



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas- Área Biología  
Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

**Follistatin-like1 en el desarrollo de tejido adiposo de pez cebra y sus mecanismos de señalización en la regulación de la ciliogénesis**

Mag. Lucía Guggeri

Orientador: Dr. José Badano

Co-orientadoras: Dra. Victoria Prieto y Dra. Paola Lepanto

Laboratorio de Genética Molecular Humana, Institut Pasteur de Montevideo

Montevideo, 2025

Tribunal:

Presidenta: Dra. Gabriela Bedó

Vocales: Dra. María Rosa García y Dr. Aldo Calliari

Comisión de Admisión y Seguimiento:

Dra. Martina Crispo, Dra. Patricia Cassina, Dra. Celia Quijano

## Agradecimientos

---

*Quiero agradecer en primer lugar a José, quien me abrió las puertas del laboratorio, por sus muy valiosas contribuciones científicas a lo largo de este proyecto. A Victoria, por su orientación en los experimentos con cultivos celulares y su visión global del trabajo. A Paola, por transmitirme su experiencia en el trabajo con pez cebra y por su apoyo en los experimentos, algo que fue clave para que este trabajo sea una realidad. A todos mis compañeros y compañeras del laboratorio, a quienes estuvieron y a quienes se sumaron durante este tiempo, y en especial a Magdalena, Ileana y Martina, quienes colaboraron en el trabajo aquí presentado. A todo el grupo de Biología Celular de la Facultad de Ciencias, con quienes compartimos el trabajo en el acuario; a Gisell, por su dedicación en el mantenimiento del acuario; y a Marcela, por su apoyo en microscopía. A todas las personas del instituto que, de una forma u otra, me acompañaron en este camino.*

*A PEDECIBA por aceptarme en el programa de posgrado y a la ANII por la beca de doctorado que me permitió realizar este trabajo. También a mis compañeros de Genia, Dasa y Lac por acompañarme durante estos años.*

*Finalmente, quiero agradecer especialmente a toda mi familia, cuyo apoyo fue esencial para que esta tesis pueda concretarse. A Marcelo, mi compañero de vida, por su confianza en mí y por el amor el cuidado de nuestros hijos. A mi madre y a Laura, por todo su apoyo, viajando desde Salto para ayudarnos en los momentos más intensos. Y a mis hijos, por su enorme paciencia y ternura. A mis amigas Nati, Lu y Leti, por estar siempre.*

# Contenido

---

Resumen.....	6
Glosario de términos y abreviaturas.....	8
1     Introducción .....	10
1.1 Las cílias primarias .....	10
1.1.1 Características principales de las cílias primarias.....	10
1.1.2 Ciliopatías y Síndrome de Bardet Biedl como modelo.....	13
1.1.3 Cílios y obesidad .....	18
1.2 FSTL1       26	
1.2.1 Estructura del gen y de proteína FSTL1 .....	26
1.2.2 FSTL1 en enfermedades cardiovasculares .....	27
1.2.3 FSTL1 y cáncer .....	28
1.2.4 FSTL1 en patologías donde la inflamación juega un rol central.....	29
1.2.5 FSTL1 y obesidad.....	31
1.2.6 Relación entre FSTL1, la cilia y la adipogénesis .....	33
2     Objetivo general .....	35
2.1 Objetivos específicos.....	35
2.1.1 Evaluar posibles mecanismos de transducción de señales que median la función de FSTL1 en la ciliogénesis en hTERT-RPE1.....	35
2.1.2 Analizar el rol de FSTL1 en la ciliogénesis y en el desarrollo del tejido adiposo en pez cebra.....	35
3     Materiales y métodos .....	36
3.1 Cultivo celular .....	36
3.1.1 Medios y condiciones de cultivo .....	36
3.1.2 KD mediante el uso de StealthRNAi™ siARN .....	37
3.1.3 Extracción de ARN y síntesis de ADN copia (ADNc) .....	38
3.1.4 Real time PCR (qPCR).....	39
3.1.5 Extracción y dosificación de proteínas .....	39
3.1.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western Blot.....	40

3.1.7	Inmunofluorescencia.....	41
3.1.8	Mediciones de las cílias y análisis estadísticos .....	42
3.2	Trabajo en pez cebra .....	44
3.2.1	Mantenimiento de peces cebra adultos .....	44
3.2.2	Obtención y mantenimiento de embriones .....	44
3.2.3	Inyección de embriones.....	45
3.2.4	KD de <i>fstl1a</i> y <i>fstl1b</i> en embriones utilizando morfolinos .....	45
3.2.5	Generación de la línea KO para <i>fstl1a</i> mediante CRISPR/ Cas9 .....	47
3.2.6	Evaluación de la eficiencia de la edición génica .....	49
3.2.7	Extracción de ADN genómico de embriones (método HotSHOT) .....	50
3.2.8	Cruces de peces adultos y establecimiento de la línea <i>fstl1a</i> (-/-).....	50
3.2.9	Genotipado de peces adultos y procedimientos de anestesia y eutanasia.....	51
3.2.10	Ánalisis de fenotipo externo de embriones.....	52
3.2.11	Inmunofluorescencia de embriones .....	52
3.2.12	Obtención de larvas/juveniles y dietas realizadas .....	53
3.2.13	Ánalisis del tejido adiposo en larvas .....	55
3.2.14	Extracción de ARN y qPCR a partir de tejido en larvas .....	56
4	Resultados.....	57
4.1	Estudio de posibles mecanismos de transducción de señales que median la función de FSTL1 en ciliogénesis .....	57
4.1.1	Evaluación de DIP2A como mediador/receptor de FSTL1 en la ciliogénesis....	58
4.1.2	Estudio de vías de señalización intracelular que median la acción de FSTL1 durante la ciliogénesis .....	64
4.2	Determinación del rol biológico de FSTL1 durante el desarrollo de pez cebra y en el desarrollo del tejido adiposo .....	66
4.2.1	Evaluación de la función de <i>fstl1</i> en la regulación del largo ciliar durante el desarrollo embrionario de pez cebra.....	71
4.2.2	Generación de una línea de peces knockout para <i>fstl1a</i> mediante el sistema de edición genómica CRISPR-Cas9.....	82
4.2.3	Evaluación de los fenotipos de la línea <i>fstl1a</i> (-/-) .....	92
5	Discusión .....	103

5.1	Posibles mecanismos de transducción de señales que median la función de FSTL1 en ciliogénesis .....	103
5.1.1	DIP2A como mediador de la acción de FSTL1 en la ciliogénesis.....	103
5.1.2	ERK1/2 como intermediario en la señalización por FSTL1 .....	105
5.2	El rol de FSTL1 durante el desarrollo de pez cebra y en el desarrollo del tejido adiposo ...	109
5.2.1	fstl1 y la regulación de la ciliogénesis in vivo .....	109
5.2.2	Generación de una línea de peces KO para fstl1a mediante el sistema de edición genómica CRISPR-Cas9.....	112
5.2.3	Rol de fstl1a en la formación de tejido adiposo .....	114
6	Conclusiones y Perspectivas .....	119
7	Bibliografía .....	121
8	Anexo .....	154

---

## Resumen

---

Las ciliopatías son un grupo de enfermedades humanas causadas por defectos en la formación, mantenimiento y/o función de las cílias primarias, que comprenden más de 30 patologías con fenotipos parcialmente solapados. Entre ellas, el Síndrome de Bardet-Biedl y el de Alström presentan como rasgo característico el desarrollo de obesidad. Diversos estudios han demostrado que las proteínas BBS, responsables del Síndrome Bardet Biedl, y las cílias, participan en la regulación de la saciedad y el balance energético a nivel del sistema nervioso central. Por otro lado, las cílias están presentes en distintos tejidos periféricos que también contribuyen al desarrollo y la presentación de la obesidad. Sin embargo, aún se conoce poco acerca de la función de las proteínas BBS en este contexto.

*Follistatin-like 1* (FSTL1) es una glicoproteína secretada que interviene en diversos procesos biológicos como la regulación de la proliferación, diferenciación y migración celular, así como en la carcinogénesis y metástasis. Su expresión se altera en múltiples patologías, incluyendo enfermedades cardiovasculares, cáncer, trastornos autoinmunes y obesidad. En un trabajo previo de nuestro grupo, identificamos a FSTL1 como un nuevo regulador de la ciliogénesis en hTERT-RPE1, no obstante, aún no se comprende completamente el mecanismo de señalización mediante el cual FSTL1 participa de la regulación de este proceso. Asimismo, identificamos un eje regulador compuesto por BBS4, FSTL1 y la cilia primaria en la diferenciación de pre-adipocitos en cultivo, lo que sugiere un papel potencialmente relevante en la regulación del tejido adiposo *in vivo*.

En este trabajo nos planteamos como objetivo profundizar en el estudio del rol biológico de FSTL1 durante el desarrollo del tejido adiposo, así como en sus mecanismos de señalización durante la regulación de la ciliogénesis.

Por un lado, planteamos la hipótesis de que DIP2A fuera el receptor putativo que media los efectos de FSTL1 sobre la cilia primaria. Para evaluarlo, inhibimos la expresión de DIP2A en células hTERT-RPE1, modelo previamente utilizado para estudiar el efecto de FSTL1 sobre la ciliogénesis. Observamos que la disminución del nivel de DIP2A no afectó

significativamente a las cílias. Alternativamente, hipotetizamos que el mediador intracelular ERK1/2 participa en la vía de señalización activada por FSTL1. Para testearlo, evaluamos el nivel de activación de ERK1/2 en presencia o ausencia de FSTL1. Interesantemente, el silenciamiento de FSTL1 produjo un aumento en el nivel de ERK1/2 fosforilado, lo cual sugiere que la vía MEK1/MAPK podría ser un intermediario en la señalización intracelular de FSTL1.

Complementariamente, analizamos la función de FSTL1 *in vivo*, utilizando el modelo de pez cebra. Para ello, inhibimos la expresión de sus genes ortólogos *fstl1a* y *fstl1b*, mediante el uso de morfolinos y evaluamos el largo de las cílias en varios órganos embrionarios. Observamos que las cílias presentes en la vesícula ótica, la fosa nasal y la vesícula de Kupffer de embriones morfantes para *fstl1a* eran más cortas. Asimismo, generamos una línea mutante *fstl1a* (-/-) utilizando CRISPR-Cas9, con el objetivo de extender el análisis a etapas post embrionarias. Evaluamos el área de tejido adiposo en larvas mutantes y controles bajo dos esquemas de alimentación: una dieta estándar y otra alta en grasas. En la línea mutante observamos una reducción significativa del área adiposa frente a larvas salvajes, que resultó más pronunciada en animales alimentados con dieta alta en grasas. El análisis de marcadores de adipogénesis en la región abdominal de estas larvas sugiere que *fstl1a* cumple un rol favoreciendo la producción de pre-adipocitos, así como también impactando en su diferenciación y maduración.

En conjunto, nuestros resultados muestran la participación de ERK1/2 en la vía de señalización de FSTL1 en el contexto de la ciliogénesis, y la participación de FSTL1 en la regulación de la ciliogénesis y el desarrollo del tejido adiposo *in vivo*.

## Glosario de términos y abreviaturas

Término	Definición
ADCY3	Adenilato ciclase 3 ( <i>Adenylyl Cyclase 3</i> )
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgRP	Péptido relacionado con Agouti ( <i>Agouti-Related Protein</i> )
ALMS	Síndrome de Alström
APCs	Células progenitoras adiposas ( <i>Adipocyte Progenitor Cells</i> )
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg	Ácido ribonucleico guía
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAT	Tejido adiposo pardo ( <i>Brown Adipose Tissue</i> )
BBS	Síndrome de Bardet-Biedl
BMP	Proteína Morfogenética Ósea ( <i>Bone Morphogenetic Protein</i> )
CCT	<i>Chaperonin Containing TCP-1</i>
C/EBP $\alpha$	Factor de transcripción <i>CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha</i>
DIP2A	<i>Disco-Interacting Protein 2 Homolog A</i>
dpf	Días post fecundación
FSTL1	<i>Follistatin-Like Protein 1</i>
FT	Fibras de Transición
GPCRs	Receptores Acoplados a Proteínas G
HFD	Dieta alta en grasas ( <i>High Fat Diet</i> )
hpf	Horas post fecundación
hTERT-RPE1	<i>hTERT-immortalized retinal pigment epithelial cells</i>
IFT	Transporte Intraflagelar
IFT-A	Complejo A de Transporte Intraflagelar
IFT-B	Complejo B de Transporte Intraflagelar
IGF-1R	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
IL-1 $\beta$	Interleuquina-1 $\beta$
IL-6	Interleuquina-6
IMC	Índice de Masa Corporal
JS	Síndrome de Joubert
KD	<i>Knock Down</i>
KO	<i>Knock Out</i>
LEPR	Receptor de leptina
MC4R	Receptor 4 de melanocortina
MCHR1	Receptor 1 de la hormona liberadora de melatonina ( <i>Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1</i> )
MKKS	Síndrome de McKusick-Kaufman
MKS	Síndrome de Meckel-Gruber
MO	Morfolino
MSCs	Células madre mesenquimales ( <i>Mesenchymal Stem Cells</i> )
MT	Microtúbulos
NMD	Decaimiento mediado por Nonsense ( <i>Nonsense-Mediated Decay</i> )

NPHP	Nefronoptisis
NPY	Neuropeptido Y ( <i>Neuropeptide Y</i> )
NPY2R	Receptor 2 del Neuropeptido Y ( <i>Neuropeptide Y Receptor 2</i> )
NRQ	Cantidad Relativa Normalizada ( <i>Normalized Relative Quantity</i> )
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
PBS-T	Solución salina tamponada con fosfatos y Tween ( <i>Phosphate-Buffered Saline with Tween</i> )
PFA	Paraformaldehído
POMC	Proopiomelanocortina ( <i>Proopiomelanocortin</i> )
PPAR $\gamma$	Receptor activador de proliferador de peroxisomas gamma ( <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i> )
pre-ZGA	Antes de la activación del genoma zigótico ( <i>pre-Zygotic Genome Activation</i> )
PTC	Codón de terminación prematuro ( <i>Premature Termination Codon</i> )
PTU	1-Phenyl 2-Thiourea
PVN	Núcleo paraventricular del hipotálamo ( <i>Paraventricular Nucleus</i> )
RNF2	<i>Ring finger Factor 2</i>
RT-PCR	PCR con transcripción inversa ( <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> )
SDA	Apéndices Subdistales
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
Shh	Señalización <i>Sonic Hedgehog</i>
siARN	ARN pequeño interferente ( <i>Small Interfering RNA</i> )
SL	Longitud estándar ( <i>Standard Length</i> )
SS	Síndrome de Sjogren
SST3	Receptor de Somatostatina 3 ( <i>Somatostatin Receptor 3</i> )
STD	Dieta estándar ( <i>Standar Fat Diet</i> )
TA	Temperatura ambiente
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante Beta ( <i>Transforming Growth Factor Beta</i> )
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>Tumour Necrosis Factor Alpha</i> )
TPM	Transcritos por millón ( <i>Transcripts Per Million</i> )
VWFC	Von Willebrand Factor tipo C
WAT	Tejido adiposo blanco ( <i>White Adipose Tissue</i> )
WNT	Señalización WNT
WT	Salvaje ( <i>Wild Type</i> )
ZT	Zona de Transición
$\mu\text{m}$	Micrómetros
$\mu\text{L}$	Microlitros

# 1 Introducción

---

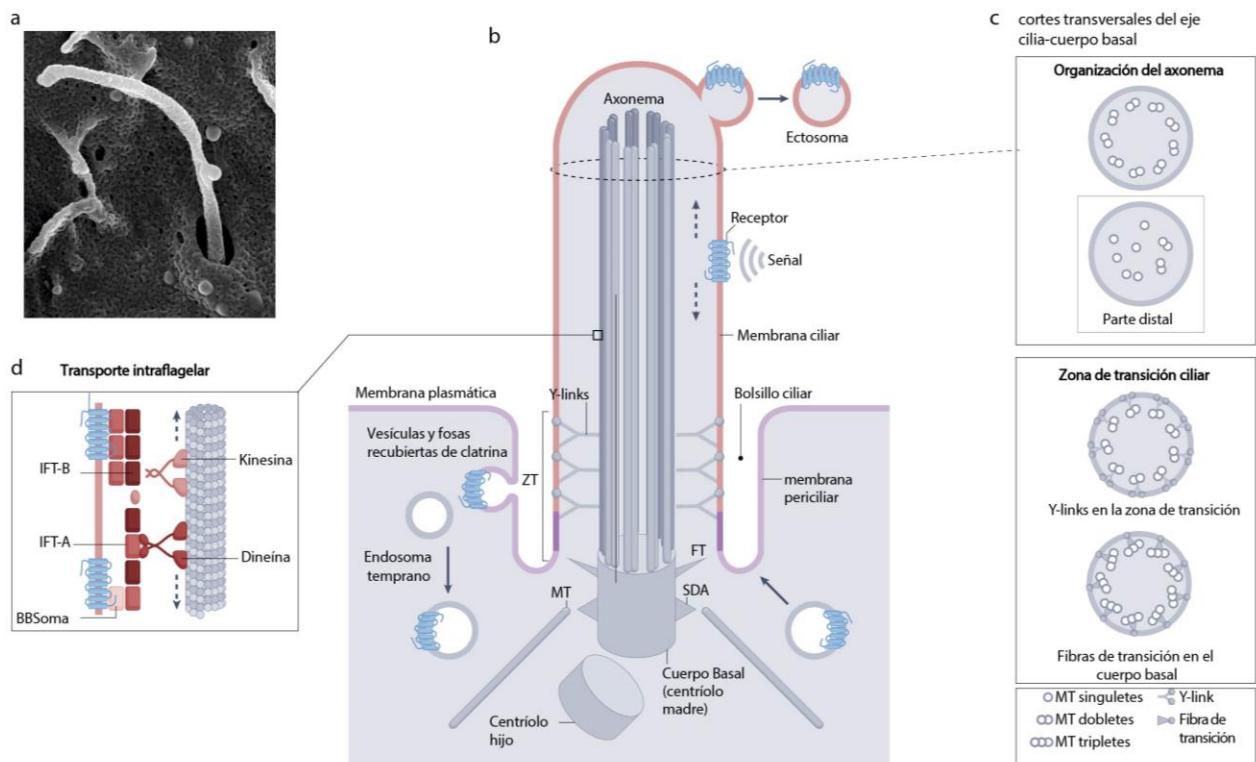
## 1.1 Las cílias primarias

### 1.1.1 Características principales de las cílias primarias

La cilia primaria es un organelo altamente conservado que se encuentra en prácticamente todas las células de organismos vertebrados. Las cílias primarias tienen un largo que varía entre 1 y 30  $\mu\text{m}$  y se presentan de a una por célula como una protrusión en su superficie (**Figura 1A**) [1]. Como se puede observar en la **Figura 1B-C**, en el interior de la cilia se encuentra el axonema ciliar, compuesto por 9 dobletes de microtúbulos. A diferencia de las cílias móviles, este axonema no contiene el par central de microtúbulos (es decir, presenta una configuración 9+0). Esta configuración canónica de dobletes puede sufrir modificaciones en la porción distal en algunos tipos celulares como son las cílias altamente especializada de fotorreceptores o las presentes en células epiteliales de riñón en mamíferos, en las que el axonema distal está compuesto por segmentos de singuletes de microtúbulos (**Figura 1C**) (revisado en [2]).

El axonema ciliar se nuclea desde el citosol cercano a la membrana plasmática a partir del cuerpo basal. El cuerpo basal es una estructura compuesta por dos centríolos, el centríolo madre, es decir el que proviene de la célula madre, se asocia a través de fibras de transición y apéndices distales y subdistales a la membrana ciliar (revisado en [3]). A su vez, en la base ciliar, existe una región especializada denominada zona de transición, donde existen fibras llamadas *Y-links*, que anclan el axonema a la membrana ciliar [4]. Tanto los *Y-links* como las fibras asociadas a los cuerpos basales, sirven como barrera de difusión, regulando el transporte de proteínas desde y hacia la cilia. De esta manera, y a pesar de ser una estructura continua con el citosol y la membrana plasmática, la cilia presenta una composición de lípidos y proteínas diferente al resto de la célula [5,6]. Además, en algunos tipos celulares la membrana periciliar presenta una invaginación, denominada bolsillo ciliar (**Figura 1 A-B**) [7]. Esta región especializada de la membrana funciona como un sitio activo de endocitosis y exocitosis de vesículas que provienen de la membrana ciliar o que están destinadas a ella, respectivamente [7]. Este mecanismo

permite regular la disponibilidad de receptores de localización ciliar, como por ejemplo el receptor de TGF $\beta$  (del inglés, *Transforming Growth Factor Beta*) [8,9]. Cabe destacar que la mayoría de los componentes ciliares son sintetizados en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Un complejo compuesto por ocho proteínas denominado BBSoma, del cual hablaremos más adelante, participa en el direccionamiento de las vesículas que tienen como destino la membrana ciliar.



**Figura 1. Principales características de la estructura y transporte en la cilia primaria.**

**A.** Microscopía electrónica de barrido de fibroblastos embrionarios de ratón donde se observa la presencia de la cilia primaria y el bolsillo ciliar.

**B.** Esquema de las principales características estructurales de las cílias primarias. El axonema de las cílias primarias presenta 9 dobletes de microtúbulos (MT) periféricos sin par central que se nuclean a partir del cuerpo basal. La membrana ciliar es continua con la membrana de la célula. En la base de la cilia se encuentra una región denominada zona de transición (ZT) que limita el pasaje de componentes entre la cilia y el resto de la célula. En esta región, el axonema ciliar se encuentra asociado a la membrana ciliar a través de Y-links. El cuerpo basal es uno de los centriolos de la célula modificado por la asociación de diferentes proteínas. Algunas de ellas forman las fibras de transición (FT) y apéndices subdistales (SDA) que le permiten su asociación a membrana. Algunas cílias se encuentran parcialmente inmersas en una invaginación de la membrana celular, llamada bolsillo ciliar. Los lípidos y proteínas necesarios para el crecimiento de la membrana ciliar se transportan desde vesículas del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi hacia la base ciliar, donde son incorporados a la membrana en la región del bolsillo ciliar mediante exocitosis. A su

vez, la endocitosis regula la disponibilidad de receptores en la membrana ciliar. La liberación de ectosomas con contenido ciliar, es un mecanismo de comunicación con células vecinas y sirve además como vía alternativa de remodelado de la composición de receptores ciliares.

**C.** Ilustración de la organización del axonema ciliar que muestran cómo se visualizaría el interior de la cilia a través de cortes transversales que van desde la punta hasta la base de esta. En los mismos se puede observar la organización de microtúbulos en la porción distal de la cilia. La presencia de Y-links en la zona de transición y de fibras de transición asociadas al cuerpo basal.

**D.** Esquema de los principales componentes del sistema de transporte intraflagelar (IFT). Las proteínas ingresan a la cilia a través de su asociación con partículas IFT-B y son transportadas hacia la punta ciliar (transporte anterógrado) unidas a la proteína kinesina II. Por otra parte, el transporte de proteínas desde la cilia hacia el citoplasma celular se da mediante la maquinaria de transporte retrógrado que utiliza motores moleculares de dineína en asociación con partículas IFT-A. La imagen utilizada en A fue extraída y adaptada de [10]. Las ilustraciones B, C y D fueron extraídas y adaptadas de [2].

En el interior de la cilia, opera una maquinaria de transporte especializada, denominada transporte intra-flagelar (IFT, del inglés *Intraflagellar Transport*) que traslada componentes ciliares, desde y hacia su extremo distal [11]. Para ello, las cargas se asocian con proteínas IFT adaptadoras, formando complejos moleculares que son transportados utilizando el axonema de microtúbulos y proteínas motoras. Un sistema de transporte anterógrado compuesto por kinesina II y partículas IFT-B mueven cargas hacia el extremo distal de la cilia, mientras que un sistema de transporte retrógrado compuesto por dineína citoplasmática 2 y partículas adaptadoras IFT-A mueven cargas desde el extremo distal de la cilia hacia el cuerpo basal (**Figura 1D**) [11,12].

Las cílias primarias cumplen un rol central en la regulación de la homeostasis celular concentrando un gran número de receptores de estímulos mecano- y quimio-sensoriales en su membrana y coordinando múltiples vías de señalización intracelulares [2,13,14]. Un ejemplo de esto es la familia de receptores GPCRs (del inglés *G protein-coupled receptors*), que transmiten señales específicas a la célula a través de proteínas G para regular diversos procesos celulares y eventos fisiológicos [15,16]. Hasta la fecha se han descrito más de 37 receptores GPCR con localización ciliar [2]. Algunos ejemplos incluyen GPCRs que controlan la detección de la luz por los fotorreceptores, la captación del olor en neuronas sensibles al olfato, procesos cognitivos en el cerebro, la homeostasis energética y el control del apetito [2,16]. Además, la cilia presenta receptores involucrados

en la señalización de Sonic Hedgehog (Shh) y WNT, receptores tirosina-quinasa y receptores involucrados en la señalización por calcio, entre otros [2,13,14].

Finalmente es importante mencionar que, en vertebrados, la ciliogénesis está estrechamente vinculada al ciclo celular, limitándose la presencia de la cilia a etapas G1 o G0 y el inicio de la fase S [13,17]. En consecuencia, las cillas primarias están ausentes durante la mitosis, momento en que los centríolos son utilizados para la organización del esqueleto de microtúbulos, y formación del huso mitótico. Por lo tanto, la regulación de la ciliogénesis es esencial en las células en proliferación [13,17].

### **1.1.2 Ciliopatías y Síndrome de Bardet Biedl como modelo**

Las ciliopatías son un grupo de enfermedades humanas causadas por defectos en la formación, mantenimiento y/o función de las cillas primarias [13,18,19]. Este grupo de patologías abarca más de 30 enfermedades diferentes con fenotipos parcialmente solapantes [2,18]. En la **Tabla 1** se describen los principales fenotipos asociados a diferentes ciliopatías. Algunas ciliopatías tienen fenotipos relativamente específicos o restringidos a un determinado órgano o tejido, como por ejemplo la poliquistosis renal (PKD), mientras que otras son síndromes multisistémicos, como por ejemplo el Síndrome de Joubert (JS), Síndrome de Alström (ALMS), Síndrome de Meckel-Gruber (MKS) y Síndrome de Bardet-Biedl (BBS). Una característica interesante, es que este solapamiento no solo se observa en la presentación de distintos fenotipos sino también a nivel genético, donde, por ejemplo, distintas mutaciones en un mismo gen pueden determinar el desarrollo de diferentes ciliopatías. Un caso interesante en este sentido es el del gen *MKS1* (OMIM \*609883). La proteína MKS1 se localiza principalmente en el cuerpo basal y zona de transición. Mutaciones en este gen han sido asociadas a un fenotipo MKS, así como BBS y JS. En este sentido, se ha encontrado que el tipo de mutaciones que porta el paciente tiene una relación con la severidad del fenotipo que desarrolla. Es decir, pacientes que portan dos mutaciones en las que se pierde completamente la función del gen, y no se produce proteína funcional (mutaciones en sitios de *splicing* canónicos o que generan codones de finalización de la traducción prematuros), desarrollan MKS. Sin embargo,

pacientes que producen ciertos niveles de proteína funcional, debido a la presencia de mutaciones del cambio de sentido en alguno de los alelos (alelos hipomorfos) pueden desarrollar un fenotipo BBS [20,21]. Otro caso interesante es el del gen *CEP290* (OMIM \*610142). La proteína CEP290 se localiza principalmente en el cuerpo basal, y mutaciones en este gen han sido identificadas en pacientes con Nefronoptosis (NPHP), Síndrome de Senior-Loken (SLS), JS, MKS y BBS, además de Amaurosis Congénita de Leber y pérdida de visión temprana [2,19,22]. En este caso, a pesar de que más de 100 mutaciones han sido descritas en este gen, aún no se ha podido establecer una correlación genotipo/fenotipo y por lo tanto el poder predictivo del genotipo relacionado a *CEP290* aún es limitado [23]. Adicionalmente, se debe tomar en cuenta, que a pesar de que las ciliopatías en su mayoría son enfermedades monogénicas recesivas, pueden existir alelos modificadores en otros genes ciliares con efecto epistático, es decir, que modulen la penetrancia y expresividad de un determinado fenotipo [20].

**Tabla 1. Diferentes fenotipos asociados a defectos en la cilia y ejemplos de ciliopatías.**

	PKD	NPHP	MKKS	SLSN	EVC	JATD	OFD	ALMS	JS	BBS	MKS
Quistes renales	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Malformaciones del CNS					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Degeneración de la retina				✓		✓		✓	✓	✓	
Defectos en el eje izq.-der.		✓		✓		✓			✓	✓	✓
Polidactilia			✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓
Malformaciones gonadales			✓		✓					✓	✓
Enfermedades cardíacas			✓		✓			✓		✓	
Retardo mental					✓	✓	✓		✓	✓	✓
Obesidad								✓		✓	
Diabetes								✓		✓	
Defectos del esqueleto					✓	✓	✓				

PKD: enfermedad policística del riñón; NPHP: nefronoptosis; MKKS: Síndrome de McKusick–Kaufman; SLSN: Síndrome de Senior-Loken; EVC: Ellis-van Creveld; JATD: displasia torácica asfixiante de Jeune; OFD síndrome orofaciocigital; ALMS: Síndrome de Almstrom; JS: Síndrome de Joubert; BBS: Síndrome de Bardet-Biedl; MKS: Síndrome de Meckel-Gruber; CNS: sistema nervioso central. Extraído y adaptado de [13].

BBS, es una enfermedad que pertenece al grupo de las llamadas “enfermedades raras”. Presenta una prevalencia de 1:100.000 individuos en Europa y 1:160.000 en América del Norte, pero alcanza una incidencia 1:13.500 en algunas poblaciones arábigas con alta consanguinidad [24,25]. BBS es un síndrome pleiotrópico: dentro de sus características principales los individuos afectados presentan distrofia de retina,

obesidad, polidactilia, disfunción renal, discapacidad intelectual, hipogonadismo, malformaciones genitourinarias, malformaciones renales y/o enfermedad del parénquima renal [25–27]. Hasta la fecha se han identificado 22 genes causantes de esta patología: *BBS1* (OMIM \*209901), *BBS2* (OMIM \*606151), *BBS3/ARL6* (OMIM \*608845), *BBS4* (OMIM \* 600374), *BBS5* (OMIM \* 603650), *BBS6/MKKS* (OMIM \*604896), *BBS7/FLJ10715* (OMIM \*607590), *BBS8/TTC8* (OMIM \*608132), *BBS9/PTHB1* (OMIM \*607968), *BBS10/C12ORF58/ FLJ23560* (OMIM \*610148), *BBS11/TRIM32/ HT2A* (OMIM \*602290), *BBS12/FLJ35630/C4ORF24* (OMIM \*610683), *BBS13/ MKS1/ FLJ20345* (OMIM \*609883), *BBS14/CEP290/KIAA0373/NPHP6/3H11AG* (OMIM \*610142), *BBS15/WDPCP* (OMIM \*613580), *BBS16/ SDCCAG8/ CCCAP/ NY-CO-8/SLSN7* (OMIM \*613524), *BBS17/LZTFL1* (OMIM \*606568), *BBS18/BBIP1* (OMIM \*613605), *BBS19/IFT27* (OMIM \*615870), *BBS20/IFT172* (OMIM \*607386), *BBS21/CFAP418* (OMIM \*614477), *BBS22/IFT74* (OMIM \*608040). Además, *CEP164* (OMIM \*614848) y *SCAPER* (OMIM \*611611) han sido postulados como genes candidatos para BBS [28,29] así como también *SCLT1* [30] con lo que se llegaría un total de 25 genes causantes de BBS. Según un meta-análisis que incluye más de 85 trabajos publicados con pacientes diagnosticados con BBS en todo el mundo, los genes con una mayor proporción de diagnósticos asociados son *BBS1* (28 %), *BBS10* (17 %), *BBS12* (8 %) y *BBS3* (8 %), como se muestra en la figura 2B [31].

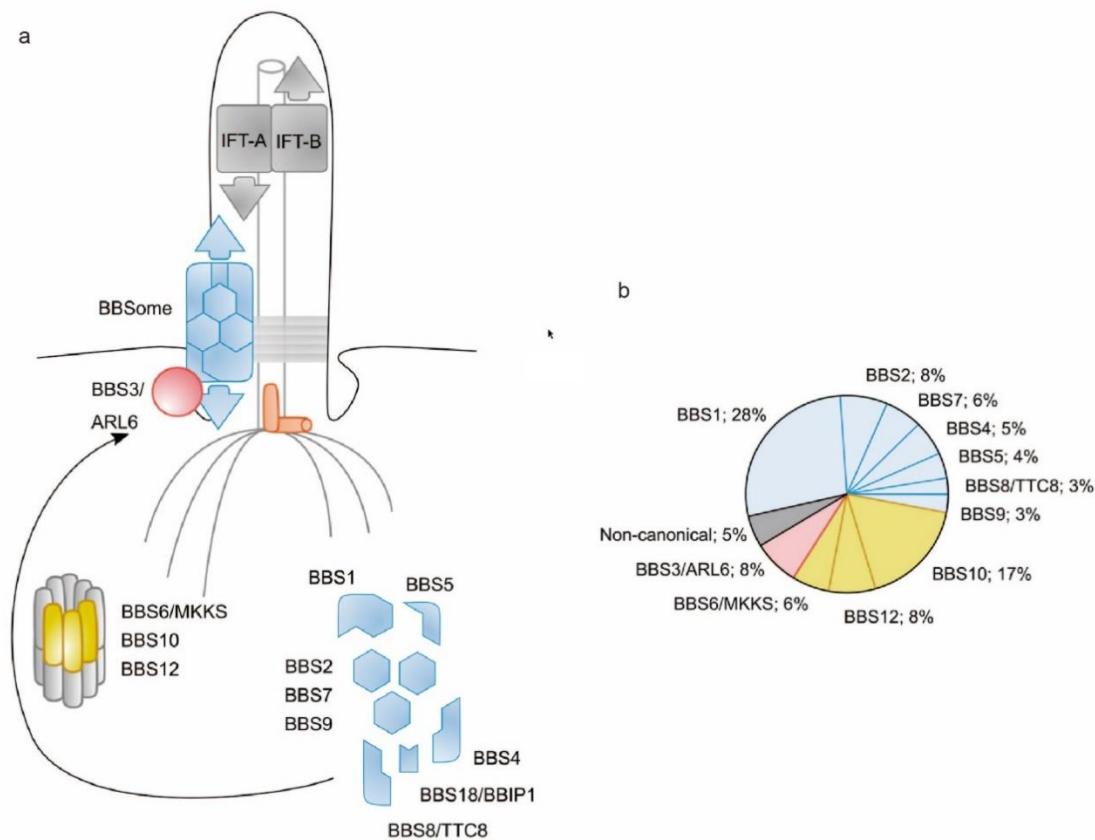
BBS es por lo tanto una patología que presenta una amplia heterogeneidad de *loci*, es decir que numerosos genes producen la misma enfermedad. Interesantemente, algunos reportes indican que la severidad y la expresión de algunos fenotipos podrían depender del gen en particular que está involucrado en el desarrollo de la enfermedad en cada individuo, lo que se podría explicar por diferencias ya sea en expresión o función entre genes/proteínas BBS [31]. Particularmente, si se comparan la presentación de los principales fenotipos (distrofia de retina, obesidad, discapacidad intelectual, polidactilia y presencia de anomalías renales) pacientes con mutaciones en *BBS3* tienen una menor penetrancia del deterioro cognitivo y manifestaciones renales en relación con otros genes BBS [31].

Como mencionamos anteriormente cuando nos referímos a las generalidades de las ciliopatías, si bien BBS en la mayoría de las familias parece heredarse siguiendo un

patrón autosómico recesivo, en algunos casos se comporta como un rasgo de herencia oligogénica, donde mutaciones en más de un gen BBS colaboran para modular la presentación de la enfermedad [18,26,32–34]. Sumado a esto, se han identificado otros genes como *CCDC28B* (OMIM \*610162) [32], *TMEM67/MKS3* (OMIM \*609884) [35] y *CORF86* [36] que modifican la expresión del fenotipo en pacientes que presentan la patología. Estos fenómenos se explican, al menos parcialmente, por el hecho de que todas estas proteínas cumplen roles relacionados en la formación de las cílias e incluso forman complejos, donde distintas proteínas BBS poseen algún grado de redundancia funcional (revisado en [19,37]).

Las proteínas BBS caracterizadas a la fecha se localizan principalmente en el centrosoma y cuerpo basal de la cilia, participando activamente tanto en la formación y mantenimiento, como en la funcionalidad de estos organelos. En la **Figura 2A**, se esquematizan la localización y organización para las proteínas BBS más estudiadas. Las proteínas BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9 y BBS18/BBIP1/BBIP10 forman un complejo proteico octamérico llamado BBSoma de 438 KDa cuya función es el tráfico de proteínas ciliares y moléculas de señalización a la membrana ciliar. De esta manera el BBSoma juega un papel principal en la regulación la composición ciliar. Proteínas del BBSoma reconocen señales en las proteínas destinadas a ir a la cilia y forman una cobertura en las vesículas que las contienen marcando su tránsito hacia la misma (**Figura 2**) [37]. En este proceso, BBS6, BBS10 y BBS12, forman un complejo junto a 6 chaperoninas del tipo CCT (del inglés *Chaperonin Containing TCP-1*). Estas proteínas, involucradas en el plegamiento de proteínas citosólicas principalmente actina y tubulina, asisten también el ensamblado del BBSoma en sus primeras etapas de formación (**Figura 2**) [38,39]. Por otra parte, BBS3/ARL6 es una GTPasa que asiste en la asociación del BBSoma a las vesículas post Golgi en la base de la cilia y su posterior ingreso a la misma [40]. La proteína BBS4 a su vez está involucrada en el transporte de proteínas hacia la región pericentriolar, en un proceso dependiente de microtúbulos y dineína. La región pericentriolar actuaría como un reservorio de BBS4, controlando su disponibilidad para formar parte del BBSoma [40,41]. Cabe señalar, que la identificación y caracterización funcional de nuevos genes/proteínas BBS ha revelado su participación en distintos aspectos de la función ciliar, así como la regulación del BBSoma. Por ejemplo, BBS17 media el transporte del BBSoma [42,43].

BBS19 actúa como intermediario entre el BBSoma e IFT y es importante para el transporte anterógrado [44].



**Figura 2. Organización funcional de las proteínas BBS más estudiadas y prevalencia de mutaciones en genes asociados al Síndrome Bardet Biedl.**

**A.** Representación esquemática de la organización de las proteínas BBS más estudiadas dentro de la ciliosome y en las proximidades de ésta. 8 de estas proteínas BBS (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8/TTC8, BBS9 y BBS18/BBIP1) forman un complejo denominado BBSoma encargado de transportar las vesículas cuya función es el tráfico de proteínas ciliares y moléculas de señalización a la membrana ciliar. Las proteínas BBS6/MKKS, BBS10, BBS12 facilitan el ensamblado del BBSoma y BBS3/ARL6 es una GTPasa que regula la entrada del BBSoma (y la salida) a la ciliosome.

**B.** Diagrama de torta basado en un meta-análisis de 426 pacientes con síndrome de Bardet-Biedl (BBS), que ilustra la prevalencia de las mutaciones en los principales genes asociados con el BBS. En celeste, genes que codifican proteínas del BBSoma; en rojo, mutaciones en BBS3/ARL6, en amarillo mutaciones en genes que codifican para las chaperoninas. En gris se incluyen mutaciones en los demás genes BBS, llamados a estos efectos "no canónicos". Paneles A y B extraídos y modificados de [31].

Adicionalmente, muchas proteínas BBS participan de diversos procesos extra ciliares también importantes para la fisiología de las células y revisados en [37]. Por ejemplo, se ha reportado que BBS7 interactúa con el factor remodelador de la cromatina

RNF2 (del inglés *Ring finger Factor 2*) y afecta la expresión génica [45]. Además, BBS6 se transporta activamente al núcleo, donde, a través de la interacción con SMARCC1, regula la expresión génica [46]. Los autores de este trabajo postulan que el desarrollo de Síndrome de McKusick-Kaufman (MKK), podría ser compatible con la función extra ciliar de esta proteína [46]. También existen algunos reportes que asocian a proteínas del BBSoma en el tráfico de vesículas hacia la membrana plasmática, a través de la vía endocítica. Este es el caso del receptor Notch vinculado a la comunicación intercelular. La unión del receptor Notch a su ligando transmembrana regula numerosos procesos de diferenciación. En ausencia de las proteínas BBS4 y BBS1, su localización en la membrana plasmática y en la cilia se ve reducida [47]. Otra función extra ciliar reportada para el BBSoma es la formación y el mantenimiento de la dinámica de los microtúbulos del axonema. Su subunidad BBIP10/BBS18 afecta la polimerización y la acetilación de microtúbulos [48].

### **1.1.3 Cillas y obesidad**

#### **A nivel de sistema nervioso central**

Como fue mencionado anteriormente, uno de los principales fenotipos asociados a un subgrupo de ciliopatías, entre ellas BBS y el síndrome de Alström (OMIM \*606844), es el desarrollo de obesidad desde edades tempranas. Esto nos plantea la pregunta de por qué un mal funcionamiento de las cillas podría estar asociado con la ganancia de peso.

Distintos estudios en los últimos años han dejado en evidencia el rol de las cillas en neuronas, y en particular en regiones del sistema nervioso central que son cruciales para el mantenimiento del balance energético [49]. A nivel central, el control de la ingesta de energía se regula principalmente en el hipotálamo a través del eje leptina-melanocortina. La leptina es una pequeña hormona del tipo citoquina, secretada por el tejido adiposo blanco que actúa en el cerebro controlando la saciedad. Su receptor principal, LEPR (del inglés *Leptin Receptor*) se expresa en el hipotálamo. Tanto una deficiencia en la producción de leptina como mutaciones en el receptor LEPR, llevan a obesidad severa [49]. Por otra parte, cabe destacar que, en pacientes y animales obesos,

los niveles circulantes de leptina en sangre suelen encontrarse elevados sin lograr reducir la ingesta de alimentos ni aumentar el gasto energético, lo que se conoce como resistencia a la leptina [49].

En el núcleo arcuato del hipotálamo, al menos dos clases de vías de señalización neuronales son moduladas por leptina: la vía catabólica, estimulada frente a niveles altos de leptina, que está representada fundamentalmente por neuronas POMC (del inglés *Proopiomelanocortin*) y la vía anabólica que está compuesta principalmente por neuronas NPY (del inglés *Neuropeptide Y*) / AgRP (del inglés *Agouti-related protein*) que son inhibidas por leptina [50]. En las neuronas POMC, la leptina aumenta la expresión del gen POMC, que se procesa enzimáticamente para producir α-MSH (del inglés *alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone*). Por otro lado, en las neuronas NPY/ AgRP, la leptina inhibe la expresión de los genes *NPY* y *AgRP* [50]. Estas neuronas de núcleo arcuato tienen proyecciones axonales hasta otras regiones del hipotálamo, entre ellas, el núcleo paraventricular (PVN). En la región PVN, los dos péptidos α-MSH y AgRP son liberados sobre neuronas que expresan el receptor MC4R (del inglés *Melanocortin 4 receptor*) donde ejercen un efecto antagónico en la regulación del apetito. La unión de α-MSH al receptor MC4R activa dicho receptor enviando señal de saciedad (efecto anorexigénico), mientras que AgRP inhibe su actividad y por lo tanto estimula el apetito (efecto orexigénico) [51].

