



Rol de la proteína DBC1 en la fisiopatología vascular y renal durante la hipertensión

Tesis de doctorado en ciencias médicas. Programa para la Investigación Biomédica (Proinbio)

Institut Pasteur de Montevideo

Presentada por Msc. Laura Colman

Tutor: Dr. Carlos Escande. Institut Pasteur Montevideo

Cotutora: Dra. Paola Contreras, Universidad de la República

Diciembre 2020

Índice

Lista de Figuras.....	3
Lista de Abreviaturas.....	5
Agradecimientos.....	8
Dedicatoria.....	9
Resumen.....	10
Introducción.....	12
Contexto actual de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT).....	12
La Hipertensión Arterial (HTA). Prevalencia, concepto y clasificación.....	15
Mecanismos responsables de regular la Presión Arterial (PA).....	16
Señalización celular mediada por los componentes del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) en el sistema cardiovascular. Rutas canónica y no canónica.....	24
Fisiopatología de la ANG II a nivel vascular.....	29
Efectos fisiológicos y fisiopatológicos de la ANG II a nivel renal.....	31
Impacto de la HTA sobre el sistema vascular. Concepto y fisiopatología del proceso de remodelación vascular.....	33
Enfermedades vasculares vinculadas con el desarrollo de la HTA.....	40
Modelos animales para el estudio de la hipertensión arterial (HTA) y disecciones aórticas (AD).....	44
Histonas desacetilasas (HDACs) y su rol en la HTA y aortopatías.....	49
DBC1: un regulador epigenético de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT).....	53
DBC1 y la regulación del ciclo celular.....	56
Hipótesis.....	58
Objetivos.....	58
Materiales y métodos.....	59
Resultados y Discusión.....	70
Conclusiones.....	120
Perspectivas.....	121
Bibliografía.....	124

Anexos I.....	150
Anexos II.....	151

Lista de figuras

Figura 1. Distribución mundial de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT).....	13
Figura 2. Porcentajes del número de muertes a nivel mundial por enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT o NCD en inglés), incluyendo ambos sexos y todas las edades, para el año 2016.....	14
Figura 3. Porcentajes del número de muertes en Uruguay por las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT o NCD en inglés), incluyendo ambos sexos y todas las edades, para el año 2016.....	14
Figura 4. Principales funciones del sistema neuroendocrino, en la regulación de la presión arterial.....	17
Figura 5. Elementos de las vías clásica y no clásica del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS).....	23
Figura 6. Transducción de la señalización clásica de la ANG II.....	26
Figura 7. Lista de Serinas/treoninas y tirosinas quinasas, activadas por el AT1R.....	26
Figura 8. Cambios que ocurren durante el proceso de remodelación vascular.....	36
Figura 9. Distintas patologías asociadas con los tipos de remodelado vascular.....	37
Figura 10. Las Disecciones Aórticas (AD) son causadas por una perfusión de sangre hacia la media, por una lesión en la íntima (a), o en los vasa vasorum de la adventicia (b).....	42
Figura 11. Clasificación de las Disecciones Aórticas (AD).....	43
Figura 12. Esquema de la estructura de DBC1.....	54
Figura 13. La ANG II induce hipertensión en ratones WT y DBC1 KO.....	71
Figura 14. La ausencia de DBC1 incrementa la incidencia de disección aórtica (AD), en respuesta a un tratamiento con ANG II.....	76
Figura 15. La formación de disección aórtica (AD) es independiente de la hipertensión arterial.....	79
Figura 16. La ausencia de DBC1 incrementa la expresión de MMP9 en presencia de ANG II, y este aumento es mayor en los ratones que forman disección aórtica (AD).....	81
Figura 17. La ausencia o disminución transitoria de la expresión de DBC1 en células musculares lisas vasculares (VSMC), incrementa la expresión de marcadores de disección aórtica (AD).....	84
Figura 18. El incremento de la expresión de marcadores de disección aórtica (AD) promovidos por la disminución de la expresión transitoria de DBC1 en las VSMC, es	

independiente de la interacción de DBC1 con sus principales blancos moleculares.....	85
Figura 19. La ausencia de DBC1 conlleva a una pérdida en el recambio de colágeno y a una defectuosa tasa de proliferación a nivel vascular, en respuesta a la hipertensión promovida por la ANG II.....	88
Figura 20. La ANG II promueve el recambio de los elementos de la ECM sólo en animales WT.....	89
Figura 21. Células quiescentes expresan de forma dinámica una forma de DBC1 de menor peso molecular.....	94
Figura 22. Las células musculares lisas vasculares (VSMC) provenientes de aortas de ratones DBC1 KO, presentan un retraso en la proliferación celular <i>in vitro</i>	95
Figura 23. Los ratones WT muestran mayor albuminuria y creatinemia como producto del proceso de HTA promovido por la ANG II.....	99
Fig. 24. La ausencia de DBC1 protege en contra de la hipertrofia glomerular y la hiperplasia renal.....	102
Fig. 25. La ausencia de DBC1 protege contra la fibrosis renal.....	103
Figura 26. La expresión de DBC1 a nivel renal incrementa durante la hipertensión arterial promovida por la ANG II.....	105
Figura 27. El tratamiento con ANG II induce la expresión de marcadores de fibrosis, <i>in vitro</i> , y este efecto es contrarrestado por la disminución transitoria en la expresión de DBC1.....	107
Figura 28. Modelo propuesto de la acción mediada por DBC1 a nivel vascular, durante la hipertensión.....	118

