Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *J Pathol*, *241*(2), 294-309. https://doi.org/10.1002/path.4843

Mokdad, A. H., Ford, E. S., Bowman, B. A., Dietz, W. H., Vinicor, F., Bales, V. S., & Marks, J. S. (2003). Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA*, *289*(1), 76-79. https://doi.org/10.1001/jama.289.1.76

Mokrzan, E. M., Lewis, J. S., & Mykytyn, K. (2007). Differences in renal tubule primary cilia length in a mouse model of Bardet-Biedl syndrome. *Nephron Exp Nephrol*, *106*(3), e88-96. https://doi.org/10.1159/000103021

Montagutelli, X. (2000). Effect of the Genetic Background on the Phenotype of Mouse Mutations. *Journal of the American Society of Nephrology*, *11*(suppl 2), S101-S105. https://doi.org/10.1681/asn.v11suppl_2s101

Moran, D. T., Rowley, J. C., Jafek, B. W., & Lovell, M. A. (1982). The fine structure of the olfactory mucosa in man. *J Neurocytol*, *11*(5), 721-746. https://doi.org/10.1007/BF01153516

Mykytyn, K., Mullins, R. F., Andrews, M., Chiang, A. P., Swiderski, R. E., Yang, B., . . . Sheffield, V. C. (2004). Bardet-Biedl syndrome type 4 (BBS4)-null mice implicate Bbs4 in flagella formation but not global cilia assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(23), 8664-8669. https://doi.org/10.1073/pnas.0402354101

Nachury, M. V. (2014). How do cilia organize signalling cascades? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1650), 20130465. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0465

Nachury, M. V., Loktev, A. V., Zhang, Q., Westlake, C. J., Peränen, J., Merdes, A., . . . Jackson, P. K. (2007). A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell*, *129*(6), 1201-1213. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.053

Nakayama, K., & Katoh, Y. (2020). Architecture of the IFT ciliary trafficking machinery and interplay between its components. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, *55*(2), 179-196. https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1768206

Naukkarinen, J., Heinonen, S., Hakkarainen, A., Lundbom, J., Vuolteenaho, K., Saarinen, L., . . . Pietiläinen, K. H. (2014). Characterising metabolically healthy obesity in weight-discordant monozygotic twins. *Diabetologia*, *57*(1), 167-176. https://doi.org/10.1007/s00125-013-3066-y

Neeland, I. J., Ross, R., Després, J. P., Matsuzawa, Y., Yamashita, S., Shai, I., . . . Obesity, I. C. o. C. R. W. G. o. V. (2019). Visceral and ectopic fat, atherosclerosis, and cardiometabolic disease: a position statement. *Lancet Diabetes Endocrinol*, *7*(9), 715-725. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30084-1

Nishimura, D. Y., Fath, M., Mullins, R. F., Searby, C., Andrews, M., Davis, R., . . . Sheffield, V. C. (2004). Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(47), 16588-16593. https://doi.org/10.1073/pnas.0405496101

Novas, R., Cardenas-Rodriguez, M., Irigoín, F., & Badano, J. L. (2015). Bardet-Biedl syndrome: Is it only cilia dysfunction? *FEBS Lett*, *589*(22), 3479-3491. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.031

Novas, R., Cardenas-Rodriguez, M., Lepanto, P., Fabregat, M., Rodao, M., Fariello, M. I., . . . Badano, J. L. (2018). Kinesin 1 regulates cilia length through an interaction with the Bardet-Biedl syndrome related protein CCDC28B. *Sci Rep*, *8*(1), 3019. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21329-6

*Obesity ranking by country*. (2016). Retrieved 12/11/2021 from https://data.worldobesity.org/rankings/

Ocbina, P. J. R., Tuson, M., & Anderson, K. V. (2009). Primary Cilia Are Not Required for Normal Canonical Wnt Signaling in the Mouse Embryo. *PLoS ONE*, *4*(8), e6839. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006839

Oh, W. J., & Jacinto, E. (2011). mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle*, *10*(14), 2305-2316. https://doi.org/10.4161/cc.10.14.16586

Pak, T. K., Carter, C. S., Zhang, Q., Huang, S. C., Searby, C., Hsu, Y., . . . Sheffield, V. C. (2021). A mouse model of Bardet-Biedl Syndrome has impaired fear memory, which is rescued by lithium treatment. *PLoS Genet*, *17*(4), e1009484. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009484

Perez, E. E., Wang, J., Miller, J. C., Jouvenot, Y., Kim, K. A., Liu, O., . . . June, C. H. (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, *26*(7), 808-816. https://doi.org/10.1038/nbt1410

Perseghin, G. (2008). Is a nutritional therapeutic approach unsuitable for metabolically healthy but obese women? *Diabetologia*, *51*(9), 1567-1569. https://doi.org/10.1007/s00125-008-1077-x