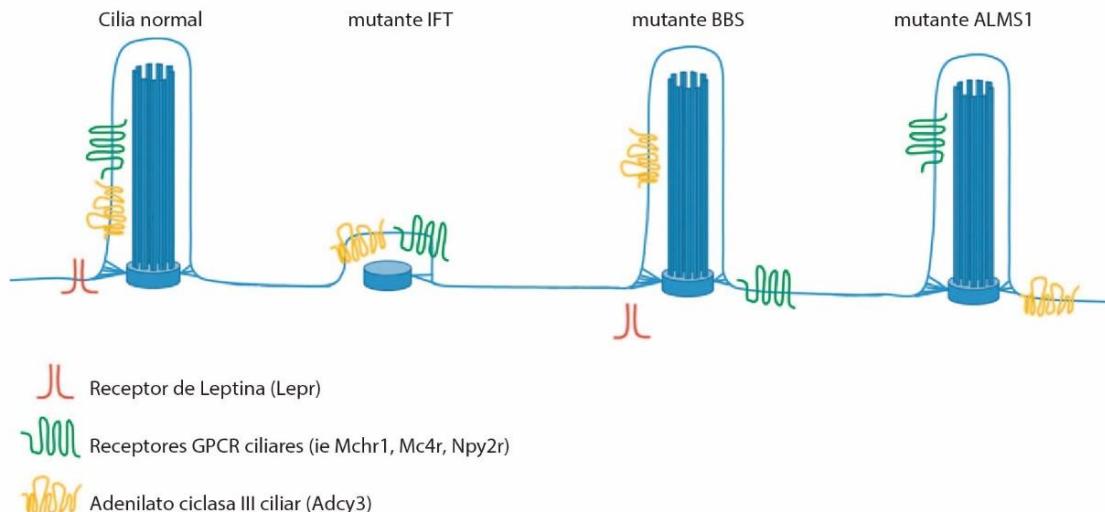
La delección condicional de genes esenciales para el transporte intraflagelar como *IFT88* y *KIF3A*, ha sido ampliamente utilizada para delimitar procesos en los que la cilia es requerida [50]. La pérdida de la cilia en ratones adultos, inducida por el *knockout* (KO) condicional de dichas proteínas, causa hiperfagia y obesidad acompañada por niveles de insulina, leptina y glucosa elevados en suero [52]. Si se aplica una dieta restrictiva sobre estos animales, se puede revertir este fenotipo, lo que indica que la cilia está involucrada en la ganancia de peso por un control de la saciedad e ingesta de alimentos [50].

Por otro lado, se ha demostrado que proteínas BBS como BBS1, BBS2, BBS4, BBS6 Y BBS17, son requeridas para una correcta señalización de leptina en el hipotálamo [53–56]. Los ratones KO para estos genes son hiperfágicos, presentan resistencia a leptina en sangre y obesidad [53–55]. La restricción calórica en estos animales previene la obesidad y reduce los niveles de leptina en sangre. Sin embargo, aunque la restricción calórica

recupere los niveles de leptina en sangre, la señalización en neuronas POMC a través del receptor LEPR se encuentra disminuida significativamente [53]. El mecanismo de acción aún no se conoce en todos los casos. En relación con BBS1, se observó que dicha proteína interacciona con LEPR a través del dominio C-terminal del receptor y que, en su ausencia, la localización del receptor LEPR se mantiene retenida en el trans-Golgi y vesículas exocíticas, llegando solo pequeña proporción de éste a la membrana (ver modelo planteado en la **Figura 3**) [53,54]. Por otro lado, en el caso de los ratones KO para BBS17, aunque la localización de LEPR en la membrana no se ve afectada, sí se observan defectos en señalización intracelular de la vía [56].

El desarrollo de obesidad en las ciliopatías, no se limita a un problema en la localización del receptor de leptina (revisado en [2,14,57]). Numerosos receptores del tipo GPCR que participan en la regulación de la ingesta en animales, entre los que se destacan MCHR1 (del inglés *Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1*), SSTR3 (del inglés *Somatostatin Receptor 3*), NPY2R (del inglés *Neuropeptide Y Receptor 2*) y MC4R se localizan en la cilia primaria en neuronas hipotalámicas. En modelos murinos KO para BBS2 y BBS4 los receptores MCHR1, SSTR3 y NPY2R pierden su localización ciliar, lo que lleva a desregulación de la ingesta (**Figura 3**) [58,59]. Por otro lado, el receptor MC4R, componente central de la vía de leptina-melanocortina, se localiza en la cilia primaria de neuronas PVN, junto con ADCY3 (del inglés *Adenylyl cyclase 3*), una proteína que media la señalización de MC4R, así como otros receptores GPCRs. Defectos tanto en la localización ciliar de MC4R, como la inhibición de la actividad de ADCY3 en estas neuronas generan obesidad [60].

Interesantemente, en el síndrome de Alström, no se han observado cambios en la localización de GPCRs y aún no se ha determinado si la localización de LEPR está alterada. Sin embargo, neuronas hipotalámicas de estos modelos muestran un menor contenido de ADCY3 por lo que la señalización intracelular por proteínas GPCRs se vería afectada (**Figura 3**) [57]. En esta misma línea hay que mencionar que ratones deficientes para ADCY3 desarrollan obesidad, debido a una reducción de la actividad física, hiperfagia y resistencia a leptina [61].



**Figura 3. Localización ciliar de receptores asociados al control de la ingesta en diferentes mutantes ciliares.** La mutación en proteínas de la maquinaria del transporte intraflagelar resulta en la ausencia de la cilia. En modelos de ratones para BBS, tanto la localización de los receptores ciliares GPCRs y la localización en la membrana del receptor de leptina LEPR se encuentra perturbada. En el modelo murino del síndrome de Alström, las proteínas GPCR se mantienen en la cilia, pero no así ADCY3. Extraído y modificado de [50].

### A nivel periférico

Como ya se mencionó anteriormente, en el contexto de deficiencia de proteínas BBS, existe una localización aberrante de receptor de Leptina y otros receptores GPCRs involucrados en la regulación de la ingesta a nivel de sistema nervioso central, defecto que conduce a hiperfagia explicando, al menos en parte, el fenotipo de obesidad encontrado en los pacientes con BBS. Sin embargo, múltiples líneas de evidencia indican que además de su rol en el sistema nervioso central, las proteínas BBS tienen un efecto a nivel periférico, en particular en el tejido adiposo.

El tejido adiposo blanco desempeña un rol crucial en el balance energético del organismo, al almacenar y también liberar ácidos grasos, además de secretar diversos tipos de adipocinas. El tejido adiposo está compuesto por diversos tipos de células, incluyendo adipocitos maduros, células estromales, fibroblastos, macrófagos, células sanguíneas, células endoteliales, células de músculo liso, células madre mesenquimales (MSCs) y células progenitoras adiposas, a las que denominamos APCs (del inglés *Adipocyte Progenitor Cells*) (**Figura 4A**).

Ante un exceso de energía, se produce una expansión del tejido adiposo ya sea por un aumento de tamaño de los adipocitos preexistentes (hipertrofia) o por la generación de nuevos adipocitos vía el proceso de adipogénesis (hiperplasia) [62,63]. La hipertrofia del tejido adiposo frecuentemente conlleva a hipoxia y fibrosis, lo que a su vez puede resultar en infiltración celular y un aumento en la liberación de citoquinas, incrementando las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad [64,65]. Por otro lado, la hiperplasia del tejido adiposo puede contrarrestar las consecuencias metabólicas perjudiciales de la obesidad, y, por lo tanto, se considera beneficiosa o protectora. Los adipocitos más pequeños generados por la adipogénesis pueden ayudar a preservar una adecuada vascularización, reducir el estrés hipódico y evitar la inflamación en el tejido adiposo [66].

El proceso de adipogénesis del tejido adiposo blanco puede dividirse en dos etapas principales. En la primera etapa, conocida como compromiso al linaje adipogénico, las células MSCs precursoras multipotentes, se diferencian a APCs comprometidas al linaje adiposo y luego a pre-adipocitos completamente comprometidos. Las APCs, son un grupo heterogéneo de células que se asemejan a fibroblastos, y que pueden diferenciarse en distintas líneas de pre-adipocitos (por ejemplo, adipocitos beige y blancos) en respuesta a factores genéticos y ambientales, contribuyendo a la expansión del tejido adiposo [67–69]. Durante este proceso, en las APCs ocurre la activación de factores de transcripción claves como PPAR $\gamma$  (receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma) y C/EBP $\alpha$  (proteína de unión al elemento potenciador CCAAT) [62]. La segunda etapa se conoce como diferenciación. Los pre-adipocitos detienen su proliferación y comienzan a adquirir características morfológicas y funcionales de adipocitos, como la acumulación de lípidos y la expresión de genes específicos de adipocitos. PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  siguen siendo cruciales en este proceso, junto con otros factores como SREBP1 (proteína de unión a elementos reguladores de esteroles) [70]. Las células se convierten en adipocitos maduros, capaces de almacenar lípidos en grandes gotas de grasa y de secretar adiponectinas. Este proceso está influenciado por varios factores externos, como señales hormonales (insulina, glucocorticoides), señales nutricionales y el microambiente tisular [62,63].

Distintas líneas de evidencia muestran un rol importante de las cílias en este complejo proceso. Por ejemplo, numerosos receptores con efectos antagónicos en la adipogénesis se localizan en la cilia primaria de APCs y pre-adipocitos (**Figura 4B**).

El receptor FZD, de tipo GPCR de la vía de WNT, se localiza en la cilia primaria de APCs [71,72]. La señalización por la vía de WNT mantiene a los pre-adipocitos en un estado indiferenciado, y su inhibición es suficiente para desencadenar la adipogénesis espontánea [73].

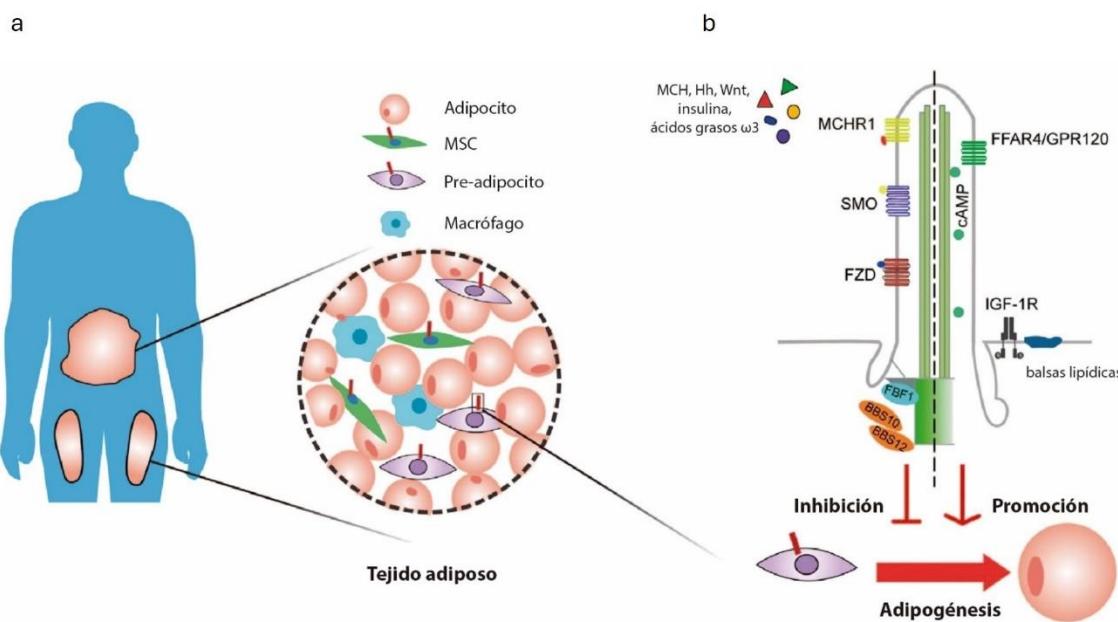
Además, los receptores PTCH1 y SMO de la vía de Shh también tienen una localización ciliar. En APCs, al activarse la vía Shh, PTCH1 es transportado fuera de la cilia, mientras que SMO se acumula en ella, promoviendo la activación de factores de transcripción GLI [71,74]. En pre-adipocitos 3T3-L1, la activación de la vía Shh inhibe la adipogénesis e induce la expresión de marcadores osteogénicos [74]. FBF1, un componente de las fibras de transición ciliares restringe la diferenciación de los pre-adipocitos al promover la transferencia del receptor SMO a la membrana ciliar [75].

Asimismo, el receptor MCHR1 puede translocar a la cilia primaria durante etapas tempranas de la diferenciación de pre-adipocitos, inhibiendo la expresión de genes que desencadenan la adipogénesis [76].

La insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) (del inglés *Insulin Like Grow Factor 1*) son reguladores clave del tejido adiposo blanco. Ambas moléculas promueven la adipogénesis al unirse a sus respectivos receptores, aunque también pueden unirse a receptores intercambiados con una menor afinidad. En pre-adipocitos 3T3-L1, el receptor IGF-1R se localiza tanto en la base de la cilia como en la membrana plasmática; sin embargo, el IGF-1R ciliar es más sensible a la estimulación por insulina. Durante las etapas tempranas de la diferenciación, el receptor IGF-1R se recluta en la base de las cílias junto con balsas lipídicas que propagan la señalización intracelular, favoreciendo así la adipogénesis en respuesta a insulina [77–79].

Finalmente, el receptor FFAR4/GPR120, un tipo de GPCR activado por ácidos grasos ω3 de la dieta, también se localiza en la cilia primaria de pre-adipocitos 3T3-L1 y

APCs murinas y humanas [80]. La activación de FFAR4 induce la adipogénesis a través de la señalización por AMPc ciliar [80].



**Figura 4. Control periférico de la obesidad por la cilia primaria.**

**A.** Esquema de la composición del tejido adiposo. El tejido adiposo blanco, presente en depósitos viscerales y subcutáneos, está formado principalmente por células MSC (del inglés mesenchymal stem cells), pre-adipocitos, macrófagos y adipocitos maduros. Tanto las células MSC como pre-adipocitos poseen cílios, las cuales están ausentes en adipocitos maduros.

**B.** Esquema de la señalización medida por la cilia primaria en tejido adiposo. La cilia primaria actúa en el tejido adiposo como un centro de señalización en células MSC y en pre-adipocitos comprometidos, organizando y transduciendo múltiples señales que regulan la adipogénesis. Específicamente, las vías Wnt y Hh han mostrado tener un efecto inhibitorio de la adipogénesis y sus receptores SMO y FZD, respectivamente, se localizan en la cilia. Asimismo, proteínas ciliares como BBS10, BBS12, FBF1 y MCHR1 también contribuyen a la inhibición de la adipogénesis. Por el contrario, la activación de las vías de señalización FFAR4/GPR120 y IGF-R promueven la adipogénesis. Extraído y modificado de [57].

La cilia sufre cambios dinámicos durante el curso de la adipogénesis. Durante los primeros días de la inducción de la adipogénesis en cultivos primarios de células APCs, ocurre un alargamiento transitorio de las cílias [77]. A medida que las gotas de lípidos comienzan a acumularse en el citoplasma de los pre-adipocitos en cultivo que se están diferenciando, la proporción de células ciliadas y el largo de estas disminuye hasta que éstas son reabsorbidas y están ausentes en los adipocitos maduros [71,77]. La importancia de la presencia de las cílias en etapas iniciales se muestra en experimentos

donde se inhibió la formación de la cilia primaria, mediante el silenciamiento de KIF3A o IFT88. El resultado fue un bloqueo de la adipogénesis tanto en líneas celulares 3T3-L1 como en modelos murinos con delección condicional de IFT88 en pre-adipocitos [78,80].

Interesantemente, numerosos genes BBS tienen un perfil de expresión dinámico a lo largo de la diferenciación de adipocitos, con un pico de expresión máximo al día 3 de la diferenciación en prácticamente todos los genes BBSs analizados [81]. A su vez, la insulina e IGF-1, inductores potentes de la adipogénesis, reducen la expresión de BBS1, BBS2, BBS4 y BBS6 [82]. Este patrón de expresión se asemeja por lo tanto al patrón de ciliación de las células durante la diferenciación. Más aún, se ha comenzado a entender que las proteínas BBS juegan un rol activo en este proceso.

El *knockdown* (KD) de BBS4 en pre-adipocitos induce un aumento de la proliferación y alteraciones en la diferenciación [83]. A lo largo de la adipogénesis, los pre-adipocitos KD para BBS4, acumulan significativamente más triglicéridos, aunque en gotas más pequeñas (pero en mayor número) con perfiles de ácidos grasos modificados [83]. La expresión de marcadores adipogénicos es deficiente en adipocitos KD para BBS4 en relación con adipocitos maduros salvajes [83]. Además, en estudios donde se sobre expresa o reduce la expresión de BBS4, se ha demostrado que este gen regula la captación de glucosa en los adipocitos [82]. Por otra parte, el KD de las chaperoninas BBS10 y BBS12 reduce el número de pre-adipocitos ciliados en tejido adiposo, no se detecta el efecto inhibitorio de la vía WNT y además se favorecen vías pro-adipogénicas a través de la activación de la transcripción de genes por PPARy [71,84]. En línea con lo anterior, adipocitos derivados del cultivo de fibroblastos dérmicos de pacientes con BBS acumulan más triglicéridos [71].

Estos hallazgos resaltan la importancia de la cilia primaria como un centro regulador clave en la adipogénesis, al integrar múltiples vías de señalización que pueden promover o inhibir la diferenciación celular. Sin embargo, el mecanismo molecular que coordina estas señales aún no se conoce completamente. Comprender con mayor precisión la función de la cilia primaria en la adipogénesis y la disfunción del tejido adiposo y trastornos metabólicos relacionados podría arrojar pistas sobre posibles estrategias terapéuticas orientadas a su tratamiento.

En un trabajo previo de nuestro grupo, se identificó un nuevo eje regulador compuesto por BBS4, la proteína FSTL1 (del inglés *Follistatin-like 1*) y la cilia primaria que desempeña un papel relevante durante la adipogénesis [85]. FSTL1 se expresa en células del linaje mesenquimal tanto en humanos como en ratones [86]. A pesar de que su función aún no se comprende completamente, participa en varios procesos como la regulación de la proliferación, diferenciación y migración celular, desarrollo de órganos, carcinogénesis y metástasis, entre otros [87]. En concordancia con una función relevante en estos procesos, el nivel de expresión de FSTL1 cambia durante el transcurso de diferentes patologías, incluyendo enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades autoinmunes sistémicas y obesidad (revisado en [88]).

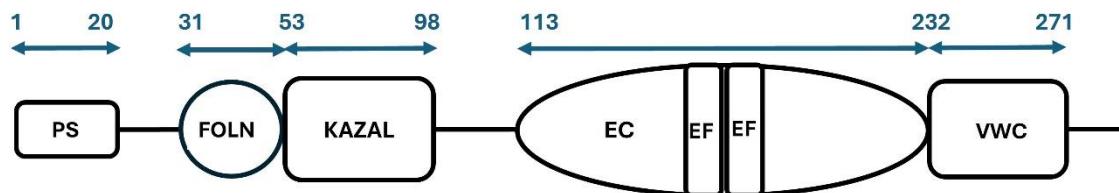
En la siguiente sección, se presenta información relevante para comprender la función de FSTL1 en distintos procesos fisiológicos, con el objetivo de generar un contexto funcional y resumir el conocimiento actual sobre los mecanismos moleculares implicados, con especial énfasis en su rol en la obesidad y en el funcionamiento de las cillas primarias.

## 1.2 *FSTL1*

### 1.2.1 *Estructura del gen y de proteína FSTL1*

En humanos el gen *FSTL1* se localiza en el cromosoma 3, región 3q13.33 y consta de 11 exones, siendo los exones 2 al 11 los exones que codifican para proteína (NCBI ID: 11167). La proteína FSTL1 producida a partir de dicho gen, es una glicoproteína secretada de 308 aminoácidos (Uniprot Q12841). La proteína fue originalmente identificada en la línea MC3T3-E1 osteoblástica murina como un factor inducido por TGF-β1 (del inglés *transforming growth factor β1*) dónde se la denominó *TSC-36* (del inglés *TGF-β1-stimulated clone 36*) [89]. Además, de forma casi simultánea, se identificó como una proteína de alta expresión en medio condicionado de glioma de rata, donde se la denominó *FRP* (del inglés *follistatin-related protein*) [90].

FSTL1 pertenece a la familia de proteínas SPARC (del inglés *secreted protein acidic and rich in cysteine*). Como se puede observar en la **Figura 5**, la región N terminal de la proteína FSTL1 humana consta de un péptido señal (PS) de unos 20 aminoácidos y una región acídica sin afinidad por calcio. Seguidamente, un dominio homólogo a follistatin (FS) que contiene 10 residuos de cisteínas que conforman 5 pares de puentes disulfuro. Este dominio FS, a su vez, puede ser subdividido en un dominio tipo follistatin (FOLN) y un dominio inhibidor de serin proteasas tipo Kazal (KAZAL) [91]. Además, presenta un dominio extracelular de unión al calcio (EC) con dos hojas EF, y en el extremo C-terminal, un dominio con alta homología al *von Willebrand factor* tipo C (VWC).



**Figura 5. Estructura de la proteína FSTL1 en humanos.** En el esquema se ilustran los dominios presentes en la proteína: el péptido señal (PS), dominio follistatin (FOLN), dominio tipo KAZAL, el dominio extracelular de unión a calcio (EC) que contiene dos hojas EF-hands y dominio Von Willebrand factor type C (VWC). Extraído y modificado de [92].

En *H. sapiens* la proteína canónica no glicosilada tiene un peso de 35 KDa, con predicción de 4 sitios de N-glicosilación, 2 sitios de O-glicosilación y 2 sitios de fosforilación [90,93] (Uniprot Q12841). Mediante espectrometría de masas se han detectado dos isoformas cargadas eléctricamente que difieren en el grado de glicosilación, particularmente en la incorporación de ácido siálico [93]. El dominio FS de la proteína FSTL1 murina, forma un dímero estable tanto en solución como en cristal [91]. Además, este dominio es indispensable para que ocurra la correcta función de FSTL1 en la transducción de señales mediada por TGF- $\beta$ 1, proteína conocida por actuar de forma dimérica [91]. Estas observaciones sugieren que la proteína FSTL1 podría estar actuando como un dímero [91].

### 1.2.2 FSTL1 en enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de patologías que afectan el corazón y los vasos sanguíneos e incluyen falla cardíaca (cardiopatías e isquemia de miocardio) y enfermedades que afectan las arterias coronarias. Los niveles séricos de FSTL1 están significativamente elevados en pacientes que sufren numerosas enfermedades cardiovasculares como: síndrome coronario agudo [94,95], falla cardíaca sistólica crónica [96] e insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada [97]. Además, el nivel de FSTL1 en sangre se correlaciona significativamente con una mayor severidad y/o menor sobrevida de los pacientes [94–96,98,99].

Por otro lado, la expresión de FSTL1 en el corazón tiene un rol protector frente diversas a lesiones [100–102]. En un corazón saludable, la expresión de FSTL1 se localiza principalmente en el epicardio [103]. Tras un infarto de miocardio se pierde la expresión en el epicardio y aumenta en el miocardio [103]. La administración de FSTL1 mediante un parche epicárdico en modelos de ratón y cerdo con infarto de miocardio ha demostrado estimular la entrada en el ciclo celular y la división de cardiomiositos preexistentes, mejorando la función cardíaca y la supervivencia [103]. Además, actualmente se investiga el uso potencial del trasplante de células MSC que sobreexpresan FSTL1 en corazones infartados, lo que favorece la revascularización, reduce la inflamación y mejora la supervivencia celular en el miocardio [104].

### **1.2.3 *FSTL1* y cáncer**

El rol de FSTL1 en el cáncer es aún controversial, ya que, dependiendo fundamentalmente del tipo de tumor, puede tanto favorecer como inhibir la carcinogénesis.

Estudios que analizaron la expresión de FSTL1 en biopsias tumorales, ya sea analizando ARNm mediante qPCR o proteína mediante Western Blot e Inmunohistoquímica, revelaron patrones opuestos según el contexto. Se ha observado un aumento significativo de FSTL1 en tejido tumoral en relación con tejido normal pareado en adenocarcinoma colorrectal [105], cáncer gástrico [106,107], glioblastoma [108–110], hepatocarcinoma [111,112]. Por otro lado, se encontró una reducción de FSTL1 en cáncer

de mama [113], carcinoma de ovario [114,115], carcinoma de endometrio [114], cáncer cervical [116], carcinoma nasofaríngeo [117], cáncer de pulmón no microcítico [118,119] y carcinoma renal de células claras [120,121].

En este sentido, se estudió la sobrevida de pacientes con baja y alta expresión de FSTL1 a nivel tumoral, con el mismo tipo de tumor. En aquellos tumores con alta expresión de FSTL1, como cáncer colorrectal [105], glioblastoma [109], cáncer gástrico [106,107] y hepatocarcinoma [111,112] una mayor expresión de FSTL1 se asoció significativamente a una peor sobrevida. En cambio, en tumores donde la expresión de FSTL1 es baja, como cáncer de mama, una menor expresión de FSTL1 se correlacionó con una reducción en la sobrevida [113].

Ensayos *in vitro* en diferentes líneas tumorales apoyan esta funcionalidad dual de FSTL1, sugiriendo que puede actuar como un oncogén o como un supresor tumoral, dependiendo del tipo celular y del microambiente [106,112,122,123].

#### **1.2.4 *FSTL1 en patologías donde la inflamación juega un rol central***

La concentración sérica de FSTL1 en pacientes con patologías reumáticas sistémicas como osteoartritis, artritis reumatoidea, artritis idiopática juvenil sistémica y artritis, es significativamente superior a la de controles [124–127]. Esta observación puede extenderse a pacientes con otras patologías autoinmunes sistémicas como colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica y polimiositis/dermatomiositis. En algunas patologías articulares, como osteoartritis, artritis reumatoidea, artritis idiopática juvenil sistémica, existe una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de FSTL1 en sangre y el grado de desarrollo de la patología, evaluado mediante otros marcadores inflamatorios [125,127,128]. Además, dichos niveles disminuyen en el curso de tratamientos eficaces [92,129]. En pacientes con patologías reumáticas, la expresión de FSTL1 se encuentra aumentada en el tejido sinovial, en relación con pacientes control con trauma de rodilla sin enfermedad [126,127,130]. Dicha expresión se restringe principalmente al citoplasma de sinoviocitos y células endoteliales [124,125].

En otro contexto, en la enfermedad de Kawasaki, que se caracteriza por una inflamación sistémica y vasculitis, la abundancia de FSTL1 en sangre aumenta en pacientes con un desarrollo agudo de la enfermedad y son superiores en pacientes que presentan complicaciones o que no responden a la terapia con inmunoglobulinas [131]. También se ha visto que pacientes críticos con sepsis bacteriana generalizada, presentan niveles mayores de FSTL1 en suero [92].

Los monocitos/macrófagos no expresan normalmente FSTL1, pero son capaces de captar FSTL1 en el sitio de la inflamación, lo que resulta en un aumento en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL6) [92,130,132].

Sin embargo, también existen reportes de que FSTL1 podría tener un efecto anti-inflamatorio en algunos escenarios. El modelo de artritis inducida por anticuerpos contra colágeno tipo II se ha utilizado frecuentemente para investigar el papel de FSTL1 en la inflamación articular en ratones. En el modelo, el tratamiento con FSTL1 humano atenúa la inflamación articular, reduciendo significativamente la gravedad de la artritis y la expresión de IL-6 (interleuquina-6), MMP3 y MMP9 (Metaloproteinasa de matriz 1 Y 9, respectivamente), que están asociados con la destrucción articular y la inflamación sinovial [133].

La hipótesis actualmente planteada es que FSTL1 podría tener un efecto anti-inflamatorio durante la fase aguda de algunas enfermedades inflamatorias, pero sin embargo tendría un efecto pro-inflamatorio a largo plazo y en enfermedades crónicas [88,129].

### **1.2.5 FSTL1 y obesidad**

La obesidad ha crecido sustancialmente en las últimas décadas convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial que tiene impacto en el riesgo y pronóstico de otras patologías tales como, las enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, diabetes tipo 2 y cáncer [134]. La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial compleja, definida por un índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 30 kg/m<sup>2</sup> y se caracteriza por un aumento excesivo de la masa del tejido adiposo [135].

El tejido adiposo, además de ser un tejido de almacenamiento de energía, actúa como un órgano clave en las funciones endocrinas e inmunológicas, a través de la secreción de una variedad de moléculas bioactivas llamadas adipoquinas. Las adipoquinas, como la leptina y la adiponectina, son capaces de modular el peso corporal, el apetito, la homeostasis de glucosa, la inflamación y la presión arterial [136]. También en este tejido se secretan citoquinas pro- y anti-inflamatorias, como por ejemplo IL-6, TNF-α, IL-1β (interleuquina -1β) [137,138]. Por otra parte, las hormonas producidas en otros tejidos como el intestino y el sistema cardiovascular son integradas en una red compleja centrada en el tejido adiposo [139]. Durante la obesidad, el exceso de tejido adiposo altera el equilibrio en la secreción de estas moléculas, promoviendo un aumento de citoquinas proinflamatorias y la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo. Esto genera un estado de estrés oxidativo e inflamación crónica, que predispone al desarrollo de resistencia a la insulina y complica las afecciones cardiovasculares asociadas a la obesidad (revisado en [139–141]).

Los niveles séricos de FSTL1 en individuos con sobrepeso/obesos están aumentados significativamente frente a sujetos controles [142,143]. Sin embargo, cuando se analizó una cohorte de hombres y mujeres con obesidad mórbida y super-obesidad (IMC promedio 44.77 kg/m<sup>2</sup>) se observó una reducción significativa en los niveles séricos de FSTL1 frente a individuos con IMC de rango normal [144]. Los niveles de FSTL1 en sangre dependen del estado metabólico de los individuos, lo que complejiza el análisis y podría explicar la diferencia entre los resultados en las diferentes cohortes de individuos. En hombres saludables, existe una correlación entre los niveles plasmáticos de FSTL1 con el IMC así como con marcadores de estrés oxidativo como proteína C reactiva y metabolitos

reactivos del oxígeno [145]. También se ha encontrado que el nivel sérico de individuos con diabetes tipo II es superior a individuos saludables [143].

En un estudio realizado en Uruguay, en el cuál participó nuestro grupo, se observó que, en pacientes sometidos a cirugía bariátrica, niveles séricos pre-quirúrgicos más altos de FSTL1 se correlacionan con una mayor reducción del IMC, es decir una mayor probabilidad de éxito de la cirugía [146].

Los principales tejidos productores de FSTL1 en ratón incluyen el tejido adiposo, tanto tejido adiposo blanco (WAT, del inglés *White Adipose Tissue*) como tejido adiposo pardo (BAT, del inglés *Brown Adipose Tissue*), pulmones y músculo (esquelético y cardíaco) [143,147]. La expresión de FSTL1 es elevada en pre-adipocitos y disminuye en etapas tempranas de la diferenciación de adipocitos [147]. En el trabajo previo de nuestro grupo se mostró que FSTL1 es un regulador directo de este proceso [85]. En ese trabajo se planteó que tanto los niveles altos de FSTL1 al inicio, así como la reducción de sus niveles una vez en marcha la diferenciación, son importantes para esta función. Cuando se silencia la expresión de FSTL1 al comienzo de la inducción de la adipogénesis, así como cuando se administra FSTL1 recombinante para mantener altos los niveles de FSTL1 en el medio de cultivo durante etapas tardías, se produce una inhibición significativa de la diferenciación de la línea celular de pre-adipocitos 3T3L1, medida por la acumulación de lípidos teñidos con Oil red oil (ORO) y la expresión de marcadores de diferenciación [85].

Interesantemente, la expresión de FSTL1 muestra un patrón similar al de las proteínas BBS con niveles altos al inicio de la diferenciación y niveles bajos una vez que comienza el proceso. Estos niveles también se correlacionan con la dinámica de las cílias durante la diferenciación, que como mencionamos antes, están presentes en pre-adipocitos y al inicio de la diferenciación y luego se acortan y reabsorben a medida que la diferenciación a adipocitos maduros avanza.

### **1.2.6 Relación entre FSTL1, la cilia y la adipogénesis**

En el trabajo previo de nuestro grupo se logró vincular a FSTL1 con la cilia, posicionando a FSTL1 no solo como un gen regulado por la funcionalidad de la cilia sino como un nuevo regulador de la ciliogénesis, aspecto que podría jugar un rol fundamental en el contexto de la adipogénesis. Se demostró que la expresión de FSTL1 depende de la funcionalidad de la cilia: el silenciamiento de BBS4, así como IFT88 en hTERT-RPE1, resultó en una reducción significativa de la expresión de FSTL1 [85]. Interesantemente, también se mostró que BBS4 regula los niveles de FSTL1 por un mecanismo adicional independiente de la cilia: cuando se silenció la expresión de BBS4 se inhibió la secreción de FSTL1 y la proteína se observó retenida en vesículas del tipo de lisosomas [85].

Además, el silenciamiento de FSTL1 resulta en una reducción significativa del número de células ciliadas, así como del largo de las cillas [85]. Interesantemente, se pudo comprobar una correlación directa entre los niveles de FSTL1 y el estado de ciliación durante la diferenciación de pre-adipocitos 3T3L1: la inhibición de FSTL1 al inicio resultó en cillas más cortas mientras que la adición de FSTL1 recombinante al medio inhibió la reabsorción de las cillas en células ocurre a partir del día 3-4 de la diferenciación [71]. Por lo tanto, nuestros resultados previos sugieren que durante la adipogénesis ocurre una regulación retroalimentada en la funcionalidad de la cilia mediada por la expresión de FSTL1 que a su vez regula la ciliogénesis. Todos estos resultados han sido obtenidos a partir del estudio de células en cultivo y se desconoce la relevancia de FSTL1 en el contexto del tejido adiposo.

Por otro lado, el efecto observado de FSTL1 sobre la ciliogénesis es de tipo paracrino, es decir a través de la proteína secretada, mediante una vía de señalización actualmente desconocida.

Existe numerosa evidencia en la literatura que vincula a FSTL1 con diferentes vías de señalización intracelular durante diferentes procesos. DIP2A (del inglés *Disco Interacting Protein 2 Homolog A*) ha sido postulado como receptor de la proteína FSTL1 en varios contextos fisiológicos. Por ejemplo, frente a daño isquémico, FSTL1 muestra efectos protectores en cardiomocitos y células endoteliales. En este contexto hay evidencias que

indican que FSTL1 actúa a través de DIP2A en la activación de la vía PI3K/AKT, facilitando sus efectos anti-apoptóticos y reparadores en el tejido cardíaco [100,102,148]. En glioblastoma, FSTL1 favorece la proliferación tumoral y la resistencia a fármacos, también a través de su interacción con DIP2A [110,149,150]. Finalmente, en procesos inflamatorios, FSTL1 y DIP2A participan en la modulación de citoquinas, regulando la respuesta antiinflamatoria en tejidos con inflamación crónica [132].

A partir de estos antecedentes surgen las preguntas que se abordarán en el presente trabajo bajo la hipótesis general **de que la reducción de los niveles de FSTL1 media al menos parte de los efectos de la deficiencia de BBS4, en el proceso de ciliogénesis y contribuye de esta manera a la patogénesis de BBS.**

En esta tesis trabajaremos sobre dos hipótesis específicas:

**Hipótesis 1:** DIP2A, un receptor descrito para FSTL1, y la vía de AKT son mediadores de la función paracrína de FSTL1 involucrada en la ciliogénesis en hTERT-RPE1.

**Hipótesis 2:** FSTL1 afecta la ciliogénesis y diferenciación de adipocitos en el tejido adiposo *in vivo*.

## **2 Objetivo general**

---

Como objetivo general nos planteamos explorar el mecanismo por el cual FSTL1 regula la ciliogénesis *in vitro* y determinar cuál es la relevancia funcional de FSTL1 sobre los procesos de ciliogénesis y adipogénesis *in vivo*.

### **2.1 Objetivos específicos**

#### **2.1.1 *Evaluuar posibles mecanismos de transducción de señales que median la función de FSTL1 en la ciliogénesis en hTERT-RPE1***

2.1.1.1 *Estudiar del rol de DIP2A en la actividad parácrina de FSTL1 sobre la ciliogénesis.*

2.1.1.2 *Estudiar las vías de señalización intracelular que median la acción de FSTL1 durante la ciliogénesis*

#### **2.1.2 *Analizar el rol de FSTL1 en la ciliogénesis y en el desarrollo del tejido adiposo en pez cebra.***

2.1.2.1 *Evaluuar el fenotipo durante el desarrollo embrionario temprano y la ciliogénesis en embriones morfantes para *fstl1a* y *fstl1b*.*

2.1.2.2 *Generar una línea de peces knockout para *fstl1a* mediante el sistema de edición genómica CRISPR-Cas9.*

2.1.2.3 *Caracterizar el fenotipo embrionario temprano y la capacidad de formación de tejido adiposo en la línea *fstl1a* (-/-).*

### 3 Materiales y métodos

---

#### 3.1 Cultivo celular

##### 3.1.1 Medios y condiciones de cultivo

**Tabla 2. Características y condiciones de cultivo de la línea celular hTERT-RPE1**

Línea	hTERT-RPE1
#	ATCC® CRL-4000™
Organismo	<i>Homo sapiens</i>
Tejido	Retina, ojo, epitelio pigmentado
Tipo celular	Células epiteliales RPE- inmortalizadas mediante la transfección con el plásmido pGRN145 que expresa la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT) [151]
Medio de cultivo	Medio DMEM: F-12 con L-Gutamina y 15 mM HEPES (#31330-38)
	10 % SFB
	100 U/mL PS
	10 mM HEPES
	0,01 mg/mL Higromicina B

Cultivamos la línea celular hTERT-RPE1 a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Para el pasaje de las células, lavamos con PBS 1X (sin magnesio y sin calcio) e incubamos con tripsina 0,05 % EDTA 1 mM (#25300-054, Gibco) durante 5 min a 37 °C (1 mL de tripsina/placa de 100 mm). Inhibimos posteriormente la tripsina mediante el agregado de medio con suero fetal bovino (SFB). Replaqueamos diluyendo la suspensión celular en placas nuevas según la densidad buscada.

Para el almacenamiento a largo plazo de la línea, resuspendimos las células tripsinizadas en 10 mL de medio completo con suero y las transferimos a un tubo cónico de 15 mL. Centrifugamos las células a 800 g durante 5 min, aspiramos el sobrenadante y

resuspendimos el *pellet* en medio de congelación (90 % SFB, 10 % DMSO). Distribuimos en crioviales y las conservamos en nitrógeno líquido (-195,8 °C).

### **3.1.2 KD mediante el uso de StealthRNAi™ siARN**

Para reducir la expresión de nuestros genes de interés (*knockdowns*: KD) empleamos oligonucleótidos sintéticos pre-diseñados *in silico* o *stealth RNAi* de Thermo Fisher Scientific. Estos oligonucleótidos de 25 pb son moléculas de ARN doble cadena (siARNs), con modificaciones químicas que le otorgan una alta especificidad y estabilidad en las condiciones de cultivo celular, hibridando e inhibiendo la traducción del ARNm del gen de interés, mediante silenciamiento inducido por interferencia por ARN. Como control negativo, empleamos un siCneg de secuencia aleatoria que no hibrida con ninguna secuencia específica en el genoma humano, con un contenido GC similar a los siARN específicos. En cada condición ensayada, añadimos la cantidad correspondiente de siCneg, de manera de que la cantidad total de siARN sea la misma en todas las transfecciones (secuencias incluidas en la Tabla 5 en el Anexo).

Transfectamos estos siARN en las células en complejos con *Lipofectamine® RNAiMAX* (#13778-150, Thermo Fisher Scientific), mediante un protocolo de transfección reversa, en donde los complejos se adicionan en la placa con las células en suspensión. Tanto la dilución de la lipofectamina como la de los siARN las realizamos en medio *Opti-MEM Reduced Serum Medium* (# 31985-062, Thermo Fisher Scientific).

Para cada pocillo de 35 mm, preparamos una mezcla de 250 µL de *Opti-MEM* y 5 µL de *Lipofectamine RNAiMAX*. Por otro lado, diluimos los siARN en 250 µL de Opti-MEM a la concentración de uso.

Mezclamos ambos tubos en una proporción 1:1 y los incubamos durante 5 min a temperatura ambiente (TA). En cada pocillo, agregamos la mezcla junto con 1 mL de células en suspensión y 500 µL de medio *DMEM GlutaMAX™* con 10 % de SFB, sin antibióticos, ya que su presencia disminuye la eficiencia de la transfección.

**Tabla 3. Condiciones de transfección con siARN dirigidos para FSTL1 y DIP2A**

siARN	stealth hDIP2A (pmol/mL)	stealth hFSTL1 (pmol/mL)	stealth hCneg (pmol/mL)
FSTL1		10	45
DIP2A	45		10
FSTL1+DIP2A			
Cneg			55

Luego de 24 h de la transfección, cambiamos el medio de las células por *DMEM GlutaMAX™* con antibióticos con o sin 10 % SFB (Suero Fetal Bovino), la ausencia de SFB favorece la ciliación, y mantuvimos el cultivo en esas condiciones por 24 o 48 horas adicionales según el experimento.

Tal como se detalla a continuación, analizamos la eficiencia del *knockdown* midiendo los niveles de ARNm mediante qRT-PCR y/o los de proteína mediante Western Blot.

### **3.1.3 Extracción de ARN y síntesis de ADN copia (ADNc)**

Realizamos la extracción de ARN total a partir de las células en cultivo en placas de 35 mm utilizando TRIZOL (Invitrogen# 15596-026), siguiendo el protocolo del fabricante con pequeñas modificaciones. Lavamos las células con PBS y luego las resuspendimos en 1 mL de TRIZOL. Las transferimos a un tubo eppendorf y las incubamos durante 5 min a TA. Agregamos 200 µL de cloroformo, agitamos vigorosamente durante 15 seg e incubamos durante 3 min a TA. Centrifugamos a 12.000 g durante 15 min a 4 °C y transferimos el sobrenadante a un nuevo tubo, al que luego añadimos 500 µL de isopropanol. Mezclamos por inversión e incubamos 10 min a TA. Centrifugamos a 7.500 g durante 5 min a 4 °C y descartamos el sobrenadante. Lavamos el *pellet* con etanol 75 %. Dejamos secar el *pellet* durante 10 min al aire y lo resuspendimos en 30 µL de agua libre de nucleasas (Gibco), incubando durante 10 min a 56 °C. Determinamos la concentración de ARN midiendo la absorbancia a 260 nm y su pureza a través de la relación de las absorbancias 260/230 nm y 260/280 nm (NanoDrop, Thermo). Finalmente, almacenamos las muestras a -80 °C. Realizamos la síntesis de ADN copia (ADNc) empleando el kit *SuperScript™ First-Strand*

*Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen #11904018) a partir de 1-5 µg de ARN, siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando como cebador oligo dT (20mer 5'Phos de IDT) o hexámeros aleatorios según el experimento.

### **3.1.4 Real time PCR (qPCR)**

Evaluamos la expresión relativa de los genes de interés mediante PCR en tiempo real, en el equipo *Eco Real-Time PCR System* (Illumina) con el agente intercalante fluorescente SYBR Green.

El valor de Ct (del inglés *cycle threshold*) corresponde al número de ciclos necesarios para que la fluorescencia de la PCR alcance un nivel umbral, y es inversamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico molde presente en la muestra. Empleamos actina como gen de referencia el cuál no modifica su expresión en las condiciones ensayadas (gen *housekeeping*) y normalizamos su expresión frente a la condición control (control de siARN). Calculamos la tasa de expresión relativa (R) de los genes de interés como  $2^{-\Delta Ct}$  (método  $\Delta\Delta Ct$ ) [152].

Todas las muestras se ensayaron por triplicado, y los valores de Ct se promediaron entre las réplicas técnicas. Los cebadores fueron diseñados con el algoritmo Primer3 a través del programa Primer-BLAST (secuencias incluidas en la Tabla 5 en el Anexo).