Lista de Abreviaturas

AAA: Aneurisma aórtico abdominal

ACE: Enzima convertidora de angiotensina, del inglés, angiotensin converting enzyme

AD: Disección aórtica, del inglés, aortic dissection

ANG II: Angiotensina II

APO: Apolipoproteína

α SMA: Proteína alfa actina de músculo liso, del inglés alpha smooth muscle actin

AT1R: Receptor de Angiotensina tipo 1

BAPN: β -aminopropionitrilo

BrdU: 5 Bromo-2'-deoxiuridina

CE: Células endoteliales

CDKs: Proteínas quinasas dependientes de ciclinas, del inglés, cyclin dependent kinase

DBC1: Deleted in breast cancer 1

DOCA: Acetato de deoxicorticosterona, del inglés, deoxycorticosterone acetate

ECM: Matriz extracelular, del inglés, extracellular matrix

ECNT: Enfermedades crónicas no transmisibles

EGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial, del inglés, epidermal growth factor receptor

ER: Retículo endoplasmático, del inglés, endoplasmic reticulum

ET-1: Endotelina 1

FBS: Suero fetal bovino, del inglés, fetal bovine serum

HAT: Histonas acetiltransferasas

HDAC: Histonas desacetilasas

HFD: Dieta con un alto contenido de grasas, del inglés high fat diet

HK2: Células epiteliales de túbulo proximal renal humanas

HTA: Hipertensión arterial

IF: inmunofluorescencia

IFN- γ : Interferón gamma

IMH: Hematoma intramural, del inglés, intramural hematoma

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible, del inglés inducible nitric oxide synthase

IP: Ioduro de propidio

IPMON: Institut Pasteur de Montevideo

K+: Potasio

KO: Knock out

MALAT1: Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1

MEFs: Células embrionarias de ratón

MMPs: Metaloproteinasas

MPAK: Proteínas quinasas activadas por mitógeno

MS: espectrometría de masa, del inglés, mass spectrometry

Na+: Sodio

NADPH: Nicotinamida adenosina dinucleótido fosfato

NAMPT: Nicotinamida fosforibosiltransferasa

NO: Óxido nítrico, del inglés, Nitric Oxide

OMS: Organización Mundial de la Salud

PA: Presión arterial

PAD: Presión arterial diastólica

PARP1: [poli(adenosina difosfato-ribosa) polimerasa]

PAS: Presión arterial sistólica

PNA: Péptido natriurético auricular

PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, del inglés, phosphoenolpyruvate carboxykinase

PPE: Elastasa pancreática porcina, del inglés, elastase pancreatic porcine

RAAS: Sistema Renina -Angiotensina -Aldosterona, del inglés, Renin Angiotensin Aldosterone System

ROS: Especies reactivas del oxígeno, del inglés, Reactive Oxygen Species

SD: Sprague-Dawley

siRNA: RNA de interferencia

SIRT: Sirtuinas

SNA: Sistema nervioso autónomo

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso parasimpático

SNS: Sistema nervioso simpático

TFG: Tasa de filtración glomerular

TGF β : Factor de crecimiento transformante beta, del inglés transforming growth factor beta

TIMP: Inhibidores endógenos de metaloproteinasas

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés, tumoral necrosis factor alpha

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés, vascular endothelial growth factor

VSMC: Células musculares vasculares lisas, del inglés, vascular smooth muscle cells

WT: Wild type

WB: Western Blot

Agradecimientos

A Carlos Escande por haberme dado la oportunidad de integrarme en su equipo de laboratorio, y haber aceptado ser mi tutor, velando siempre por mi bienestar, transmitiendo sus conocimientos, exigiendo siempre lo mejor de mí y dándome libertad para plasmar mis ideas y llevarlas a cabo.

A Paola Contreras por haberme aceptado como cotutora, siempre dispuesta a colaborar, enseñando y guiándome en el manejo de nuevas técnicas de laboratorio, y viendo siempre las cosas positivas aun cuando estas no fueron muy obvias.