Phillips, C. M. (2013). Metabolically healthy obesity: definitions, determinants and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord*, *14*(3), 219-227. https://doi.org/10.1007/s11154-013-9252-x

Picó, C., Palou, M., Pomar, C. A., Rodríguez, A. M., & Palou, A. (2021). Leptin as a key regulator of the adipose organ. *Rev Endocr Metab Disord*. https://doi.org/10.1007/s11154-021-09687-5

Prieto-Echagüe, V., Lodh, S., Colman, L., Bobba, N., Santos, L., Katsanis, N., . . . Badano, J. L. (2017). BBS4 regulates the expression and secretion of FSTL1, a protein that participates in ciliogenesis and the differentiation of 3T3-L1. *Sci Rep*, *7*(1), 9765. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10330-0

Pucci, G., Alcidi, R., Tap, L., Battista, F., Mattace-Raso, F., & Schillaci, G. (2017). Sex- and gender-related prevalence, cardiovascular risk and therapeutic approach in metabolic syndrome: A review of the literature. *Pharmacol Res*, *120*, 34-42. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.03.008

Pérez-Torres, I., Guarner, V., El Hafidi, M., & Baños, G. (2011). Sex hormones, metabolic syndrome and kidney. *Curr Top Med Chem*, *11*(13), 1694-1705. https://doi.org/10.2174/156802611796117577

Qureshi, K. (2007). Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, *13*(26), 3540. https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i26.3540

Rahmouni, K., Fath, M. A., Seo, S., Thedens, D. R., Berry, C. J., Weiss, R., . . . Sheffield, V. C. (2008). Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet-Biedl syndrome. *J Clin Invest*, *118*(4), 1458-1467. https://doi.org/10.1172/JCI32357

Ravussin, E., Lillioja, S., Anderson, T. E., Christin, L., & Bogardus, C. (1986). Determinants of 24-hour energy expenditure in man. Methods and results using a respiratory chamber. *J Clin Invest*, *78*(6), 1568-1578. https://doi.org/10.1172/JCI112749

Redman, L. M., Heilbronn, L. K., Martin, C. K., de Jonge, L., Williamson, D. A., Delany, J. P., . . . Team, P. C. (2009). Metabolic and behavioral compensations in response to caloric restriction: implications for the maintenance of weight loss. *PLoS One*, *4*(2), e4377. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004377

Reiter, J. F., Blacque, O. E., & Leroux, M. R. (2012). The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep*, *13*(7), 608-618. https://doi.org/10.1038/embor.2012.73

Ritter, A., Louwen, F., & Yuan, J. (2018). Deficient primary cilia in obese adipose-derived mesenchymal stem cells: obesity, a secondary ciliopathy? *Obesity Reviews*, *19*(10), 1317-1328. https://doi.org/10.1111/obr.12716

Satir, P., & Christensen, S. T. (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol*, *69*, 377-400. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236

Selman, C., & Swindell, W. R. (2018). Putting a strain on diversity. *The EMBO Journal*, *37*(22). https://doi.org/10.15252/embj.2018100862

Seo, S., Guo, D. F., Bugge, K., Morgan, D. A., Rahmouni, K., & Sheffield, V. C. (2009). Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum Mol Genet*, *18*(7), 1323-1331. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp031

Severi, C., & Moratorio, X. (2014). Double burden of undernutrition and obesity in Uruguay. *Am J Clin Nutr*, *100*(6), 1659S-1662S. https://doi.org/10.3945/ajcn.114.083808

Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C., & Crawley, J. N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci*, *11*(7), 490-502. https://doi.org/10.1038/nrn2851

Slavotinek, A., & Beales, P. (2011). Clinical utility gene card for: Bardet-Biedl syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*, *19*(3). https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.199

Smith, U. (2015). Abdominal obesity: a marker of ectopic fat accumulation. *J Clin Invest*, *125*(5), 1790-1792. https://doi.org/10.1172/JCI81507

Sookoian, S., & Pirola, C. J. (2015). Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: From systems biology to the personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology*, *21*(3), 711. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i3.711

Starks, R. D., Beyer, A. M., Guo, D. F., Boland, L., Zhang, Q., Sheffield, V. C., & Rahmouni, K. (2015). Regulation of Insulin Receptor Trafficking by Bardet Biedl Syndrome Proteins. *PLoS Genet*, *11*(6), e1005311. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005311

Stefan, N., Häring, H. U., Hu, F. B., & Schulze, M. B. (2013). Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *Lancet Diabetes Endocrinol*, *1*(2), 152-162. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70062-7

Stefan, N., Kantartzis, K., Machann, J., Schick, F., Thamer, C., Rittig, K., . . . Häring, H. U. (2008). Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch Intern Med*, *168*(15), 1609-1616. https://doi.org/10.1001/archinte.168.15.1609