**Tabla 4. Condiciones de reacción empleadas en qPCR**

SYBR FAST Universal 2X qPCR Master Mix (Kapa # SFUKB)	1 x
cebador F	0.4 µM
cebador R	0.4 µM
ADNc	1/100

### **3.1.5 Extracción y dosificación de proteínas**

Lavamos las células con PBS (sin magnesio ni calcio) y las incubamos con tripsina 0,05 % durante 5 min a 37 °C (1 mL de tripsina/placa de 100 mm). Inhibimos la tripsina añadiendo medio con SFB y transferimos las células a un tubo cónico de 15 mL.

Realizamos dos lavados con PBS, centrifugando a 800 g durante 5 min. Agregamos 100-200 µL de Buffer de Lisis 150 mM NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 1 % NP-40, 1x cocktail de inhibidores de proteasas (#S8830, Roche) al *pellet* de células e incubamos los extractos durante 45 min a 4 °C en cámara fría con rotación. Centrifugamos los extractos 14.000 g durante 15 min y conservamos el sobrenadante, que se almacena a -20 °C.

Utilizamos el método de ácido bicinconíco (*BCA Protein Assay Kit # 23225 Thermo Fisher Scientific*) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante para placas de 96 pocillos. Dosificamos la concentración de proteínas a partir de 25 µL de diluciones de los lisados proteicos. Realizamos las mediciones por duplicado para cada muestra y una curva estándar con diluciones seriadas de Sero-Albúmina Bovina (BSA) también por duplicado. Medimos la absorbancia de las muestras por espectrofotometría a 562 nm en un lector de placas de ELISA y calculamos la concentración de proteínas mediante la interpolación en la recta de calibración, empleando una planilla electrónica de cálculos.

### **3.1.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western Blot**

Separamos las proteínas según su peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Hervimos las muestras disueltas en buffer Laemmli (Tris-HCl (pH6,8) 62,5 mM, SDS 2 %, Glicerol 10 % (v/v), azul de bromofenol 0,01 %, β-mercaptoetanol 5 % (v/v)) durante 5 min a 95 °C, y las enfriamos en hielo y luego sembramos la cantidad deseada. Utilizamos como *buffer* de corrida TGS (Tris-HCl 24 mM, Glicina 192 mM y SDS 3.5 mM, pH 8.3-8.6). Sembramos también marcador de peso molecular *PageRuler™ Plus Pre-stained Protein Ladder, 10-250 kDa (#26619, Thermo Fisher Scientific)*. Realizamos las electroforesis a 30 mA por gel hasta que la migración del frente de corrida alcance el final del gel. Posteriormente realizamos las transferencias a una membrana de PVDF *Hybond P 0,45 PVDF (#10600023, Amersham)*, previamente activada con metanol en buffer de transferencia (TGS, 20% EtOH), a 400 mA durante 1-2 h a 4 °C.

Luego de la transferencia, bloqueamos las membranas en una solución PBS-T (PBS 1X/Tween 20 0,1 % v/v), 5 % BSA durante 1 h a TA con agitación. Posteriormente, incubamos las membranas con el anticuerpo primario apropiado en PBS-T, 1 %BSA durante 1-4 h a TA o durante toda la noche con agitación a 4 °C. A continuación, realizamos 3 lavados con PBS-T por 10 min con agitación. Luego, incubamos las membranas con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con HRP (*Horseradish Peroxidase*). Para el revelado, utilizamos el sistema de quimioluminiscencia apropiado para cada ensayo, *SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate* (#34077, *Thermo Fisher Scientific*), o *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (#34094, *Thermo Fisher Scientific*), y placas de rayos X, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Utilizamos los anticuerpos: Anti-FSTL1 humana (AF1694, R&D), anti-DIP2A (PA5-49457, *Thermo Fisher Scientific*), anti-fosfo-p44/42 MAPK (ERK1/2) (clone D13.14.4E #4370, *Cell Signaling*), anti-p42/44 MAPK (Erk1/2) (clone 137F5, #4695, *Cell Signaling*), anticuerpo conjugado a HRP anti-ratón (A0545, *Sigma*).

### **3.1.7 Inmunofluorescencia**

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia, sembramos las células sobre cubreobjetos estériles. Retiramos el medio de cultivo y lavamos las células con PBS precalentado a 37 °C. Luego, fijamos las células con metanol durante 10 min a -20 °C. Realizamos 2 lavados con PBS durante 1 min cada uno y luego permeabilizamos las células con Tritón X-100 al 0.1% en PBS durante 10 min a TA. Luego de dos lavados con PBS de 5 min cada uno, bloqueamos con 0,5 % de SFB (suero fetal bovino) en PBS durante 1 h a TA. Lavamos los cubreobjetos con PBS y los incubamos durante 1 h con el anticuerpo primario diluido en PBS a TA. Posteriormente, efectuamos 3 lavados con PBS de 10 min cada uno e incubamos, protegiendo de la luz, con el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo correspondiente y el marcador nuclear durante 1 h. Para finalizar realizamos 3 lavados con PBS de 5-10 min cada uno, montamos los preparados en medio de montaje *ProLong Gold Antifade Reagent* (#P36930, *Invitrogen*) y sellamos con esmalte de uñas. Obtuvimos las

imágenes de los preparados utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 equipado con un objetivo 63X de inmersión con aceite 1,4 NA.

Para visualizar las cílias, utilizamos los siguientes anticuerpos: anti-tubulina acetilada (T7451, Sigma) para marcar axonema ciliar, anti- $\gamma$ -tubulina (T6557, Sigma) para marcar el cuerpo basal, anti-ratón IgG1 Alexa488 (A21121, Thermo); anti-ratón IgG2b-568 (A21144, Thermo), en todos los casos en una dilución 1/1000 en PBS. Junto con el anticuerpo secundario incluimos DAPI (6  $\mu$ g/ml) para visualizar los núcleos.

Para las pruebas de localización subcelular de DIP2A, utilizamos el anticuerpo anti-DIP2A PA5-49457 (Thermo Fisher Scientific) realizando diferentes modificaciones del protocolo de inmunofluorescencia. Además de la fijación con metanol, probamos con PFA al 4 % o la combinación de metanol y luego PFA. También probamos de permeabilizar con Tritón X-100 al 0,1 % en PBS, así como con Saponina al 0,1 % en PBS durante 10 min.

### **3.1.8 *Mediciones de las cílias y análisis estadísticos***

Para el análisis de las cílias medimos su largo, así como también el número de células ciliadas en cada condición. Para esto, procesamos y analizamos las imágenes confocales obtenidas con el software *ImageJ*. Para la medición de largos de cílias, realizamos la proyección en Z de las imágenes obtenidas, hicimos el ajuste de brillo y contraste, seleccionamos las cílias individuales utilizando la herramienta de selección *freehand tool* y realizamos la medición utilizando la herramienta *measure tool* disponible en *ImageJ*. En cada condición medimos al menos 50 cílias. Analizamos los resultados mediante el software *GraphPad Prism*. Luego de la identificación de *outliers* realizamos test de normalidad. En el caso que las medidas, presentaran una distribución normal, realizamos las comparaciones mediante el *test t* de Student o el *test* de ANOVA con comparaciones *a posteriori* con el *test* de Tukey. En los casos que los datos no presentaron una distribución normal, utilizamos el *test* no paramétrico de Kruskal Wallis.

Para el análisis del número de células ciliadas, contamos la cantidad de células ciliadas en relación con el número de células totales en varios campos de cada condición.

Realizamos la comparación entre proporciones por medio de un *test* específico en el que se analizan y comparan las sumas de los datos de número de cílios y número de células contados en 5-10 campos de imágenes obtenidas con un aumento de 63X (*test* de hipótesis para proporciones) [153].

En todos los casos, consideramos las diferencias significativas cuando los valores de *p* valor fueron inferiores a 0,05.

### **3.2 Trabajo en pez cebra**

#### **3.2.1 Mantenimiento de peces cebra adultos**

En este trabajo utilizamos el modelo experimental *Danio rerio* (pez cebra), para realizar los ensayos *in vivo*. Mantuvimos los peces adultos en un sistema *ZebTec Stand Alone* o *Active Blue* de *Tecniplast* (Italia), con el agua a 28 °C (máximo 30 °C, mínimo 26 °C), conductividad de 500 µS/ cm<sup>2</sup> (máximo 600 µS/cm<sup>2</sup>, mínimo 400 µS/cm<sup>2</sup>) y pH 7,5 (máximo 8,5; mínimo 6,5). Estos sistemas, también controlan las concentraciones de NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (máximo 0,5 ppm), NO<sub>2</sub> (máximo 0,25 ppm) y NO<sub>3</sub> (máximo 50 ppm). El ciclo luz: oscuridad en el acuario fue de 14:10 h. La alimentación fue a base de comida seca dos veces por día (generalmente TetraMin en escamas; Tetra, Alemania) y viva (larvas nauplio de *Artemia salina* de 24-48 h post-eclosión) una vez por día. Utilizamos la línea salvaje de peces TAB5. Para la manipulación tanto de embriones, larvas y adultos, seguimos los protocolos aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales de Institut Pasteur de Montevideo (Protocolos # 007-19, 009-19, 010-19, 011-19) y contamos con la acreditación personal otorgada por CHEA y CNEA.

#### **3.2.2 Obtención y mantenimiento de embriones**

Para obtener embriones, sepáramos peces machos y hembras del resto del grupo en la tarde anterior al día de reproducción. Los colocamos en peceras especiales de doble fondo, denominadas parideras, conteniendo agua del sistema. Se coloca la cantidad de peces adecuada de acuerdo con el tamaño de la paridera (máximo 4 peces/L) y son separados por sexo mediante un tabique. A la mañana siguiente, retiramos el tabique y cambiamos el agua, dejándola a un nivel mínimo, para inducir el desove. Luego del desove, recolectamos los embriones y los colocamos en placas de 10 cm de diámetro con agua de acuario con 0,2 mg/L de azul de metileno para prevenir el crecimiento de hongos (medio de embriones). Incubamos los embriones a una temperatura estándar de 28,5 °C, o en caso de desear modificar la velocidad del desarrollo, a un mínimo de 26 °C y un máximo de 32 °C [154]. Realizamos la datación de embriones entre las 0 y las 72 horas post fecundación (hpf) de acuerdo con el trabajo de Kimmel y colaboradores [154]. Para

aumentar la transparencia óptica en la obtención de imágenes, incubamos los embriones desde las 8 hpf con 30 mg/L PTU (1-phenyl 2-thiourea, Sigma P7629) en medio de embriones [155]. PTU es un inhibidor que se emplea de forma rutinaria para inhibir la pigmentación. Mediante la inhibición de la enzima tirosinasa, inhibe la síntesis de melanina, y a la dosis empleada, genera efectos secundarios mínimos [156].

### **3.2.3 Inyección de embriones**

Colocamos los embriones a ser inyectados en una fila usando de guía el lado largo de un portaobjetos en la tapa de una placa de 10 cm, manteniendo una mínima cantidad de medio de embriones. Para realizar la microinyección utilizamos agujas estiradas en un *puller* Sutter (P97) a partir de capilares de borosilicato con filamento (WPI #1B100F-4), micromanipulador y un microinyector neumático, utilizando aire comprimido a aproximadamente 50 psi (ASI, modelo MPPI-3).

Para la inyección de morfolinos (ver la siguiente sección), inyectamos entre 0,5 y 5 nL de la solución de morfolino 2 mM en el vitelo de embriones de entre 1 a 8 células. En el caso de las inyecciones con ARNg y ARNm de Cas9, descargamos un volumen de 0,5 o 1 nL de la solución en el citoplasma de embriones de una célula. Inyectamos ambos guías por separado (50 pg de cada ARNg junto con 150 pg de ARNm de la enzima Cas9) o combinados (25 pg junto con 100 pg de la enzima Cas9).

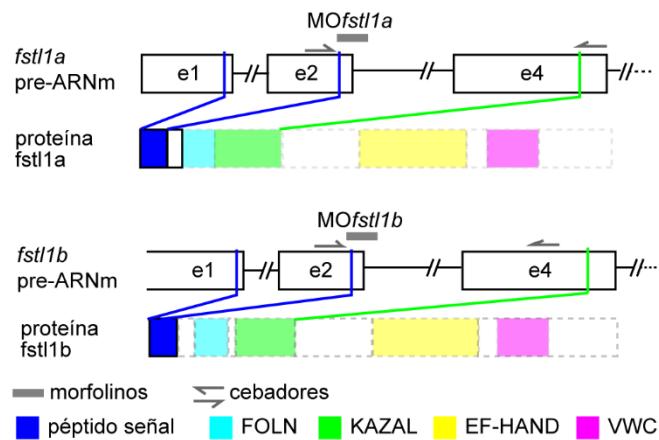
### **3.2.4 KD de *fstl1a* y *fstl1b* en embriones utilizando morfolinos**

Los oligómeros de morfolino (MO) son moléculas sintéticas conformadas por las bases de los ácidos nucleicos (A, T, C, G) asociadas a anillos de morfolino que se unen a través de grupos fosfodiamidato [157]. Estos grupos no poseen carga a pH fisiológico y no son degradados por nucleasas. En general tienen 25 pares de bases de largo y se unen a secuencias complementarias en el ARNm. Pueden actuar por dos mecanismos: inhibiendo el procesamiento del ARNm (*splicing*) o el inicio de la traducción [157].

En este trabajo empleamos MO de bloqueo de *splicing* para los genes *fstl1a* y *fstl1b*. Estos MOs están diseñados para interferir con el proceso de *splicing*, en este caso reteniendo el intrón 2 en el ARNm tanto para *fstl1a* como *fstl1b*) (**Figura 6**). Además, utilizamos un MO estándar (que no hibrida con ninguna secuencia conocida en el pez) de control a las mismas dosis que las empleadas por los MOs específicos. Los MOs que empleamos en este trabajo fueron diseñados por nuestro laboratorio con el equipo de diseño de Gene Tools (Philomath, USA) y su secuencia se encuentra incluida (en la Tabla 5 en el Anexo).

Los MOs son recibidos liofilizados y los resuspendimos en agua ultrapura a una concentración de 2 mM, incubando durante 15 min a 65 °C. Para su almacenamiento, los alicuotamos y almacenamos a -20 °C. Realizamos las diluciones de trabajo en agua ultrapura y las almacenamos a -20 °C. Previo a ser utilizadas, incubamos las soluciones durante 15 min a 65 °C y las centrifugamos a aproximadamente 8000 g por 5 min.

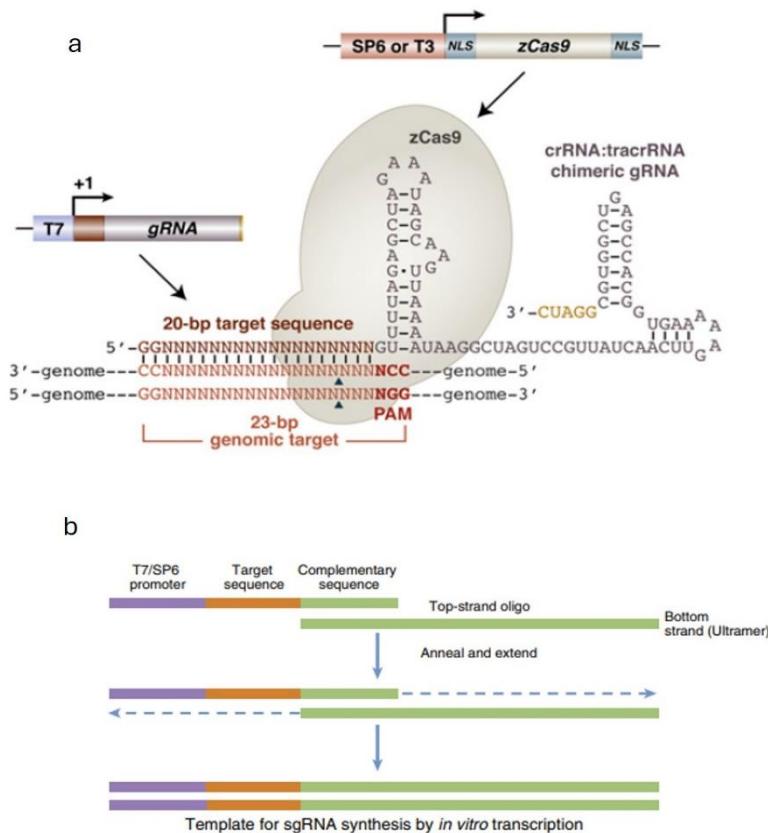
Para determinar la eficiencia del silenciamiento de cada MO, realizamos ensayos de RT-PCR semicuantitativa utilizando ARNm de embriones control y morfantes (embriones inyectados con los MO de interés). El ARN total fue extraído de 30 embriones morfantes o inyectados con MOcontrol utilizando Trizol (Invitrogen) y el ADNc fue preparado utilizando el sistema de síntesis de primera hebra de Invitrogen para RT-PCR (*SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR*) y hexámeros aleatorios. Para este análisis, determinamos la eficiencia de cada MO por su capacidad de producir la retención de un intrón y para esto diseñamos cebadores que hibridan a regiones exónicas flanqueantes al intrón retenido por el MO (**Figura 6**) (secuencias incluidas en la Tabla 5 en el Anexo).



**Figura 6. Diseño experimental del knockdown de *fstl1a* y *fstl1b*.** Esquema de los genes *fstl1a* y *fstl1b* mostrando los sitios de unión de los morfolinos en el ARNm (barra gris) y sitios de hibridación de los cebadores empleados (flechas) para la verificación del knockdown mediante la retención del intrón en el ARNm (flechas). Extraído y modificado de [158].

### 3.2.5 Generación de la línea KO para *fstl1a* mediante CRISPR/ Cas9

En este trabajo empleamos la estrategia de generación de KO mediante CRISPR-Cas9. Resumidamente, este método consiste en el direccionamiento de la nucleasa Cas9 hacia sitios específicos del ADN, típicamente en la zona 5' del marco abierto de lectura, donde la misma introduce cortes doble hebra. Posteriormente, estos cortes son reparados por la maquinaria celular a través del proceso de unión de extremos no homólogos. Este mecanismo de reparación, propenso a errores, genera frecuentemente inserciones o delecciones en el ADN tras la reparación, que es lo que permite la generación de alelos mutantes (**Figura 7**). El sistema CRISPR-Cas9 ha demostrado ser un excelente método para la mutagénesis dirigida en pez cebra, debido a su alta eficiencia y a que es técnicamente accesible [159].



**Figura 7. Ilustración del sistema de edición génica utilizando CRISPR/Cas9.**

**A** El sistema consiste en dos componentes, una Cas9 con dos señales de localización nuclear (extremo C y N terminal) con un uso de codones optimizado para pez cebra. Además, una molécula químérica ARNg, que contiene los 20 pares de bases complementarios a la secuencia blanco adyacentes a la secuencia PAM (NGG). Ambos componentes son generados *in vitro* por la transcripción a partir de un promotor SP6 o T3 (en el caso de la Cas9) o T7 (para el ARNg). El mix del ARNg y el ARNm de la Cas9 son luego inyectados en embriones de una célula de manera de inducir la introducción de cortes doble cadena en el ADN dirigidos por el ARNg y mediados por la enzima Cas9. Las flechas denotan sitios putativos de corte. Extraído y modificado de [160].

**B** Representación esquemática del procedimiento de síntesis del ARNg que se utilizó en este trabajo. El ARNg se sintetiza por la hibridación de dos cebadores. El cebador superior es diseñado para hibridar con el blanco y el cebador inferior (ultramer) es un oligo genérico. Una vez que hibridan ambos oligos son utilizados como molde de una PCR. El producto de esta PCR es utilizado como molde para la transcripción in vitro. Extraído y modificado de [159].

Para la elección de los ARNg utilizamos la herramienta *CRISPR Scan*, elegimos los dos guías que tenían un mayor puntaje y menos *off targets* predichos (secuencias incluidas en la Tabla 5 en el Anexo) [161]. Para la síntesis de los ARN guías (ARNg) utilizamos una estrategia basada en PCR [159]. En esta estrategia se utilizan dos cebadores: a uno de ellos lo llamaremos específico (55-57 nucleótidos) y al otro, que es cebador genérico lo

llamaremos *ultramer* por su mayor largo (80 nucleótidos). El cebador específico contiene la secuencia del promotor T7, una secuencia complementaria a la secuencia blanco y una secuencia complementaria al *ultramer* (**Figura 7B**). El segundo cebador *ultramer*, contiene una secuencia complementaria a la del cebador específico, que permite la hibridación de ambas moléculas y una secuencia que tiene los elementos de estructura secundaria necesarios para ser reconocido por la endonucleasa Cas9 (**Figura 7B**). Los dos cebadores son hibridados y extendidos por una ADN polimerasa generando un molde que utilizamos para la transcripción *in vitro* a partir del promotor T7 utilizando el kit *MAXI Script* del ARNg (#AM1312, Thermo Fisher Scientific). Purificamos el ARNg obtenido luego mediante precipitación con acetato de sodio.

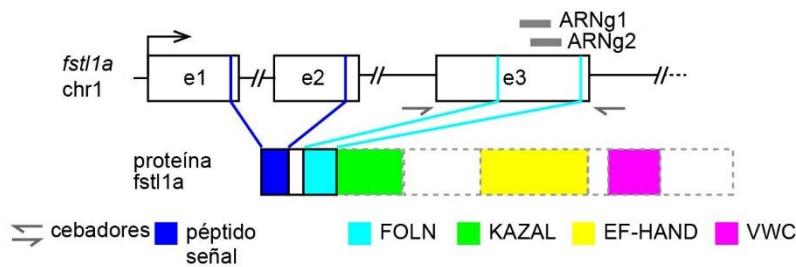
La síntesis del ARNm de Cas9 la realizamos a partir del vector pT3TS-nzfCas9 (Addgene 46757) [160]. El vector incluye la secuencia del promotor T3, la secuencia codificante para Cas9 con el uso de codones optimizado para la expresión en pez cebra (zCas9) y una doble señal de localización nuclear (NLS) del antígeno T-grande de SV40 tanto en el extremo amino (N-terminal) y carboxi (C-terminal) de la proteína sintetizada, que dirige la expresión de Cas9 al núcleo celular (nls-zCas9-nls). Para la síntesis de ARNm, linealizamos el vector utilizando la enzima XbaI. La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo durante 2 h a 37 °C, utilizando el *mMESSAGE MACHINE Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific), y el producto se purificó con MicroSpin G-50 columns (GE Healthcare).

Además, trabajamos con otro plásmido que contiene la región 3'UTR del gen *manos* que dirige la expresión de la enzima Cas9 a las gónadas (Cas9nanos) (Addgene #62542) [161], permitiendo generar mutaciones en la línea germinal, sin que se vea afectado el tejido somático. Este plásmido cuenta con un promotor SP6 y la linealización de este se realizó con la enzima NotI.

### **3.2.6 Evaluación de la eficiencia de la edición génica**

Para analizar las mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9, extrajimos el ADN genómico de los embriones de forma individual mediante el método *HotSHOT* (descrito a

continuación) y realizamos una PCR utilizando cebadores que amplifican la región flanqueante al sitio de corte predicho (**Figura 8**) (secuencias incluidas en la Tabla 5 en el Anexo). Los productos obtenidos los analizamos en geles de agarosa al 2 %. Adicionalmente, analizamos el fenotipo de los embriones inyectados (F0) a las 72 hpf.



**Figura 8. Diseño experimental del knockout de *fstl1a*.** Esquema mostrando los sitios donde hibridan los guías diseñados ARNg1 y ARNg2 (barras grises) y los cebadores utilizados para el análisis de la presencia de mutaciones en embriones inyectados y la determinación de las mutaciones mediante la secuenciación de la región. Extraído y modificado de [158].

### 3.2.7 Extracción de ADN genómico de embriones (método HotSHOT)

Para el genotipado de embriones individuales seguimos el protocolo *HotSHOT* [162]. Colocamos los embriones en tubos que contienen 50 mM NaOH, en una cantidad de líquido suficiente para que permanezcan sumergidos (para embriones/larvas individuales 20-100 µL). Calentamos las muestras a 95 °C hasta lograr una disgregación del tejido (5-10 min en el caso de embriones). Vortexeamos los tubos y los enfriamos en hielo. Agregamos un décimo de volumen de 1 M Tris-HCl, pH 8,0; de manera de neutralizar la solución básica. Centrifugamos a 14.000 g por 1 min y recuperamos el sobrenadante descartando así los restos de tejido sin disgregar.

### 3.2.8 Cruces de peces adultos y establecimiento de la línea *fstl1a* (-/-)

Los peces inyectados (F0) fueron criados hasta la madurez sexual. Luego de evaluar las mutaciones presentes en cada individuo, los ejemplares con las mutaciones seleccionadas fueron cruzados con peces salvajes (método denominado *outcross*) por

dos generaciones de manera de minimizar el efecto *off targets* y para el mantenimiento de la línea. En cada generación, seleccionamos los peces heterocigotas (+/-), siendo (+) el alelo salvaje y (-) el alelo con la mutación de interés. Para los experimentos de dietas, utilizamos peces homocigotas (-/-), los cuales obtuvimos a partir del cruce de peces (+/-) (método denominado *incross*) y selección mediante genotipado. El genotipado de las mutaciones seleccionadas en este estudio fue realizado utilizando cebadores alelo específicos (secuencias incluidas en la Tabla 5 en el Anexo).

### **3.2.9 Genotipado de peces adultos y procedimientos de anestesia y eutanasia**

Para llevar a cabo el genotipado de los peces adultos, primero anestesiamos los peces con una solución de tricaina (MS222) (A5040, Sigma,) al 0,02 % en 100 mL de agua de acuario, a partir de una solución de 0,4 % MS222 en 20 µM Tris-20 HCl pH 7,5). Monitoreamos los peces durante el pasaje por las diferentes etapas de la anestesia: primero el cese del nado y pérdida del equilibrio, luego el movimiento de los opérculos se vuelve arrítmico [163]. Este punto se alcanza dentro de los 5 min de colocarlos en la solución con MS222, aunque de forma variable dependiendo del peso de cada individuo.

Una vez anestesiados, transferimos los peces a una placa de Petri sobre papel humedecido, donde cortamos un pequeño trozo de su cola para extraer ADN utilizando un bisturí. Colocamos el tejido de la cola en tubos de 1.5 mL conteniendo 60 µL de la solución de lisis (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,3 % Tween-20, 0,3 % NP40, 1 mg/mL Proteinasa K, agregada el día de uso) y los tubos son mantenidos en hielo hasta continuar con el proceso. Inmediatamente después, regresamos los peces a una pecera con agua de acuario donde la recuperación, suele lograrse en 1-2 minutos, y se mantienen separados hasta obtener los resultados del genotipado.

Para la extracción de ADN calentamos el tejido en solución de lisis a 55 °C por 4 h. Luego inactivamos la Proteinasa K incubando por 10 min a 98 °C. Diluimos la solución obtenida 1/20 en agua de donde tomamos 5 µL para la reacción de PCR.

En el caso que sea necesario realizar eutanasia, diluimos Eugenol en agua de acuario, a una concentración de 1,5 mL/L.

### ***3.2.10 Análisis de fenotipo externo de embriones***

En cuanto a la morfología externa, realizamos observaciones de embriones bajo aumento a lo largo de los primeros días del desarrollo utilizando una lupa estereoscópica asociada a una cámara. Nos enfocamos en analizar el fenotipo a las 24-48 hpf poniendo especial atención a fenotipos típicamente asociados con defectos a nivel de las cillas como, por ejemplo, cambios en la curvatura y extensión del eje corporal, forma de los somites y de la notocorda, la presencia de hidrocefalia y el número de otolitos en la vesícula ótica.

### ***3.2.11 Inmunofluorescencia de embriones***

Los protocolos que empleamos para estas técnicas ya habían sido utilizados en nuestro laboratorio [164,165].

Fijamos los embriones del estadio deseado en PFA 4 % durante una noche a 4 °C. Al día siguiente lavamos el fijador por medio de varias incubaciones con 1 % Tritón-PBS (PBS-T) a TA con agitación. En el caso de embriones de 10 somites, utilizados para la observación de la vesícula de Kupffer, realizamos una post-fijación con metanol. Para esto, se deshidratan los embriones por medio de dos lavados en metanol:PBS-T 50:50 de 5 min cada uno, un lavado en metanol 100 % de 5 min y una incubación con metanol 100 % durante 20 min a -20 °C. Luego re-hidratamos, por medio de un lavado en metanol: PBS-T 50:50 de 5 min y dos lavados en PBS-T de 5 min. En el caso de embriones en estadio de 48 hpf realizamos una permeabilización con 0.25 % Tripsina-EDTA durante 15 a 30 min a 4 °C dependiendo del estadio (30 hpf: 15 min; 48 hpf: 20 min; 72 hpf: 30 min). Posteriormente realizamos un lavado con PBS-T por 10 min en hielo. Para llevar a cabo el inmunomarcado, bloqueamos los sitios inespecíficos incubando los embriones con 0.1 % BSA en PBS-T durante 30-60 min. Realizamos la incubación con anticuerpos, ya sea primario o

secundario, en solución de bloqueo a 4 °C en agitación durante toda la noche. Retiramos el anticuerpo primario no unido haciendo varios lavados (2 a 5) en 0,1 % BSA en PBS-T con agitación. Se retira el anticuerpo secundario no unido por medio de dos lavados con PBS-T de 15 min cada uno y un lavado final con PBS de 15 min a TA con agitación.

Utilizamos los siguientes anticuerpos: anti-tubulina acetilada (T7451, Sigma), anti- $\gamma$ -tubulina (T6557, Sigma), anti-ratón IgG1 Alexa488 (A21121, Thermo); anti-ratón IgG2b-568 (A21144, Thermo Fisher Scientific). En algunos casos junto con el anticuerpo secundario incluimos 0,2  $\mu$ g/mL faloidina-TMR (P1951, Sigma) o verde de metilo (1/2500) para visualizar esqueleto de actina y núcleo respectivamente. Finalmente montamos los embriones en glicerol: Tris pH 7,4 en una relación 3:1.

Observamos los embriones montados enteros utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 con el objetivo LD ICI Plan Apochromat 25X AN 0,4 de inmersión en glicerol. Realizamos el análisis de las imágenes y las mediciones del largo de las cílias de forma similar a lo expuesto anteriormente (sección **3.1.8**).

Para el análisis estadístico utilizamos el software Past [166], Graphpad-Prism o R. La normalidad y homocedasticidad la verificamos utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene o F, respectivamente. Los tests utilizados para la comparación de los conjuntos de datos se indican en cada caso. Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de  $p$  fue menor a 0,05.

### **3.2.12 Obtención de larvas/juveniles y dietas realizadas**

El crecimiento de larvas y peces juveniles lo realizamos de acuerdo con los lineamientos publicados [167] y que describimos brevemente a continuación.

*Durante los 1-5 dpf:* se mantienen los embriones en placas de Petri, (aproximadamente 20-40 embriones por placa) en estufa a 28 °C. Se agrega en el agua azul de metileno para inhibir el crecimiento bacteriano y fúngico. A las 24 hpf se realiza un *bleaching* con una solución de hipoclorito al 0,003 % y a las 48 hpf los embriones son

decorionados. Los embriones que mueren son retirados diariamente de manera que no afecten el crecimiento de los restantes.

*Durante los 5-9 dpf.* Se transfieren 100 larvas aproximadamente a contenedores con agua obtenida del sistema del acuario en un nivel máximo de 2-4 cm. Los recipientes son mantenidos a TA y se realizan cambios diarios en el agua de los contenedores. La alimentación en esta etapa se basa en AP100 #1 (0,1 g /100 larvas, Zeigler) dos veces al día y Artemia (crustáceo branquiópodo) de 24 h post eclosión 1 vez por día. Durante la alimentación, se monitorean las larvas y se retiran los individuos muertos.

*Durante los 10 -15 dpf:* El día 10 dpf se introducen las larvas en grupos de 60 ejemplares en peceras de 5 L en el sistema de flujo automático y se mantienen con un flujo de agua reducido. Durante el período de 10-15 dpf la alimentación de las larvas se basa a una mezcla de AP100 #1 (0,1 g /100 larvas, Zeigler) y Golden Pearls (de 100-200 µm Brine Shrimp Direct 0,04 g / 100 larvas) dos veces por día, y además Artemia de 24 h 1 vez por día.

Posteriormente, las larvas se separan en grupos experimentales de 30 individuos y su alimentación se basa en una mezcla de AP100 #1 (0,1 g /100 larvas, Zeigler) y Golden Pearls (de 100-200 µm Brine Shrimp Direct 0,1 g /100 larvas) dos veces por día, y además Artemia de 24h 1 vez por día.

Las larvas en dieta alta en grasas HFD (del inglés *High Fat Diet*) tuvieron un suplemento adicional de yema de huevo (0,3 g / 100 larvas; E0625, Sigma-Aldrich) fuera del sistema durante 1h, una vez por día.

Para el crecimiento de los juveniles, a partir de 30 dpf, las peceras son mantenidas en el sistema con flujo de agua normal. La dieta de éstos se basa en *Golden pearls* y TetraMin en escamas (2-3 veces por día), y *Artemia* de 48 h (1 vez por día). Considerando una densidad máxima de 30 ejemplares cada 2,8 L de agua.

### **3.2.13 Análisis del tejido adiposo en larvas**

La tinción de lípidos se realizó de acuerdo con lo descrito previamente [168]. Dado que tanto los alimentos como la bilis en el intestino presentan autofluorescencia, mantuvimos los peces en ayuno durante la noche antes de iniciar la tinción de lípidos, con el fin de reducir señales inespecíficas. Para el marcado, incubamos las larvas en placas de Petri de 100 mm en una solución de Nile Red (Sigma-Aldrich, N1142) (0,25 µg/mL en agua de acuario) durante 1 hora. El Nile Red es una sonda lipofílica cuyo espectro de emisión cambia con la polaridad del entorno: en presencia de lípidos neutros frente a lípidos polares. En presencia de lípidos polares presenta un máximo de emisión en 637 nm, mientras que en presencia de lípidos neutros el máximo de emisión es aproximadamente de 583 nm [169].

Para obtener las imágenes, anestesiamos las larvas en una solución de MS222 (metanosulfonato de tricaina) (A5040, Sigma) a 0,04 g/L, luego las incubamos en una solución de epinefrina (E4375, Sigma) a 10 mg/mL más MS222 a 0,06 g/L durante 5 min para contraer los melanosomas, y las montamos en metilcelulosa al 3 % (MO387, Sigma).

Adquirimos imágenes en campo claro y de fluorescencia del lado derecho de cada larva, ya que la acumulación de la grasa se inicia en el depósito pancreático, localizado en el lado derecho. Para ello, empleamos una cámara Cannon EOS Rebel T3i asociada a un estereomicroscopio Nikon SMZ 800 equipado con una lámpara UV de mercurio. Realizamos la datación de las larvas en las imágenes de campo claro midiendo su longitud estándar, SL (del inglés *Standard Length*) [170] que corresponde a la distancia desde la boca hasta el pedúnculo caudal, usando la herramienta de línea en ImageJ. La cuantificación de la extensión del tejido adiposo visceral (depósitos abdominal y pancreático) la realizamos delimitando el área ocupada por la señal de Nile Red utilizando un umbral de intensidad y la herramienta “Meassure” en ImageJ.

El análisis estadístico para la comparación de los datos de área entre las diferentes condiciones lo realizó Hugo Naya utilizando R. El área de tejido adiposo varía con el estadio de desarrollo (medido como SL), a través de una relación no lineal. Por lo tanto, los datos de área fueron transformados utilizando la raíz cuadrada para lograr una relación lineal con

el SL. Luego se utilizó un ajuste con un modelo lineal mixto, lo cuál permite modelar tanto la variabilidad introducida por la condición experimental como la introducida por la aleatoriedad de los datos. Para ello, se tomó la raíz cuadrada del área (sqrtA) como variable respuesta, SL como co-variable (ya que es un factor fijo que sabemos que explica la variación del crecimiento del tejido adiposo en pez [171], genotipo y dieta como efectos fijos (intervenciones experimentales para las que deseamos conocer su efecto sobre la formación del tejido adiposo) y al experimento como factor aleatorio (variabilidad inherente entre individuos en diferentes experimentos). Usando este modelo, se logró un ajuste aceptable (se logró explicar el 89% de la varianza y la distribución residual se ajustó a una función normal).

### **3.2.14 Extracción de ARN y qPCR a partir de tejido en larvas**

Para cuantificar la expresión relativa de diferentes marcadores moleculares, luego de la adquisición de imágenes de las larvas utilizadas en los ensayos de dietas, disecamos la región abdominal de cada larva, que contenía el tejido adiposo visceral. Las muestras obtenidas las colocamos en TRIzol y las almacenamos a -80 °C hasta su procesamiento. La extracción del ARN y la síntesis del ADNc mediante el kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* con oligo dT, se realizaron siguiendo instrucciones del fabricante, como se detalla en la **sección 3.1.3**. La qPCR se llevó a cabo en un equipo QuantStudio 3 (ThermoFisher Scientific), utilizando el kit KAPA SYBR FAST Kit (Sigma, KK46000).

Los cebadores se diseñaron con el algoritmo Primer3 a través del programa Primer-BLAST (secuencias incluidas en la Tabla 5 en el Anexo). La cantidad relativa normalizada (NRQ, del inglés *Normalized Relative Quantity*) se calculó siguiendo el protocolo descrito en [172], empleando las eficiencias medias de amplificación grupales obtenidas mediante el software LinRegPCR (v2021.2) [173]. Los genes *ef1a* y *rpl3a* se utilizaron como genes de referencia [174–176].

## 4 Resultados

---

### 4.1 Estudio de posibles mecanismos de transducción de señales que median la función de *FSTL1* en ciliogénesis

Como se mencionó anteriormente, un trabajo previo de nuestro grupo mostró que *FSTL1* regula la ciliogénesis. El KD de *FSTL1* mediante siARN en células hTERT-RPE1, así como en 3T3-L1, produce un fenotipo de acortamiento de las cilias primarias [85]. Este fenotipo pudo ser rescatado mediante la adición de 200 ng/mL de Fstl1 recombinante (recFstl1) en el medio extracelular, lo que sugiere que la función de *FSTL1* en la ciliogénesis se ejerce a través de una acción autócrina/parácrina de la proteína [85].

En este trabajo, nos planteamos profundizar en las vías de transducción de señales que median la actividad de *FSTL1* en el proceso de ciliogénesis. Particularmente, y en base a lo mencionado en la introducción, nos enfocamos en analizar a DIP2A como posible mediador/receptor involucrado en este proceso. Para ello, utilizamos la línea celular hTERT-RPE1, una línea de células epiteliales de retina transformada por telomerasa extensamente empleada como modelo para el estudio de la cilia y ciliogénesis. Evaluamos el efecto de reducir la expresión de DIP2A utilizando siARN, sobre el largo y número de las cilias y comparamos el efecto en la cilia tras silenciar la expresión de *FSTL1* en las condiciones previamente ensayadas [85].

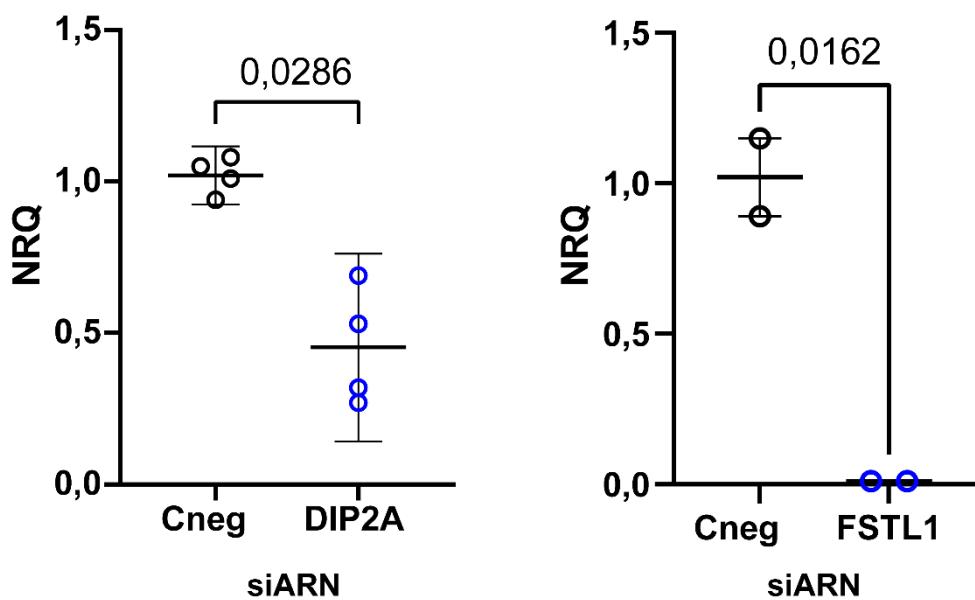
En paralelo, nos planteamos estudiar la localización subcelular de DIP2A. Particularmente, dada la evidencia que en ese momento reportaba su localización en membrana, nos propusimos evaluar la posibilidad de que dicho receptor se localice en la cilia.

Finalmente, con el objetivo de comprender las vías de señalización intracelular moduladas por *FSTL1*, nos propusimos analizar la activación de ERK1/2 y AKT frente al KD de *FSTL1*, dos intermediarios ampliamente asociados con su señalización en numerosos procesos celulares [88].

#### 4.1.1 Evaluación de *DIP2A* como mediador/receptor de *FSTL1* en la ciliogénesis.

##### 4.1.1.1 Puesta a punto del knockdown de *DIP2A* y *FSTL1*

Como primer paso dentro de este objetivo, validamos las condiciones del KD de *DIP2A*. Para ello, transfectamos células hTERT-RPE1 con diferentes dosis de siARN para *DIP2A* (*siDIP2A*): 10 pmol/mL, 30 pmol/mL y 45 pmol/mL. A las 24 h luego de la transfección retiramos el suero del medio de cultivo por 48 h, extraímos el ARN total y analizamos la expresión de *DIP2A* mediante qRT-PCR. En la **Figura 9** se muestra el efecto obtenido con la dosis máxima (45 pmol/mL), en la cual la expresión de *DIP2A* se redujo a una media de 42 % en comparación con el control. A la derecha se observa una confirmación del KD de *FSTL1* con las condiciones previamente reportadas [85].