A mis compañeros de laboratorio, Mariana Bresque, Leonardo Santos, María Caggiani, Aldo Calliari, Alejandro Leyva, Jorge y Alejandro Rodríguez, Rosina Dapuetto, Germán Galliussi, Karina Cal, Adriana Carlomagno y muchos otros compañeros "de pasillo", con los cuales compartía el día a día, y vivimos muchas alegrías pero también algunas frustraciones.

Al Institut Pasteur del cual me considero un miembro más, por la forma de integración e inclusión que tiene. Partiendo de la base de que el trabajo interdisciplinario es la clave del éxito.

A las agencias financiadoras y de posgrado, ANII-INNOVA, CAP, PROINBIO, CABBIO y FOCEM, las cuales garantizaron el financiamiento de mi beca de doctorado y permitieron que se pudiera llevar a cabo este proyecto.

Dedicatoria

A mi familia por acompañarme y apoyarme en todo momento a lo largo de este pasaje.

A Héctor por su paciencia, y apoyo incondicional.

A mis amigos y ex tutores que despertaron en mí el deseo de continuar formándome en el área científica, la cual se convirtió en mi pasión. En especial a Pimali Felibertt, quién fue no sólo una amiga sino un pilar fundamental en mi formación como científica. Lamentablemente tuvo que partir luego de haber sufrido un aneurisma cerebral y haber batallado hasta el final como una gran guerrera.

A todos, mi más profundo agradecimiento.

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son un conjunto de patologías no infecciosas de larga duración y generalmente de lento progreso dentro de las cuales destacan las enfermedades cardiovasculares, que representan la principal causa de muerte en la población adulta, tanto en nuestro país como a nivel mundial. Dentro de estas últimas, la hipertensión arterial (HTA) es especialmente relevante, ya que constituye el principal factor de riesgo de accidentes cerebrovasculares y cardiopatía isquémica. La HTA promueve cambios estructurales y funcionales a nivel de los vasos, un proceso conocido como remodelación vascular, en el cual ocurre una pérdida del tono vascular y un aumento en el grosor de la pared, eventos que culminarán en una injuria vascular, aumentando el riesgo de padecer de síndromes aórticos agudos, como la disección aórtica (AD). La ANG II es el principal péptido conocido hasta ahora, responsable de mediar a través de su interacción con el receptor AT1R, los efectos deletéreos causados durante la HTA, como la inflamación, producción de especies reactivas de O₂, exacerbada actividad de las metaloproteinasas (MMPs), en especial la MMP9 y la MMP2, hiperplasia, migración, fibrosis y apoptosis.

DBC1 es una proteína nuclear que modula la actividad biológica de diversos factores de transcripción y reguladores epigenéticos. A través de estos, modula procesos de supervivencia, apoptosis y metabolismo energético. En relación con este último, se ha reportado que la ausencia de DBC1 promueve un fenotipo de "obesidad saludable" en ratones que han recibido una dieta con un alto contenido calórico, debido a que a pesar que ganan un mayor peso con respecto a los animales WT, presentan mayor sensibilidad a la insulina, mejor perfil lipídico, y protección contra la aterosclerosis. Esta protección vascular observada en los ratones KO para DBC1 ocurre como un efecto secundario a la acumulación de grasa en el tejido adiposo y no a un efecto local en la vasculatura. No existían hasta la fecha evidencias de una participación directa de DBC1 en la fisiología cardiovascular. Es por ello que nos planteamos estudiar el rol de DBC1 en la fisiopatología vascular y renal durante la HTA inducida por ANG II.

A nivel vascular, evidenciamos que la ausencia de DBC1 promueve una mayor susceptibilidad al desarrollo de AD en respuesta a ANG II. Este fenómeno fue independiente de los niveles de presión arterial ya que se evidenció incluso antes del desarrollo de HTA. A nivel del mecanismo, detectamos elevados niveles de expresión de marcadores aneurismales como MMP9, MMP2 y VEGF, con respecto a los animales WT. Asimismo, la ausencia de DBC1 tuvo como consecuencia el retraso del proceso de hiperplasia vascular, destacando la participación de las VSMC en este proceso, y por tanto, al aumento de la fragilidad del vaso. Todos estos resultados fueron corroborados a nivel *in vitro*, utilizando cultivos de VSMC, extraídas de explantos de aortas abdominales de ratones WT o DBC1 KO. A nivel renal, si bien sólo se hizo una exploración primaria de los procesos de proliferación y fibrosis, debido a que el modelo de HTA empleado no desencadena un daño renal crónico, por la cepa de ratón utilizada, los ratones DBC1 KO mostraron menores niveles de albuminuria, no presentaron hiperplasia ni padecieron de fibrosis túbulointersticial, comparados con los animales WT en las mismas condiciones experimentales. A nivel *in vitro* se pudo constatar que frente a un estímulo con ANG II, el silenciamiento transitorio de DBC1 atenuaba el incremento de marcadores de fibrosis observados en las células control.