Stock, M. J. (1999). Gluttony and thermogenesis revisited. *Int J Obes Relat Metab Disord*, *23*(11), 1105-1117. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801108

Stoetzel, C., Laurier, V., Davis, E. E., Muller, J., Rix, S., Badano, J. L., . . . Dollfus, H. (2006). BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet*, *38*(5), 521-524. https://doi.org/10.1038/ng1771

Stoetzel, C., Muller, J., Laurier, V., Davis, E. E., Zaghloul, N. A., Vicaire, S., . . . Dollfus, H. (2007). Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet*, *80*(1), 1-11. https://doi.org/10.1086/510256

Stowe, T. R., Wilkinson, C. J., Iqbal, A., & Stearns, T. (2012). The centriolar satellite proteins Cep72 and Cep290 interact and are required for recruitment of BBS proteins to the cilium. *Mol Biol Cell*, *23*(17), 3322-3335. https://doi.org/10.1091/mbc.E12-02-0134

Suganami, T., Yuan, X., Shimoda, Y., Uchio-Yamada, K., Nakagawa, N., Shirakawa, I., . . . Ogawa, Y. (2009). Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circ Res*, *105*(1), 25-32. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.196261

Sulik, K., Dehart, D. B., Iangaki, T., Carson, J. L., Vrablic, T., Gesteland, K., & Schoenwolf, G. C. (1994). Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev Dyn*, *201*(3), 260-278. https://doi.org/10.1002/aja.1002010309

Tchoukalova, Y. D., Koutsari, C., Votruba, S. B., Tchkonia, T., Giorgadze, N., Thomou, T., . . . Jensen, M. D. (2010). Sex- and Depot-Dependent Differences in Adipogenesis in Normal-Weight Humans. *Obesity*, *18*(10), 1875-1880. https://doi.org/10.1038/oby.2010.56

Tobin, J. L., & Beales, P. L. (2009). The nonmotile ciliopathies. *Genet Med*, *11*(6), 386-402. https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181a02882

van Vliet-Ostaptchouk, J. V., Nuotio, M. L., Slagter, S. N., Doiron, D., Fischer, K., Foco, L., . . . Wolffenbuttel, B. H. (2014). The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocr Disord*, *14*, 9. https://doi.org/10.1186/1472-6823-14-9

Varghese, M., Griffin, C., Abrishami, S., Eter, L., Lanzetta, N., Hak, L., . . . Singer, K. (2021). Sex hormones regulate metainflammation in diet-induced obesity in mice. *Journal of Biological Chemistry*, *297*(5), 101229. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101229

Vieira Potter, V. J., Strissel, K. J., Xie, C., Chang, E., Bennett, G., Defuria, J., . . . Greenberg, A. S. (2012). Adipose Tissue Inflammation and Reduced Insulin Sensitivity in Ovariectomized Mice Occurs in the Absence of Increased Adiposity. *Endocrinology*, *153*(9), 4266-4277. https://doi.org/10.1210/en.2011-2006

Virtue, S., & Vidal-Puig, A. (2008). It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol*, *6*(9), e237. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060237

Virtue, S., & Vidal-Puig, A. (2021). GTTs and ITTs in mice: simple tests, complex answers. *Nat Metab*, *3*(7), 883-886. https://doi.org/10.1038/s42255-021-00414-7

Vishvanath, L., & Gupta, R. K. (2019). Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, *129*(10), 4022-4031. https://doi.org/10.1172/jci129191

Wajchenberg, B. L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, *21*(6), 697-738. https://doi.org/10.1210/edrv.21.6.0415

Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., & Scherer, P. E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*, *19*(10), 1338-1344. https://doi.org/10.1038/nm.3324

Wang, X., Yu, C., Feng, J., Chen, J., Jiang, Q., Kuang, S., & Wang, Y. (2017). Depot-specific differences in fat mass expansion in WT and ob/ob mice. *Oncotarget*, *8*(28), 46326-46336. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17938

Wang, Z., Deurenberg, P., Wang, W., Pietrobelli, A., Baumgartner, R. N., & Heymsfield, S. B. (1999). Hydration of fat-free body mass: new physiological modeling approach. *Am J Physiol*, *276*(6), E995-E1003. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.276.6.E995

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, *112*(12), 1796-1808. https://doi.org/10.1172/JCI19246

Wheway, G., Parry, D. A., & Johnson, C. A. (2014). The role of primary cilia in the development and disease of the retina. *Organogenesis*, *10*(1), 69-85. https://doi.org/10.4161/org.26710

WHO. (2021). *Obesity and overweight*. Retrieved 12/11/2021 from https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight#