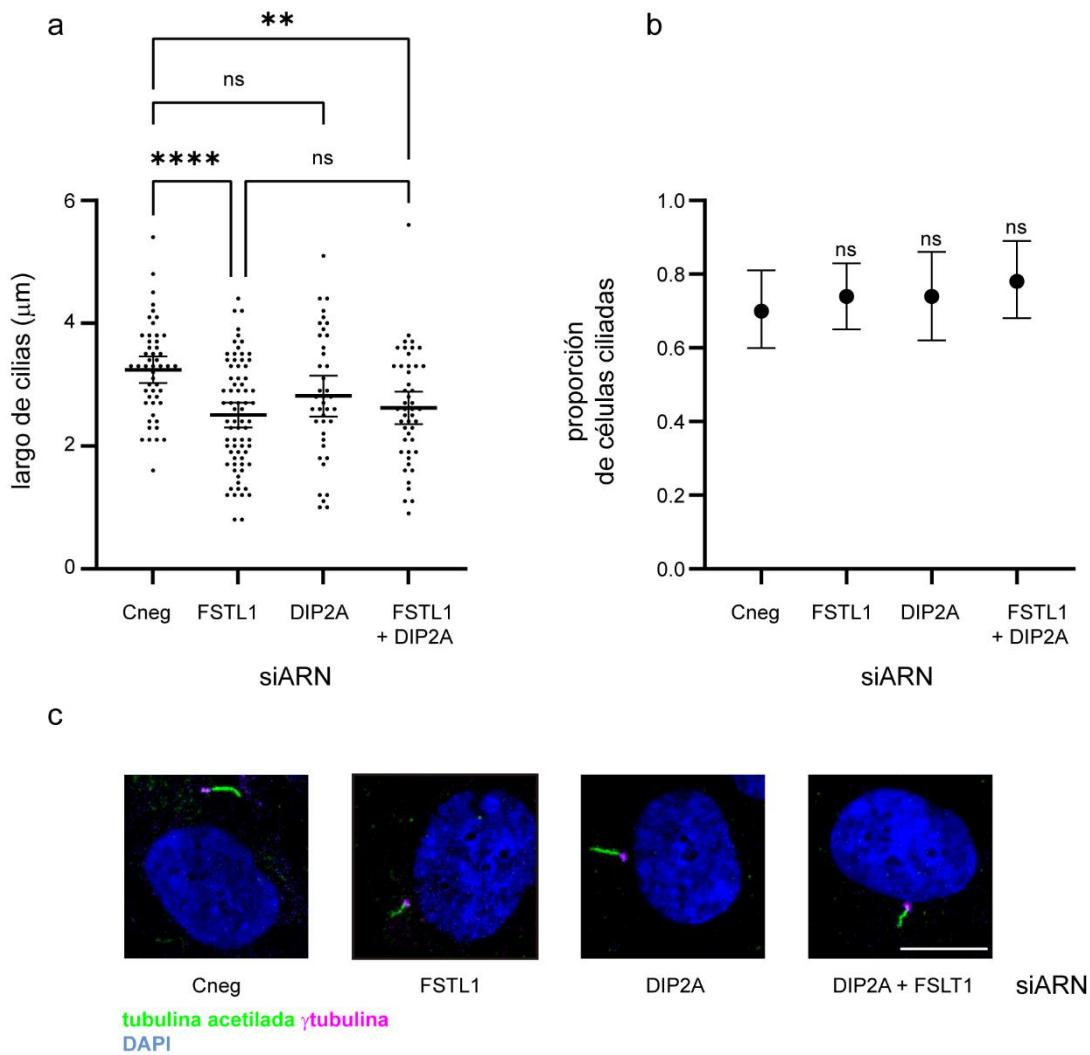
**Figura 9** Análisis del silenciamiento de *DIP2A* y *FSTL1* en células hTERT-RPE1 mediante qRT-PCR. A las 48 h de haber realizado la transfección con *siDIP2A*, *siFSTL1* y *siCneg*, respectivamente analizamos el silenciamiento de *DIP2A* y *FSTL1*. NRQ (del inglés, Normalized Relative Quantity) representa la cantidad de ARNm normalizada con el gen de referencia, en este caso actina y relativa al promedio de la muestra control. En el caso de *siDIP2A* se grafican los resultados de 2 experimentos con dos réplicas biológicas cada uno y en cada caso y en el caso de *FSTL1* se muestran los resultados de 1 experimento con dos réplicas biológicas. Las barras de error representan la desviación estándar. La reducción de la expresión fue significativa en ambos casos. (\*):  $p=0,01-0,05$ , test Mann-Whitney. Extraído y modificado de [158].

#### **4.1.1.2 Análisis del KD de DIP2A en ciliogénesis**

Utilizando las condiciones de silenciamiento puestas a punto en la parte anterior, analizamos el largo de las cílias primarias y la proporción de células ciliadas en hTERT-RPE1. Analizamos, por un lado, células tratadas con si*FSTL1*, por otro lado, células tratadas con si*DIP2A*, así como también células tratadas con ambos siARN de forma simultánea y, comparamos los resultados con respecto a la transfección con un siARN control (siCneg). Luego de las 24 h eliminamos el suero del medio de cultivo por 48 h adicionales, de manera de favorecer la ciliación. Finalmente, a las 72 h luego de la transfección fijamos con metanol y realizamos ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti- $\gamma$  tubulina para marcar el cuerpo basal, anti-tubulina acetilada, para marcar el axonema ciliar y DAPI para teñir los núcleos. Luego de obtener imágenes mediante microscopía confocal, cuantificamos el largo de las cílias utilizando el *software* FIJI y analizamos los datos utilizando el *software* PRISM como se describió en la sección Materiales y Métodos.

La **Figura 10A** muestra el largo de cílias en células hTERT-RPE1 medidas bajo las diferentes condiciones experimentales previamente descritas. El silenciamiento de *DIP2A*, no produjo diferencias en el largo de las cílias en comparación con el control. De acuerdo con lo previamente reportado por nuestro grupo, con la expresión de *FSTL1* silenciada, las cílias son más cortas comparadas con el control [85]. Asimismo, en células donde se realizó el silenciamiento simultáneo de *DIP2A* y *FSTL1* también observamos un acortamiento de las cílias. Sin embargo, el efecto observado no difiere del obtenido al silenciar únicamente *FSTL1*. Estos resultados surgen del análisis de 3 experimentos independientes y en la figura se muestra uno de ellos de forma representativa.

En la **Figura 10B**, se muestra el análisis de proporción de células ciliadas. Para ello analizamos el número de cílias y el número de núcleos en cada una de las condiciones y la proporción de células ciliadas mediante una prueba de proporciones. No se observan diferencias en ninguna de las condiciones en relación con las células tratadas con el siCneg. Si bien se había reportado en células 3T3L1 una menor proporción de células ciliadas frente al KD de *FSTL1*, en esta línea celular no se observaron diferencias significativas.



**Figura 10. Análisis del KD de DIP2A en la ciliogénesis.**

**A.** Gráfico con los resultados de la cuantificación del largo de cílios en células *hTERT-RPE1* transfectadas con siARN para *FSTL1* (10 pmol/mL), *DIP2A* (45 pmol/mL) y control (dosis correspondiente). Se realizaron tres experimentos, se presentan los datos de un único experimento. Se grafican los valores individuales de largo de cílios y mediana  $\pm$  IC95 %. ns:  $p>0,05$ ; (\*):  $p=0,01-0,05$ ; (\*\*):  $p=0,001-0,01$ ; (\*\*\*\*):  $p<0,0001$ , test ANOVA.

**B.** Gráfico con los resultados de la cuantificación de proporción de células ciliadas en cada condición. Se realizaron tres experimentos con resultados similares, se presentan los datos de un único experimento. Se realizó la comparación entre proporciones mediante test de hipótesis para proporciones [153].

**C.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia obtenidas en microscopía confocal. El axonema ciliar se evidenció mediante inmunomarcado con anti-tubulina acetilada (verde), el cuerpo basal mediante inmunomarcado con anti- $\gamma$  tubulina (magenta) y DAPI para tinción de núcleos (azul). Barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ .

Estos resultados, sugieren que DIP2A no participa en la mediación del efecto prociliogénico de FSTL1 en las condiciones analizadas. No obstante, no podemos descartar que el KD no haya sido lo suficientemente eficiente para evidenciar un efecto, dado que no se logró una eliminación completa de la expresión de DIP2A.

#### **4.1.1.3 Estructura de la proteína DIP2A, expresión y localización subcelular en hTERT-RPE1.**

La localización de DIP2A en la célula es aún controversial. En el momento de comenzar con esta tesis, la evidencia que se tenía indicaba que en células endoteliales y neuronas DIP2A se localiza en la membrana plasmática [148,177]. En este sentido nos parecía interesante investigar la localización subcelular de DIP2A en células hTERT-RPE1, modelo *in vitro* que empleamos para experimentos de ciliogénesis y evaluar su posible co-localización con la cilia.

El gen humano de *DIP2A* está compuesto por 38 exones (NM\_015151.4). A nivel transcripcional, se han identificado 10 variantes producto de *splicing* alternativo, que se denominan del 1 al 11, de las cuales los transcriptos 1 y 9 codifican para la isoforma canónica. A nivel de proteína se han detectado 10 isoformas, denominadas A-J, siendo A la isoforma canónica (**Figura 11A**). La proteína canónica humana y su homóloga murina comparten un 94,3 % de identidad entre sí y un 57,4 y 58,9 % de identidad con su homólogo en *D. melanogaster* respectivamente (**Figura 11B**).

La isoforma canónica, al igual que sus homólogos en ratón y *Drosophila* contiene tres dominios: un dominio DBD1 (del inglés *DNMAP1 binding domain*), siendo DMAP1 una proteína ADN metil transferasa, y dos dominios AFDs (del inglés *adenylate forming domain*) con sitios de unión a Adenosina monofosfato (AMP) y Coenzima A (Co-A) (**Figura 11A**). La funcionalidad de los dominios ADF fue analizada en *Drosophila*, donde se comprobó la capacidad de sintetizar acetil-CoA *in vitro* [178,179].

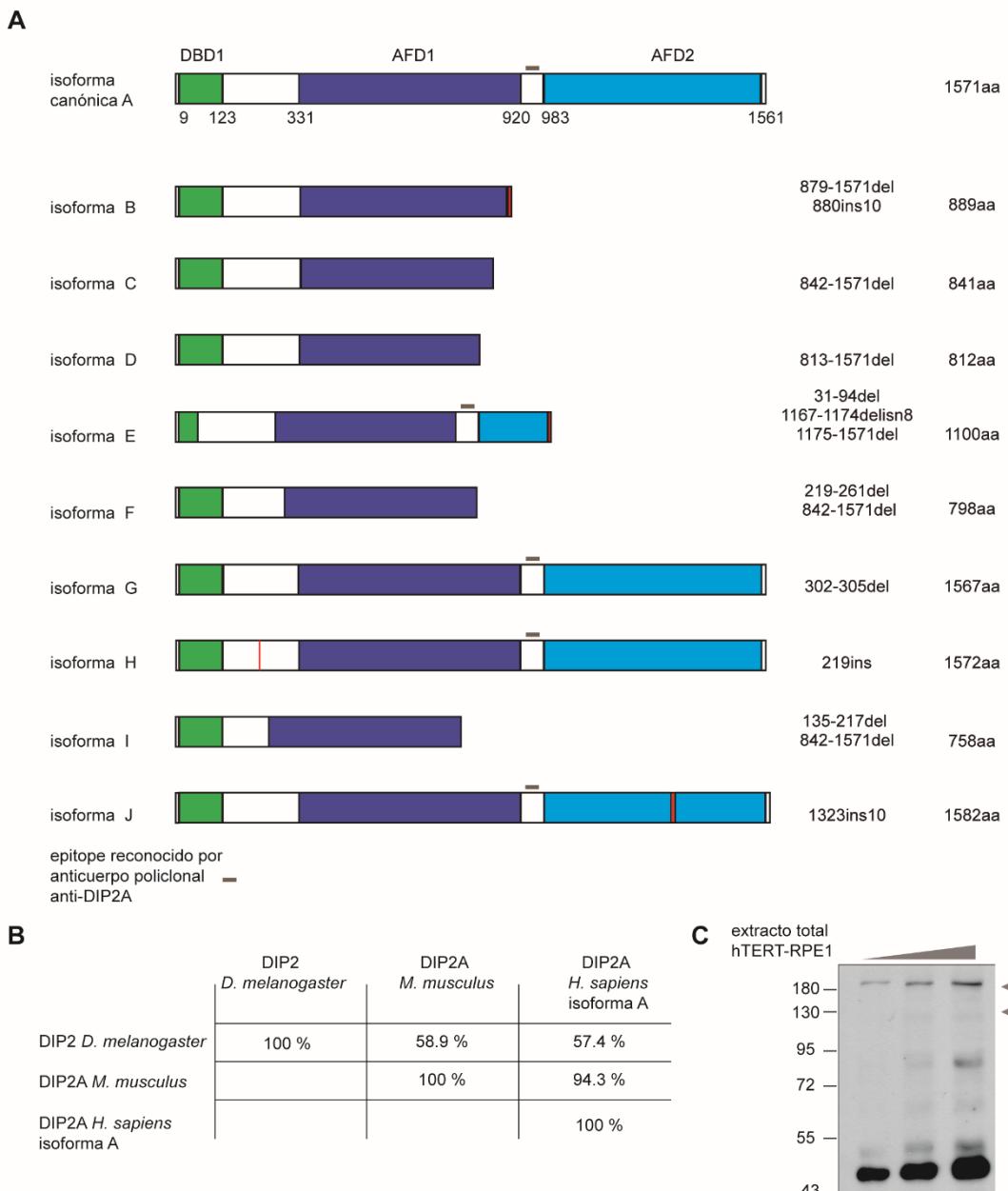
Para analizar la expresión y la localización subcelular de DIP2A, adquirimos un anticuerpo comercial polyclonal de ratón anti DIP2A. Este anticuerpo fue generado

utilizando como inmunógeno un péptido sintético conteniendo una porción central de la proteína DIP2A (aminoácidos 934 al 969). Cabe aclarar que los anticuerpos empleados en los trabajos antes mencionados de Liang y colaboradores, 2014 y Ouchi y colaboradores, 2010, se encontraban discontinuados. En la **Figura 11A** se indica el epítope reconocido por el anticuerpo, presente en las isoformas A, G, H, J de un tamaño aproximado a los 170-175 kDa y la isoforma E, con un tamaño esperado de 120 kDa aproximadamente. Con el objetivo de probar el anticuerpo, realizamos un Western Blot con extractos de proteínas totales de células hTERT-RPE1. En la **Figura 11C** se muestra el resultado, donde detectamos una banda intensa de unos 180 kDa aproximadamente y otra banda muy tenue de unos 120 kDa (ambas señaladas con flechas) que podrían corresponder a isoformas específicas de DIP2A. También observamos una señal inespecífica de menor peso molecular posiblemente inespecífica ya que no corresponde al peso esperado para ninguna de las isoformas de DIP2A reportadas.

A continuación, decidimos probar nuestro anticuerpo y poner a punto su uso para inmunofluorescencia ya que aún no había sido evaluado para esta técnica.

Sin embargo, a pesar de múltiples intentos y en los que probamos diferentes condiciones de fijación (metanol, PFA 4 %, y su combinación) y permeabilización (saponina, Tritón X-100) en el protocolo de inmunofluorescencia, no logramos obtener una señal específica mediante inmunofluorescencia para DIP2A con este anticuerpo.

El estudio de la localización subcelular de dicha proteína, con los anticuerpos disponibles, resultó una limitante. Por lo tanto, dado que los experimentos de ciliogénesis tampoco arrojaron evidencia de que DIP2A estuviera implicado en la señalización de FSTL1, nos propusimos continuar explorando otras vías moleculares.



**Figura 11. DIP2A isoformas humanas y homología con otros organismos.**

**A.** Esquema donde se ilustran la posición de los dominios de la proteína DIP2A isoforma canónica (también denominada isoforma A) y las demás isoformas descritas en NCBI. A la derecha se detallan sus diferencias con respecto a la canónica y su tamaño esperado en aminoácidos. Además, se ilustra la posición de la región reconocida por el anticuerpo utilizado en este estudio.

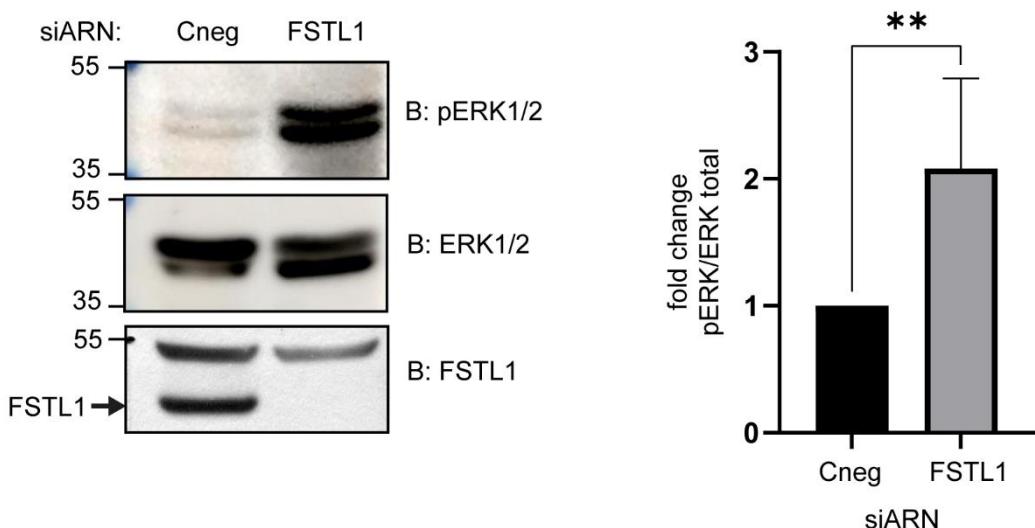
**B.** Matriz de identidad producida a partir del alineamiento de la proteína DIP2 de *D. melanogaster* y sus homólogos denominados DIP2A en *M. musculus* y *H. sapiens* (isoforma A).

**C.** Western Blot de extractos de proteínas totales en la línea celular hTERT-RPE1 con el anticuerpo políclonal anti-DIP2A. Se señalan con flechas dos bandas de unos 180 kDa y 120 kDa aproximadamente que podrían ser señales específicas.

#### **4.1.2 Estudio de vías de señalización intracelular que median la acción de *FSTL1* durante la ciliogénesis**

ERK1 y ERK2 (referidas como ERK1/2) son dos proteínas quinasas con un 84 % de identidad de secuencia, que comparten funciones en la cascada de transducción de señales de las MAP quinasas (MAPK/ERK). Tanto la fosforilación de un residuo de tirosina (Tyr 204/187 respectivamente) como de una treonina (Thr 202/185 respectivamente) son necesarias para la activación de las enzimas ERK 1/2 [180,181]. Una vez activas, ERK1/2 catalizan la fosforilación de cientos de sustratos citoplasmáticos y nucleares, incluyendo moléculas reguladoras y factores de transcripción participando en la regulación de una amplia variedad de procesos celulares, como la adhesión, la progresión del ciclo celular, la migración, la supervivencia, la diferenciación, el metabolismo, la proliferación y la transcripción [181].

Para analizar si ERK1/2 median el efecto de *FSTL1* en la ciliogénesis, redujimos los niveles de expresión de *FSTL1* en células hTERT-RPE1 mediante siARN de acuerdo en las condiciones previamente publicadas [85], y detectamos ERK1/2 fosforiladas (pERK1/2) y ERK1/2 total utilizando anticuerpos específicos mediante Western Blot. Tras la inhibición de la expresión de *FSTL1* (si*FSTL1*) observamos un aumento promedio de dos veces en los niveles de ERK1/2 fosforiladas normalizados con ERK1/2 total y comparados con las células control (siCneg) (**Figura 12**). Por lo tanto, este resultado vincula la vía de señalización de ERK1/2 con la actividad de *FSTL1*, sugiriendo que la fosforilación de ERK1/2 es un factor importante en la regulación de la ciliogénesis mediada por *FSTL1*. Estos resultados fueron reproducidos en el trabajo posterior de Leonardo Santos y Victoria Prieto-Echagüe y figuran como parte del *pre-print* en [182].



**Figura 12. Estado de activación de ERK1/2 cuando FSTL1 es silenciada.** Análisis por Western Blot de ERK1 fosforilada (*p*-ERK1, *p*44-ERK), ERK2 fosforilada (*p*-ERK2, *p*42-ERK) y total (ERK1/2 total) en células hTERT-RPE1 transfectadas con stealth de ARN para FSTL1 y control. A la derecha se observa el análisis por densitometría de los resultados agrupados de 10 experimentos diferentes, las barras de error representan los intervalos de confianza del 95 %. (\*\*):  $p = 0,001-0,01$ .

Es importante mencionar, que, dados los antecedentes de la literatura [102,140,177], también intentamos evaluar qué ocurría con la señalización de AKT. En este caso, no obtuvimos una señal clara con el anticuerpo que reconoce *p*-AKT y, por lo tanto, no pudimos tener un resultado que nos permita ser concluyentes.

#### **4.2 Determinación del rol biológico de FSTL1 durante el desarrollo de pez cebra y en el desarrollo del tejido adiposo**

Durante el desarrollo murino, FSTL1 desempeña un papel central, contribuyendo a la organogénesis de los pulmones [183–185], tejidos esqueléticos [183] y la uretra [186]. En ratones, la pérdida de FSTL1 en homocigosis resulta en la muerte perinatal, debido principalmente a defectos respiratorios [183,184]. Esto hace que el empleo de este modelo para estudios *in vivo* haya sido restringido a líneas KO tejido-específico.

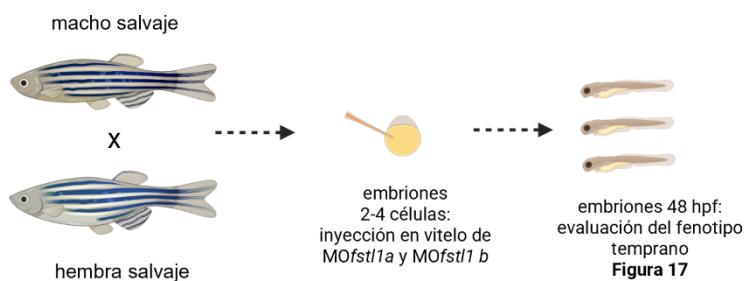
Dadas las limitaciones del modelo murino para explorar las funciones de FSTL1 *in vivo*, en este trabajo optamos por utilizar *Danio rerio* (pez cebra) como sistema experimental.

Pez cebra posee múltiples ventajas que lo han posicionado como un excelente modelo en el estudio de la función génica y de enfermedades genéticas humanas. Por un lado, sus embriones se desarrollan de manera externa y son transparentes, lo que facilita el seguimiento de distintos procesos mediante microscopía. A su vez, su corto tiempo generacional permite realizar experimentos en plazos relativamente breves. Además, el desarrollo de numerosas herramientas de edición génica ha acelerado significativamente la evaluación de genes asociados a patologías humanas mediante la generación de modelos mutantes. Finalmente, su pequeño tamaño, combinado con su fácil mantenimiento y reproducción a bajo costo, hace posible trabajar con un gran número de individuos al mismo tiempo, aumentando la potencia del análisis estadístico de cada experimento [187].

Desde etapas tempranas del desarrollo, pez cebra posee numerosas estructuras ciliadas fácilmente identificables, entre ellas la vesícula de Kupffer (VK), los pronefros, el tubo neural, neuronas sensoriales como fotorreceptores, las células ciliadas de la vesícula ótica y del epitelio olfatorio [188]. Además, muchos de los fenotipos vinculados a genes ciliares observados en pez cebra, muestran una fuerte correlación con los fenotipos observados en los pacientes con ciliopatías [189–191]. Estas características han posicionado a *D. rerio* como un organismo modelo para el estudio de las cilias [164,165,192–196].

La fisiología de la regulación metabólica de pez cebra es muy similar a la de los humanos, desde los circuitos del apetito presentes en el hipotálamo, hasta el páncreas y los tejidos sensibles a la insulina: hígado, músculo y WAT [197]. Cabe señalar, que, al ser un animal poiquilotermo, no cuenta con depósitos de tejido adiposo marrón. Estudios previos muestran que el metabolismo lipídico entre peces y mamíferos está conservado [171,198,199]. Las características histológicas distintivas descritas para los adipocitos de mamíferos, también se encuentran en pez cebra: estas células presentan una gota lipídica unilocular, citoplasma escaso y un núcleo pequeño y periférico [199,200].

En este contexto, decidimos profundizar en el estudio del rol de FSTL1 tanto en la ciliogénesis como en la adipogénesis, utilizando embriones y larvas de pez cebra, respectivamente, para evaluar su rol *in vivo*. Para evaluar la función de *fstl1* en etapas tempranas del desarrollo, inhibimos la expresión génica de forma transitoria, utilizando una estrategia de *knockdown* de *fstl1* mediada por la inyección de morfolinos (MOs) (**Figura 13**). Los MOs han sido extensamente empleados como una herramienta rápida y económica para generar el silenciamiento de la expresión de genes en pez cebra [157].



**Figura 13. Inyección de morfolinos y evaluación del fenotipo temprano.** Los MO para *fstl1a* y *fstl1b* se inyectaron en el vitelo de embriones de 2 a 4 células. Se analizó el fenotipo de los embriones a las 48 hpff. Esquema realizado utilizando Biorender.

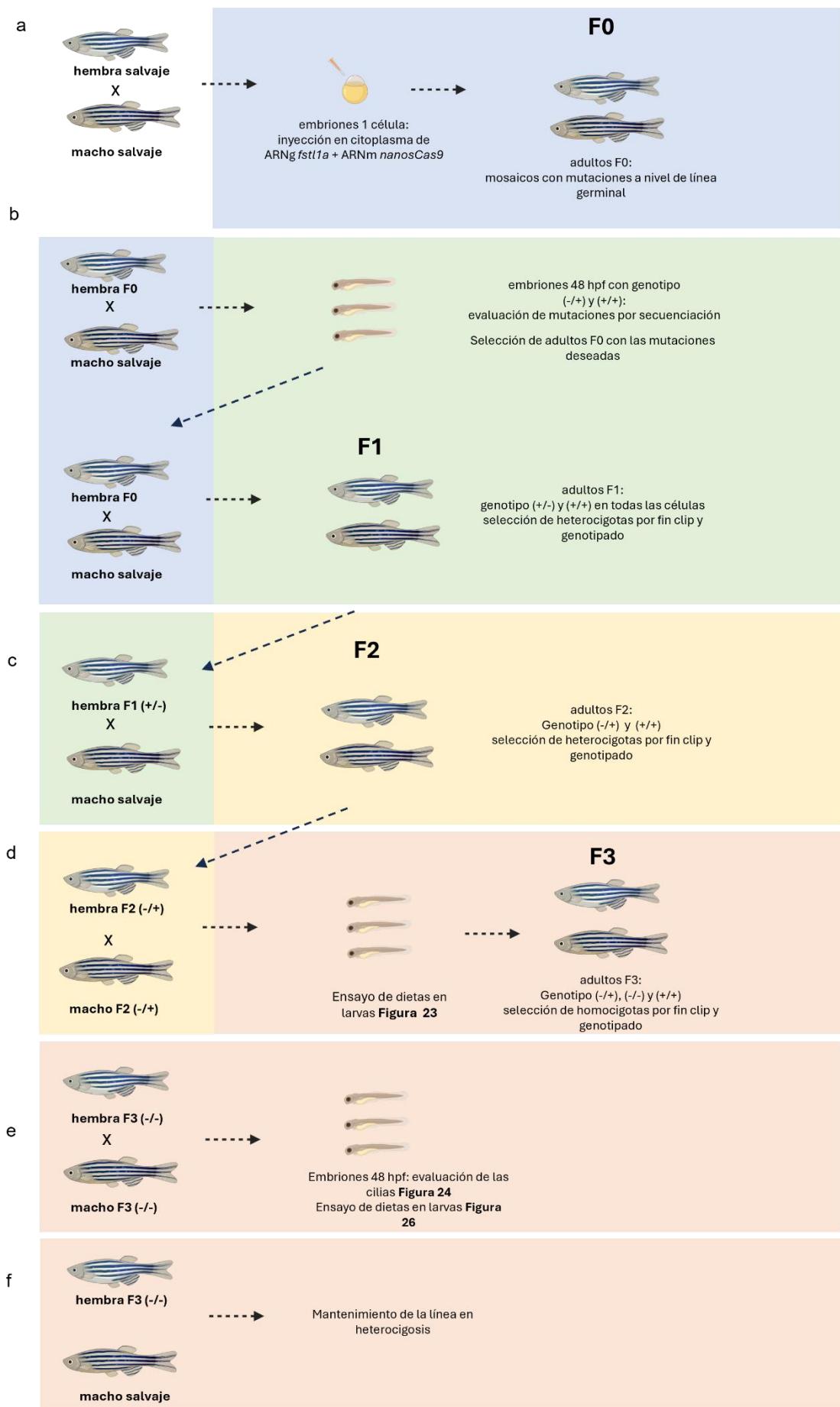
Empleamos el KD con MO para estudiar fenotipos embrionarios tempranos, con el objetivo de analizar posibles defectos asociados a la ciliogénesis.

Debido a un efecto de dilución durante las etapas sucesivas de desarrollo, los MOs presentan la limitación de inhibir la expresión génica solamente hasta aproximadamente los 5 días post fecundación (dpf) [157,201]. Para estudiar procesos post-embrionarios

como el desarrollo del tejido adiposo que comienza a formarse alrededor de los 10 dpf, generamos una línea mutante *fstl1a* mediante CRISPR-Cas9.

CRISPR/Cas9, originalmente descubierto como un sistema inmunológico adaptativo en bacterias, ha revolucionado la ingeniería genética. Los avances recientes en esta tecnología han ampliado su uso en edición génica, terapias génicas, estudios del desarrollo y análisis mutacional en diversos organismos modelo. El pez cebra se ha consolidado como uno de los modelos animales más utilizados para evaluar la función de genes específicos con CRISPR/Cas9 mediante abordajes de pérdida de función.

El proceso para generar una línea de *D. rerio* mutante para *fstl1a* se dividió en las siguientes etapas principales: selección de la secuencia objetivo del ARNg, síntesis y purificación del ARNg y ARNm de Cas9, inyección de estos ARNs en los embriones de pez cebra, cruzamientos y análisis molecular para la selección de mutaciones (**Figura 14**).



**Figura 14 Generación y evaluación de una línea mutante para *fstl1a* en pez cebra.** Representación esquemática del proceso de generación y evaluación de una línea mutante para *fstl1a* CRISPR-Cas9.

- A. Inyección de ARNg para *fstl1a* y ARNm codificante para *nanosCas9* en embriones salvajes, para dar lugar a la generación F0
- B. Evaluación de las mutaciones, selección de parentales con la mutación de interés y cruce de estos parentales con peces salvajes para dar lugar a la generación F1.
- C. Outcross de peces heterocigotas de la generación F1 con peces salvajes para dar lugar a la F2. Selección de peces heterocigotas adultos por fin clipping y genotipado.
- D. Incross de F2 para ensayo de desarrollo de tejido adiposo preliminar y para crecer adultos de la generación F3
- E. Selección de homocigotas F3 mediante fin clipping y genotipado. Incross para obtener larvas para experimentos de análisis de las cílias a las 48 hpf y realizar experimentos de dietas
- F. Outcross de la F3 con peces salvajes, para el mantenimiento de la línea en heterocigosis.

El alelo salvaje es representado por (+) y el alelo mutado (-)

Esquema realizado utilizando Biorender.

#### **4.2.1 Evaluación de la función de *fstl1* en la regulación del largo ciliar durante el desarrollo embrionario de pez cebra.**

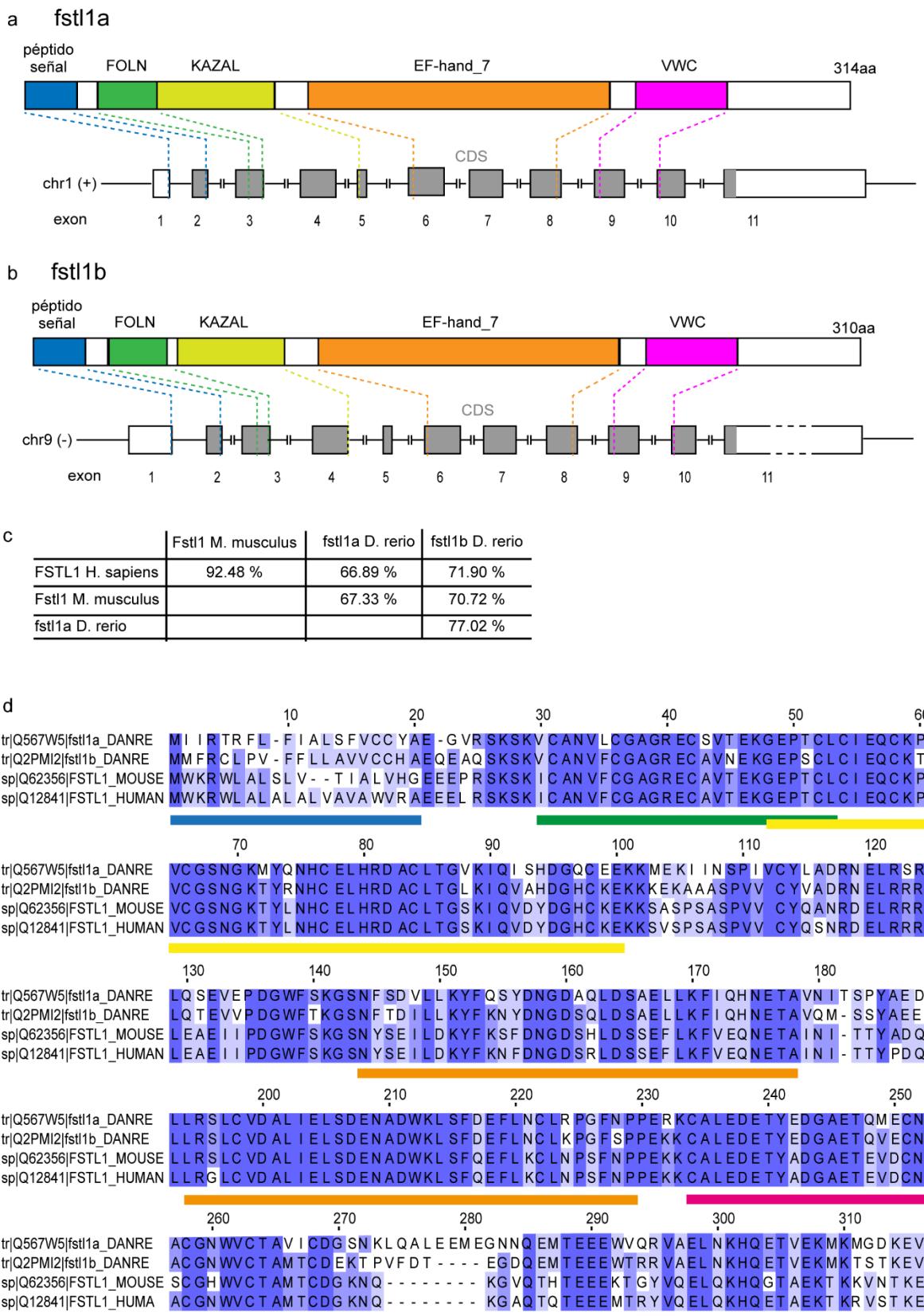
##### **4.2.1.1 Análisis de homología y conservación de *fstl1a* y *fstl1b***

El genoma de los mamíferos contiene una única copia del gen que codifica para FSTL1. Sin embargo, en el genoma de *D. rerio*, se han identificado dos genes homólogos a *FSTL1*, denominados *fstl1a* y *fstl1b* (**Figura 15A y B**) [202,203]. Se postula que esta duplicación génica, proviene de la duplicación genómica que sufrieron los peces teleósteos hace aproximadamente 350 millones de años [204–206]. A partir de la secuencia de los transcriptos canónicos disponibles en *Genbank* se predicen 11 exones para ambos genes (NM\_001017860.1 y NM\_001039621.1 respectivamente).

*fstl1a* y *fstl1b* codifican para dos proteínas de 314 y 310 aminoácidos respectivamente (UNIPROT #Q567W5 y #Q2PMI2). En la estructura de ambas proteínas se predice la presencia de los dominios canónicos de FSTL1 presentes tanto en sus homólogos en humano y ratón (**Figura 15A y B**).

Mediante un alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de las proteínas *fstl1a* y *fstl1b* de *D. rerio* y la proteína FSTL1 de *H. sapiens* y *M. musculus* con ClustalW, analizamos el nivel de conservación en estos organismos. Como se puede observar en la **Figura 15C y D**, *fstl1a* y *fstl1b*, comparten una identidad de secuencia de un 77 % entre ellos, y un 67 % y 72 % de identidad con FSTL1 humana respectivamente. Además, como ya fue reportado previamente, FSTL1 está altamente conservada entre humanos y ratón con un porcentaje de identidad mayor al 92 % (**Figura 15C**) [90,91,207].

La alta identidad de secuencia entre las proteínas de pez cebra y su homólogo humano y murino, junto con la conservación de los dominios funcionales clave, sugiere que las proteínas podrían ser efectivamente ortólogos y, por consiguiente, desempeñar funciones biológicas similares. Por lo tanto, este análisis respalda a *D. rerio* como un modelo válido para el estudio del rol de FSTL1 en el contexto de los vertebrados.



**Figura 15. Conservación de la secuencia de FSTL1 en humanos, ratón y pez cebra.**

**A** Esquema de la estructura del gen y la proteína fsl1a de pez cebra (UNIPROT #Q567W5). Se ilustran los dominios predichos en la proteína: el péptido señal, dominio FOLN, dominio tipo KAZAL, los dominios EF:

*EF-hands del dominio extracelular de unión a calcio (EC) y dominio VWC Von Willebrand factor tipo C. Además, se muestran los exones (1-11) del ARNm canónico (NM\_001017860.1), que codifican para cada dominio putativo.*

**B** Esquema de la estructura del gen y la proteína *fstl1b* de pez cebra (UNIPROT #Q2PMI2). Se ilustran los dominios predichos y los exones (1-11) del ARNm canónico (NM\_001039621.1), que codifican para cada dominio putativo.

**C** Matriz de identidad. Se muestra el porcentaje de identidad entre las secuencias de *FSTL1* de las distintas especies, calculado como la proporción de residuos idénticos en el alineamiento par a par de las proteínas.

**D** Alineamiento múltiple de las secuencias aminoácidas de las proteínas *fstl1a* y *fstl1b* de *D. rerio* y la proteína *FSTL1* de *H. sapiens* y *M. musculus* realizado con la herramienta bioinformática ClustalW. Los símbolos debajo del alineamiento indican el grado de conservación entre las secuencias: (\*) identidad total, (:) conservación fuerte (los residuos son diferentes, pero comparten propiedades físico-químicas similares), (.) conservación débil, ( ) no hay conservación.

Extraído y modificado de [158].

#### 4.2.1.2 Expresión de *fstl1a* y *fstl1b*

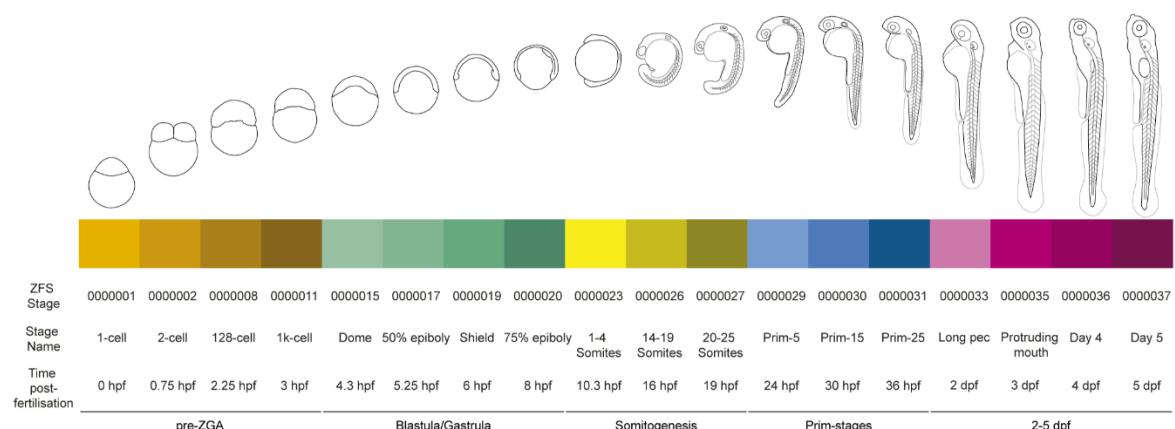
A continuación, analizamos los perfiles de expresión temporal de los genes *fstl1a* y *fstl1b* durante el desarrollo embrionario de pez cebra. Para ello, utilizamos los datos públicos provenientes del estudio de White y colaboradores, quienes realizaron ARN-Seq a partir de ARN poliadenilado desde las 0 hpf a los 5 dpf [208]. Los datos fueron accedidos a través del *Expression Atlas* y se expresan en TPM (transcriptos por millón) [209].

En la **Figura 16A** se detallan los 18 puntos temporales que fueron analizados durante el desarrollo embrionario de pez cebra y su equivalencia en horas post-fecundación (hpf). Los primeros cuatro puntos corresponden a estadios previos o al inicio de la transcripción cigótica (pre-ZGA). Luego cuatro puntos en la etapa de la gastrulación (blástula/gástrula). Posteriormente, tres puntos durante la somitogénesis. Luego, los siguientes tres puntos corresponden a las 24, 30 y 36 hpf respectivamente. Los últimos cuatro puntos van desde 2 dpf hasta 5 dpf, con intervalos de 24 h [208]. En la **Figura 16B** se muestran los perfiles de expresión de los genes *fstl1a* y *fstl1b* a lo largo de estas etapas. Existen niveles detectables de ARNm de *fstl1b* desde las 0 hpf, indicando la presencia de transcriptos maternos en el cigoto. Estos niveles se mantienen relativamente constantes durante los estadios de blástula y gástrula, pero aumentan a partir del estadio de 75 % de epibolia, alcanzando un máximo en los estadios de segmentación (20-25 somites). Este nivel máximo se mantuvo relativamente constante hasta los 5 dpf. Por otro lado, la

expresión de *fstl1a* comienza a detectarse a partir del estadio de segmentación (2-5 somites). Su expresión alcanzó un valor máximo en el estadio faríngula (prim-5) y disminuye posteriormente en etapas larvales, con niveles mínimos en los 5 dpf.

El coeficiente de correlación de Pearson, que se interpreta como una medida de similitud entre los perfiles de expresión de *fstl1a* y *fstl1b* es de 0,78, lo que sugiere que ambos genes mantienen cierto grado de coordinación en el patrón de expresión temporal, al igual que ocurre con otros genes parálogos [208].

a



b

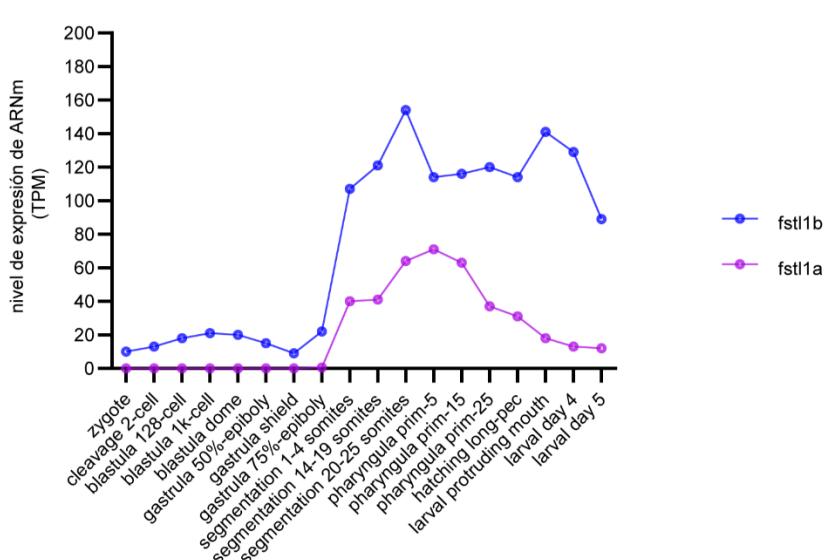


Figura 16. Expresión de *fstl1a* y *fstl1b* en etapas tempranas del desarrollo de *D. rerio*.

**A** Esquema representativo de las etapas analizadas en estudio de transcriptómica de White y cols [208]. Las etapas de encuentran identificadas de acuerdo con la denominación ZFS, (Zebrafish developmental stages [210]) los nombres de las etapas y las horas post fertilización aproximadas (a 28,5 °C) correspondientes a cada etapa y las cinco categorías de desarrollo (pre-ZGA, blástula/gástrula, somitogénesis, etapa primordial, larva, cada una de ellas representada con un color diferente). Extraído de [208].

**B** Gráfico del perfil de expresión de ARNm de los genes *fstl1a* y *fstl1b* durante el desarrollo embrionario de pez cebra. El nivel de expresión se expresa en TPM (Transcripto por millón). Datos extraídos a partir de [208] disponibles en Expression Atlas.