Si bien las acciones de DBC1 no se estarían ejerciendo de manera directa por su interacción con sus principales interactores como SIRT1 y HDAC3, se abre un camino de estudio no sólo para determinar el posible impacto de DBC1 sobre la fisiopatología vascular y renal, sino para que pueda ser utilizado como un marcador de prognosis y hasta incluso como un blanco terapéutico.

Contexto actual de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT).

Las ECNT son un conjunto de patologías no infecciosas de larga duración y generalmente de lento progreso, entre las cuales destacan, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes y la insuficiencia respiratoria crónica ¹. Los factores de riesgo pueden clasificarse como no modificables, los cuales están relacionados con la edad, sexo y causas hereditables; modificables, causados por altos consumos de sal, alcohol y tabaco, e inactividad física, y por último, fisiológicos, causados por desórdenes metabólicos como el sobrepeso y elevados niveles de glucosa y de presión arterial (PA) ².

Las ECNT representan la principal causa de muerte en la población adulta a nivel mundial ². Para el 2016, las mismas causaron el 71% de muertes en todo el mundo, lo que equivale a 41 millones de personas, principalmente en aquellos países en vías de desarrollo ². En términos económicos las ECNT tienen un fuerte impacto sobre el sistema de salud público debido a los costos que generan, por la morbilidad y discapacidad física a nivel mundial que producen ³ (ver figura 1 por distribución mundial y figura 2 por el porcentaje de mortalidad de las ECNT).

Cabe destacar que la principal causa de fallecimientos de las ECNT se debe a las enfermedades cardiovasculares, con un 31% ² de muertes a nivel mundial (figura 2), siendo la hipertensión arterial (HTA) la enfermedad que cobra más vidas ⁴. La prevalencia de la HTA a nivel mundial para el 2015 fue de un 20%, tanto en hombres como en mujeres, y de acuerdo al boletín publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2019, se estima que existen unos 1130 millones de personas con HTA ⁵.

Asimismo, según datos reportados por la OMS para el 2016, las enfermedades cardiovasculares también fueron la principal causa de muerte en Uruguay, lo que corresponde en un 28% de decesos ² (figura 3). En este sentido, el Ministerio de Salud Pública para el 2017, estableció que la prevalencia de la HTA era de un 9% en edades comprendidas entre 15-24 años, y este valor incrementaba a un 37% cuando el grupo

etario se situaba entre 25-64 años ⁶. El mayor problema de la HTA es que cursa como una enfermedad silente, y la mayoría de las personas desconocen su condición, lo que trae complicaciones a futuro por no recibir un tratamiento a tiempo ⁷.

La HTA representa un problema creciente también en niños de nuestro país. Un estudio publicado en el año 2018 evaluó una población infantil proveniente de distintas escuelas públicas, cuyas edades estaban comprendidas entre 10 y 13 años, reportando no sólo una incidencia de un 7.8% de HTA indistintamente del sexo, sino una relación entre el sobrepeso y obesidad con el desarrollo de la HTA ⁸.

En base a que existen factores conductuales que predisponen al desarrollo de ECNT, los mismos pueden ser modificables. En ese sentido, los países miembros de la OMS acordaron una serie de objetivos para ser alcanzados en el 2025, con la intención de disminuir la incidencia de las ECNT. Entre algunos de estos objetivos planteados destacan: la disminución de un 10% en el consumo de alcohol, reducción de un 30% del consumo de sodio en las comidas, y la reducción del consumo de tabaco, así como incentivar a la población a que realice actividades físicas y consuma un mayor porcentaje de vegetales y frutas, en vez de alimentos con alto contenido de azúcares y grasas saturadas ⁹.