Wildman, R. P. (2009). Healthy obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *12*(4), 438-443. https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32832c6db7

Wildman, R. P., Muntner, P., Reynolds, K., McGinn, A. P., Rajpathak, S., Wylie-Rosett, J., & Sowers, M. R. (2008). The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2

phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). *Arch Intern Med*, *168*(15), 1617-1624. https://doi.org/10.1001/archinte.168.15.1617

Yen, H. J., Tayeh, M. K., Mullins, R. F., Stone, E. M., Sheffield, V. C., & Slusarski, D. C. (2006). Bardet-Biedl syndrome genes are important in retrograde intracellular trafficking and Kupffer's vesicle cilia function. *Hum Mol Genet*, *15*(5), 667-677. https://doi.org/10.1093/hmg/ddi468

Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M., & Shoelson, S. E. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*, *293*(5535), 1673-1677. https://doi.org/10.1126/science.1061620

Zhang, J., Xu, L., Li, J., Sun, L., Qin, W., Ding, G., . . . Zhou, C. (2019). Gender differences in the association between body mass index and health-related quality of life among adults:a cross-sectional study in Shandong, China. *BMC Public Health*, *19*(1). https://doi.org/10.1186/s12889-019-7351-7

Zhang, Q., Seo, S., Bugge, K., Stone, E. M., & Sheffield, V. C. (2012). BBS proteins interact genetically with the IFT pathway to influence SHH-related phenotypes. *Hum Mol Genet*, *21*(9), 1945-1953. https://doi.org/10.1093/hmg/dds004

Zhang, Q., Yu, D., Seo, S., Stone, E. M., & Sheffield, V. C. (2012). Intrinsic protein-protein interaction-mediated and chaperonin-assisted sequential assembly of stable bardet-biedl syndrome protein complex, the BBSome. *J Biol Chem*, *287*(24), 20625-20635. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341487

Zhou, Z., Qiu, H., Castro-Araya, R.-F., Takei, R., Nakayama, K., & Katoh, Y. (2021). Impaired cooperation between IFT74/BBS22–IFT81 and IFT25–IFT27/BBS19 causes Bardet-Biedl syndrome. *Human Molecular Genetics*. https://doi.org/10.1093/hmg/ddab354

Zhu, D., Shi, S., Wang, H., & Liao, K. (2009). Growth arrest induces primary-cilium formation and sensitizes IGF-1-receptor signaling during differentiation induction of 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Sci*, *122*(Pt 15), 2760-2768. https://doi.org/10.1242/jcs.046276

Zhu, S. W., Yee, B. K., Nyffeler, M., Winblad, B., Feldon, J., & Mohammed, A. H. (2006). Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behav Brain Res*, *169*(1), 10-20. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.11.024

# ANEXO

## Soluciones y Medios

*Buffer PBS*

| | [ ] final 10X | Para 1 litro |
|---|---|---|
| **NaCl** | 1.37 M | 80 g |
| **KCl** | 27 mM | 2 g |
| **$Na_2HPO_4$** | 100 mM | 14.2 g |
| **$KH_2PO_4$** | 18 mM | 2.4 g |

*Buffer RIPA*

| | [ ] final | [ ] stock | Para 500 mL |
|---|---|---|---|
| **Tris pH 7,4** | 50 mM | 1 M | 25 mL |
| **NaCl** | 150 mM | 3 M | 25 mL |
| **EDTA** | 5 mM | 0,5 M | 5 mL |
| **Desoxicolato de Na** | 1 % | polvo | 5 g |
| **NP - 40** | 1 % | 100 % | 5 mL |

## *Medios para la diferenciación de adipocitos en cultivo*

**Medios de diferenciación:**

**1. Medio de inducción (COCKTAIL)**

DMEM 10 % SBF con Peni/Strepto

+ 0,001 mg/ml Insulina (Gibco, 4 mg/ml)

+ 0,25 µM Dexamethasone (Stock 10.000X: 1 mg en 1 ml de EtOH = 2,5 mM)

+ 0,5 mM IBMX (Stock 1000X: 111 mg en 1 ml de DMSO = 0,5 M)

+ 2,5 µM Rosiglitazona (Stock 1000X: 893,5 µg en 1 ml de DMSO = 2,5 mM)

**2. Medio + INS**

DMEM 10 % SBF con Peni/Strepto

+ 0,001 mg/ml Insulina

Preparación del medio de inducción (COKTAIL)

Para 50 ml de medio DMEM 10 % SBF:

Insulina 4 mg/ml ----------12,5 µl

DEX 1000X----------50 µl

IBMX 1000X---------- 50 µl

Rosiglitazona 1000X------50 µl

Preparación del medio + Insulina:

Para 50 ml de medio DMEM 10 % SBF:

Insulina 4 mg/ml ----------12,5 µl