#### 4.2.1.3 KD de *fstl1a* y *fstl1b* mediante el empleo de morfolinos

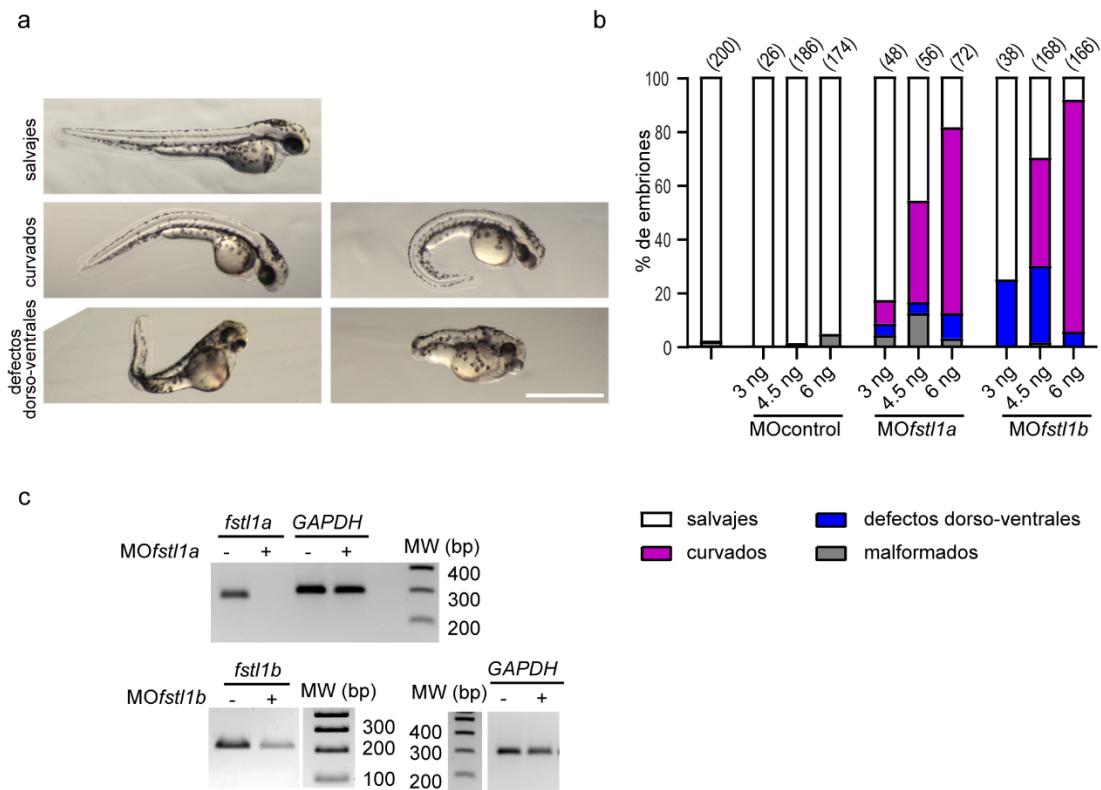
Como mencionamos anteriormente, trabajamos con MOs dirigidos para los *fstl1a* y *fstl1b* con el fin de evaluar el efecto de la inhibición de la expresión de estos genes durante etapas tempranas del desarrollo de pez cebra. Inyectamos embriones de 1-4 células con MO en distintas dosis y analizamos su fenotipo externo en un estereomicroscopio a las 48 hpf. Dado que los fenotipos obtenidos no son homogéneos en todos los individuos injectados, para cuantificar el efecto de los morfolinos, clasificamos los embriones en categorías según su severidad y los graficamos en función de la dosis de morfolino injectada.

La **Figura 17A** muestra imágenes representativas de los diferentes fenotipos observados y su clasificación en categorías y la **Figura 17B** resume la proporción de embriones en cada categoría. Observamos que el efecto de los morfolinos es dependiente de la dosis ya que, al incrementar la dosis de MO inyectada, aumenta la cantidad de embriones afectados, así como la proporción de embriones con fenotipos más severos.

La inhibición de cada gen individualmente resultó principalmente en un *fenotipo con curvatura ventral*, en forma de “C”. Este fenotipo caracterizado por el eje corporal curvado es un rasgo usualmente encontrado tanto en morfantes como en líneas mutantes dirigidas a genes que afectan a la cilia primaria [164,165,192,193,195,196]. Otros fenotipos asociados a defectos en las cillas tales como el desarrollo de hidrocefalia y la presencia de tres otolitos en el oído también fueron observados, aunque en una baja proporción y no de forma sistemática entre los experimentos analizados.

En menor proporción encontramos embriones con alteración en la formación del eje dorso-ventral: la cola se curva dorsalmente, son más cortos, tienen la cabeza más pequeña y los ojos más pequeños [211]. Es importante destacar que los embriones con defectos dorso-ventrales fueron más frecuentes tras la inyección de *fstl1b*, en concordancia con el papel más prominente reportado para este gen en el establecimiento del eje dorso-ventral [202,203]. Por último, la categoría de embriones *malformados* incluye a aquellos embriones que tenían defectos severos.

En la condición que encontramos un mayor número de embriones con fenotipo (6ng de MO), evaluamos la eficiencia de los morfolinos para bloquear el *splicing*. Para ello, realizamos RT-PCR a partir de ARNm de embriones control y tratados y los fragmentos amplificados se visualizaron en geles de agarosa. El esquema experimental se muestra en la **Figura 6** en la sección materiales y métodos, donde se describe la ubicación de los morfolinos en los transcriptos diana. Como se puede ver en la **Figura 17C** la amplificación a partir de ARNm de tipo salvaje generó amplicones de PCR de 282 pb y 212 pb para *fstl1a* y *fstl1b*, respectivamente, mientras que el ARNm empalmado de forma aberrante no se esperaba que produjera un producto de PCR debido al tamaño del intrón retenido (>10 kb y >60 kb para *fstl1a* y *fstl1b*, respectivamente). Nuestros resultados muestran que los morfolinos afectaron eficientemente el empalme de ambos genes.



**Figura 17. Fenotipo externo de embriones morfantes.**

- A** Imágenes a baja magnificación de embriones salvajes y morfantes a 48 hpf.
- B** Gráfico con la distribución de los embriones en las distintas clases fenotípicas según la severidad, evaluadas en las dosis de morfolino probadas. Se presentan datos agrupados de tres experimentos, el número de embriones analizados en cada condición se indica entre paréntesis. Escala: 1 mm.
- C** Imagen del gel que muestra los resultados de RT-PCR, evidenciando una amplificación reducida de los transcriptos de *fsl1a* y *fsl1b* empalmados correctamente en los embriones morfantes MO*fsl1a* y MO*fsl1b*, respectivamente. Gapdh se utilizó como control.

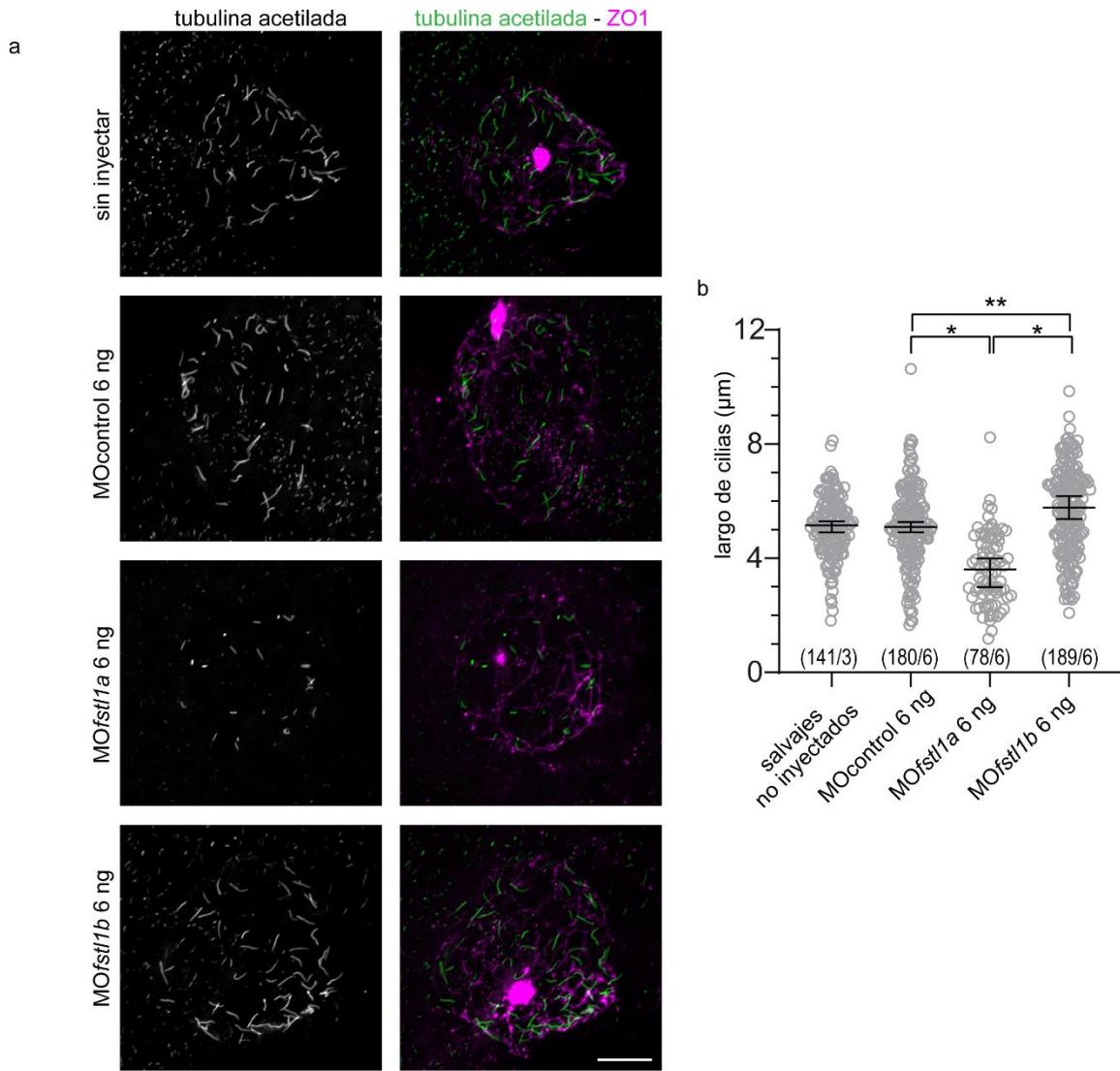
Extraído y modificado de [158].

#### 4.2.1.4 Evaluación del largo de las cílias en la vesícula de Kupffer

Con el fin de cuantificar el efecto de la expresión reducida de *fsl1a* y *fsl1b* en la formación de la cilia, analizamos las cílias de la vesícula de Kupffer (VK), una estructura ciliada transitoria que funciona como centro organizador de la simetría izquierda-derecha conservada en todos los peces teleósteos [212]. Esta estructura se forma durante el final

de la gastrulación en el primordio de la cola (del inglés *tailbud*) y tiene una localización ventral a la notocorda y adyacente al vitelo. Para esto, inyectamos embriones con MOcontrol, MO*fstl1a* o MO*fstl1b*, los fijamos en el estadio de 12 somites en PFA 4%, realizamos inmunomarcaje de la cilia con anticuerpo anti-tubulina acetilada y el cuerpo basal con anticuerpo anti- $\gamma$  tubulina y observamos los preparados mediante microscopía confocal.

En la **Figura 18A** se muestran imágenes representativas de estas vesículas. Una vesícula de Kupffer es una estructura simple, formada por una monocapa de aproximadamente 50 células epiteliales denominadas DFCs (del inglés *Dorsal Forerunner Cells*) que recubren una cavidad. Cada célula DFC proyecta una única cilia al lumen de la cavidad [213]. Las cílias localizadas dentro de la vesícula son móviles y su movimiento genera un flujo antihorario [189,214]. En la **Figura 18B** se muestra un gráfico de los largos de las cílias en las condiciones ensayadas. Las cílias en los embriones no inyectados y en los embriones inyectados con morfolinos control fueron de  $5,1 \pm 1,1 \mu\text{m}$  (media  $\pm$  DE) y  $5,1 \pm 1,4 \mu\text{m}$  de largo, respectivamente, mientras que las cílicas en los morfantes de *fstl1a* midieron  $3,6 \pm 1,3 \mu\text{m}$ . En contraste, las cílicas en los embriones inyectados con MO*fstl1b* fueron de  $5,6 \pm 1,5 \mu\text{m}$  de largo. Por lo tanto, mientras que la reducción del nivel de *fstl1a* inhibió la formación de cílicas, la reducción de *fstl1b* resultó en cílicas más largas en la VK.



**Figura 18. Cílios en la vesícula de Kupffer.**

**A** Imágenes representativas de las cílias en la VK en cada condición. Proyecciones de máxima intensidad de VK de embriones de 12 somites inyectados con 6 ng de MOcontrol, MOfstl1a o MOfstl1b. Las cílias se evidencian por tinción con anti-tubulina acetilada y se utiliza anti-ZO1 para delimitar la vesícula. Barra de escala: 20  $\mu$ m

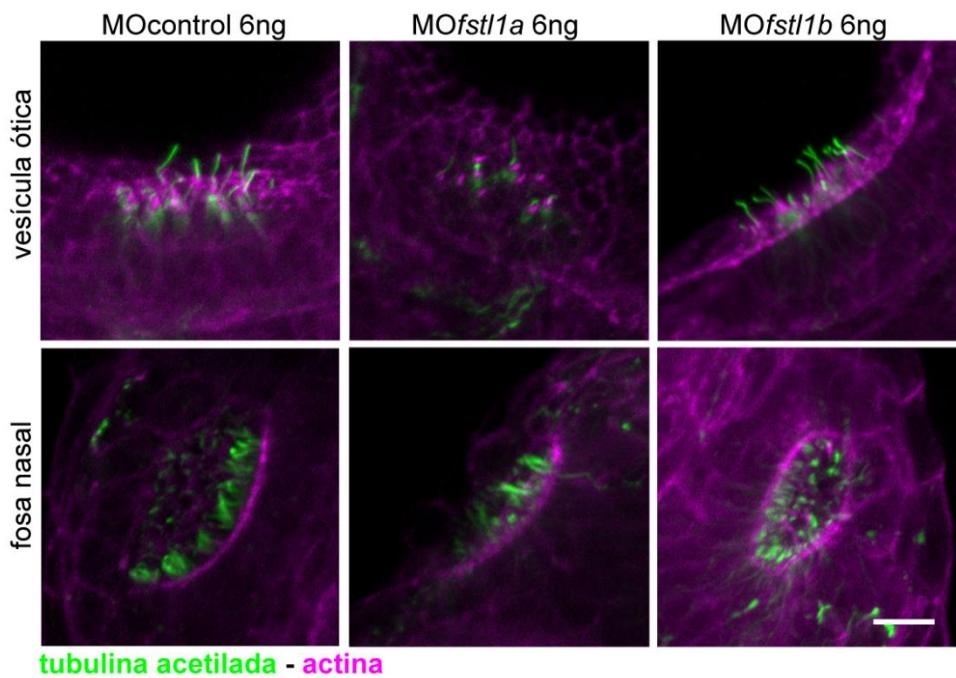
**B** Gráfico con la cuantificación del largo de las cílias en la VK en el estadio de 12 somites de embriones morfantes y controles. Se presentan los datos agrupados de un único experimento. Dentro del paréntesis se indican la cantidad de cílias/número de embriones analizados. Se grafican los valores individuales de largo de cílias y mediana  $\pm$  IC (95 %). (\*)  $p<0,0001$ ; (\*\*)  $p=0,0019$ ; prueba de Games-Howell.

Extraído y modificado de [158].

#### **4.2.1.5 Evaluación del largo de las cílias en la vesícula ótica y fosa nasal**

Seguidamente, decidimos examinar las cílias presentes en otros tejidos ciliados en embriones de pez cebra, como la vesícula ótica y la fosa nasal. Para ello, inyectamos embriones con MOcontrol, MO $fstl1a$  o, MO $fstl1b$ , los fijamos a las 48 hpf, realizamos una inmunomarcación con anticuerpo anti-tubulina acetilada para identificar las cílias y F-actina conjugada a faloidina para marcar la estructura del tejido, y los analizamos mediante microscopía confocal.

En los paneles superiores de la **Figura 19**, se presentan imágenes de microscopía confocal que muestran conjuntos de cílios denominadas *kinocilia*s, presentes en las células ciliadas sensoriales (en inglés *hair sensory cells*) de la vesícula ótica (primordio del oído interno). Estas células forman agrupaciones en parches sensoriales denominados máculas. En los paneles inferiores de la figura se muestran imágenes de las cílias presentes en células sensoriales olfatorias de la fosa nasal. En el caso de embriones morfantes para  $fstl1a$  pudimos observar una reducción tanto en el largo como en el número de las cílias presentes en ambas estructuras sensoriales. No observamos diferencias en el caso de embriones morfantes para  $fstl1b$ . Cabe notar que, debido a la alta superposición de estas cílias, el análisis de estas estructuras fue exclusivamente cualitativo, ya que no es posible cuantificar largo o número de cílias.



**Figura 19. Efecto de la inhibición de la expresión de *fstl1a* y *fstl1b* sobre la formación de las cílias en la vesícula ótica y fosa nasal a las 48 hpf.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestran las cílias primarias (evidenciadas mediante inmunotinción de tubulina acetilada) en la fosa nasal y vesícula ótica de embriones de 48 hpf inyectados con 6 ng de MOcontrol, MOfstl1a o MOfstl1b. La tinción de F-actina con faloidina se utilizó para delinear el órgano. Barra de escala: 10  $\mu$ m. Extraído y modificado de [158].

## **4.2.2 Generación de una línea de peces knockout para *fstl1a* mediante el sistema de edición genómica CRISPR-Cas9.**

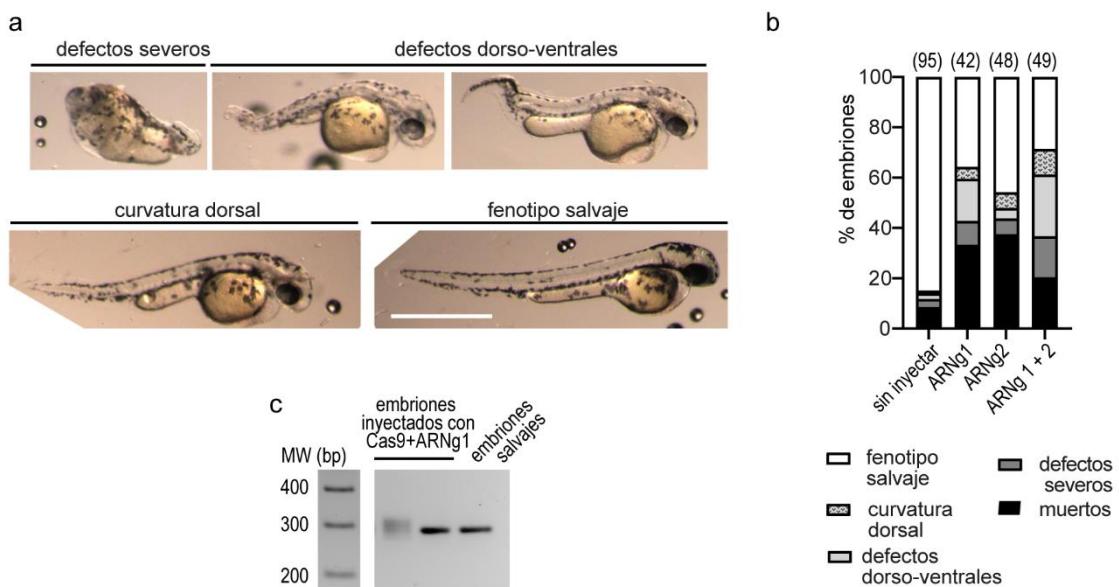
### **4.2.2.1 Evaluación de la eficiencia de los ARN guías**

Basándonos en los resultados presentados anteriormente, que evidencian un papel pro-ciliogénico de *fstl1a*, seleccionamos este gen para continuar nuestro trabajo. Diseñamos dos guías (ARNg1 y ARNg2) utilizando la herramienta *CRISPR Scan*, dirigidos al exón 3 del gen *fstl1a* el cual codifica para el dominio FOLN (ver esquema en sección de materiales y métodos). Para evaluar la eficiencia de la mutagénesis, inyectamos en embriones de una célula estos dos guías de forma individual o combinada, junto con ARNm de Cas9 generado mediante transcripción *in vitro* a partir del vector pT3TS-nzfCas9.

En la **Figura 20A**, se ilustran los principales fenotipos observados a las 48 hpf en los embriones inyectados. Dentro de estos fenotipos se observó un acortamiento del eje corporal con malformación en la extensión de la cola y curvatura dorsal, el cuál mostró similitud con los defectos observados en el eje dorso-ventral de embriones morfantes para *fstl1a*. Como se observa en el gráfico de la **Figura 20B**, el ARNg1 generó un mayor porcentaje de embriones con fenotipo dorso-ventral que el ARNg2 y un porcentaje similar de embriones con defectos graves. La inyección de la combinación de ambos ARNg dio resultados similares a la inyección de ARNg1.

Extrajimos ADN genómico de estos embriones inyectados y analizamos la región genómica que abarca el sitio objetivo en *fstl1a* mediante amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa. Los análisis iniciales de embriones individuales mostaron la presencia de mutaciones en la región objetivo, que se puede observar como un *smear* en la corrida electroforética, mientras que la amplificación a partir de embriones salvajes genera una banda definida del tamaño esperado (**Figura 20C**).

Basándonos en todo lo anterior, elegimos seguir trabajando con el ARNg1 para la generación de la línea KO para *fstl1a* en pez cebra.



**Figura 20. Evaluación de la eficiencia de la mutagénesis**

**A** Imágenes a baja magnificación de embriones de 48 hpf inyectados con ARNg1 y ARNg2, mostrando ejemplos de las distintas categorías fenotípicas: fenotipo severo, defectos dorso-ventrales, curvatura dorsal, fenotipo salvaje.

**B** Gráfico con los porcentajes de embriones en cada una de las categorías fenotípicas. Los datos fueron obtenidos a partir de un único experimento y el número total de embriones se encuentra indicado entre paréntesis.

**C** Imagen del gel mostrando la amplificación por PCR de la región flanqueante a la región PAM utilizando cebadores genéricos a partir de la inyección de embriones con ARNg1 + ARNm Cas9 así como también embriones salvajes. La introducción de mutaciones en mosaico en alta proporción se detecta como un smear (segundo carril), mientras que la ausencia de mutaciones se detecta como una banda definida (tercer carril).

Extraído y modificado de [158].

#### **4.2.2.2 Mutagénesis por CRISPR-Cas9nanos y caracterización de las mutaciones generadas**

Dado que las mutaciones en *fstl1a* produjeron alteraciones morfológicas que podrían ser incompatibles con un desarrollo posterior, decidimos utilizar ARNm de Cas9-nanos para la generación de la línea KO, restringiendo así la expresión de Cas9 a la línea germinal de los embriones inyectados. De este modo, evitamos la generación de mutaciones en *fstl1a* en células somáticas, lo que podría afectar el desarrollo de los peces fundadores adultos [161]. Mantuvimos los embriones inyectados hasta la madurez sexual estableciendo así la generación denominada F0.

Cruzamos 8 ejemplares seleccionados de F0 con peces salvajes para evaluar las mutaciones de *fstl1a* segregadas en la descendencia. Para genotipar cada individuo, extrajimos ADN genómico de embriones individuales de este cruce, que empleamos para amplificar y secuenciar la región aledaña al motivo PAM (definida en sección Materiales y métodos). En la **Figura 21A** se observan los productos amplificados corridos en un gel de agarosa 2 %. En los casos señalados con asterisco se puede observar la diferencia de tamaños en el producto amplificado, debido a alelos con mutaciones. Durante el proceso de genotipado, mantuvimos los 8 ejemplares seleccionados de F0 de forma aislada en el sistema hasta obtener los resultados de la secuenciación.

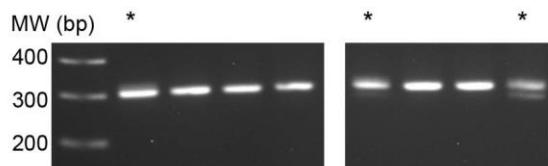
Como se muestra en la **Figura 21B** logramos identificar múltiples inserciones y delecciones (indels) de diferente longitud en la región flanqueante al motivo PAM, con efecto variado en las proteínas resultantes. Por un lado, detectamos la inserción de una adenina, que interrumpe un residuo de cisteína (Cys) y genera la introducción de un codón de terminación de la traducción prematuro (PTC del inglés *premature termination codon*). También identificamos una delección de 23 pb y una inserción de 7 pb que generan un corrimiento en el marco de lectura, que en ambos casos resultan en la introducción de múltiples aminoácidos sin sentido y la introducción de un PTC en el exón 4 de *fstl1a*. La presencia de un PTC en la síntesis temprana de una proteína normalmente tiene consecuencias muy severas en la funcionalidad de ésta afectando no sólo la estructura de la proteína, sino que también puede resultar en una reducción de la expresión del gen. Esto se debe a que estas señales son reconocidas por la maquinaria de NMD (del inglés,

*nonsense mediated decay*) la cual induce la degradación de los ARNm que portan esos PTC, así como de la proteína naciente [215].

Por otro lado, también identificamos casos en los que, la generación de indels no produjeron un corrimiento en el marco de lectura (al ser indels de números múltiplos de 3) generando la inserción/deleción de aminoácidos en la proteína, y por lo tanto cambios en la estructura primaria de la proteína. Dentro de estos cambios encontramos una delección de 5 pb combinada junto con una inserción de 14 pb, que ocasiona la eliminación de un residuo de Cys y la incorporación de los aminoácidos Arg-Lys-Thr-Val; una delección de 3 pb que reemplaza los residuos de Cys y Ser por un residuo de Pro; una delección de 1 pb combinada con una inserción de 10 pb, que provoca la eliminación de un residuo de Cys y la adición de los aminoácidos Pro-Phe-Leu-Ser; y finalmente, una inserción de 99 pb que se traduce en la incorporación de 33 aminoácidos adicionales en la proteína resultante.

a

embriones cruce F0 x peces salvajes



b

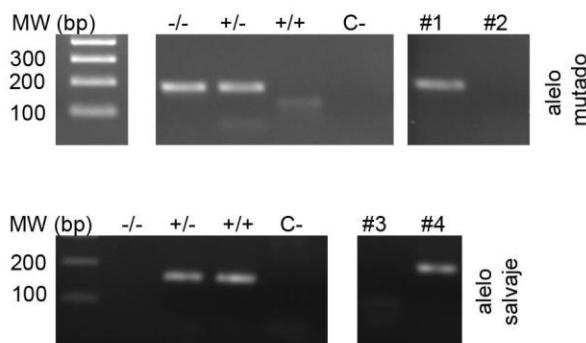
secuencia 5' → 3'	modificación en el ADN	modificación en la proteína	mutación #
TTCTGTGGAGCTGGGAGAGAATGTTGGTCACA	wt	-	
TTCTGTGGAGCTGGGAGAGAAT <b>A</b> GTTCGGTACA	1 bp ins	Cys → STOP	1
TTC <b>-</b> GGTCACA	23 bp del	FS and PSC in exon 4	2
TTCTGTGGAGCTGGGAGAGA <b>-</b> GAGAAAGACGGTCA	5 bp del / 14 bp ins	Cys → Arg-Lys-Thr-Val	3
TTCTGTGGAGCTGGGAGAGA <b>-</b> CGGTACA	3 bp del	Cys-Ser → Pro	4
TTCTGTGGAGCTGGGAGAGA <b>-</b> <b>C</b> CTTTTGAGTTCGGTACA	1 bp del / 10 bp ins	Cys → Pro-Phe-Leu-Ser	5
TTCTGTGGAGCTGGGAGAGA <b>-</b> (99 bp) <b>-</b> ATGTTCGGTACA	99 bp ins	33 aa ins	6
TTCTGTGGAGCTGGGAGAGA <b>-</b> <b>C</b> ACA	7 bp del	FS and PSC in exon 4	7

secuencias PAM y gRNA / cambios relativos a la secuencia salvaje

c

PCR con primers alelo específicos

F3 fin-clipping



**Figura 21. Identificación de las mutaciones introducidas**

**A** Imagen del gel mostrando la amplificación por PCR de la región flanqueante a la región PAM utilizando cebadores genéricos a partir de ADN extraído a partir del cruce de F0 con peces salvajes. Cada carril corresponde a un embrión diferente. Los asteriscos indican los productos que fueron secuenciados.

**B** Secuencias de las diferentes mutaciones encontradas en embriones derivados del cruce de individuos F0 y peces salvajes.

**C** Imagen del gel del genotipado de peces adultos con cebadores diseñados específicamente para detectar el alelo con la mutación 1 y el alelo salvaje. Arriba se muestra resultado PCR realiza con cebadores diseñados para amplificar únicamente el alelo mutado y abajo resultado de PCR para amplificar el alelo salvaje. Controles: (-/-), (-/+ y (+/+) son ADN extraídos de peces homocigota mutados, heterocigotas y salvajes respectivamente. A la derecha se observa el resultado del genotipado de dos individuos.

Extraído y modificado de [158].

Inicialmente, seleccionamos tres de estas mutaciones (las que denominamos mutación 1, 3, 5) para realizar una evaluación del efecto sobre el desarrollo del tejido adiposo. Para esto, cruzamos los peces de la F0 portadores de las mutaciones seleccionadas con peces salvajes. Como los peces F0 son mosaicos para la mutación en la línea germinal, se espera que una proporción de los individuos de la generación F1 sean heterocigotas para las mutaciones identificadas previamente (**Figura 14**). Los peces adultos de la F1, una vez que alcanzaron la adultez, fueron genotipados utilizando un trozo de la cola (*fin clipping*), cómo se describe en la sección de Materiales y métodos. En estos casos se diseñaron cebadores específicos para amplificar el alelo mutado, en cada caso, y el alelo salvaje. Tomando la mutación 1 a modo de ejemplo, en el caso de que haya producto amplificado en ambas PCR tenemos un pez de genotipo heterocigota (-/+), en el caso de los peces salvajes solo se amplifica el alelo salvaje (**Figura 21C**).

Posteriormente, peces de la generación F1 (-/+) se cruzaron con peces salvajes (*outcross*) para dar lugar a la generación F2. Como resultado de este cruce el genotipo de la progenie es (+/+) y (-/+), por lo tanto, una vez que los peces llegaron a la edad adulta, seleccionamos aquellos con genotipo (-/+) mediante el genotipado de un trozo de la cola (*fin clipping*)

Luego, realizamos un *incross* de peces de generación F2 [(-/+) x (-/+)]. Con larvas obtenidas de este cruce trabajamos en un ensayo preliminar de dietas, como se muestra a continuación en la siguiente sección (**Figura 14**).

#### **4.2.2.3 Screening preliminar con los mutantes**

Con el objetivo de obtener información preliminar sobre el efecto del KO de *fstl1a* en el desarrollo del tejido adiposo, y definir cuál mutación seleccionar para la generación de la línea homocigota, realizamos ensayos para evaluar el desarrollo del tejido adiposo en larvas provenientes del *incross* de individuos de la generación F2 portadores de las tres mutaciones generadas (1, 3, 5). El genotipo esperado de las larvas producidas como resultado de este cruce, es un genotipo mezclado (+/+), (+/-) y (-/-), en proporciones teóricas de 25 %, 50 %, 25 %, respectivamente.

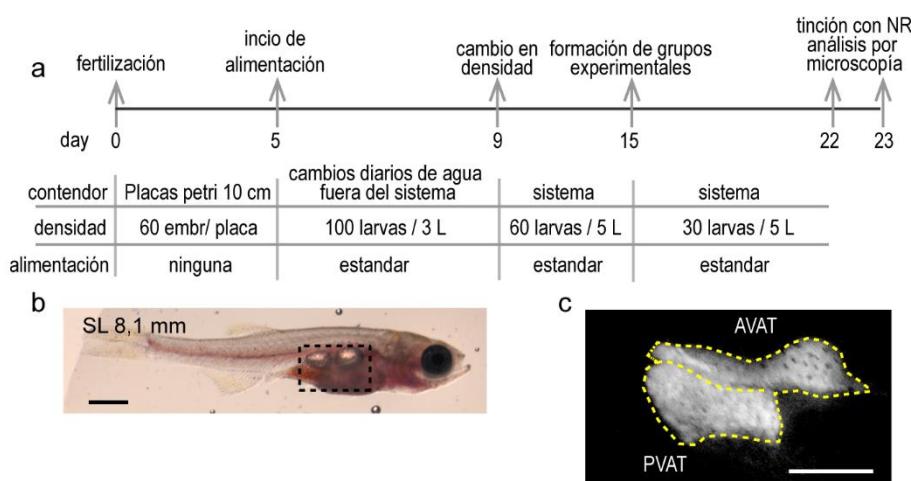
Para mejorar la reproducibilidad de estos experimentos, diseñamos un protocolo de alimentación y análisis de los depósitos de tejido adiposo en base a datos y métodos publicados, que adaptamos según la disponibilidad de alimentos en nuestro acuario (**Figura 22A**).

Crecimos las larvas en condiciones controladas de alimentación a partir de los 5 dpf, cuando las larvas ya han consumido por completo los nutrientes del vitelo y comienzan a ingerir alimentos de forma activa [197,199].

Al igual que en mamíferos, el tejido adiposo de pez cebra, se distribuye en ubicaciones anatómicas específicas a lo largo del cuerpo. La utilización de colorantes lipofílicos fluorescentes, como Nile Red, permite visualizar, clasificar y cuantificar sistemáticamente estos depósitos [216].

A los 23 dpf, incubamos a las larvas con Nile Red y adquirimos imágenes en luz transmitida y de fluorescencia para medir el estadio de desarrollo y el área del tejido adiposo respectivamente, de acuerdo con lo previamente establecido [168,216]. En la **Figura 22B**, se muestra una larva en el estadio PB (SL 8,1 mm). Como referencia anatómica, en este estadio, la vejiga natatoria presenta dos lóbulos: el posterior, que es el primero en formarse y que se alarga progresivamente, y el anterior, que se desarrolla más tarde. Un rasgo distintivo de esta etapa es la aparición del par de aletas pélvicas en la región ventral, justo por debajo del lóbulo posterior de la vejiga natatoria. Las aletas caudal, anal y dorsal ya están completamente formadas y comienzan a aparecer xantóforos amarillos y los pliegues de las aletas se han reabsorbidos en gran medida [167,170]. Debido a la

utilización de epinefrina, no se observa el patrón característico de melanóforos. En la **Figura 22C**, se muestra una imagen de fluorescencia de la región abdominal de la misma larva. En la misma se pueden observar los depósitos de tejido adiposo visceral abdominal (AVAT) y tejido adiposo visceral pancreático (PVAT), los cuáles fueron analizados en este trabajo.



**Figura 22 Evaluación del tejido adiposo de larvas.**

**A** Representación esquemática del protocolo de alimentación utilizado para la evaluación inicial de las diferentes mutaciones.

**B** Ejemplos de imágenes de campo claro, obtenidas con estereomicroscopio, empleadas para determinar el largo estándar (SL). Escala: 1 mm.

**C** Ejemplos de imágenes de fluorescencia en larvas teñidas con Nile Red, obtenidas con estereomicroscopio, empleadas para determinar el área de tejido adiposo. Se señalan con rayas punteadas el área correspondiente a los depósitos AVAT y PVAT medida en estos ensayos. Escala: 0,5 mm.

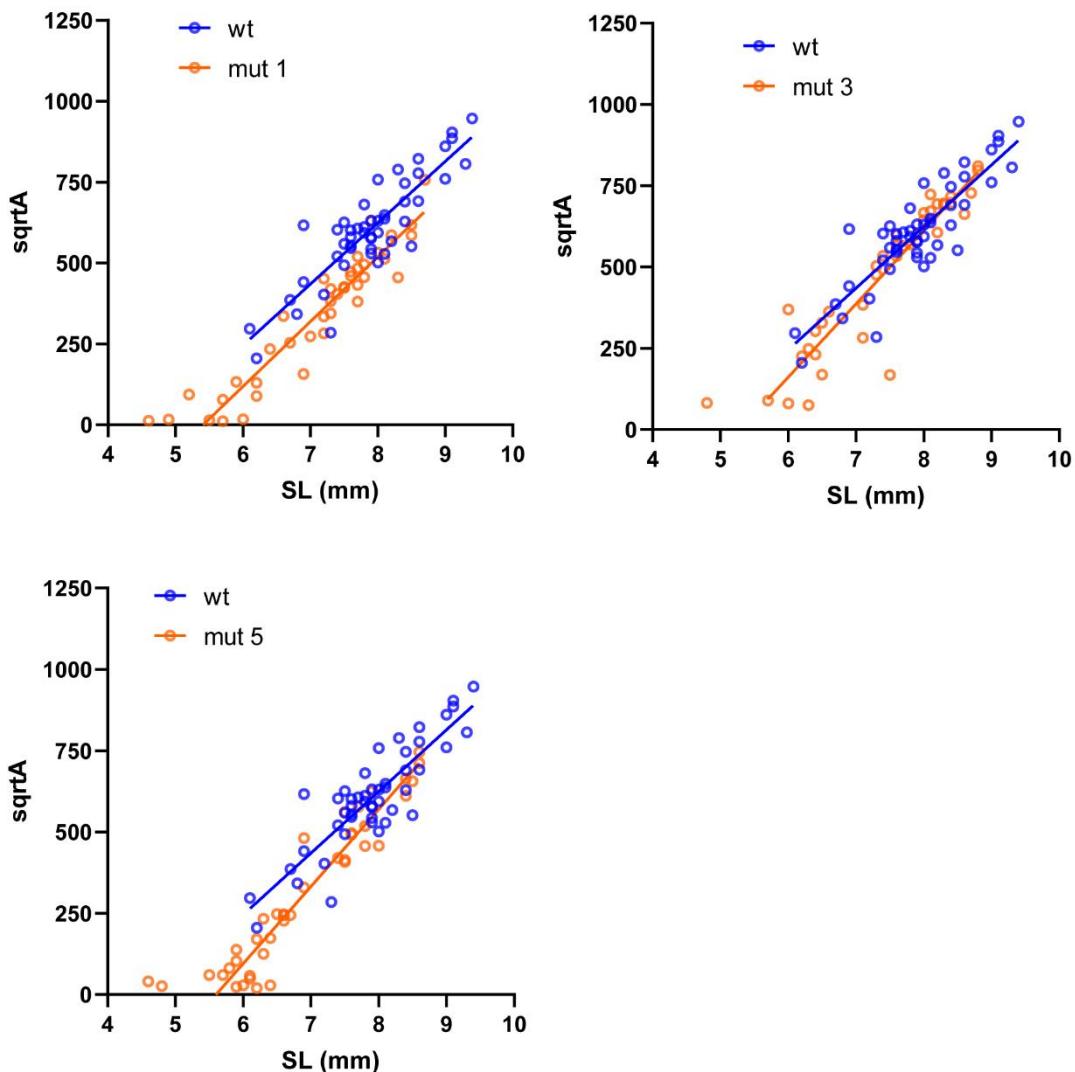
Extraído y modificado de [158].

El PVAT es el tejido adiposo que primero se detecta en pez cebra y tiene, localización ventral en relación a la vejiga natatoria. Se comienza a detectar en peces con un SL de 4,2 mm (8-12 dpf) como un pequeño grupo de gotas lipídicas y rápidamente experimenta una expansión significativa, adoptando una forma alargada

[168,199,200,216,217]. Dado que está asociado con el páncreas exocrino, se localiza asimétricamente en el lado derecho de larvas [216]. El AVAT, se localiza también en la región ventro-lateral de la cavidad abdominal, asociado con la vejiga natatoria. Este tejido es el segundo depósito en formarse, apareciendo cuando los peces tienen una longitud estándar de 5,5 mm aproximadamente [200,216].

El área bidimensional del tejido adiposo total, determinada mediante tinción con colorantes lipofílicos fluorescentes, así como el área de los depósitos AVAT y PVAT evaluados individualmente, muestran una correlación lineal con del contenido lipídico de cada depósito. Por lo tanto, esta medición puede utilizarse para cuantificar el grado de acumulación de grasa y seguir el desarrollo del tejido adiposo [216].

El área del tejido adiposo depende del estadio de desarrollo de las larvas (medido como la longitud estándar, SL) a través de una relación no lineal, lo que es consistente con lo descrito previamente [216]. Por lo tanto, transformamos los datos de área mediante la función raíz cuadrada como se observa en la **Figura 23**. Podemos observar que existe una relación lineal entre la raíz cuadrada del área del tejido adiposo y el estadio de desarrollo de las larvas representado por el SL. En el caso de las larvas producidas por el *incross* de la F2, podemos observar que el área de tejido adiposo fue menor que en las salvajes para todas las mutaciones estudiadas. Las larvas del cruce conteniendo la mutación 1, que se corresponde a la inserción de 1 pb y la generación de un codón stop, mostró el efecto más severo. De acuerdo con esta observación, decidimos continuar trabajando únicamente con esta mutación.



**Figura 23 Evaluación preliminar de las mutaciones.** Gráficas con los resultados del ensayo preliminar de crecimiento en dieta estándar, comparando larvas salvajes y provenientes del incross de F2 de con 3 mutaciones diferentes (1, 3, 5).

Por lo tanto, continuamos trabajando con la mutación 1, a la cuál nombramos **c.118insA, p.(Cys40\*)** siguiendo recomendaciones de nomenclatura de HGVS.

Cruzamos ejemplares de la F2, mediante un *incross* y los crecimos hasta la madurez sexual. Luego, seleccionamos los individuos homocigotas mutantes (-/-) de la generación F3 mediante el genotipado de la cola. Los embriones producto de su descendencia, fueron empleados tanto para análisis de fenotipo ciliar, así como y las larvas para ensayos de dietas (**Figura 14**). El mantenimiento de la línea se realizó en heterocigosis, mediante el cruce de peces homocigotas con salvajes.

#### 4.2.3 Evaluación de los fenotipos de la línea *fstl1a* (-/-)

##### 4.2.3.1 Verificación del KO de *fstl1a* y de los fenotipos ciliares en embriones *fstl1a* (-/-)

A continuación, evaluamos los niveles de ARNm de *fstl1a* en embriones de 48 hpf la línea mutante *fstl1a* (-/-) mediante qPCR y lo comparamos con el nivel de embriones salvajes, ya que esperábamos que en el caso de la línea con la mutación c.118insA, p.(Cys40\*), el ARNm mutante fuese degradado, al menos parcialmente mediante un mecanismo de NMD, como consecuencia de que la síntesis proteica de *fstl1a* en el mutante se detiene prematuramente en el aminoácido 40.

Como se puede ver en la figura **Figura 24A**, observamos una reducción significativa de los niveles de ARNm de *fstl1a* (aproximadamente 40 %). A su vez, verificamos la expresión de *fstl1b* pudiendo comprobar que sus niveles de ARNm no estaban afectados en los mutantes. Por otro lado, intentamos evaluar *fstl1* a nivel de proteína. Cabe mencionar que si bien disponíamos de dos anticuerpos anti-*fstl1*, uno dirigido contra la proteína humana y otro contra la de ratón, no obtuvimos señales específicas en los ensayos de Western Blot.