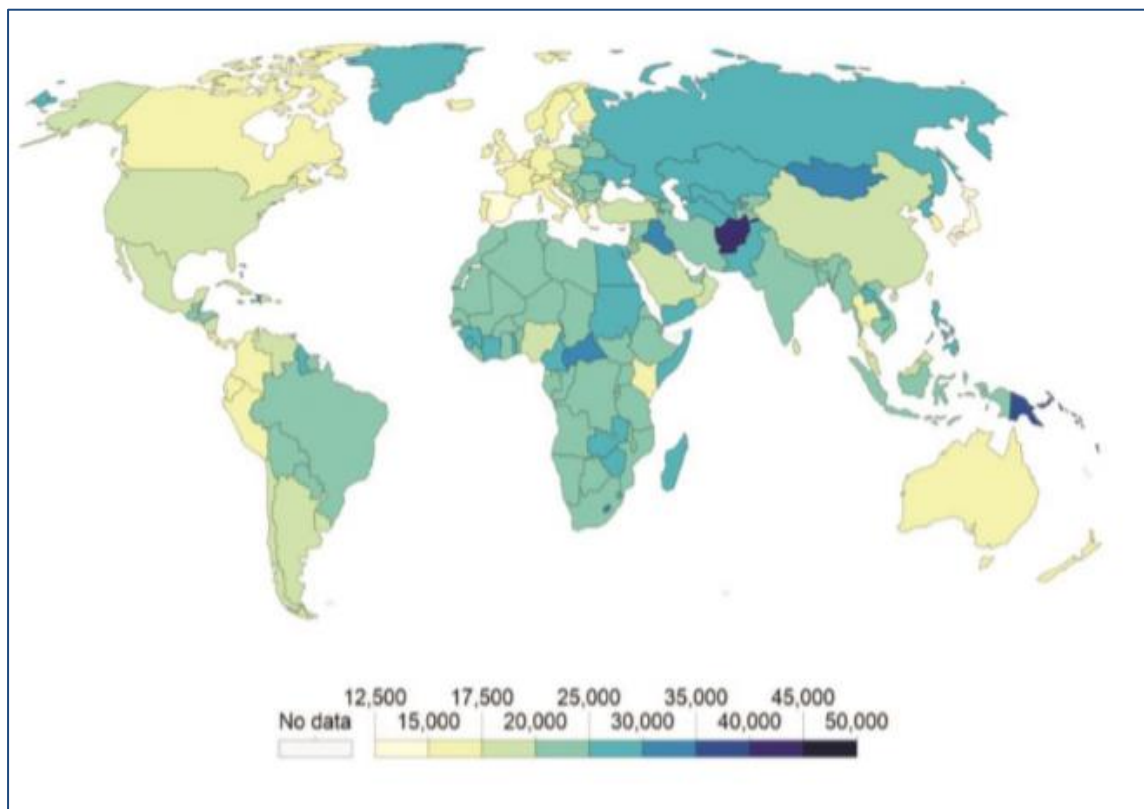


Figura 1. Distribución mundial de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) para el año 2017. Número de casos por cada 100.000 habitantes (ambos sexos) ¹.

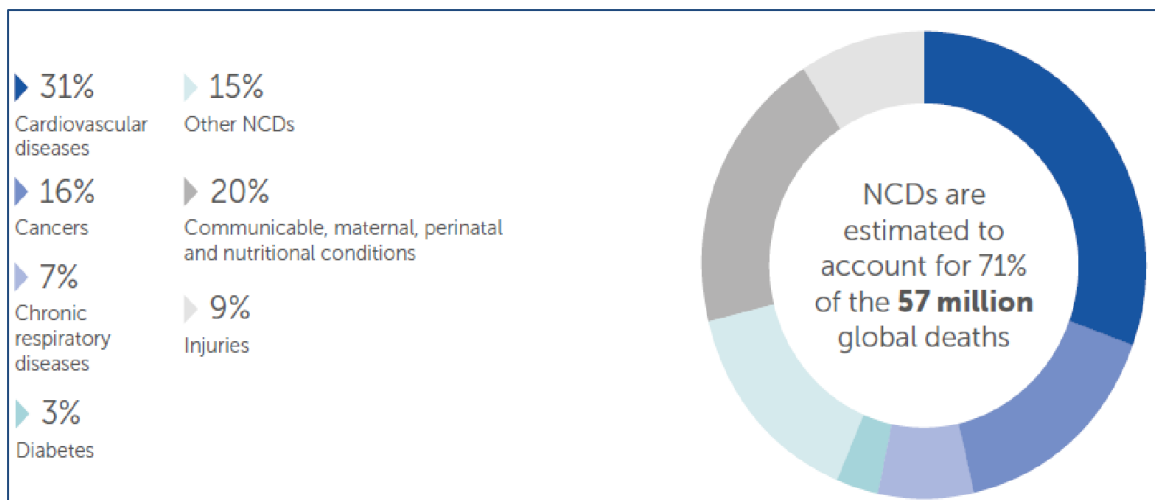


Figura 2. Porcentajes del número de muertes a nivel mundial por enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT o NCD en inglés), incluyendo ambos sexos y todas las edades, para el año 2016 ².

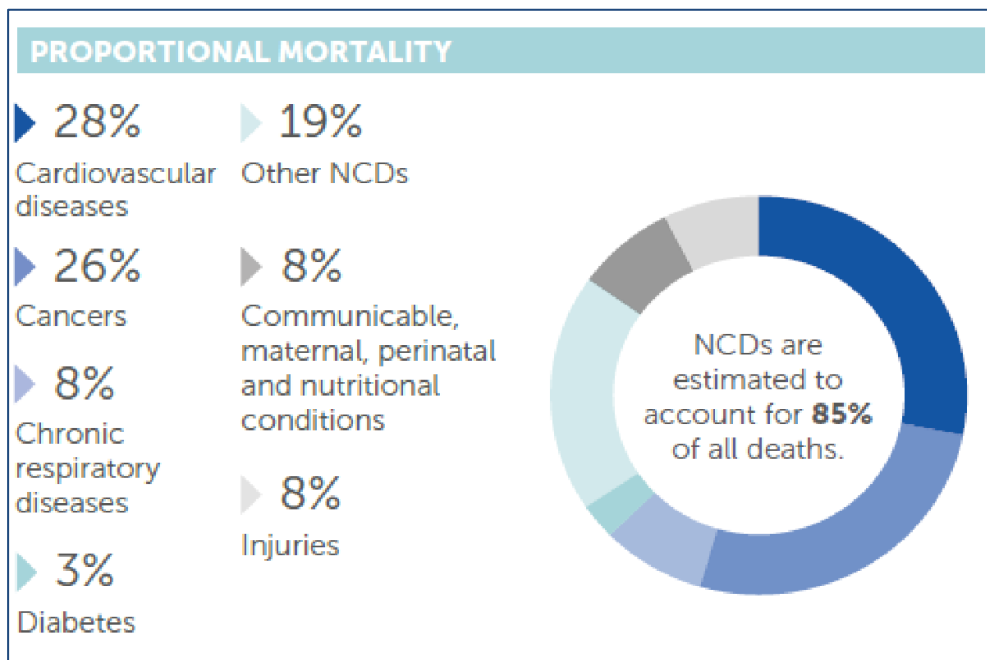


Figura 3. Porcentajes del número de muertes en Uruguay por las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT o NCD en inglés), incluyendo ambos sexos y todas las edades, para el año 2016 ².

La Hipertensión Arterial (HTA). Prevalencia, concepto y clasificación.

De acuerdo al concepto que establece la OMS, las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de patologías que afectan el funcionamiento del corazón y el sistema circulatorio. Como ejemplos de algunas de estas enfermedades tenemos a la HTA, las cardiopatías coronarias, la insuficiencia vascular periférica, entre otras ¹⁰. Asimismo, existen otras patologías que predisponen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la obesidad y la diabetes mellitus ³.

La HTA es la principal enfermedad cardiovascular responsable del padecimiento de muertes prematuras, ya que se considera una enfermedad silenciosa. Además, es un factor de riesgo para otras enfermedades tales como; infarto agudo al miocardio, accidente cerebrovascular hemorrágico o isquémico, insuficiencia cardíaca e insuficiencia renal crónica ¹¹, aneurismas ¹² y disecciones aórticas ¹³.

Prevalencia de la Hipertensión Arterial (HTA).

De acuerdo a datos de la OMS, 1 de cada 4 hombres y 1 de cada 5 mujeres, mayores de 18 años, sufren de HTA ¹. Para el 2015 la prevalencia de la HTA alcanzaba 30-45% a nivel mundial ⁸, y se estima que para el año 2025 más de 1500 millones de adultos sean afectados por esta patología ⁷. Asimismo, la OMS estima que el 54% de infartos y el 47% de casos de isquemia cardíaca son una consecuencia directa de la HTA, convirtiéndose la misma en el primer factor de morbimortalidad de las enfermedades cardiovasculares ¹⁴.

Concepto, clasificación y causas de la HTA. Mecanismos implicados en orquestar su desarrollo.

La presión arterial (PA) se define como la fuerza que ejerce la sangre proveniente del corazón contra las paredes de los vasos sanguíneos y está determinada por la presión arterial sistólica (PAS, presión ejercida sobre la pared arterial cuando ocurre una contracción cardíaca), y la presión arterial diastólica (PAD, relajación cardíaca) ¹¹. Un incremento sostenido de la PA en el tiempo, se considera HTA y es causada por una elevación del gasto cardíaco y/o de la resistencia vascular periférica ¹⁵.

Existen dos criterios para determinar el punto de corte de la HTA. Por un lado, la Asociación de Cardiología Europea, establece valores de PA \geq 140/90 mmHg (sistólica/diastólica respectivamente), y tres niveles de HTA, los cuales se citan a continuación ⁸.

Grado 1: 140-159 y/o 90-99 mmHg

Grado 2: 160-179 y/o 100-109 mmHg

Grado 3: ≥ 180 y/o ≥ 110 mmHg.

Por otro parte, el Colegio Americano de Cardiología, propone definir HTA cuando la PA es de 130/80 mmHg y establece dos estadios de HTA:

1: 130-139/80-89 mmHg

2: ≥ 140 y ≥ 90 mmHg ⁸.