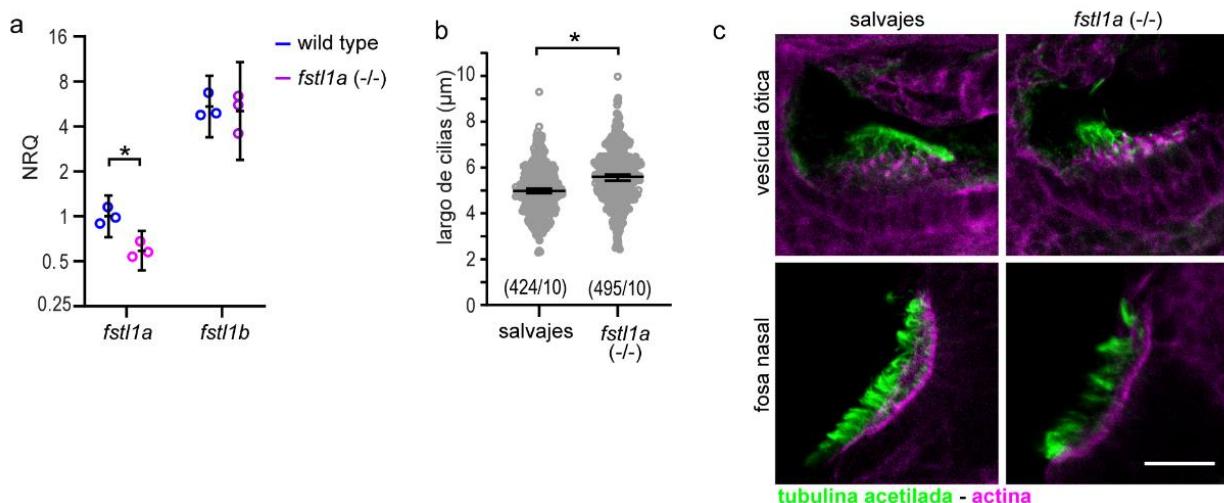


Figura 24 Evaluación de embriones *fstl1a* (-/-)

- A. Cuantificación del nivel de ARNm de *fstl1a* y *fstl1b* en un pool de embriones de 48 hpf salvajes o de la línea *fstl1a* (-/-). Se presentan las réplicas técnicas con la media ± IC 95%. NRQ: cantidad relativa normalizada. (\*) p = 0,007, test t.
- B. Resultados de la cuantificación del largo de las cílias en la VK de embriones salvajes o mutantes *fstl1a* en estadio de 12 somites. Se muestran los datos agrupados de un único experimento; el número total de cílias medidas/número de embriones se indica entre paréntesis. Se representan los valores individuales de longitud y la mediana ± IC 95%. (\*) p =  $3,8 \times 10^{-14}$ , test de Mann-Whitney.
- C. Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestran las cílias primarias (tubulina acetilada) en la cavidad nasal y la vesícula ótica y actina para delimitar la estructura de embriones salvajes y *fstl1a* KO de 48 hpf. Barra de escala: 20 μm.

Extraído y modificado de [158].

Posteriormente, analizamos el fenotipo externo y largo de las cílias en tejidos ciliados de embriones de la línea *fstl1a* (-/-) con el fin de comparar los resultados con los obtenidos previamente en los experimentos con morfolino. Los embriones mutantes no mostraron defectos observables, siendo indistinguibles de los embriones salvajes.

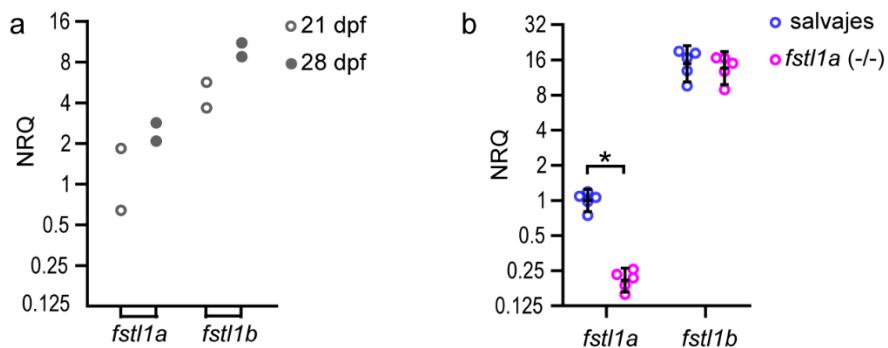
Como se puede observar en la **Figura 24B**, cuando analizamos el largo de las cílias en embriones de 12 somites en VK, sorprendentemente encontramos un aumento en la longitud de éstas en los embriones *fstl1a* KO ( $5,6 \pm 1,2$  μm) en comparación con los embriones salvajes ( $5,0 \pm 1,0$  μm). Cuando analizamos las cílias presentes en la vesícula ótica y la fosa nasal en embriones de 48 hpf, no observamos un fenotipo evidente, aunque no podemos descartar efectos sutiles en la longitud y número de las cílias (**Figura 24C**).

Los embriones de la línea *fstl1a* (-/-) por lo tanto no recapitularon el fenotipo observado con los morfolinos o en la generación F0 de la línea de CRISPR, lo que nos podría estar hablando de la existencia de mecanismos de compensación funcional (ver Discusión). Sin embargo, el experimento de screening preliminar realizado con *incross* de la generación F2, nos alentó a igualmente continuar estudiando la formación del tejido adiposo en la línea *fstl1a*. Considerando también que existen antecedentes en dónde las líneas mutantes que no tienen defectos en las cílias si logran recapitular otros fenotipos post embrionarios [218].

#### 4.2.3.2 Evaluación del rol de *fstl1a* en la formación de tejido adiposo

Dado que no existían estudios previos sobre la expresión de *fstl1a* o *fstl1b* en larvas de pez cebra, primero realizamos qPCR para ambos genes utilizando ARN aislado del tejido adiposo de larvas salvajes de 21 y 28 días post-fertilización (dpf). Como se puede observar en la **Figura 25**, pudimos observar que ambos genes se expresan en el tejido adiposo de pez cebra. A su vez, *fstl1b* mostró un nivel de expresión mayor que *fstl1a* en todas las condiciones ensayadas.

En nuestra línea mutante, el nivel de ARNm de *fstl1a* estaba reducido: las larvas *fstl1a* (-/-) de 21 dpf mostraron una reducción del 80 % en la expresión de *fstl1a* en comparación con las larvas salvajes. Nuevamente, el efecto fue específico, ya que el nivel de ARNm de *fstl1b* no se vio afectado (**Figura 25B**).



**Figura 25** Evaluación de la expresión de *fstl1a* y *fstl1b* en el tejido adiposo.

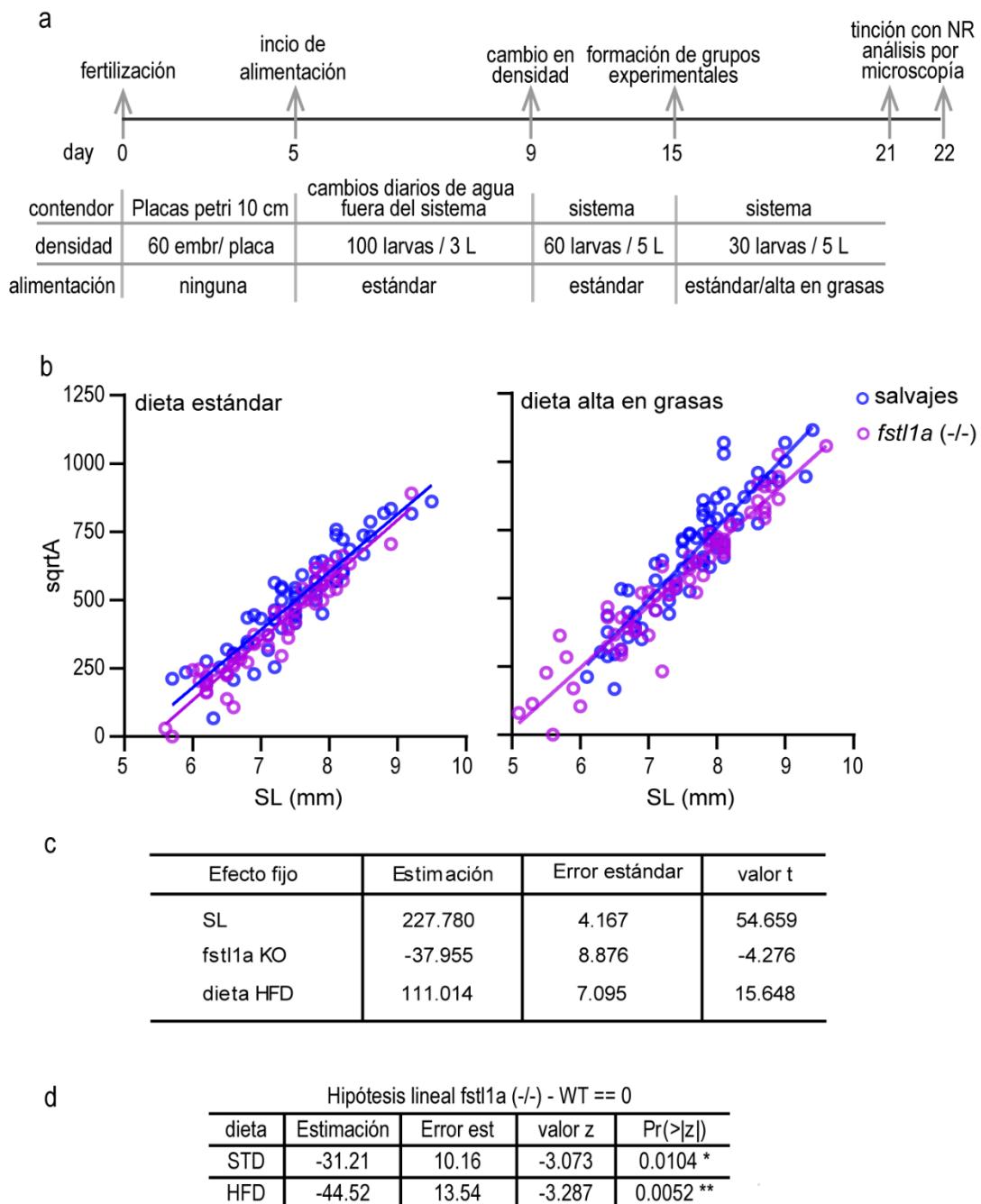
**A** Gráfico mostrando los resultados de qPCR para determinar los niveles de expresión de *fstl1a* y *fstl1b* en el depósito de grasa abdominal a los 21 y a los 28 dpf. Se utilizó la media de la expresión de *fstl1a* a 21 dpf como referencia. Se grafican muestras de dos larvas.

**B** Gráfico mostrando los resultados de qPCR del análisis de la expresión de los genes *fstl1a* y *fstl1b* en la región abdominal de larvas salvajes y KO para *fstl1a* a los 21 dpf. Se analizaron 5 larvas en cada condición. Se grafican los valores individuales de NRQ y la media ± IC95 %. (\*)  $p = 0,012$  Mann-Whitney test.

Extraído y modificado de [158].

Para analizar el efecto de la ausencia de *fstl1a* en la formación del tejido adiposo, crecimos larvas salvajes y mutantes *fstl1a* (-/-) con una dieta regular hasta los 15 dpf. Luego, decidimos analizar la respuesta del tejido adiposo en dos condiciones diferentes: larvas alimentadas con dieta estándar (STD, del inglés *Standard Fat Diet*) y larvas alimentadas con dieta alta en grasas (HFD, del inglés *High Fat Diet*), como se describe en Materiales y métodos [219] y en la **Figura 26A**. Para ello, sepáramos las larvas en dos grupos que crecieron bajo distintos esquemas de alimentación, donde la dieta HFD incluyó un suplemento adicional de yema de huevo de gallina administrado durante 1 h fuera del sistema (**Figura 26A**).

Mientras que la dieta estándar nos permitió evaluar la capacidad basal del tejido para expandirse, la dieta alta en grasas proporcionó información sobre la respuesta del tejido a una mayor disponibilidad energética. En la **Figura 26B** se muestran los resultados combinados obtenidos en tres experimentos independientes que comparan larvas salvajes y mutantes para *fstl1a* (KO) en ambos tipos de dieta.



**Figura 26 Evaluación del tejido adiposo de larvas KO para *fstl1a*.**

- A Representación esquemática del protocolo de alimentación utilizado para la evaluación del efecto de la mutación en *fstl1a* en dos condiciones de dieta: estándar y alta en grasas.
- B Gráfico que muestra la variación de la raíz cuadrada del área del tejido adiposo con el SL de larvas salvajes o KO para *fstl1a* sometidas a dietas estándar (STD) o alta en grasas (HFD). Las rectas representan el ajuste por mínimos cuadrados a los datos combinados de tres experimentos.
- C Tabla con la comparación estadística utilizando el ajuste con un modelo lineal mixto y contraste de Tukey utilizando como variable la raíz cuadrada del área (sqrtA) como variable, SL como covariable y el genotipo y la dieta como efectos fijos.
- D Tabla con la comparación post-hoc para la dieta a través del contraste de Tukey.  
Los análisis estadísticos fueron realizados por Hugo Naya del Laboratorio de Bioinformática del Institut Pasteur de Montevideo. Extraído y modificado de [158].

Como ya mencionamos, el área del tejido adiposo depende del estadio de desarrollo de las larvas (medido como la longitud estándar, SL) a través de una relación no lineal [216]. Por lo tanto, transformamos los datos de área mediante la función raíz cuadrada y utilizamos un modelo lineal mixto para comparar los datos transformados y analizar así las posibles diferencias entre las condiciones. Establecimos SL como una covariante, el genotipo y la dieta como efectos fijos, y el experimento como un factor aleatorio. Con este modelo, pudimos explicar el 89 % de la varianza en la raíz cuadrada del área, con residuos distribuidos normalmente, lo que indica un ajuste aceptable.

De este análisis surgió, como era de esperarse, que el estadio de desarrollo (SL) fue una variable principal que afectó positivamente el área del tejido adiposo. La dieta fue el segundo factor más importante, con la dieta HFD induciendo un aumento en la raíz cuadrada del área del tejido adiposo en comparación con la dieta estándar (**Figura 26C**).

De manera notable, el análisis indicó que el genotipo también fue un factor relevante: el genotipo *fstl1a* KO presentó una reducción de la raíz cuadrada del área del tejido adiposo en comparación con el genotipo salvaje en ambas dietas (**Figura 26C-D**). Es importante destacar que la diferencia en el área del tejido adiposo entre las larvas mutantes y las de control también fue significativa cuando analizamos cada dieta de forma individual. Por lo tanto, nuestros resultados mostraron que *fstl1a* cumple un rol importante en el desarrollo y/o expansión del tejido adiposo en pez cebra.

#### **4.2.3.3 Caracterización de los marcadores moleculares del tejido adiposo en larvas *fstl1a* (-/-)**

Para obtener una visión más profunda sobre los mecanismos subyacentes al efecto de *fstl1a* en la expansión del tejido adiposo, cuantificamos la expresión de genes marcadores de la diferenciación del tejido adiposo y la movilización de grasa mediante RT-qPCR en la región abdominal de larvas salvajes y mutantes bajo dieta alta en grasas y dieta estándar. Los genes analizados son marcadores de cinco estadios o procesos diferentes: pre-adipocitos, adipocitos en diferenciación, adipocitos maduros, activación de la vía Shh anti-adipogénica y movilización de lípidos.

Durante el desarrollo del tejido adiposo en mamíferos se han caracterizado diferentes marcadores moleculares y la mayoría de estos tienen al menos un ortólogo identificado en pez cebra con el cuál comparten una homología significativa a nivel de proteína, con humano y ratón [200]. En lo posible, seleccionamos marcadores para los que encontramos evidencia de expresión en pez cebra.

Como marcadores del estadío de pre-adipocito, trabajamos con a los genes *dlk1* (del inglés, *delta-like 1 homolog*) y *zfp423* (del inglés, *zinc finger protein 423*). Ambas proteínas se expresan en APCs y pre-adipocitos y su expresión se reduce drásticamente durante adipogénesis, y han mostrado en mamíferos un rol anti-adipogénico tanto *in vivo* como *in vitro* [220–223]. El estudio de ambos genes en pez cebra hasta el momento se ha centrado en roles adicionales, en el caso de *dlk1*, como inhibidor de la angiogénesis [224] y en el caso de *zfpb423* en su rol en sistema nervioso central [225]. Es importante señalar que mutaciones en el gen *zfpb423* en humanos producen ciliopatías como Síndrome de Joubert y nefronoptosis [225].

Como marcadores de diferenciación elegimos estudiar *pparg* (del inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*) (isoformas *pparg1* y *pparg2* producto de splicing alternativo) y el gen *cebpα* (del inglés *CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha*). Como se mencionó previamente en la introducción, en mamíferos ambos factores de transcripción son centrales y actúan sinéricamente durante la diferenciación de adipocitos y en el mantenimiento del fenotipo adiposo [226]. En pez cebra, la expresión de *pparg* tiene una localización en el tejido adiposo visceral de las larvas y su expresión se modifica en respuesta a cambios en la alimentación [198–200,227]. *cebpα* también se expresa en PVAT y AVAT, aunque su expresión no sería exclusiva de este tejido y que también se expresa en hígado [171,200].

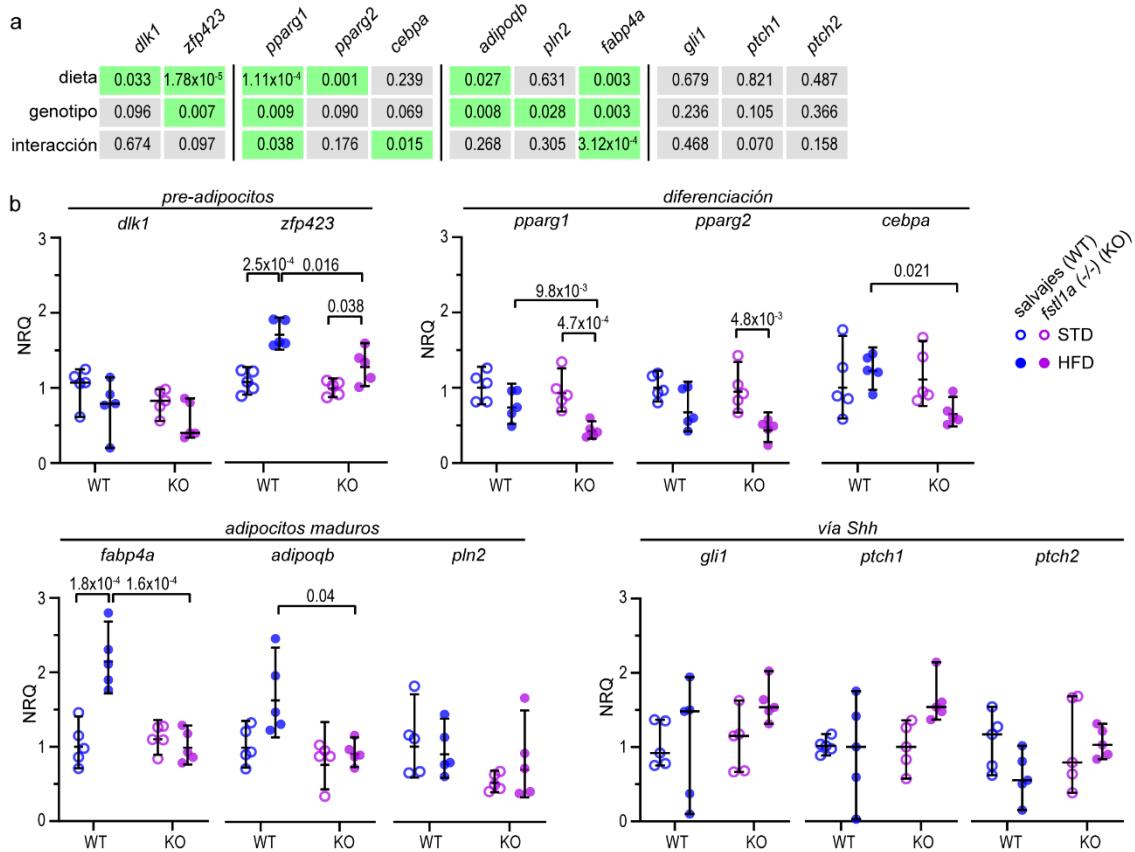
Como marcadores de adipocitos maduros, seleccionamos *fabp4*, *adipoqb* y *pln2*. FABP4 (*fatty acid-binding protein 4*), es una proteína citoplasmática de unión a los ácidos grasos, que participa en su transporte intracelular. En mamíferos su expresión es inducida durante la fase terminal de la diferenciación de adipocitos, por lo que se considera un marcador tardío de adipogénesis. Tiene dos ortólogos en pez cebra, solamente uno de ellos, *fabp4a* (antes denominado *fabp11a*) se expresa tanto en adipocitos maduros como

en etapas más tempranas de diferenciación [199,200,228]. Por otro lado, analizamos también uno de los dos ortólogos de pez cebra que codifica para adiponectina denominado *adipoqb* que se expresa en tejido adiposo y su expresión se modifica con la alimentación [200,229]. Además, *pln2* que codifica para perlipina 2, una proteína estructural de las gotas lipídicas de mamíferos y que se ha demostrado que en pez cebra comparte la misma función [230,231].

Por otro lado, también evaluamos la activación de la vía de Shh analizando transcripción de *gli1*, *ptch1* y *ptch2*. La señalización por Shh en células madre mesenquimales se la vincula con el desarrollo osteogénico y la inhibición de la adipogénesis [232,233]. La vía de Shh participa del desarrollo embrionario de pez cebra [234] pero su funcionalidad a nivel de tejido adiposo no ha sido evaluada aún.

A su vez, analizamos la expresión de marcadores de movilización de lípidos. Entre ellos, seleccionamos *srebf1*, que codifica para un factor de transcripción que regula la expresión de genes implicados en la lipogénesis [235]. También incluimos *cd36*, que codifica para un transportador de ácidos grasos facilitando su captación hacia el interior celular, y que en pez cebra se postula como candidato para la percepción gustativa [236]. Por otro lado, *lpla*, *pnpla2*, que codifican para lipasas involucradas en la hidrólisis de triacilglicéridos, mientras que *dgat2* codifica para una sintetasa de triacilglicéridos y por lo tanto desempeñando una función opuesta a la movilización lipídica[237,238]. De todos estos genes, la información en pez cebra es limitada, en un ensayo inducido por sobrealimentación de peces adultos, se analizó la expresión de los marcadores *srebf1*, *lpla*, *pnpl2*, pero únicamente *lpla* modificó su expresión [239].

Para evaluar la expresión relativa de estos marcadores, una vez finalizado el ensayo con dieta STD y HFD mencionado en la sección anterior, disecamos la región abdominal de larvas de 21 dpf con longitudes estándar entre 7,7 y 8,7 mm. Luego de extraer el ARN total, sintetizamos ADNc con oligo dT y realizamos una qPCR utilizando cebadores específicos para los diferentes marcadores.



**Figura 27 Análisis de marcadores de diferenciación de adipocitos en la región abdominal de larvas *fstl1a* (-/-) y salvajes en dieta STD y HFD.**

**A.** Tabla con los valores de *p* resultado del análisis de ANOVA. Para la expresión cada gen analizado, se muestra el valor de *p* para cada factor fijo (dieta y genotipo) y de la interacción entre ambos.

**B.** Gráfico de puntos con los valores individuales de NRQ (Normalized Relative Quantity) y la media ± IC95 % del ARNm para diferentes genes marcadores de preadipocitos (*dlk1*, *zfp423*), diferenciación (*pparg1*, *pparg2*, *ceba*) y adipocitos maduros (*fabp4a*, *adipoqb*, *pln2*), así como genes indicativos de activación de la vía Shh (*gli1*, *ptch1*, *ptch2*) en la región abdominal de larvas salvajes (WT; azul) o mutantes *fstl1a* KO (magenta) bajo dieta estándar (○; círculo vacío) o dieta alta en grasa (●; círculo lleno). Se analizaron cinco larvas por condición a partir de un experimento de dieta. Las diferencias significativas por pares se indican con sus valores de *p* (test post-hoc de Tukey).

Extraído y modificado de [158].

Los resultados se muestran en la **Figura 27**. Por un lado, realizamos un análisis ANOVA de dos vías para evaluar el efecto de cada factor y la posible interacción entre ellos (**Figura 27A**). Varios de los marcadores mostraron variaciones de expresión con el genotipo (*zfp423*, *pparg1*, *adipoqb*, *pln2* y *fabp4a*) y/o con la dieta (*dlk1*, *zfp423*, *pparg1*, *pparg2*,

*adipoqb*, *fabp4a*), y en algunos casos detectamos interacción entre ambos factores (*pparg1*, *cebpα* y *fabp4a*).

A continuación, realizamos una comparación *post-hoc* entre cada par de condiciones para evaluar entre qué condiciones se daban los cambios (**Figura 27B**).

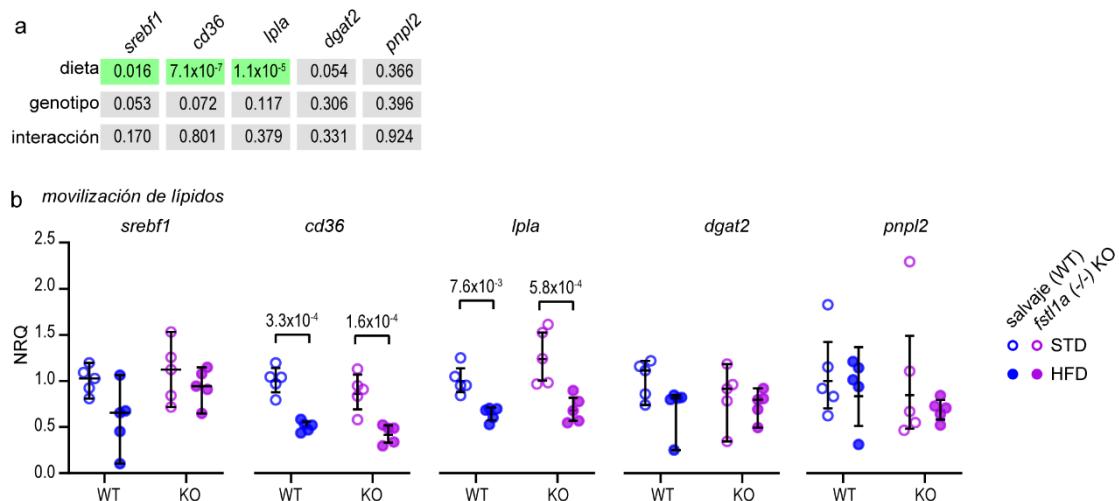
La expresión de *zfp423*, presentó diferencias significativas tanto en respuesta a la dieta como al genotipo. El incremento observado en la expresión de *zfp423* en larvas salvajes con la dieta HFD, se vio disminuido en larvas *fstl1a* (-/-). Contrariamente, el marcador *dlk1*, mostró diferencias únicamente en relación con el tipo de dieta, independientemente del genotipo, mostrando una tendencia a disminuir su expresión en tejido adiposo de animales bajo dieta HFD.

En el caso de *pparg1*, *pparg2* y *cebpα*, su expresión en larvas salvajes se mantuvo incambiada entre dieta STD y HFD, Interesantemente, en las larvas *fstl1a* (-/-) observamos una disminución de la expresión de estos marcadores en respuesta a la dieta HFD.

Para los marcadores de adipocitos maduros *fabp4b*, *adipoqb*, su expresión en peces salvajes aumentó en dieta HFD en relación con la dieta STD. Llamativamente, en larvas *fstl1a* (-/-), el nivel de expresión en dieta STD y HFD fue similar.

Con respecto a *gli1*, *ptch1* y *ptch2*, genes inducidos por la vía de señalización Shh (anti-adipogénica) no observamos una diferencia significativa en el test de ANOVA de 2 vías (**Figura 27A**).

Realizamos el mismo análisis para algunos genes asociados con la movilización de grasa, incluyendo *srebf1*, *cd36*, *lpla*, *dgat2* y *pnpla2* (**Figura 28**). Encontramos un efecto de la dieta sobre los genes asociados con la acumulación de grasa (*srebf1*, *cd36* y *lpla*), pero no se detectaron diferencias significativas asociadas con el genotipo en el análisis de ANOVA de dos vías ni en la comparación *post-hoc* de a pares de grupos (**Figura 28**).



**Figura 28.** Análisis de marcadores asociados a la movilización de lípidos en la región abdominal de larvas *fsl1a* (-/-) y salvajes en dieta STD y HFD. Extraído y modificado de [158].

En conjunto, nuestros datos muestran que en las larvas *fsl1a* (-/-) crecidas en dieta HFD el perfil de expresión de marcadores se altera, sugiriendo una disminución de marcadores de pre-adipocitos, de adipocitos en diferenciación y de adipocitos maduros. Estos resultados sugieren que *fsl1a* sería una señal adipogénica que podría favorecer la producción de pre-adipocitos y su diferenciación.

## 5 Discusión

---

### 5.1 Posibles mecanismos de transducción de señales que median la función de FSTL1 en ciliogénesis

#### 5.1.1 DIP2A como mediador de la acción de FSTL1 en la ciliogénesis

Al inicio de esta tesis existían antecedentes que reportaban a DIP2A como receptor de FSTL1, participando en distintos procesos biológicos, a través de la activación de la señalización mediada por AKT en células endoteliales, cardiomiositos y neuronas [148,177,240]. A su vez, la interacción entre FSTL1 y DIP2A, había sido previamente demostrada mediante ensayos *in vitro* de resonancia plasmónica superficial (Biacore), inmunoprecipitación y doble híbrido [148,177,240]. Ensayos de inmunofluorescencia en células endoteliales y neuronas mostraron además la localización de DIP2A en la membrana plasmática [148,177].

En este contexto, una de las hipótesis que nos planteamos fue que DIP2A actúe como el receptor de FSTL1 en el contexto de su actividad pro-ciliogénica. Dado que previamente en el laboratorio habíamos demostrado que el silenciamiento de FSTL1 produce cilios más cortos, nos propusimos analizar si el silenciamiento de la expresión de DIP2A (KD DIP2A) tenía un impacto en este mismo fenotipo en células hTERT-RPE1, nuestro modelo celular para ensayos de ciliogénesis [85]. En paralelo, buscamos determinar si DIP2A se localiza en la membrana de la cilia primaria, utilizando células hTERT-RPE1. Cabe resaltar, que la localización de DIP2A en la cilia no constituye un requisito indispensable para que pudiera actuar como receptor mediando la actividad pro-ciliogénica de FSTL1.

En las condiciones ensayadas, logramos reducir la expresión de DIP2A y vimos que esto no alteraba el largo de las cilios, el cuál si se ve afectado por el KD de FSTL1 como se demostró previamente. Si bien no descartamos que el nivel de reducción de la expresión de DIP2A no fue suficiente como para observar cambios significativos en el fenotipo que analizamos de acortamiento de cilios, o que verdaderamente, DIP2A no participa en nuestro modelo como un mediador/receptor de FSTL1 en su función ciliar. Cabe destacar

que el siARN empleado para DIP2A tuvo como blanco todas las isoformas descritas del gen. Para posible manera de concluir de forma definitiva sobre esta pregunta sería mediante la generación de una línea KO para DIP2A.

Paralelamente nos planteamos explorar la posibilidad de que DIP2A se localice en la cilia primaria. Cuando buscamos los anticuerpos empleados en los trabajos previos en ensayos de inmunofluorescencia, vimos que los mismos fueron discontinuados. Es por eso por lo que resolvimos analizar dos anticuerpos disponibles que no habían sido probados para este fin. Lamentablemente, a pesar de los múltiples intentos, donde modificamos tanto las condiciones de permeabilización como de fijación, no logramos tener una señal clara en ensayos de inmunofluorescencia.

Interesantemente, trabajos más recientes han mostrado resultados dónde DIP2A se localizaría en citoplasma y tendría la posibilidad de translocar al núcleo en un modelo de glioblastoma [110]. Estos resultados generan controversias con respecto a la localización de DIP2A, o muestran que la misma sería más compleja de lo previamente reportado. Sería muy importante avanzar en confirmar de forma definitiva su localización celular y en el desarrollo de un modelo que explique cómo se produciría su interacción con FSTL1, dado que esta última es una proteína secretada.

### **5.1.2 ERK1/2 como intermediario en la señalización por FSTL1**

Otro objetivo de este trabajo fue aportar información sobre vías intracelulares reguladas por FSTL1 que potencialmente fueran relevantes para la ciliogénesis.

Como se mencionó anteriormente en los antecedentes de este trabajo, previo a esta tesis en nuestro laboratorio se observó que el silenciamiento de FSTL1 produce cílias más cortas en células hTERT-RPE1 [85]. En este trabajo empleando el mismo modelo, observamos que, FSTL1 tendría un papel represor en la señalización mediada por ERK1/2 en células hTERT-RPE1 ya que el silenciamiento de FSTL1 produce una activación de la vía. Interesantemente, este resultado fue confirmado y continuado en el trabajo de nuestro grupo [182], observando además que la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 mediante la adición de U0126 rescata el fenotipo de acortamiento de cílias que se observa cuando se silencia la expresión de FSTL1 en células hTERT-RPE1, así como también en células NIH3T3L1 [182]. **Estos resultados muestran que FSTL1 modularía el largo de las cílias actuando como un regulador negativo de la señalización de ERK1/2.**

Interesantemente, la señalización de ERK1/2 ha sido relacionada previamente en la modulación y el largo de las cílias. De forma resumida, el nivel de activación de la vía ERK1/2, depende del balance entre la fosforilación mediada por la quinasa MEK1/2 y la desfosforilación mediada por la fosfatasa DUSP6 [241]. En este sentido, se ha visto que la inhibición de MEK1/2 con el compuesto U0126, reduce la fosforilación de ERK1/2, promueve la formación de cílias más largas y mayor número de células ciliadas [242,243]. Por otra parte, tanto en *Chlamydomonas reinhardtii* como en célula hTERT-RPE1, la activación de la vía ERK1/2 a través de la utilización del inhibidor de la fosfatasa DUSP6, llamado BCI, produce el efecto opuesto: un acortamiento de las cílias y una inhibición de la ciliogénesis [244]. Aunque estos hallazgos evidencian la relevancia de la vía ERK1/2 en la ciliogénesis, queda por determinar aún los detalles de su mecanismo.

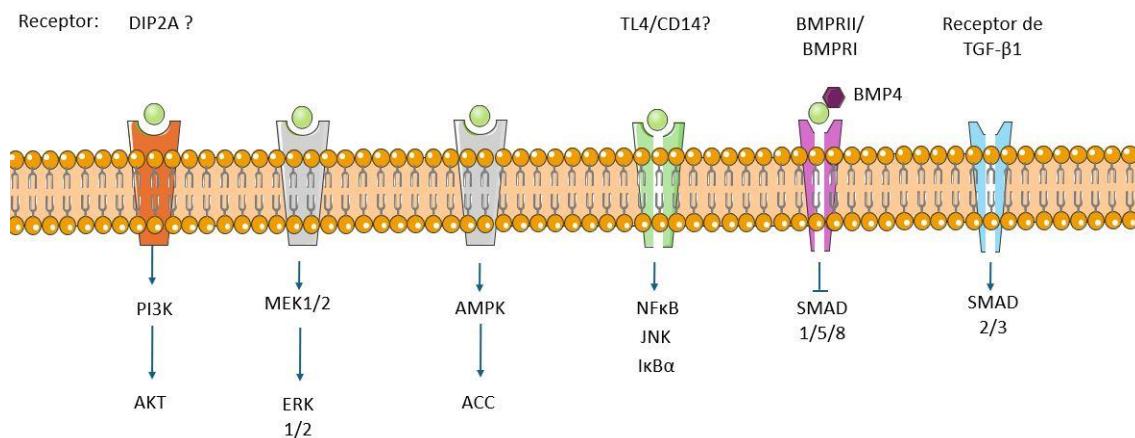
La señalización intracelular de FSTL1 mediada por ERK1/2 ha sido reportada en diversos contextos biológicos. Por ejemplo, en células del núcleo pulposo, se ha visto que, frente a una hernia de disco, FSTL1 modularía la activación de ERK1/2 junto con vías inflamatorias [245]. Asimismo, esta señalización está implicada en la remodelación vascular tras una lesión [246] y en la protección de cardiomiositos frente al daño [102]. En

estos casos, sin embargo, FSTL1 actúa como activador de la señalización de ERK1/2, aumentando el nivel de fosforilación de ERK1/2. En nuestro caso observamos el efecto contrario, FSTL1 tendría un efecto represor en la vía de ERK1/2. Una situación análoga ha sido reportada en astrocitos, como modelo de neuroinflamación [247]. Finalmente, este efecto inhibitorio de FSTL1 en la señalización de ERK1/2 también se ha reportado durante la adipogénesis en cultivos primarios de fracción estromal vascular de ratones FSTL1 KO específicos de adipocitos [248].

Como mencionamos, durante la adipogénesis las cílias y la expresión de genes como los BBS y FSTL1 presentan una dinámica muy particular. Resumidamente, las cílias están presentes en células progenitoras y pre-adipocitos y son reabsorbidas durante el proceso de diferenciación. Un patrón similar se observa en la expresión de FSTL1: los niveles de ARNm de FSTL1 son altos en preadipocitos y se reducen durante la diferenciación. Desde hace varios años se conoce que la señalización de ERK1/2 es requerida durante la diferenciación de adipocitos y que inhibidores de ERK1/2 tienen un efecto inhibitorio en la adipogénesis, evitar la reabsorción de las cílias [249,250]. A su vez, ERK1/2 puede fosforilar a PPAR $\gamma$ , un receptor nuclear que activa la expresión de genes necesarios para la adipogénesis [249,251]. La forma fosforilada de PPAR $\gamma$  reduce su actividad transcripcional y por lo tanto inhibe su papel pro-adipogénico [252]. Durante el desarrollo de esta tesis, el grupo de Fang y colaboradores, publicaron resultados que indican que FSTL1 reprime la vía ERK1/2 durante la adipogénesis, manteniendo el nivel de fosforilación de PPAR $\gamma$  reducido, y por lo tanto, favoreciendo la adipogénesis [248]. Confirmando estos datos, nuestro grupo también observó que durante la diferenciación de adipocitos existen cambios en los niveles de fosforilación de ERK1/2 y que los mismos son modulados por FSTL1 [182].

Queda aún por determinar cuál o cuáles son el/los receptores/es involucrados en la señalización intracelular de FSTL1 y que median la activación de ERK1/2 en este tejido. Por un lado, se ha propuesto que el rol inhibitorio de FSTL1 sobre ERK1/2 sería mediado a través de la inhibición de la vía no canónica de BMP [182]. También en tejido adiposo, se postula a integrina  $\beta$ 1 como receptor [248].

En el esquema de la **Figura 29** se representan los receptores y mediadores intracelulares que han sido más frecuentemente vinculados en la señalización mediada por FSTL1 en diferentes contextos biológicos. A través de este esquema intentamos destacar la potencial complejidad de dicha señalización. La evidencia actual sugiere que el mecanismo molecular de acción de FSTL1 sería tejido-específico, y que esto se podría vincular con la naturaleza o disponibilidad del receptor involucrado en cada tejido [88].



**Figura 29. Representación esquemática de las principales vías de señalización intracelular moduladas por FSTL1.** En el esquema se señalan con color los principales receptores y las vías/moléculas señalizadoras que han sido identificados en diferentes contextos, con los que FSTL1 tendría la capacidad de interaccionar o modular su actividad. FSTL1 se representa con color verde. Los receptores pintados en gris permanecen aún sin identificar. Figura creada utilizando la herramienta disponible en: <http://smart.servier.com>

Otro aspecto interesante a explorar son los mecanismos moleculares que regulan la expresión de FSTL1, ya que es llamativo como su nivel de expresión se altera en diversas patologías [88]. Existen evidencias que sugieren que la desregulación de FSTL1 podría deberse a una combinación de mecanismos epigenéticos, transcripcionales y post-traduccionales [88]. Por un lado, trabajos previos de nuestro grupo, mostraron como la cilia y BBS4 regulan la expresión de FSTL1 a nivel transcripcional y post-traduccional. Mientras que la disfunción ciliar provoca una reducción en los niveles de ARNm de FSTL1, el silenciamiento de BBS4 afecta tanto los niveles de ARNm como la secreción de la proteína. En relación a esto último, la inhibición de la expresión de BBS4 resulta en la acumulación de FSTL1 en los lisosomas, donde es degradada [85]. Por otra parte, la hipermetilación del promotor de FSTL1 regula su expresión en tejidos específicos, particularmente en el tejido

adiposo de madres con diabetes gestacional, en donde se ha visto que esta hipermethylación se asocia con un aumento en la expresión génica [253]. Además, en ADN de saliva de niños preescolares, el perfil de metilación en regiones CpG de FSTL1 se correlaciona con el IMC materno, sugiriendo una posible marca epigenética vinculada a la predisposición a obesidad pediátrica [254]. En cuanto a la regulación post-transcripcional, el transcripto primario de FSTL1 incluye la secuencia para el miRNA-198, cuyo procesamiento determina si se genera ARNm de FSTL1 o miRNA-198, cuya expresión está alterada en diversas enfermedades [255]. Además, la región 3'UTR de FSTL1 contiene sitios de unión para otros miRNAs relevantes (miR-206, miR-32-5p, miR-27a, miR-125a-3p), implicados en su regulación en distintos contextos fisiopatológicos [88]. Particularmente, se ha visto que miR-125a-3p regula la expresión de FSTL1 durante la diferenciación adipogénica en ratones. Estudios adicionales que permitan integrar estos niveles de regulación, podrían aportar claridad para entender su posible desbalance en enfermedad.

## **5.2 El rol de *FSTL1* durante el desarrollo de pez cebra y en el desarrollo del tejido adiposo**

### **5.2.1 *fstl1* y la regulación de la ciliogénesis *in vivo***

El patrón de expresión espacial y temporal de los ortólogos de *FSTL1* en pez cebra, *fstl1a* y *fstl1b*, había sido previamente estudiado mediante hibridación *in situ* (ISH) [203]. En esta tesis analizamos el perfil de expresión de ARNm de ambos genes desde la fecundación hasta los 5 dpf, utilizando datos de transcriptómica previamente publicados [208]. De manera concordante con lo reportado mediante ISH, *fstl1b* comienza a expresarse en estadios más tempranos que *fstl1a* [203]. Se detectaron niveles de transcripto de *fstl1b* ya en el cigoto, lo que sugiere que serían mensajeros de origen materno y, por lo tanto, que podrían tener un rol importante en las etapas iniciales del desarrollo [256]. Este resultado no había sido reportado mediante ISH, posiblemente debido a la menor sensibilidad de esta técnica en comparación con los análisis de transcriptómica a alta profundidad de secuenciación. En el caso de *fstl1a*, el perfil de expresión observado mediante transcriptómica coincide con los datos previos de ISH, que muestran que se comienza a expresar en la somitogénesis temprana [203]. Mediante qPCR, corroboramos que ambos genes se expresan en embriones de 48 hpf y, además, confirmamos su expresión en el tejido adiposo de larvas de 21 dpf, durante el desarrollo post-embionario, para lo cual no existían datos previos.

A pesar de las diferencias en los niveles de expresión y en el momento de comienzo de detección de los transcriptos, el coeficiente de correlación de Pearson entre ambos perfiles sugiere que *fstl1a* y *fstl1b* mantienen cierto grado de conservación en sus patrones de expresión temporal, similar a lo observado en otros pares de genes parálogos [208]. Los datos de ISH mostraron que además su patrón de expresión espacial también se superpone, ya que tanto *fstl1a* y *fstl1b* se localizan en regiones coincidentes que incluyen el mesodermo axial y paraxial durante la gastrulación tardía y las etapas de segmentación, y posteriormente en arcos branquiales, aletas pectorales y pliegue de la aleta media [202,203]. En conjunto, estos antecedentes sugieren que este par de parálogos podría conservar, al menos en parte, funciones biológicas comunes.