En relación a las causas que predisponen al desarrollo de la HTA, se considera que la HTA puede ser primaria o esencial cuando existe un factor genético mientras que la HTA secundaria, puede desarrollarse como consecuencia de una enfermedad preexistente como el caso de obesidad, diabetes mellitus, feocromocitoma, enfermedades renales, aldosteronismo primario y el síndrome de Cushing. Además, la HTA puede ser ocasionada por factores ambientales y conductuales tales como alta ingesta de sodio, baja ingesta de potasio, alta ingesta de alcohol e inactividad física ⁹.

En el caso de las embarazadas, puede ocurrir una HTA gestacional ⁹. Además existe una alta probabilidad de desarrollar HTA durante la vejez, debido a la progresiva disfunción endotelial vascular, producto de la rigidez de los vasos sanguíneos, lo cual conlleva cambios en la remodelación de la vasculatura, que sentarán la base para el establecimiento de enfermedades del sistema cardiovascular ¹⁶.

Mecanismos responsables de regular la Presión Arterial (PA).

El mantenimiento de los niveles fisiológicos de la PA se lleva a cabo gracias a un sistema neurohumoral que trabaja de manera conjunta para garantizar su correcto funcionamiento. El mismo está conformado por: los péptidos natriuréticos, el endotelio, el Sistema Nervioso Simpático (SNS), el sistema inmune y el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS, por sus siglas en inglés), ¹¹ (ver figura 4 donde se esquematizan las funciones más importantes del sistema neuroendocrino en la regulación de la PA). Defectos en alguno de estos sistemas, determinan variaciones de PA, que de mantenerse en el tiempo pueden redundar en daños deletéreos sobre órganos vitales ¹¹.

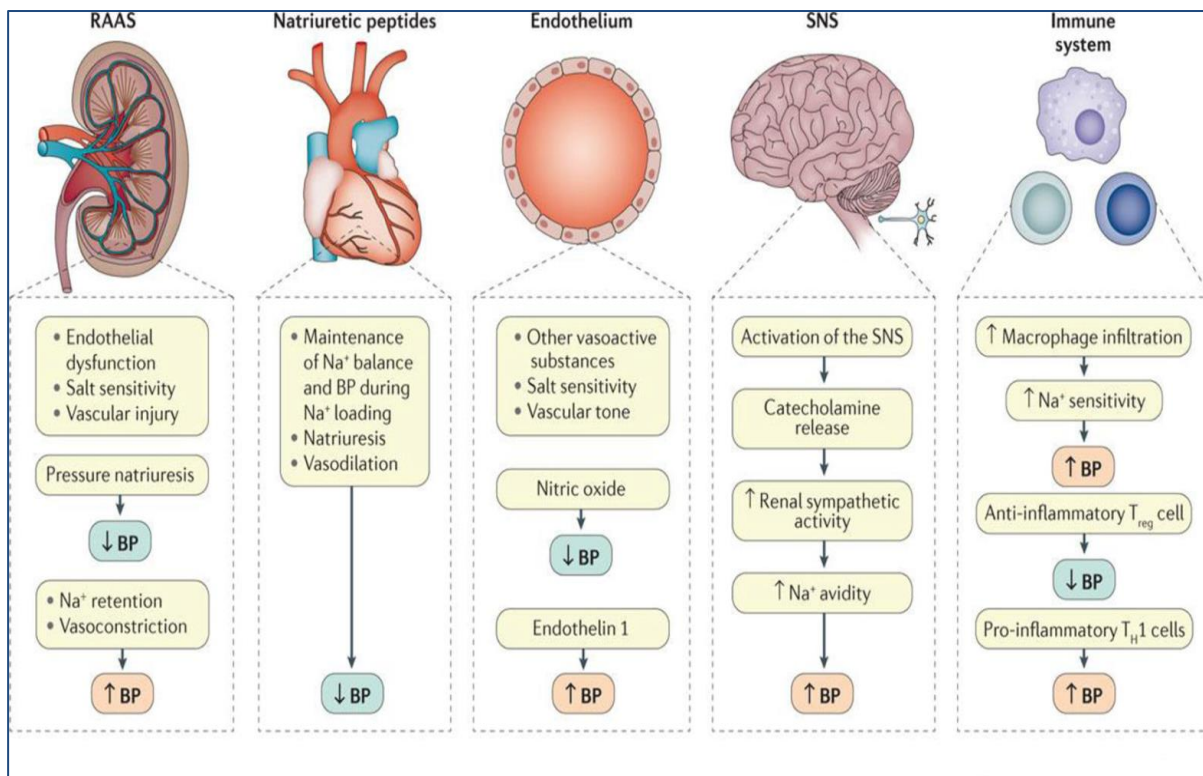


Figura 4. Principales funciones del sistema neuroendocrino, en la regulación de la presión arterial ¹¹.

A continuación se hará una descripción de cada uno de los mecanismos del sistema neuroendocrino.

Péptidos natriuréticos.