Durante el desarrollo temprano *fstl1a* y *fstl1b* participan en el establecimiento del eje dorso-ventral, actuando de forma redundante y junto a cordina, noggin y follistatin para antagonizar el factor ventralizante BMP [257]. Los estudios previos con morfolinos para *fstl1a* y *fstl1b* reportan que el KD de estos genes por sí solos no generan fenotipo, pero sí potencian el efecto del KD de otros inhibidores de BMP [202,203]. En nuestro caso, cuando silenciamos la expresión de *fstl1a* y *fstl1b* mediante el empleo de morfolinos y examinamos el fenotipo externo de los embriones de 24 y 48 hpf, detectamos defectos en la especificación del eje dorso-ventral (defectos en la formación del primordio de la cola y curvatura dorsal). El fenotipo fue más frecuente en embriones morfantes para *fstl1b* que para *fstl1a*, en concordancia con una función preponderante de *fstl1b* en la formación del eje dorso-ventral [202,203]. Dado que los inhibidores de BMP actúan como morfógenos ventralizantes, la reducción de su expresión debería dar lugar a embriones ventralizados. Sin embargo, el fenotipo que observamos recuerda a embriones dorsalizados [258]. Este hallazgo se suma a los resultados contradictorios descritos para los KD o sobre-expresión discutidos por Sylva y colaboradores (2013) [87]. En este trabajo se menciona que el fenotipo observado en ratones Fstl1 KO no siempre se asemeja al de otros ratones KO para inhibidores de BMP, sino que a veces, por el contrario, se parece a fenotipos asociados a una disminución de la señalización de BMP, como en el caso de las uniones asimétricas entre las costillas y el esternón [259], lo que añade complejidad a la interpretación de la función de FSTL1. Aún más desconcertante es el hecho de que no se hayan descrito defectos en el desarrollo en pez cebra [203], ranas [260] ni ratones [259] tras la sobre-expresión de FSTL1. Si FSTL1 actuara como un inhibidor “simple”, la ausencia de un fenotipo resultaría poco probable [87].

Más allá del potencial rol de *fstl1a* y *fstl1b* en la determinación del eje dorso-ventral, un aspecto sumamente importante de nuestros resultados fue observar que la mayoría de los embriones morfantes, tenían un fenotipo similar a aquellos embriones con alteraciones en genes relacionados con las cilias [164,165,192,193,195,196]. Más aún, cuando analizamos las cilias presentes en las células que recubren la cavidad de la vesícula de Kupffer, pudimos ver que embriones morfantes para *fstl1a* tienen cilias más cortas que los embriones control. Embriones morfantes para *fstl1a* también mostraron

defectos en las cílias de la vesícula ótica y la fosa nasal. Una observación interesante e inesperada sin embargo fue que las cílias presentes en embriones *fstl1b* eran más largas.

Si bien los morfolinos poseen múltiples características que los posicionan como una herramienta esencial para el silenciamiento de genes en pez cebra, se ha documentado su toxicidad y la aparición de efectos *off target*, lo que ha abierto debate acerca de la validez de los fenotipos inducidos. En este sentido, vale la pena destacar, que el fenotipo observado en los morfantes tanto de *fstl1a* y *fstl1b* generados en este trabajo, no coincide el fenotipo de muerte celular observado tras una activación inespecífica de la vía apoptótica de p53 [261]. Dicho esto, una estrategia para confirmar que los fenotipos observados en los morfantes se deben a efectos específicos, sería con-inyectando los morfolinos junto con el ARNm de *fstl1a*, en donde a cierta dosis, esperamos tener una reversión del fenotipo observado.

Por lo tanto, los resultados presentados aquí, serían los **primeros antecedentes que relacionan a FSTL1 con un fenotipo ciliar en un modelo *in vivo***, y que apoyan lo demostrado a nivel de líneas celulares previamente por nuestro laboratorio.

Como mencionamos, nuestros resultados mostraron una participación más relevante para *fstl1a* en la regulación de las cílias y es por esto, que decidimos continuar con el estudio de este gen en el desarrollo de una línea de peces KO. Esto nos permitió estudiar procesos más tardíos tales como la adipogénesis.

### **5.2.2 Generación de una línea de peces KO para *fstl1a* mediante el sistema de edición genómica CRISPR-Cas9.**

Durante la puesta a punto de este trabajo, la edición génica del gen *fstl1a* con CRISPR/Cas9 mostró una alta eficiencia en la introducción de mutaciones. Al evaluar el fenotipo de los embriones inyectados de la F0, observamos fenotipos caracterizados por el acortamiento del eje corporal, malformaciones en la formación del primordio de la cola y defectos en la formación del eje dorso ventral, similares a los observados previamente en los embriones morfantes tanto para *fstl1a* y *fstl1b*. Sin embargo, una vez establecida la línea de CRISPR para *fstl1a* no observamos embriones (-/-) con un fenotipo externo evidente. Asimismo, al analizar lo que ocurría en los tejidos ciliados, no observamos el fenotipo de acortamiento de las cílias registrado previamente en embriones morfantes, sino que incluso, el largo de las cílias en los mutantes se vio levemente aumentado respecto a los embriones salvajes.

Situaciones similares, en donde los animales inyectados con morfolinos dirigidos a un gen específico, o mutantes CRISPR F0, presentan defectos severos, que no son recapitulados en las líneas mutantes establecidas, han sido previamente descritas con otras líneas mutantes en pez cebra [262–264].

En algunos de estos casos, los efectos *off target* de los morfolinos (los cuales fueron mencionados en la sección anterior) podrían ser responsables de las diferencias observadas entre un método y otro. No obstante, en otros ejemplos, el mecanismo que explicaría las diferencias observadas es la compensación genética (revisados en [263,265]). Estos mecanismos de compensación se basan en la plasticidad genómica y la adaptación transcripcional [263].

Uno de los primeros trabajos en donde se evidencia que estaría actuando un mecanismo de compensación, fue el de Rossi y colaboradores, donde se investigaron las diferencias entre los fenotipos observados en los mutantes y los morfantes para *egfl7* (del inglés, EGF-like domain multiple 7) [262]. *Egfl7* es un factor secretado derivado de células endoteliales, asociado con la proliferación y la migración celular durante el desarrollo vascular. En pez cebra, los morfantes mostraron defectos importantes en la angiogénesis y tubulogénesis vascular [266]. A pesar de esto, los mutantes para *egfl7*, no mostraron

ningún fenotipo evidente, incluso cuando se co-inyectaron con los morfolinos para dicho gen, sugiriendo que los efectos *off target* de los morfolinos no serían responsables de la diferencia entre los fenotipos observados y que las señales que desencadenan esta vía compensatoria se encuentran corriente arriba de la síntesis proteica. En estos mutantes, muchos otros genes de la familia *Emilin*, especialmente *emilin3a*, quien comparte un dominio funcional con *egfl7*, se encontraban sobre-expresados [262]. A partir de este trabajo y otros, a través del análisis de transcriptoma y proteoma de animales mutantes sin fenotipo en relación con los morfantes, se ha visto que existe un número de genes y proteínas que están sobre-expresadas en los mutantes, que funcionan como una red compensatoria para amortiguar los efectos de mutaciones deletéreas [262].

Teniendo en cuenta estos mecanismos de compensación, evaluamos embriones mutantes y morfantes para identificar genes/vías funcionalmente relevantes y vinculados a *fstl1a*. El objetivo fue realizar un análisis de transcriptómica con ARNm en embriones salvajes, mutantes homocigotos y morfantes a las 48 hpf utilizando la tecnología de secuenciación de *Oxford Nanopore*. Si bien la obtención de ARNm de los embriones, la síntesis de ADNc y la generación de las librerías, funcionó correctamente, la profundidad en la secuenciación no fue suficiente como para permitir obtener diferencias significativas de expresión génica (datos no mostrados). Si bien la aproximación no funcionó en el marco de esta tesis, consideramos que sería interesante a futuro evaluar las diferencias en expresión génica entre morfantes y mutantes, no sólo para identificar vías relevantes a *fstl1*, sino también para aportar al conocimiento general sobre los mecanismos de compensación.

### **5.2.3 Rol de *fstl1a* en la formación de tejido adiposo**

Distintos trabajos han mostrado que, los esquemas de alimentación con dietas altas en grasas permiten caracterizar el desarrollo del tejido adiposo en pez cebra, así como también evaluar intervenciones anti-adipogénicas, en un modelo relevante para la salud humana.

Resumidamente, el uso de distintos protocolos de alimentación en pez cebra comienza en el año 2010, cuando Oka y colaboradores establecieron el primer protocolo de sobre-alimentación de peces adultos utilizando larvas recién eclosionadas de Artemia, un alimento accesible en todos los acuarios. En ese trabajo, se observó un aumento sostenido del IMC, acompañado de hipertrigliceridemia y esteatosis hepática, tanto en machos como en hembras [198]. A nivel del análisis de la expresión génica, se detectó la activación de vías fisiopatológicas relacionadas con la coagulación y el metabolismo de lípidos, al igual que en humanos y ratones [198].

A partir de ese momento, se han desarrollado otros esquemas de alimentación de peces adultos y larvas que emplean comida paletizada, grasa de origen animal, o aceite de maíz, así como también dietas altas en colesterol [267–270]. A pesar de las diferencias metodológicas, en todos los casos, se observa que el tejido adiposo de pez cebra responde a la disponibilidad de nutrientes. Cuando los peces se sobre-alimentaron con una dieta con alto contenido de grasas, se vio un aumento en la acumulación de grasa en los depósitos viscerales, aumento del hígado graso y niveles elevados de glucosa en ayuno, comparado con un protocolo de sobre-alimentación con una dieta de contenido de grasas normal [239]. Nuevamente, estos resultados fueron consistentes con lo observado en mamíferos, en los que la dieta alta en grasas se asocia a una forma de obesidad metabólicamente menos saludable [271]. Por el contrario, tras una restricción calórica, el volumen de grasa corporal disminuye, en concordancia con lo observado en mamíferos [198]. Interesantemente, el aumento de la grasa corporal puede ser modulado mediante el agregado de algunos compuestos como el té verde o fármacos anti-obesogénicos, lo que amplía su potencialidad de experimentación [267,268]. Basándonos en los datos previamente publicados, en este trabajo, logramos optimizar un protocolo de alimentación en larvas de pez cebra. Utilizando este esquema, pudimos observar diferencias en el

desarrollo de los depósitos de larvas salvajes en dietas normales y dieta alta en grasas y también pudimos evaluar el rol de *fstl1a* en este contexto.

La obesidad es una condición multifactorial, producto de la interacción entre genética y ambiente. En pez cebra, la manipulación genética de vías relacionadas con la regulación energética ha producido modelos de obesidad comparables a los mamíferos. Entre ellos, mutantes para los genes *lepr*, *gh1*, *cyp2r1* y *plxnd1* han sido caracterizados y muestran alteraciones en los depósitos de tejido adiposo [171,272,273]. Estas líneas mutantes refuerzan la conservación de los mecanismos genéticos que regulan la adipogénesis, y posicionan al pez cebra como modelo útil para estudiar vías metabólicas con relevancia biomédica.

En cuanto al análisis de larvas *fstl1a* (-/-) realizado en esta tesis, observamos que las larvas mutantes presentan una reducción significativa del área del tejido adiposo en comparación con controles, tanto en dieta estándar como en dieta alta en grasas. Cabe destacar que, si bien no se detectó una interacción estadísticamente significativa entre el genotipo y la dieta, en todos nuestros experimentos observamos una tendencia a tener un fenotipo más severo en dieta alta en grasas, una situación similar a lo que había sido reportado para la línea mutante *plxind1* [171].

Estos resultados se condicen a los obtenidos en ratones que carecen de expresión de FSTL1 en adipocitos maduros, en el que se observó una reducción en el aumento de peso sólo bajo dieta alta en grasas [248]. Existen varias posibilidades que podrían explicar esta diferencia. Por un lado, el alcance de la eliminación de FSTL1 entre los modelos es diferente: nuestro trabajo se basa en la generación de un *knockout* completo, mientras que el modelo murino se basa de un *knockout* específico de adipocitos maduros. Como explicamos anteriormente, FSTL1 es secretada por una variedad de órganos y tejidos y, por lo tanto, el modelo murino puede no estar ilustrando completamente el rol de FSTL1 en el desarrollo de la obesidad. Además, en nuestro modelo pudimos evaluar una gran cantidad de individuos y en etapas tempranas del desarrollo, lo que posiblemente brinde una mayor sensibilidad para detectar fenotipos más leves.

El desarrollo de esta línea de pez cebra *fstl1a* (-/-) proporciona un modelo útil para abordar una comprensión mecanicista del rol de FSTL1 en el desarrollo del tejido adiposo. La patogénesis de la obesidad implica procesos complejos como la hipertrofia (aumento del tamaño de adipocitos) y la hiperplasia (formación de nuevos adipocitos). El análisis de marcadores de tejido adiposo de peces salvajes y peces mutantes *fstl1a* (-/-) sugiere que, al igual que en células en cultivo, *fstl1a* es una señal pro-adipogénica que favorece la producción de pre-adipocitos y su diferenciación. La distinción entre la acumulación de tejido adiposo por hipertrofia o hiperplasia es relevante, ya que una hipertrofia excesiva se ha asociado con mayor riesgo de trastornos metabólicos en humanos. Será interesante a futuro utilizar el modelo de pez cebra aquí generado para analizar si la ausencia de *fstl1a* impacta significativamente en el balance entre ambos procesos.

Por otro lado, sería interesante estudiar las vías de señalización mediadas por *fstl1a* en pez cebra durante el desarrollo del tejido adiposo, como la activación de vía de ERK1/2, por ejemplo, analizando la fosforilación de ERK1/2. Además, sería interesante incubar larvas con el inhibidor de ERK1/2 U0126, y evaluar su impacto frente al desarrollo del tejido adiposo en nuestro modelo experimental. De hecho, ya se ha utilizado este compuesto para el estudio de la relevancia de la señalización de ERK1/2 en otros procesos patológicos tanto en embriones como en larvas de pez cebra [274,275].

En conjunto, nuestros resultados muestran que FSTL1 cumple un papel durante el desarrollo del tejido adiposo, probablemente favoreciendo la generación de nuevos adipocitos, y además que su presencia y/o su función podrían volverse más críticas durante la respuesta del tejido a un aumento en la disponibilidad de energía. Se requerirán estudios adicionales para profundizar en dicha función.

### **5.2.3.1 Evaluación de efecto compensatorio en KO para *fstl1a* por *fstl1b***

Como se mencionó anteriormente, los morfantes de *fstl1a* mostraron cillas primarias acortadas en las primeras etapas embrionarias y defectos externos evidentes, fenotipos que no se replicaron completamente en los mutantes de *fstl1a* (-/-). De igual forma, pudimos observar que los primeros análisis de dietas con individuos productos del *incross* de F2, el efecto de *fstl1a* parecía ser más severo que el recapitulado luego en generaciones posteriores. Esto sugiere que, en la línea *fstl1a* (-/-) podrían estar actuando mecanismos compensatorios.

Dada la alta homología y el patrón de expresión similar entre los dos parálogos *fstl1a* y *fstl1b* (**Figura 15** y **Figura 16**), existía la posibilidad de que *fstl1b* estuviese compensando la depleción de *fstl1a*. Esta hipótesis fue abordada en trabajo posterior de nuestro grupo y los resultados fueron incluidos en el manuscrito asociado a esta tesis.

Para evaluar el efecto mediado por *fstl1b* en la línea *fstl1a* (-/-) en la ciliogénesis, se injectó MO *fstl1b* en embriones *fstl1a* (-/-). Lo que se observó en este caso es que las cillas de estos embriones fueron significativamente más cortas que las de embriones salvajes, sugiriendo que *fstl1b* tiene actividad pro-ciliogéncia en la línea *fstl1a* KO [158].

Por otro lado, para probar si esta función compensatoria también ocurría durante la formación del tejido adiposo, se generó un crispante F0 para *fstl1b* en el contexto de la línea *fstl1a* (-/-). Las larvas crispantes de *fstl1b* en el contexto de la línea *fstl1a* (-/-) redujeron significativamente el área del tejido adiposo en comparación con las larvas de *fstl1a* (-/-) inyectadas solo con proteína Cas9, pero solo en dieta HFD [158]. Así, estos resultados muestran que *fstl1b* puede compensar la ausencia de *fstl1a* también en el contexto de la formación del tejido adiposo, al menos cuando se desafía a las larvas de pez cebra con dieta alta en grasas [158].

En suma, nuestros datos mostraron un efecto compensatorio de *fstl1b* en la línea mutante *fstl1a* (-/-). Como mencionamos, esto era una posibilidad dada la alta similitud entre los dos ortólogos a nivel de la proteína, así como la similitud en sus patrones de expresión. Un aspecto importante es que este efecto no depende de cambios transcripcionales: los niveles de ARNm de *fstl1b* no se alteraron en los peces mutantes

para *fstl1a*. Curiosamente a su vez, la compensación se logra a pesar de que los ortólogos parecen tener funciones distintas cuando se los analiza individualmente: la depleción de *fstl1a* llevó a cílios más cortos en la VK, mientras que el silenciamiento de *fstl1b* produjo el efecto opuesto. Sin embargo, cuando se silencia *fstl1b* con morfolinos en un fondo mutante para *fstl1a*, se observa acortamiento de las cílios. Por lo tanto, nuestros resultados respaldan un papel de *fstl1b* en la regulación de la longitud ciliar, aunque su acción específica en ese contexto parece estar modulada por la presencia o ausencia de *fstl1a*. En otras palabras, en presencia de ambos ortólogos, *fstl1b* parece inhibir la formación de las cílios, pero en ausencia de *fstl1a*, *fstl1b* puede sustituir su función, al menos parcialmente. Se requerirán experimentos adicionales para comprender completamente esta interacción funcional entre *fstl1a* y *fstl1b* en la formación de las cílios primarias. Finalmente, se ha demostrado que la degradación de transcritos mutantes por NMD, cómo estaría ocurriendo con la mutación introducida en el gen *fstl1a*, puede inducir la activación transcripcional de genes relacionados, resultando en efectos compensatorios, por mecanismos que aún no se encuentran completamente elucidados [263,265]. En este contexto, la línea mutante para *fstl1a* aquí generada representa una oportunidad para evaluar el rol de NMD y elucidar posibles vías funcionalmente relacionadas a *fstl1* y relevantes tanto para la ciliogénesis como para el desarrollo del tejido adiposo.

## 6 Conclusiones y Perspectivas

---

En conjunto, nuestros resultados aportan evidencia funcional que posiciona a FSTL1 como un modulador clave en dos procesos fundamentales: la ciliogénesis y el desarrollo del tejido adiposo, con relevancia tanto desde el punto de vista fisiológico como en el contexto de enfermedades complejas.

Nuestros estudios *in vitro* permitieron avanzar en la comprensión del mecanismo molecular de acción de FSTL1 durante la ciliogénesis, identificando a la vía de ERK1/2, previamente asociado al control del largo de las cilias, como un intermediario relevante de la señalización por FSTL1. En nuestro modelo, la evidencia reunida indica que DIP2A no actuaría como receptor/mediador de estos efectos, al menos en el contexto de la ciliogénesis.

Desde el punto de vista metodológico, implementamos un abordaje *in vivo* previamente descrito para el análisis del tejido adiposo en pez cebra. Esta herramienta, queda disponible para futuras aplicaciones con líneas mutantes, así como también la evaluación de compuestos con potencial efecto metabólico.

Los resultados obtenidos en pez cebra, a partir de embriones morfantes para *fstl1a*, refuerzan el rol de FSTL1 en la regulación de la ciliogénesis. Adicionalmente, nuestros datos *in vivo* con larvas mutantes muestran que la deficiencia de FSTL1 compromete el desarrollo del tejido adiposo en concordancia con los resultados previos obtenidos por nuestro grupo en líneas celulares. A su vez, observamos un fenotipo más severo en condiciones de alta disponibilidad energética, lo que sugiere un papel importante de FSTL1 en la respuesta adaptativa del tejido adiposo.

A partir de estos resultados, quedan algunos puntos interesantes por explorar a partir de los resultados obtenidos. En primer lugar, será importante explorar si existen cambios en la fosforilación de otros intermediarios intracelulares asociados a la señalización de FSTL1, como Akt, AMPK, NF-κB, SMAD1/5/8 y SMAD2/3. Asimismo, resta

identificar los mediadores responsables de la activación de ERK1/2 en el control de la ciliogénesis.

También queda por explorar en mayor profundidad el mecanismo de compensación observado en la línea mutante de *fstl1a* en pez cebra, donde ciertos efectos tempranos son posiblemente atenuados. Si bien datos obtenidos en el laboratorio muestran un rol para *fstl1b*, abordajes más amplios y complementarios, por ejemplo, a través de ensayos de transcriptómica (RNA-seq) comparativa entre morfantes y mutantes, serán importantes para esclarecer este fenómeno y entender los mecanismos de adaptación que se activan frente a la pérdida de *fstl1a*.

## 7 Bibliografía

---

1. Saggese T, Young AA, Huang C, Braeckmans K, McGlashan SR. Development of a method for the measurement of primary cilia length in 3D. *Cilia*. 2012;1: 11. doi:10.1186/2046-2530-1-11
2. Mill P, Christensen ST, Pedersen LB. Primary cilia as dynamic and diverse signalling hubs in development and disease. *Nature Reviews Genetics* 2023 24:7. 2023;24: 421–441. doi:10.1038/s41576-023-00587-9
3. Ma D, Wang F, Teng J, Huang N, Chen J. Structure and function of distal and subdistal appendages of the mother centriole. *J Cell Sci.* 2023;136. doi:10.1242/JCS.260560
4. Szymanska K, Johnson CA. The transition zone: an essential functional compartment of cilia. *Cilia*. 2012;1. doi:10.1186/2046-2530-1-10
5. Nachury M V., Mick DU. Establishing and regulating the composition of cilia for signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20: 389–405. doi:10.1038/S41580-019-0116-4
6. Macarelli V, Harding EC, Gershlick DC, Merkle FT. A Short Sequence Targets Transmembrane Proteins to Primary Cilia. *Cells*. 2024;13. doi:10.3390/CELLS13131156
7. Benmerah A. The ciliary pocket. *Curr Opin Cell Biol.* 2013;25: 78–84. doi:10.1016/j.ceb.2012.10.011
8. Clement CA, Ajbro KD, Koefoed K, Vestergaard ML, Veland IR, HenriquesdeJesus MPR, et al. TGF- $\beta$  Signaling Is Associated with Endocytosis at the Pocket Region of the Primary Cilium. *Cell Rep.* 2013;3: 1806–1814. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.020
9. Molla-Herman A, Ghossoub R, Blisnick T, Meunier A, Serres C, Silbermann F, et al. The ciliary pocket: An endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci.* 2010;123: 1785–1795. doi:10.1242/jcs.059519

10. Pampliega O, Orhon I, Patel B, Sridhar S, Díaz-Carretero A, Beau I, et al. Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature*. 2013;502: 194–200. doi:10.1038/NATURE12639
11. Lacey SE, Pigino G. The intraflagellar transport cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2025;26: 175–192. doi:10.1038/S41580-024-00797-X,
12. Taschner M, Lorentzen E. The Intraflagellar Transport Machinery. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A028092
13. Irigoin F, L. Badano J. Keeping the balance between proliferation and differentiation: the primary cilium. *Curr Genomics*. 2011;12: 285–297. doi:10.2174/138920211795860134
14. Hilgendorf KI, Myers BR, Reiter JF. Emerging mechanistic understanding of cilia function in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2024;25: 555–573. doi:10.1038/S41580-023-00698-5
15. Schou KB, Pedersen LB, Christensen ST. Ins and outs of GPCR signaling in primary cilia. *EMBO Rep*. 2015;16: 1099–1113. doi:10.15252/EMBR.201540530
16. Mykytyn K, Askwith C. G-Protein-Coupled receptor signaling in cilia. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9. doi:10.1101/cshperspect.a028183
17. Pan J, Snell W. The primary cilium: keeper of the key to cell division. *Cell*. 2007;129: 1255–1257. doi:10.1016/J.CELL.2007.06.018
18. Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7: 125–148. doi:10.1146/ANNUREV.GENOM.7.080505.115610
19. Cardenas-Rodriguez M, Badano JL. Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2009;151C: 263–280. doi:10.1002/AJMG.C.30227

20. Leitch CC, Zaghoul 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: 443–448. doi:10.1038/NG.97
21. Xing DJ, Zhang HX, Huang N, Wu KC, Huang XF, Huang F, et al. Comprehensive molecular diagnosis of Bardet-Biedl syndrome by high-throughput targeted exome sequencing. *PLoS One.* 2014;9. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0090599
22. Weihbrecht K, Goar WA, Pak T, Garrison JE, DeLuca AP, Stone EM, et al. Keeping an Eye on Bardet-Biedl Syndrome: A Comprehensive Review of the Role of Bardet-Biedl Syndrome Genes in the Eye. *Med Res Arch.* 2017;5. doi:10.18103/MRA.V5I9.1526
23. Coppieters F, Lefever S, Leroy BP, De Baere E. CEP290, a gene with many faces: mutation overview and presentation of CEP290base. *Hum Mutat.* 2010;31: 1097–1108. doi:10.1002/HUMU.21337
24. Ece Solmaz A, Onay H, Atik T, Aykut A, Cerrah Gunes M, Ozalp Yuregir O, et al. Targeted multi-gene panel testing for the diagnosis of Bardet Biedl syndrome: Identification of nine novel mutations across BBS1, BBS2, BBS4, BBS7, BBS9, BBS10 genes. *Eur J Med Genet.* 2015;58: 689–694. doi:10.1016/j.ejmg.2015.10.011
25. Forsythe E, Beales PL. Bardet-Biedl syndrome. *European Journal of Human Genetics* 2013 21:1. 2012;21: 8–13. doi:10.1038/ejhg.2012.115
26. Badano JL, Katsanis N. Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. *Nat Rev Genet.* 2002;3: 779–789. doi:10.1038/NRG910
27. Forsyth R, Gunay-Aygun M. Bardet-Biedl Syndrome Overview. *Genetics and Genomics of Eye Disease: Advancing to Precision Medicine.* 2023; 117–136. doi:10.1016/B978-0-12-816222-4.00008-3
28. Wormser O, Gradstein L, Yogeve Y, Perez Y, Kadir R, Goliand I, et al. SCAPER localizes to primary cilia and its mutation affects cilia length, causing Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2019;27: 928–940. doi:10.1038/S41431-019-0347-Z

29. Shamseldin HE, Shaheen R, Ewida N, Bubshait DK, Alkuraya H, Almardawi E, et al. The morbid genome of ciliopathies: an update. *Genet Med.* 2020;22: 1051–1060. doi:10.1038/S41436-020-0761-1
30. Morisada N, Hamada R, Miura K, Ye MJ, Nozu K, Hattori M, et al. Bardet-Biedl syndrome in two unrelated patients with identical compound heterozygous SCLT1 mutations. *CEN Case Rep.* 2020;9: 260–265. doi:10.1007/S13730-020-00472-Y
31. Niederlova V, Modrak M, Tsyklauri O, Huranova M, Stepanek O. Meta-analysis of genotype-phenotype associations in Bardet-Biedl syndrome uncovers differences among causative genes. *Hum Mutat.* 2019;40: 2068–2087. doi:10.1002/HUMU.23862
32. 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: 326–330. doi:10.1038/NATURE04370
33. 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: 1651–1659. doi:10.1093/HMG/DDG188
34. Badano JL, Ansley SJ, Leitch CC, Lewis RA, Lupski JR, Katsanis N. Identification of a Novel Bardet-Biedl Syndrome Protein, BBS7, That Shares Structural Features with BBS1 and BBS2. *Am J Hum Genet.* 2003;72: 650. doi:10.1086/368204
35. Leitch CC, Zaghoul NA, Davis EE, Stoetzel C, Diaz-Font A, Rix S, et al. Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nature Genetics* 2008 40:4. 2008;40: 443–448. doi:10.1038/ng.97
36. Jaffe KM, Grimes DT, Schottenfeld-Roames J, Werner ME, Ku TSJ, Kim SK, et al. c21orf59/kurly Controls Both Cilia Motility and Polarization. *Cell Rep.* 2016;14: 1841–1849. doi:10.1016/J.CELREP.2016.01.069

37. Novas R, Cardenas-Rodriguez M, Irigoín F, Badano JL. Bardet–Biedl syndrome: Is it only cilia dysfunction? *FEBS Lett.* 2015;589: 3479–3491. doi:10.1016/J.FEBSLET.2015.07.031
38. 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: 1488–1493. doi:10.1073/PNAS.0910268107
39. Satta M, Castro-Sánchez S, Valverde D. Bardet-Biedl Syndrome as a Chaperonopathy: Dissecting the Major Role of Chaperonin-Like BBS Proteins (BBS6-BBS10-BBS12). 2017;4. doi:10.3389/fmolb.2017.00055
40. Nachury M V., Loktev A V., Zhang Q, Westlake CJ, Peränen J, Merdes A, et al. A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell.* 2007;129: 1201–1213. doi:10.1016/J.CELL.2007.03.053
41. 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. *Nature Genetics* 2004 36:5. 2004;36: 462–470. doi:10.1038/ng1352
42. Seo S, Zhang Q, Bugge K, Breslow DK, Searby CC, Nachury M V., et al. A novel protein LZTFL1 regulates ciliary trafficking of the BBSome and Smoothened. *PLoS Genet.* 2011;7. doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1002358
43. Marion V, Stutzmann F, Gérard M, De Melo C, Schaefer E, Claussmann A, et al. Exome sequencing identifies mutations in LZTFL1, a bbsome and smoothened trafficking regulator, in a family with bardetebiedl syndrome with situs inversus and insertional polydactyly. *J Med Genet.* 2012;49: 317–321. doi:10.1136/JMEDGENET-2012-100737,
44. Aldahmesh MA, Li Y, Alhashem A, Anazi S, Alkuraya H, Hashem M, et al. IFT27, encoding a small GTPase component of IFT particles, is mutated in a

- consanguineous family with bardet-biedl syndrome. *Hum Mol Genet.* 2014;23: 3307–3315. doi:10.1093/HMG/DDU044,
45. Gascue C, Tan PL, Cardenas-Rodriguez M, Libisch G, Fernandez-Calero T, Liu YP, et al. Direct role of Bardet-Biedl syndrome proteins in transcriptional regulation. *J Cell Sci.* 2012;125: 362–375. doi:10.1242/JCS.089375
  46. Scott CA, Marsden AN, Rebagliati MR, Zhang Q, Chamling X, Searby CC, et al. Nuclear/cytoplasmic transport defects in BBS6 underlie congenital heart disease through perturbation of a chromatin remodeling protein. *PLoS Genet.* 2017;13. doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1006936
  47. Leitch CC, Lodh S, Prieto-Echagüe V, Badano JL, Zaghloul NA. Basal body proteins regulate Notch signaling through endosomal trafficking. *J Cell Sci.* 2014;127: 2407–2419. doi:10.1242/JCS.130344
  48. Loktev A V., 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: 854–865. doi:10.1016/J.DEVCEL.2008.11.001
  49. Volta F, Gerdes JM. The role of primary cilia in obesity and diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1391: 71–84. doi:10.1111/NYAS.13216
  50. Vaisse C, Reiter JF, Berbari NF. Cilia and Obesity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A028217
  51. Ghamari-Langroudi M, Digby GJ, Sebag JA, Millhauser GL, Palomino R, Matthews R, et al. G-protein-independent coupling of MC4R to Kir7.1 in hypothalamic neurons. *Nature.* 2015;520: 94–98. doi:10.1038/NATURE14051
  52. Davenport JR, Watts AJ, Roper VC, Croyle MJ, van Groen T, Wyss JM, et al. Disruption of intraflagellar transport in adult mice leads to obesity and slow-onset cystic kidney disease. *Curr Biol.* 2007;17: 1586–1594. doi:10.1016/J.CUB.2007.08.034

53. Seo S, Guo DF, Bugge K, Morgan DA, Rahmouni K, Sheffield VC. Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum Mol Genet.* 2009;18: 1323–1331. doi:10.1093/HMG/DDP031
54. Guo DF, Cui H, Zhang Q, Morgan DA, Thedens DR, Nishimura D, et al. The BBSome Controls Energy Homeostasis by Mediating the Transport of the Leptin Receptor to the Plasma Membrane. *PLoS Genet.* 2016;12. doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1005890
55. Rahmouni K, Fath MA, Seo S, Thedens DR, Berry CJ, Weiss R, et al. Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet-Biedl syndrome. *Journal of Clinical Investigation.* 2008;118: 1458–1467. doi:10.1172/JCI32357
56. Wei Q, Gu YF, Zhang QJ, Yu H, Peng Y, Williams KW, et al. Lztfl1/BBS17 controls energy homeostasis by regulating the leptin signaling in the hypothalamic neurons. *J Mol Cell Biol.* 2018;10: 402–410. doi:10.1093/JMBC/MJY022
57. Wu Y, Zhou J, Yang Y. Peripheral and central control of obesity by primary cilia. *Journal of Genetics and Genomics.* 2023;50: 295–304. doi:10.1016/j.jgg.2022.12.006
58. Loktev A V., Jackson PK. Neuropeptide Y family receptors traffic via the Bardet-Biedl syndrome pathway to signal in neuronal primary cilia. *Cell Rep.* 2013;5: 1316–1329. doi:10.1016/J.CELREP.2013.11.011
59. 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 U S A.* 2008;105: 4242–4246. doi:10.1073/PNAS.0711027105
60. Siljee JE, Wang Y, Bernard AA, Ersoy BA, Zhang S, Marley A, et al. Subcellular localization of MC4R with ADCY3 at neuronal primary cilia underlies a common pathway for genetic predisposition to obesity. *Nature Genetics* 2017 50:2. 2018;50: 180–185. doi:10.1038/s41588-017-0020-9

61. Wang Z, Li V, Chan GCK, Phan T, Nudelman AS, Xia Z, et al. Adult Type 3 Adenylyl Cyclase–Deficient Mice Are Obese. *PLoS One.* 2009;4: e6979. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0006979
62. Dowker-Key PD, Jadi PK, Gill NB, Hubbard KN, Elshaarrawi A, Alfatlawy ND, et al. A Closer Look into White Adipose Tissue Biology and the Molecular Regulation of Stem Cell Commitment and Differentiation. *Genes (Basel).* 2024;15. doi:10.3390/GENES15081017
63. Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20: 242–258. doi:10.1038/S41580-018-0093-Z
64. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259: 87–91. doi:10.1126/SCIENCE.7678183
65. Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12: 722–734. doi:10.1038/NRM3198
66. McLaughlin T, Sherman A, Tsao P, Gonzalez O, Yee G, Lamendola C, et al. Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis. *Diabetologia.* 2007;50: 1707–1715. doi:10.1007/S00125-007-0708-Y
67. Merrick D, Sakers A, Irgebay Z, Okada C, Calvert C, Morley MP, et al. Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue. *Science.* 2019;364. doi:10.1126/SCIENCE.AAV2501
68. Hepler C, Shan B, Zhang Q, Henry GH, Shao M, Vishvanath L, et al. Identification of functionally distinct fibro-inflammatory and adipogenic stromal subpopulations in visceral adipose tissue of adult mice. *Elife.* 2018;7. doi:10.7554/ELIFE.39636

69. Scamfer SR, Lee MD, Hilgendorf KI. Ciliary control of adipocyte progenitor cell fate regulates energy storage. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10: 1083372. doi:10.3389/FCELL.2022.1083372/BIBTEX
70. Kim HY, Jang HJ, Muthamil S, Shin UC, Lyu JH, Kim SW, et al. Novel insights into regulators and functional modulators of adipogenesis. *Biomed Pharmacother.* 2024;177. doi:10.1016/J.BIOPHA.2024.117073
71. Marion V, Stoetzel C, Schlicht D, Messadeq 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;106: 1820–1825. doi:10.1073/PNAS.0812518106
72. Corbit KC, Shyer AE, Dowdle WE, Gaulden J, Singla V, Reiter JF. Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat Cell Biol.* 2008;10: 70–76. doi:10.1038/NCB1670
73. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science.* 2000;289: 950–953. doi:10.1126/SCIENCE.289.5481.950
74. Suh JM, Gao X, McKay J, McKay R, Salo Z, Graff JM. Hedgehog signaling plays a conserved role in inhibiting fat formation. *Cell Metab.* 2006;3: 25–34. doi:10.1016/J.CMET.2005.11.012
75. Zhang Y, Hao J, Tarrago MG, Warner GM, Giorgadze N, Wei Q, et al. FBF1 deficiency promotes beiging and healthy expansion of white adipose tissue. *Cell Rep.* 2021;36: 109481. doi:10.1016/J.CELREP.2021.109481
76. Cook LB, Ophardt HD, Shen R, Pratt BH, Galbier LA. Transcriptome analysis of ciliary-dependent MCH signaling in differentiating 3T3-L1 pre-adipocytes. *Sci Rep.* 2021;11. doi:10.1038/S41598-021-84138-4
77. Dalbay MT, Thorpe SD, Connelly JT, Chapple JP, Knight MM. Adipogenic Differentiation of hMSCs is Mediated by Recruitment of IGF-1r Onto the Primary

- Cilium Associated With Cilia Elongation. Stem Cells. 2015;33: 1952. doi:10.1002/STEM.1975
78. Zhu D, Shi S, Wang H, Liao K. Growth arrest induces primary-cilium formation and sensitizes IGF-1-receptor signaling during differentiation induction of 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Sci.* 2009;122: 2760–2768. doi:10.1242/JCS.046276
79. Yamakawa D, Katoh D, Kasahara K, Shiromizu T, Matsuyama M, Matsuda C, et al. Primary cilia-dependent lipid raft/caveolin dynamics regulate adipogenesis. *Cell Rep.* 2021;34. doi:10.1016/J.CELREP.2021.108817
80. Hilgendorf KI, Johnson CT, Mezger A, Rice SL, Norris AM, Demeter J, et al. Omega-3 Fatty Acids Activate Ciliary FFAR4 to Control Adipogenesis. *Cell.* 2019;179: 1289–1305.e21. doi:10.1016/J.CELL.2019.11.005
81. Forti E, Aksanov O, Birk RZ. Temporal expression pattern of Bardet-Biedl syndrome genes in adipogenesis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2007;39: 1055–1062. doi:10.1016/j.biocel.2007.02.014
82. Nahum N, Forti E, Aksanov O, Birk R. Insulin regulates Bbs4 during adipogenesis. *IUBMB Life.* 2017;69: 489–499. doi:10.1002/IUB.1626
83. Aksanov O, Green P, Birk RZ. BBS4 directly affects proliferation and differentiation of adipocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71: 3381–3392. doi:10.1007/S00018-014-1571-X
84. 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 Metab.* 2012;16: 363–377. doi:10.1016/J.CMET.2012.08.005
85. Prieto-Echagüe 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. doi:10.1038/S41598-017-10330-0

86. Chaly Y, Marinov AD, Oxburgh L, Bushnell DS, Hirsch R. FSTL1 promotes arthritis in mice by enhancing inflammatory cytokine/chemokine expression. *Arthritis Rheum.* 2012;64: 1082–1088. doi:10.1002/art.33422
87. Sylva M, Moorman AFM, Van den Hoff MJB. Follistatin-like 1 in vertebrate development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2013;99: 61–69. doi:10.1002/BDRC.21030
88. Mattiotti A, Prakash S, Barnett P, van den Hoff MJB. Follistatin-like 1 in development and human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2018;75: 2339–2354. doi:10.1007/s00018-018-2805-0
89. SHIBANUMA M, MASHIMO J, MITA A, KUROKI T, NOSE K. Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor- $\beta$ 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide. *Eur J Biochem.* 1993;217: 13–19. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18212.x
90. Zwijsen A, Blockx H, Van Arnhem W, Willemse J, Fransen L, Devos K, et al. Characterization of a rat C6 glioma-secreted follistatin-related protein (FRP). Cloning and sequence of the human homologue. *Eur J Biochem.* 1994;225: 937–946. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.0937B.X
91. Li X, Li L, Chang Y, Ning W, Liu X. Structural and functional study of FK domain of Fstl1. *Protein Science.* 2019;28: 1819–1829. doi:10.1002/pro.3696
92. Chaly Y, Hostager B, Smith S, Hirsch R. Follistatin-like protein 1 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Immunol Res.* 2014;59: 266–272. doi:10.1007/S12026-014-8526-Z
93. Hambrock HO, Kaufmann B, Müller S, Hanisch FG, Nose K, Paulsson M, et al. Structural characterization of TSC-36/Flik: analysis of two charge isoforms. *J Biol Chem.* 2004;279: 11727–11735. doi:10.1074/JBC.M309318200
94. Widera C, Giannitsis E, Kempf T, Korf-Klingebiel M, Fiedler B, Sharma S, et al. Identification of follistatin-like 1 by expression cloning as an activator of the growth

- differentiation factor 15 gene and a prognostic biomarker in acute coronary syndrome. *Clin Chem*. 2012;58: 1233–1241. doi:10.1373/clinchem.2012.182816
95. Widera C, Horn-Wichmann R, Kempf T, Bethmann K, Fiedler B, Sharma S, et al. Circulating concentrations of follistatin-like 1 in healthy individuals and patients with acute coronary syndrome as assessed by an immunoluminometric sandwich assay. *Clin Chem*. 2009;55: 1794–1800. doi:10.1373/clinchem.2009.129411
96. El-Armouche A, Ouchi N, Tanaka K, Doros G, Wittkötter K, Schulze T, et al. Follistatin-like 1 in chronic systolic heart failure: a marker of left ventricular remodeling. *Circ Heart Fail*. 2011;4: 621–627. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.960625
97. Tanaka K, Valero-Muñoz M, Wilson RM, Essick EE, Fowler CT, Nakamura K, et al. Follistatin like 1 Regulates Hypertrophy in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *JACC Basic Transl Sci*. 2016;1: 207–221. doi:10.1016/J.JACBTS.2016.04.002
98. Aikawa T, Shimada K, Miyauchi K, Miyazaki T, Sai E, Ouchi S, et al. Associations among circulating levels of follistatin-like 1, clinical parameters, and cardiovascular events in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting stents. *PLoS One*. 2019;14: e0216297. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0216297
99. Yamazaki Y, Kishimoto Y, Saita E, Aoyama M, Ikegami Y, Ohmori R, et al. Association between Plasma Follistatin-like Protein 1 Levels and the Presence and Severity of Coronary Artery Disease. *Int Heart J*. 2021;62: 1207–1212. doi:10.1536/IHJ.21-203
100. Ouchi N, Oshima Y, Ohashi K, Higuchi A, Ikegami C, Izumiya Y, et al. Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2008;283: 32802–32811. doi:10.1074/JBC.M803440200
101. Ogura Y, Ouchi N, Ohashi K, Shibata R, Kataoka Y, Kambara T, et al. Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models.

Circulation. 2012;126: 1728–1738. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.115089/-/DC1

102. Oshima Y, Ouchi N, Sato K, Izumiya Y, Pimentel DR, Walsh K. Follistatin-like 1 is an Akt-regulated cardioprotective factor that is secreted by the heart. Circulation. 2008;117: 3099–3108. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.767673
103. Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, Diez-Cunado M, Zhao M, Maruyama S, et al. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. Nature. 2015;525: 479–485. doi:10.1038/NATURE15372
104. Shen H, Cui G, Li Y, Ye W, Sun Y, Zhang Z, et al. Follistatin-like 1 protects mesenchymal stem cells from hypoxic damage and enhances their therapeutic efficacy in a mouse myocardial infarction model. Stem Cell Res Ther. 2019;10. doi:10.1186/s13287-018-1111-y
105. Zhao Y, Ou Q, Deng Y, Peng J, Li C, Li J, et al. Determination of follistatin-like protein 1 expression in colorectal cancer and its association with clinical outcomes. Ann Transl Med. 2019;7: 606–606. doi:10.21037/ATM.2019.09.20
106. Wu M, Ding Y, Wu N, Jiang J, Huang Y, Zhang F, et al. FSTL1 promotes growth and metastasis in gastric cancer by activating AKT related pathway and predicts poor survival. Am J Cancer Res. 2021;11: 712. Available: /pmc/articles/PMC7994156/
107. Li L, Huang S, Yao Y, Chen J, Li J, Xiang X, et al. Follistatin-like 1 (FSTL1) is a prognostic biomarker and correlated with immune cell infiltration in gastric cancer. World J Surg Oncol. 2020;18. doi:10.1186/S12957-020-02070-9
108. Jin X, Nie E, Zhou X, Zeng A, Yu T, Zhi T, et al. Fstl1 Promotes Glioma Growth Through the BMP4/Smad1/5/8 Signaling Pathway. Cell Physiol Biochem. 2017;44: 1616–1628. doi:10.1159/000485759
109. Reddy SP, Britto R, Vinnakota K, Aparna H, Sreepathi HK, Thota B, et al. Novel glioblastoma markers with diagnostic and prognostic value identified through

- transcriptome analysis. *Clin Cancer Res.* 2008;14: 2978–2987. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4821
110. Nie E, Miao F, Jin X, Wu W, Zhou X, Zeng A, et al. Fstl1/DIP2A/MGMT signaling pathway plays important roles in temozolomide resistance in glioblastoma. *Oncogene.* 2019;38: 2706–2721. doi:10.1038/s41388-018-0596-2
111. Loh JJ, Li TW, Zhou L, Wong TL, Liu X, Ma VWS, et al. FSTL1 Secreted by Activated Fibroblasts Promotes Hepatocellular Carcinoma Metastasis and Stemness. *Cancer Res.* 2021;81: 5692–5705. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-4226
112. Yang W, Wu Y, Wang C, Liu Z, Xu M, Zheng X. FSTL1 contributes to tumor progression via attenuating apoptosis in a AKT/GSK-3 $\beta$  - dependent manner in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark.* 2017;20: 75–85. doi:10.3233/CBM-170132
113. Zhang Y, Xu X, Yang Y, Ma J, Wang L, Meng X, et al. Deficiency of Follistatin-Like Protein 1 Accelerates the Growth of Breast Cancer Cells at Lung Metastatic Sites. *J Breast Cancer.* 2018;21: 267–276. doi:10.4048/JBC.2018.21.E43
114. Chan QKY, Ngan HYS, Ip PPC, Liu VWS, Xue WC, Cheung ANY. Tumor suppressor effect of follistatin-like 1 in ovarian and endometrial carcinogenesis: a differential expression and functional analysis. *Carcinogenesis.* 2009;30: 114–121. doi:10.1093/CARCIN/BGN215
115. Liu YK, Jia YJ, Liu SH, Ma J. FSTL1 increases cisplatin sensitivity in epithelial ovarian cancer cells by inhibition of NF- $\kappa$ B pathway. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2021;87: 405–414. doi:10.1007/S00280-020-04215-9
116. Zhao C, Chen Z, Zhu L, Miao Y, Guo J, Yuan Z, et al. The BMP inhibitor follistatin-like 1 (FSTL1) suppresses cervical carcinogenesis. *Front Oncol.* 2023;13. doi:10.3389/FONC.2023.1100045
117. Zhou X, Xiao X, Huang T, Du C, Wang S, Mo Y, et al. Epigenetic inactivation of follistatin-like 1 mediates tumor immune evasion in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7: 16433–16444. doi:10.18632/ONCOTARGET.7654

118. Chudasama D, Bo V, Hall M, Anikin V, Jeyaneethi J, Gregory J, et al. Identification of cancer biomarkers of prognostic value using specific gene regulatory networks (GRN): a novel role of RAD51AP1 for ovarian and lung cancers. *Carcinogenesis*. 2018;39: 407–417. doi:10.1093/CARCIN/BGX122
119. Ni X, Cao X, Wu Y, Wu J. FSTL1 suppresses tumor cell proliferation, invasion and survival in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2018;39: 13–20. doi:10.3892/OR.2017.6061
120. Tan X, Zhai Y, Chang W, Hou J, He S, Lin L, et al. Global analysis of metastasis-associated gene expression in primary cultures from clinical specimens of clear-cell renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2008;123: 1080–1088. doi:10.1002/IJC.23637
121. Liu Y, Han X, Yu Y, Ding Y, Ni C, Liu W, et al. A genetic polymorphism affects the risk and prognosis of renal cell carcinoma: association with follistatin-like protein 1 expression. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/SREP26689
122. Peng X, Wang P, Shikuan LI, Jiang Y, Changliang WU. Follistatin-like protein 1 knockdown elicits human gastric cancer cell apoptosis via a STAT6-dependent pathway. *Oncol Rep.* 2019;42: 2806–2813. doi:10.3892/OR.2019.7334
123. Bevivino G, Sedda S, Franzè E, Stolfi C, Grazia A Di, Dinallo V, et al. Follistatin-like protein 1 sustains colon cancer cell growth and survival. *Oncotarget*. 2018;9: 31278–31290. doi:10.18632/ONCOTARGET.25811
124. Wang Y, Li D, Xu N, Tao W, Zhu R, Sun R, et al. Follistatin-like protein 1: a serum biochemical marker reflecting the severity of joint damage in patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011;13. doi:10.1186/AR3522
125. Li D, Wang Y, Xu N, Wei Q, Wu M, Li X, et al. Follistatin-like protein 1 is elevated in systemic autoimmune diseases and correlated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011;13. doi:10.1186/ar3241

126. Tanaka M, Ozaki S, Osakada F, Mori K, Okubo M, Nakao K. Cloning of follistatin-related protein as a novel autoantigen in systemic rheumatic diseases. *Int Immunol.* 1998;10: 1305–1314. doi:10.1093/INTIMM/10.9.1305
127. Wilson DC, Marinov AD, Blair HC, Bushnell DS, Thompson SD, Chaly Y, et al. Follistatin-like protein 1 is a mesenchyme-derived inflammatory protein and may represent a biomarker for systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62: 2510–2516. doi:10.1002/ART.27485
128. Wang S, Wei J, Shi J, He Q, Zhou X, Gao X, et al. Follistatin-Like 1 Attenuation Suppresses Intervertebral Disc Degeneration in Mice through Interacting with TNF- $\alpha$  and Smad Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021. doi:10.1155/2021/6640751
129. Li W, Alahdal M, Deng Z, Liu J, Zhao Z, Cheng X, et al. Molecular functions of FSTL1 in the osteoarthritis. *Int Immunopharmacol.* 2020;83. doi:10.1016/j.intimp.2020.106465
130. Clutter SD, Wilson DC, Marinov AD, Hirsch R. Follistatin-like protein 1 promotes arthritis by up-regulating IFN-gamma. *J Immunol.* 2009;182: 234–239. doi:10.4049/JIMMUNOL.182.1.234
131. Gorelik M, Wilson DC, Cloonan YK, Shulman ST, Hirsch R. Plasma follistatin-like protein 1 is elevated in Kawasaki disease and may predict coronary artery aneurysm formation. *J Pediatr.* 2012;161: 116–119. doi:10.1016/J.JPEDS.2012.01.011
132. Murakami K, Tanaka M, Usui T, Kawabata D, Shiomi A, Iguchi-Hashimoto M, et al. Follistatin-related protein/follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* 2012;586: 319–324. doi:10.1016/J.FEBSLET.2012.01.010
133. Kawabata D, Tanaka M, Fujii T, Umehara H, Fujita Y, Yoshifuji H, et al. Ameliorative effects of follistatin-related protein/TSC-36/FSTL1 on joint inflammation in a mouse model of arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50: 660–668. doi:10.1002/ART.20023

134. Lempesis IG, Tsilingiris D, Liu J, Dalamaga M. Of mice and men: Considerations on adipose tissue physiology in animal models of obesity and human studies. *Metabol Open*. 2022;15: 100208. doi:10.1016/j.metop.2022.100208
135. Frühbeck G, Busetto L, Dicker D, Yumuk V, Goossens GH, Hebebrand J, et al. The ABCD of obesity: An EASO position statement on a diagnostic term with clinical and scientific implications. *Obes Facts*. 2019;12: 131–136. doi:10.1159/000497124,
136. Recinella L, Orlando G, Ferrante C, Chiavaroli A, Brunetti L, Leone S. Adipokines: New Potential Therapeutic Target for Obesity and Metabolic, Rheumatic, and Cardiovascular Diseases. *Front Physiol*. 2020;11. doi:10.3389/FPHYS.2020.578966
137. Savulescu-Fiedler I, Mihalcea R, Dragosloveanu S, Scheau C, Baz RO, Caruntu A, et al. The Interplay between Obesity and Inflammation. *Life (Basel)*. 2024;14. doi:10.3390/LIFE14070856
138. Kang YE, Kim JM, Joung KH, Lee JH, You BR, Choi MJ, et al. The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction. *PLoS One*. 2016;11. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0154003
139. Senesi P, Luzi L, Terruzzi I. Adipokines, Myokines, and Cardiokines: The Role of Nutritional Interventions. *Int J Mol Sci*. 2020;21: 1–27. doi:10.3390/IJMS21218372
140. Ouchi N, Ohashi K, Shibata R, Murohara T. Protective roles of adipocytokines and myokines in cardiovascular disease. *Circulation Journal*. 2016;80: 2073–2080. doi:10.1253/circj.CJ-16-0663
141. Chung HS, Choi KM. Adipokines and Myokines: A Pivotal Role in Metabolic and Cardiovascular Disorders. *Curr Med Chem*. 2017;25: 2401–2415. doi:10.2174/0929867325666171205144627
142. Fan N, Sun H, Wang Y, Wang Y, Zhang L, Xia Z, et al. Follistatin-like 1: A potential mediator of inflammation in obesity. *Mediators Inflamm*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/752519

143. Xu X, Zhang T, Mokou M, Li L, Li P, Song J, et al. Follistatin-like 1 as a Novel Adipomyokine Related to Insulin Resistance and Physical Activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105. doi:10.1210/CLINEM/DGAA629
144. Horak M, Kuruczova D, Zlamal F, Tomandl J, Bienertova-Vasku J. Follistatin-Like 1 Is Downregulated in Morbidly and Super Obese Central-European Population. *Dis Markers.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/4140815
145. Hayakawa S, Ohashi K, Shibata R, Takahashi R, Otaka N, Ogawa H, et al. Association of Circulating Follistatin-Like 1 Levels with Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Healthy Men. *PLoS One.* 2016;11. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0153619
146. Santos L, Patrone M, Prieto-Echagüe V, Lapi S, Perdomo M, Vaucher A, et al. Impact of Bariatric Surgery on metabolic health in a Uruguayan cohort and the emerging predictive role of FSTL1. *Sci Rep.* 2024;14. doi:10.1038/S41598-024-65651-8
147. Wu Y, Zhou S, Smas CM. Downregulated expression of the secreted glycoprotein follistatin-like 1 (Fstl1) is a robust hallmark of preadipocyte to adipocyte conversion. *Mech Dev.* 2010;127: 183–202. doi:10.1016/j.mod.2009.12.003
148. Liang X, Hu Q, Li B, McBride D, Bian H, Spagnoli P, et al. Follistatin-like 1 attenuates apoptosis via disco-interacting protein 2 homolog A/Akt pathway after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 2014;45: 3048–3054. doi:10.1161/STROKEAHA.114.006092
149. Sundaram GM, Quah S, Sampath P. Metastasis suppression and enhancement of anti-tumour immunity by targeting the FSTL1-DIP2A axis. *Transl Cancer Res.* 2019;8: S149–S151. doi:10.21037/tcr.2018.12.25
150. Kudo-Saito C, Ishida A, Shouya Y, Teramoto K, Igarashi T, Kon R, et al. Blocking the FSTL1-DIP2A Axis Improves Anti-tumor Immunity. *Cell Rep.* 2018;24: 1790–1801. doi:10.1016/J.CELREP.2018.07.043

151. Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, et al. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet*. 1999;21: 111–1114. doi:10.1038/5056
152. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$  Method. *Methods*. 2001;25: 402–408. doi:10.1006/METH.2001.1262
153. Sokal RR, Lahoz León M, Rohlf FJ. Biometría: principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. 1979; 832. Available: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=21017>
154. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995;203: 253–310. doi:10.1002/AJA.1002030302
155. Westerfield M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene. 2000.
156. Chen XK, Kwan JSK, Chang RCC, Ma ACH. 1-phenyl 2-thiourea (PTU) activates autophagy in zebrafish embryos. *Autophagy*. 2020;17: 1222. doi:10.1080/15548627.2020.1755119
157. Bill BR, Petzold AM, Clark KJ, Schimmenti LA, Ekker SC. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish*. 2009;6: 69–77. doi:10.1089/ZEB.2008.0555
158. Guggeri L, Sosa-Redaelli I, Cárdenas-Rodríguez M, Alonso M, González G, Naya H, et al. Follistatin like-1 (Fstl1) regulates adipose tissue development in zebrafish. *Adipocyte*. 2024;13. doi:10.1080/21623945.2024.2435862
159. Varshney GK, Carrington B, Pei W, Bishop K, Chen Z, Fan C, et al. A high-throughput functional genomics workflow based on CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in zebrafish. *Nat Protoc*. 2016;11: 2357–2375. doi:10.1038/NPROT.2016.141

160. Jao LE, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110: 13904–13909. doi:10.1073/PNAS.1308335110
161. Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods.* 2015;12: 982–988. doi:10.1038/NMETH.3543
162. Meeker ND, Hutchinson SA, Ho L, Trede NS. Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *Biotechniques.* 2007;43: 610–614. doi:10.2144/000112619
163. Matthews M, Varga ZM. Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR J.* 2012;53: 192–204. doi:10.1093/ILAR.53.2.192
164. Lepanto P, Davison C, Casanova G, Badano JL, Zolessi FR. Characterization of primary cilia during the differentiation of retinal ganglion cells in the zebrafish. *Neural Dev.* 2016;11. doi:10.1186/S13064-016-0064-Z
165. Cardenas-Rodriguez M, Osborn DPS, Irigoín F, Graña 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: 91–105. doi:10.1007/s00439-012-1228-5
166. Hammer DAT, Ryan PD, Hammer Ø, Harper DAT. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica.* 2001;4: 178. Available: [http://palaeo-electronica.orghttp://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.orghttp://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).
167. McMenamin SK, Chandless MN, Parichy DM. Working with zebrafish at postembryonic stages. *Methods Cell Biol.* 2016;134: 587–607. doi:10.1016/BS.MCB.2015.12.001
168. Minchin JEN, Rawls JF. In vivo imaging and quantification of regional adiposity in zebrafish. *Methods Cell Biol.* 2017;138: 3–27. doi:10.1016/BS.MCB.2016.11.010

169. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red - PubMed. [cited 8 Aug 2025]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4031658/>
170. Parichy DM, Elizondo MR, Mills MG, Gordon TN, Engeszer RE. Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev Dyn.* 2009;238: 2975–3015. doi:10.1002/DVDY.22113
171. Minchin JEN, Dahlman I, Harvey CJ, Mejhert N, Singh MK, Epstein JA, et al. Plexin D1 determines body fat distribution by regulating the type V collagen microenvironment in visceral adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112: 4363–4368. doi:10.1073/PNAS.1416412112,
172. Ganger MT, Dietz GD, Ewing SJ. A common base method for analysis of qPCR data and the application of simple blocking in qPCR experiments. *BMC Bioinformatics.* 2017;18: 1–11. doi:10.1186/S12859-017-1949-5/FIGURES/2
173. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den hoff MJB, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009;37: e45–e45. doi:10.1093/NAR/GKP045
174. Xu H, Li C, Zeng Q, Agrawal I, Zhu X, Gong Z. Genome-wide identification of suitable zebrafish *Danio rerio* reference genes for normalization of gene expression data by RT-qPCR. *J Fish Biol.* 2016;88: 2095–2110. doi:10.1111/JFB.12915
175. Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb WC, Love DR. Validation of Zebrafish *Danio rerio* Reference Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Normalization. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2007;39: 384–390. doi:10.1111/J.1745-7270.2007.00283.X
176. Rassier GT, Silveira TLR, Remião MH, Daneluz LO, Martins AWS, Dellagostin EN, et al. Evaluation of qPCR reference genes in GH-overexpressing transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Sci Rep.* 2020;10: 1–15. doi:10.1038/S41598-020-69423-Y;SUBJMETA
177. Ouchi N, Asaumi Y, Ohashi K, Higuchi A, Sono-Romanelli S, Oshima Y, et al. DIP2A functions as a FSTL1 receptor. *Journal of Biological Chemistry.* 2010;285: 7127–7134. doi:10.1074/jbc.M109.069468

178. Ma J, Chen L, He XX, Wang YJ, Yu HL, He ZX, et al. Functional prediction and characterization of Dip2 gene in mice. *Cell Biol Int.* 2019;43: 421–428. doi:10.1002/CBIN.11106
179. Mukhopadhyay M, Pelka P, DeSousa D, Kablar B, Schindler A, Rudnicki MA, et al. Cloning, genomic organization and expression pattern of a novel *Drosophila* gene, the disco-interacting protein 2 (dip2), and its murine homolog. *Gene.* 2002;293: 59–65. doi:10.1016/S0378-1119(02)00694-7
180. Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* 2012;66: 105–143. doi:10.1016/J.PHRS.2012.04.005
181. Martin-Vega A, Cobb MH. Navigating the ERK1/2 MAPK Cascade. *Biomolecules.* 2023;13. doi:10.3390/BIOM13101555
182. Santos L, Guggeri L, Escande C, Badano JL, Prieto-Echagüe V. FSTL1 is an antagonist of ERK1/2 phosphorylation during ciliogenesis and preadipocyte differentiation. *bioRxiv.* 2024; 2024.02.21.581425. doi:10.1101/2024.02.21.581425
183. Sylva M, Li VSW, Buffing AAA, van Es JH, van den Born M, van der Velden S, et al. The BMP antagonist follistatin-like 1 is required for skeletal and lung organogenesis. *PLoS One.* 2011;6. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0022616
184. Geng Y, Dong Y, Yu M, Zhang L, Yan X, Sun J, et al. Follistatin-like 1 (Fstl1) is a bone morphogenetic protein (BMP) 4 signaling antagonist in controlling mouse lung development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108: 7058–7063. doi:10.1073/PNAS.1007293108
185. Li X, Fang Y, Li X, Liang J, Jiang D, Geng Y, et al. Apical Secretion of FSTL1 in the Respiratory Epithelium for Normal Lung Development. *PLoS One.* 2016;11. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0158385
186. Xu J, Qi X, Gong J, Yu M, Zhang F, Sha H, et al. Fstl1 antagonizes BMP signaling and regulates ureter development. *PLoS One.* 2012;7. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0032554

187. D'Angelo L, de Girolamo P. Laboratory Fish in Biomedical Research: Biology, Husbandry and Research Applications for Zebrafish, Medaka, Killifish, Cavefish, Stickleback, Goldfish and Danionella Translucida. *Laboratory Fish in Biomedical Research: Biology, Husbandry and Research Applications for Zebrafish, Medaka, Killifish, Cavefish, Stickleback, Goldfish and Danionella Translucida*. 2021; 1–450. doi:10.1016/C2019-0-02845-2
188. Leventea E, Hazime K, Zhao C, Malicki J. Analysis of cilia structure and function in zebrafish. *Methods Cell Biol.* 2016;133: 179–227. doi:10.1016/BS.MCB.2016.04.016
189. Corkins ME, Krneta-Stankic V, Kloc M, Miller RK. Aquatic models of human ciliary diseases. *Genesis*. 2021;59: e23410. doi:10.1002/DVG.23410
190. Pinto AL, Rasteiro M, Bota C, Pestana S, Sampaio P, Hogg C, et al. Zebrafish Motile Cilia as a Model for Primary Ciliary Dyskinesia. *Int J Mol Sci.* 2021;22. doi:10.3390/IJMS22168361
191. Marshall RA, Osborn DPS. Zebrafish: a vertebrate tool for studying basal body biogenesis, structure, and function. *Cilia*. 2016;5. doi:10.1186/S13630-016-0036-2
192. Sun Z, Amsterdam A, Pazour GJ, Cole DG, Miller MS, Hopkins N. A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney. *Development*. 2004;131: 4085–4093. doi:10.1242/DEV.01240
193. Yen HJ, Tayeh MK, Mullins RF, Stone EM, Sheffield VC, Slusarski DC. Bardet-Biedl syndrome genes are important in retrograde intracellular trafficking and Kupffer's vesicle cilia function. *Hum Mol Genet.* 2006;15: 667–677. doi:10.1093/HMG/DDI468
194. Sayer JA, Otto EA, O'Toole JF, Nurnberg G, Kennedy MA, Becker C, et al. The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat Genet.* 2006;38: 674–681. doi:10.1038/NG1786

195. Baye LM, Patrinostro X, Swaminathan S, Beck JS, Zhang Y, Stone EM, et al. The N-terminal region of centrosomal protein 290 (CEP290) restores vision in a zebrafish model of human blindness. *Hum Mol Genet.* 2011;20: 1467–1477. doi:10.1093/HMG/DDR025
196. Tsujikawa M, Malicki J. Intraflagellar Transport Genes Are Essential for Differentiation and Survival of Vertebrate Sensory Neurons. *Neuron.* 2004;42: 703–716. doi:10.1016/S0896-6273(04)00268-5
197. Anderson JL, Carten JD, Farber SA. Zebrafish Lipid Metabolism: From Mediating Early Patterning to the Metabolism of Dietary Fat and Cholesterol. *Methods Cell Biol.* 2011;101: 111–141. doi:10.1016/B978-0-12-387036-0.00005-0,
198. Oka T, Nishimura Y, Zang L, Hirano M, Shimada Y, Wang Z, et al. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiol.* 2010;10. doi:10.1186/1472-6793-10-21,
199. Flynn EJ, Trent CM, Rawls JF. Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *J Lipid Res.* 2009;50: 1641–1652. doi:10.1194/jlr.M800590JLR200
200. Imrie D, Sadler KC. White adipose tissue development in zebrafish is regulated by both developmental time and fish size. *Developmental Dynamics.* 2010;239: 3013–3023. doi:10.1002/DVDY.22443,
201. Eisen JS, Smith JC. Controlling morpholino experiments: Don't stop making antisense. *Development.* 2008;135: 1735–1743. doi:10.1242/DEV.001115,
202. Esterberg R, Delalande JM, Fritz A. Tailbud-derived Bmp4 drives proliferation and inhibits maturation of zebrafish chordamesoderm. *Development.* 2008;135: 3891–3901. doi:10.1242/DEV.029264
203. Dal-Pra S, Fürthauer M, Van-Celst J, Thisse B, Thisse C. Noggin1 and Follistatin-like2 function redundantly to Chordin to antagonize BMP activity. *Dev Biol.* 2006;298: 514–526. doi:10.1016/J.YDBIO.2006.07.002

204. Taylor JS, Braasch I, Frickey T, Meyer A, Van de Peer Y. Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res.* 2003;13: 382–390. doi:10.1101/GR.640303
205. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 2013;496: 498–503. doi:10.1038/NATURE12111,
206. Meyer A, Schartl M. Gene and genome duplications in vertebrates: The one-to-four (–to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11: 699–704. doi:10.1016/S0955-0674(99)00039-3
207. Sun YW, Li FG, Chen J, Jiang XY, Zou SM. Two follistatin-like 1 homologs are differentially expressed in adult tissues and during embryogenesis in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Gen Comp Endocrinol.* 2015;223: 1–8. doi:10.1016/J.YGCEN.2015.09.017
208. White RJ, Collins JE, Sealy IM, Wali N, Dooley CM, Digby Z, et al. A high-resolution mRNA expression time course of embryonic development in zebrafish. *Elife.* 2017;6. doi:10.7554/ELIFE.30860
209. Petryszak R, Keays M, Tang YA, Fonseca NA, Barrera E, Burdett T, et al. Expression Atlas update--an integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants. *Nucleic Acids Res.* 2016;44: D746–D752. doi:10.1093/NAR/GKV1045
210. van Slyke CE, Bradford YM, Westerfield M, Haendel MA. The zebrafish anatomy and stage ontologies: representing the anatomy and development of *Danio rerio*. *J Biomed Semantics.* 2014;5: 12. doi:10.1186/2041-1480-5-12
211. Tajer B, Dutko JA, Little SC, Mullins MC. BMP heterodimers signal via distinct type I receptor class functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118. doi:10.1073/PNAS.2017952118/-/DCSUPPLEMENTAL

212. Essner JJ, Amack JD, Nyholm MK, Harris EB, Yost HJ. Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development.* 2005;132: 1247–1260. doi:10.1242/DEV.01663
213. Forrest K, Barricella AC, Pohar SA, Hinman AM, Amack JD. Understanding laterality disorders and the left-right organizer: Insights from zebrafish. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10. doi:10.3389/FCELL.2022.1035513
214. Kramer-Zucker AG, Olale F, Haycraft CJ, Yoder BK, Schier AF, Drummond IA. Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development.* 2005;132: 1907–1921. doi:10.1242/DEV.01772
215. Brogna S, Wen J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16: 107–113. doi:10.1038/NSMB.1550
216. Minchin JEN, Rawls JF. A classification system for zebrafish adipose tissues. *Dis Model Mech.* 2017;10: 797–809. doi:10.1242/DMM.025759
217. Tingaud-Sequeira A, Ouadah N, Babin PJ. Zebrafish obesogenic test: A tool for screening molecules that target adiposity. *J Lipid Res.* 2011;52: 1765–1772. doi:10.1194/JLR.D017012,
218. Wang J, Thomas HR, Thompson RG, Waldrep SC, Fogerty J, Song P, et al. Variable phenotypes and penetrance between and within different zebrafish ciliary transition zone mutants. *Dis Model Mech.* 2022;15. doi:10.1242/DMM.049568
219. Zang L, Maddison LA, Chen W. Zebrafish as a model for obesity and diabetes. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6. doi:10.3389/FCELL.2018.00091,
220. Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell.* 1993;73: 725–734. doi:10.1016/0092-8674(93)90252-L

221. Wang Y, Kim KA, Kim JH, Hei SS. Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis. *Journal of Nutrition*. 2006;136: 2953–2956. doi:10.1093/jn/136.12.2953
222. Gupta RK, Arany Z, Seale P, Mepani RJ, Ye L, Conroe HM, et al. Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature*. 2010;464: 619–623. doi:10.1038/NATURE08816,
223. Gupta RK, Mepani RJ, Kleiner S, Lo JC, Khandekar MJ, Cohen P, et al. Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab*. 2012;15: 230–239. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.010
224. Rodríguez P, Higueras MA, González-Rajal A, Alfranca A, Fierro-Fernández M, García-Fernández RA, et al. The non-canonical NOTCH ligand DLK1 exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2012;93: 232–241. doi:10.1093/CVR/CVR296,
225. Hong CJ, Hamilton BA. Zfp423 Regulates Sonic Hedgehog Signaling via Primary Cilium Function. *PLoS Genet*. 2016;12: e1006357. doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1006357
226. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 2000;14: 1293–1307. doi:10.1101/GAD.14.11.1293
227. Den Broeder MJ, Kopylova VA, Kamminga LM, Legler J. Zebrafish as a Model to Study the Role of Peroxisome Proliferating-Activated Receptors in Adipogenesis and Obesity. *PPAR Res*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/358029,
228. Lepanto P, Levin-Ferreyyra F, Koziol U, Malacrida L, Badano JL. Insights into in vivo adipocyte differentiation through cell-specific labeling in zebrafish. *Biol Open*. 2021;10. doi:10.1242/BIO.058734,
229. Nishio SI, Gibert Y, Bernard L, Brunet F, Triqueneaux G, Laudet V. Adiponectin and adiponectin receptor genes are coexpressed during zebrafish embryogenesis and

- regulated by food deprivation. *Developmental Dynamics*. 2008;237: 1682–1690. doi:10.1002/DVDY.21559;CTYPE:STRING:JOURNAL
230. Griseti E, Bello AA, Bieth E, Sabbagh B, Iacovoni JS, Bigay J, et al. Molecular mechanisms of perilipin protein function in lipid droplet metabolism. *FEBS Lett.* 2024;598: 1170–1198. doi:10.1002/1873-3468.14792,
231. Lumaquin D, Johns E, Montal E, Weiss JM, Ola D, Abuhashem A, et al. An *in vivo* reporter for tracking lipid droplet dynamics in transparent zebrafish. *Elife*. 2021;10. doi:10.7554/ELIFE.64744,
232. Spinella-Jaegle S, Rawadi G, Kawai S, Gallea S, Faucheu C, Mollat P, et al. Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *J Cell Sci*. 2001;114: 2085–2094. doi:10.1242/JCS.114.11.2085
233. James AW, Leucht P, Levi B, Carre AL, Xu Y, Helms JA, et al. Sonic Hedgehog influences the balance of osteogenesis and adipogenesis in mouse adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng Part A*. 2010;16: 2605–2616. doi:10.1089/TEN.TEA.2010.0048
234. Vanderlaan G, Tyurina O V., Karlstrom RO, Chandrasekhar A. Gli function is essential for motor neuron induction in zebrafish. *Dev Biol*. 2005;282: 550–570. doi:10.1016/j.ydbio.2005.04.010
235. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002;109: 1125. doi:10.1172/JCI15593
236. Liu H, Xu Y, Wang Y, Zhong S, Wang M, Lin P, et al. Cd36 is a candidate lipid sensor involved in the sensory detection of fatty acid in zebrafish. *Physiol Behav*. 2017;182: 34–39. doi:10.1016/j.physbeh.2017.09.015

237. Zhang JF, Choi SH, Li Q, Wang Y, Sun B, Tang L, et al. Overexpression of DGAT2 Stimulates Lipid Droplet Formation and Triacylglycerol Accumulation in Bovine Satellite Cells. *Animals*. 2022;12: 1847. doi:10.3390/ANI12141847/S1
238. Taxiarchis A, Mahdessian H, Silveira A, Fisher RM, Van'T Hooft FM. PNPLA2 influences secretion of triglyceride-rich lipoproteins by human hepatoma cells. *J Lipid Res*. 2019;60: 1069. doi:10.1194/JLR.M090928
239. Landgraf K, Schuster S, Meusel A, Garten A, Riemer T, Schleinitz D, et al. Short-term overfeeding of zebrafish with normal or high-fat diet as a model for the development of metabolically healthy versus unhealthy obesity. *BMC Physiol*. 2017;17: 1–10. doi:10.1186/S12899-017-0031-X,
240. Tanaka M, Murakami K, Ozaki S, Imura Y, Tong XP, Watanabe T, et al. DIP2 discointeracting protein 2 homolog A (*Drosophila*) is a candidate receptor for follistatin-related protein/follistatin-like 1 - Analysis of their binding with TGF- $\beta$  superfamily proteins. *FEBS Journal*. 2010;277: 4278–4289. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07816.x
241. Lake D, Corrêa SAL, Müller J. Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73: 4397. doi:10.1007/S00018-016-2297-8
242. Avasthi P, Marley A, Lin H, Gregori-Puigjane E, Shoichet BK, Von Zastrow M, et al. A chemical screen identifies class a g-protein coupled receptors as regulators of cilia. *ACS Chem Biol*. 2012;7: 911–919. doi:10.1021/CB200349V
243. Wang S, Wei Q, Dong G, Dong Z. ERK-mediated suppression of cilia in cisplatin-induced tubular cell apoptosis and acute kidney injury. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832: 1582–1590. doi:10.1016/J.BBADIS.2013.05.023
244. Dougherty LL, Dutta S, Avasthi P. The ERK activator, BCI, inhibits ciliogenesis and causes defects in motor behavior, ciliary gating, and cytoskeletal rearrangement. *Life Sci Alliance*. 2023;6. doi:10.26508/LSA.202301899

245. Liu Y, Wei J, Zhao Y, Zhang Y, Han Y, Chen B, et al. Follistatin-like protein 1 promotes inflammatory reactions in nucleus pulposus cells by interacting with the MAPK and NF $\kappa$ B signaling pathways. *Oncotarget.* 2017;8: 43023–43034. doi:10.18632/ONCOTARGET.17400
246. Zhang W, Wang W, Liu J, Li J, Wang J, Zhang Y, et al. Follistatin-like 1 protects against hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Scientific Reports* 2017 7:1. 2017;7: 1–14. doi:10.1038/srep45820
247. Cheng KY, Liu Y, Han YG, Li JK, Jia JL, Chen B, et al. Follistatin-like protein 1 suppressed pro-inflammatory cytokines expression during neuroinflammation induced by lipopolysaccharide. *J Mol Histol.* 2017;48: 63–72. doi:10.1007/S10735-016-9706-Z
248. Fang D, Shi X, Jia X, Yang C, Wang L, Du B, et al. Ups and downs: The PPAR $\gamma$ /p-PPAR $\gamma$  seesaw of follistatin-like 1 and integrin receptor signaling in adipogenesis. *Mol Metab.* 2022;55. doi:10.1016/j.molmet.2021.101400
249. Kim SW, Muise AM, Lyons PJ, Ro HS. Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation. *J Biol Chem.* 2001;276: 10199–10206. doi:10.1074/JBC.M010640200
250. Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR $\gamma$ . *Science.* 1996;274: 2100–2103. doi:10.1126/SCIENCE.274.5295.2100
251. Prusty D, Park BH, Davis KE, Farmer SR. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and C/EBP $\alpha$  gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 2002;277: 46226–46232. doi:10.1074/JBC.M207776200
252. Kim HJ, Kang WY, Seong SJ, Kim SY, Lim MS, Yoon YR. Follistatin-like 1 promotes osteoclast formation via RANKL-mediated NF- $\kappa$ B activation and M-CSF-induced

precursor proliferation. Cell Signal. 2016;28: 1137–1144.  
doi:10.1016/J.CELLSIG.2016.05.018

253. Deng X, Yang Y, Sun H, Qi W, Duan Y, Qian Y. Analysis of whole genome-wide methylation and gene expression profiles in visceral omental adipose tissue of pregnancies with gestational diabetes mellitus. Journal of the Chinese Medical Association. 2018;81: 623–630. doi:10.1016/J.JCMA.2017.06.027
254. Oelsner KT, Guo Y, To SBC, Non AL, Barkin SL. Maternal BMI as a predictor of methylation of obesity-related genes in saliva samples from preschool-age Hispanic children at-risk for obesity. BMC Genomics. 2017;18. doi:10.1186/S12864-016-3473-9
255. Liu H, Wen J, Tian X, Li T, Zhao J, Cheng J, et al. miR-125a-3p regulates the expression of FSTL1, a pro-inflammatory factor, during adipogenic differentiation, and inhibits adipogenesis in mice. FASEB Journal. 2023;37. doi:10.1096/FJ.202300851R,
256. Ugolini M, Vastenhoud NL. Maternally loaded RNAs: no time to die. Cell Res. 2022;32: 707–708. doi:10.1038/S41422-022-00670-6,
257. Fuentes R, Tajer B, Kobayashi M, Pelliccia JL, Langdon Y, Abrams EW, et al. The maternal coordinate system: Molecular-genetics of embryonic axis formation and patterning in the zebrafish. Curr Top Dev Biol. 2020;140: 341–389. doi:10.1016/BS.CTDB.2020.05.002
258. Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, Brand M, Van Eeden FJM, et al. Genes establishing dorsoventral pattern formation in the zebrafish embryo: the ventral specifying genes. Development. 1996;123: 81–93. doi:10.1242/DEV.123.1.81
259. Luo G, Hofmann C, Bronckers ALJJ, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. Genes Dev. 1995;9: 2808–2820. doi:10.1101/GAD.9.22.2808

260. Okabayashi K, Shoji H, Onuma Y, Nakamura T, Nose K, Sugino H, et al. cDNA cloning and distribution of the *Xenopus* follistatin-related protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254: 42–48. doi:10.1006/bbrc.1998.9892
261. Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Farber SA, et al. p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet.* 2007;3: 787–801. doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.0030078,
262. Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölder S, Krüger M, et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature.* 2015;524: 230–233. doi:10.1038/NATURE14580,
263. Salanga CM, Salanga MC. Genotype to phenotype: Crispr gene editing reveals genetic compensation as a mechanism for phenotypic disjunction of morphants and mutants. *Int J Mol Sci.* 2021;22. doi:10.3390/IJMS22073472,
264. Kok FO, Shin M, Ni CW, Gupta A, Grosse AS, van Impel A, et al. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev Cell.* 2015;32: 97–108. doi:10.1016/j.devcel.2014.11.018
265. El-Brolosy MA, Kontarakis Z, Rossi A, Kuenne C, Günther S, Fukuda N, et al. Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature.* 2019;568: 193–197. doi:10.1038/S41586-019-1064-Z,
266. Parker LH, Schmidt M, Jin SW, Gray AM, Beis D, Pham T, et al. The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation. *Nature.* 2004;428: 754–758. doi:10.1038/NATURE02416,
267. Hasumura T, Shimada Y, Kuroyanagi J, Nishimura Y, Meguro S, Takema Y, et al. Green tea extract suppresses adiposity and affects the expression of lipid metabolism genes in diet-induced obese zebrafish. *Nutr Metab (Lond).* 2012;9. doi:10.1186/1743-7075-9-73,

268. Meguro S, Hasumura T, Hase T. Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. *PLoS One*. 2015;10. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0120142,
269. David et al J, Justin David C, Rajapriya R, Veena V, Kumaresan G. High Cholesterol Diet Induces Obesity in Zebrafish. *Int J Adv Sci Eng.* 2016;2: 197. Available: [www.mahendrapublications.com](http://www.mahendrapublications.com)
270. Dai W, Wang K, Zheng X, Chen X, Zhang W, Zhang Y, et al. High fat plus high cholesterol diet lead to hepatic steatosis in zebrafish larvae: a novel model for screening anti-hepatic steatosis drugs. *Nutr Metab (Lond)*. 2015;12. doi:10.1186/S12986-015-0036-Z,
271. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*. 2007;15: 798–808. doi:10.1038/OBY.2007.608,
272. McMenamin SK, Minchin JEN, Gordon TN, Rawls JF, Parichy DM. Dwarfism and increased adiposity in the gh1 mutant zebrafish vizzini. *Endocrinology*. 2013;154: 1476–1487. doi:10.1210/EN.2012-1734,
273. Peng X, Shang G, Wang W, Chen X, Lou Q, Zhai G, et al. Fatty Acid Oxidation in Zebrafish Adipose Tissue Is Promoted by 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3. *Cell Rep.* 2017;19: 1444–1455. doi:10.1016/j.celrep.2017.04.066
274. Hawkins TA, Cavodeassi F, Erdélyi F, Szabó G, Lele Z. The small molecule Mek1/2 inhibitor U0126 disrupts the chordamesoderm to notochord transition in zebrafish. *BMC Dev Biol.* 2008;8: 42. doi:10.1186/1471-213X-8-42
275. Guo M, Wei H, Hu J, Sun S, Long J, Wang X. U0126 inhibits pancreatic cancer progression via the KRAS signaling pathway in a zebrafish xenotransplantation model. *Oncol Rep.* 2015;34: 699–706. doi:10.3892/OR.2015.4019,

## 8 Anexo

Trabajo en células

Nombre	Secuencia 5' -> 3'
<b>Stealth (#código)</b>	
hDIP2A (HSS118321)	UAGAGGUUCAUUCUUACUUGUCAGU
hFSTL1 (HSS117329)	AUUGAUGGCAGUUUCAUUCUGUUCC
Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Low GC Duplex	Secuencia no disponible- Número de catálogo #12935200
<b>Evaluación de la eficiencia de los knockdown</b>	
Hdip2a_F	GTGCTGCTTGTCACTGTGTA
Hdip2a_R	CAGCATCAAGTTACAAACCAGGA
hFSTL1 INT FWD	GGTGATTCTCGCCTGGACTCCAGTG
hFSTL1 INT REV	GGTTACAGTCCACCTCGGTCTCAGC
hactina_F	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
hactina_R	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

Trabajo en pez cebra

Nombre	Secuencia 5' -> 3'
<b>Morfolinos</b>	
fstl1a MOspl	ACTTTCTGCTTACCTCTGCATAGC
fstl1b MOspl	GGTTTGGTGTAACTTACCTCGGCAT
Standard MO	CCTCTTACCTCAGTTACAATTATA
<b>Evaluación de la eficiencia de los morfolinos</b>	
zfFstl1aMOsplFwd	GGACACGTTTCTATTATTGC
zfFstl1aMOsplRev	CTTCACATTGCGTGTG
zfFstl1bMOsplFwd	TTCCGGTGTACCCGTGTT
zfFstl1bMOsplRev	GCAGTGGTCCGGTATGTCT
zfGAPDHFwd	TTAAGGCAGAAGGCAGCAA
zfGAPDHRev	AAGGAGCCAGGCAGTTGGTG
<b>CRISPR/Cas9 para fstl1a</b>	
gRNAfstl1a_1	taatacgactcaataGGGAGCTGGAGAGAAATGTTtttagagctagaa
gRNAfstl1a_2	taatacgactcaataGGATGTTGGTCACAGAGAAgttttagagctagaa
<b>Cebadores genéricos para fstl1a</b>	
Crispr_DrFstl1a_Fwd	GGAGCCAAAGTCCAAACGTC
Crispr_DrFstl1a_Rv	GGCAACCCCTATTGGGAACG
<b>Cebadores alelos específicos para genotipado de KO fstl1a*</b>	
DrFstl1a_wt_Rv	TCTCTGTGACCGAACAA
DrFstl1a_mut_Rv	TCTCTGTGACCGAACAT
<b>qPCR</b>	
zfFstl1aFwd	TCCTTATGCCGAGGACGAGA
zfFstl1aRv	GGCACACTTCTCTCTGGAGG
zfFstl1bFwd	ATGACTTGTGATGAGAAAACCCC
zfFstl1bRv	CTCCTCTCGTCTCGGTCTG
zfZFP423Fwd	CTTCAAGTGTCCCGTCTGCT
zfZFP423Rv	TGTGGTTCTGGAGCTCAGTT
zfDlk1Fwd	AGTGTATCTGTGAGTCCGGC
zfDlk1Rv	TGGCAGAGAGATCCGTGAC

zfPPARg2Fwd	CTCTTATACACCTCAGCAGACCC
zfPPARg2Rv	CTGTAGTCGAGCGTGGAGAAG
zfPPARg1Fwd	GACCTTCAGGAGACGGTTCT
zfPPARg1Rv	GGCCTCGGTCTCCTCATCAT
zfCebpaFwd	AGTCGGGACAAGGCAGAAAAT
zfCebpaRv	TGAAGATGCCCGTAACGTC
zfFabp11aFwd	ACAGAAAGACCACGACTGTCA
zfFabp11aRv	TGAACTGAGCCTGGCATCTTC
zfAdipoqbFwd	CACTGAGGGAATCGAGGAGC
zfAdipoqbRv	TTTCTCCAGGGTCGCCCTTC
zfPln2Fwd	GCGTGCAAAGGACTTGATAAGATA
zfPln2Rv	CTTGGCACCGCTCACAGTC
Dr_ptch1_Fwd	CAAGGTCTTCCCAGCTACCC
Dr_ptch1_Rv	ATGAGGATGACGACAGGCAC
Dr_ptch2_Fwd	GAACACTCGTTCAGCCGTTG
Dr_ptch2_Rv	TATGGCCAGCACAGCAAAGA
Dr_gli1_Fwd	AAGAGTTGACACGCAGGAG
Dr_gli1_Rv	GCTCTCGGAACAGTCCTTC
zf_srebf1_Fwd	CCCGAAAGCATGTGTGAACG
zf_srebf1_Rv	CTGTCCTGGAACAGAACGCT
zf_LPL_Fwd	CTGGGAGAAAGACACGCTCA
zf_LPL_Rv	TCACCTCCACGGGAAAGGTA
zf_CD36_Fwd	GGTCGGAATGAACCCCCACT
zf_CD36_Rv	TGTCCATCCGGGAAATCAGC
zf_DGAT2_Fwd	TGAAGAAGGGCTTGGTGGC
zf_DGAT2_Rv	CTATGACGTCCTGAGTCGGC
zf_PNPL2_Fwd	GGAGAGGCGGAGTCTTCTTC
zf_PNPL2_Rv	CACATCCAGCTGACACGACA
ef1a Fw	CTACCTACCCCTCTTGGTCG
ef1a Rev	ACACGCCGCAACCTTGAA
rpl13a Fw	TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC
rpl13a Rev	ACACGCACAATCTGAGAGCAG

Tabla 5. Secuencia de cebadores, morfolinos, guías y stealth empleados en este trabajo. \* (**cebadores alelo específicos, utilizados en combinación con Crispr\_DrFstl1a\_Fwd**)