Los péptidos natriuréticos son un conjunto de hormonas secretadas principalmente por el corazón, para mantener la homeostasis de la PA y lo hacen por un lado promoviendo la natriuresis y kaliuresis (excreción de electrolitos Na⁺ y K⁺ respectivamente, por parte de los riñones), y por otro lado, promoviendo la liberación de sustancias vasodilatadoras, regulando de esta manera la volemia ¹⁷.

Entre ellos podemos citar al péptido natriurético auricular (PNA), liberado principalmente por las aurículas; el péptido natriurético B, liberado por los ventrículos (PNB) y el péptido natriurético tipo C, presente en el sistema nervioso central y en células endoteliales ¹⁷. A nivel renal, los péptidos natriuréticos incrementan la tasa de filtración glomerular por vía de la vasodilatación de la arteriola aferente, e inhiben la reabsorción de Na⁺ por un lado, por disminución de la actividad de la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa y el cotransportador de sodio-glucosa en el túbulo proximal, y por inhibición del canal de Na⁺

de la nefrona distal. Por otro lado, los péptidos pueden inhibir la liberación de sustancias vasoactivas como la renina y aldosterona, regulando así la PA. Se ha determinado que la deficiencia en la producción o función de los péptidos natriuréticos puede promover el desarrollo de HTA ¹⁷.

El endotelio.

Las células endoteliales (CE) son la principal fuente de sustancias vaso reguladoras, siendo el óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés), la principal sustancia vasodilatadora liberada en respuesta al estrés generado por fluctuaciones en la velocidad del flujo sanguíneo, promoviendo la relajación de las células musculares lisas vasculares (VSMC, por sus siglas en inglés), a través de la activación de la enzima guanilato ciclasa y formación de la guanosina monofosfato cíclica ¹⁸. Se ha demostrado una reducción en los niveles de NO en pacientes hipertensos con respecto a pacientes sanos, resaltando la importancia del NO en la HTA ¹⁹.

Como contrapartida al efecto vasodilatador del NO, las CE pueden secretar endotelina 1 (ET-1) causando vasoconstricción por medio de la activación del receptor ET-A en la superficie de las VSMC ¹⁸. El rol de esta sustancia vasoactiva ha sido demostrado por medio del uso de un antagonista del ET-A, en pacientes hipertensos, en los cuales hubo una disminución significativa en sus valores de PA, con lo cual este sistema ET-1–ET-A es otro blanco de estudio para el tratamiento de la HTA ²⁰.

Se ha determinado que la disfunción endotelial es un paso previo a la patogénesis de la HTA, debido a que la pérdida del tono vascular como producto de la rigidez de los vasos sanguíneos durante la HTA, promueve la liberación por parte del endotelio de sustancias que favorecen el estrés oxidativo y la inflamación, y disminuyen la producción de sustancias vasodilatorias como el NO ¹⁸.

El sistema nervioso simpático (SNS).

El sistema nervioso simpático (SNS) y parasimpático (SNP) pertenecen al sistema nervioso autónomo (SNA). El SNS actúa como un mecanismo de respuesta rápida ante un descenso repentino de la PA, provocando vasoconstricción de los vasos sanguíneos gracias al estímulo que recibe de unas terminaciones nerviosas, llamadas barorreceptores. Cuando ocurre un incremento en la PA, estos barorreceptores ubicados tanto en las arterias carótidas como en el cayado aórtico, se estiran y emiten una señal al sistema nervioso central (SNC), el cual a su vez responde disminuyendo la actividad del SNS para

que cese la vasoconstricción de arteriolas y vasos de mayor calibre, y activando al SNP. Como resultado final habrá un descenso de la PA gracias a la disminución de la resistencia vascular periférica y al gasto cardíaco ²¹.

El desbalance entre el SNS y el SNP predisponen al desarrollo de la HTA. Específicamente la hiperactividad del SNS es considerada un factor determinante en la generación de la HTA tanto en humanos como en modelos animales ²².

El sistema inmune.

Para que pueda darse la regulación de la PA es necesaria la participación de mecanismos fisiológicos que actúan en conjunto para tratar de mantener la homeostasis. Como veremos en detalle más adelante, existe una molécula llamada angiotensina II (ANG II), que forma parte de RAAS. Se ha reportado que durante la HTA promovida por la ANG II, se establece un ambiente inflamatorio originado por la activación del sistema inmune, tanto a nivel de la respuesta innata como adaptativa, que ocasiona la migración y acumulación de células leucocitarias sobre órganos vitales. La cascada de eventos que desencadena este sistema inmune no sólo repercute en un mayor aumento de la PA, sino que además con el tiempo, ocurrirá un deterioro en los principales órganos vitales ²³.

Citando algunos trabajos en esta línea, se reportó la importancia de la respuesta inmune innata utilizando un modelo de HTA inducido por ANG II, en ratones que tenían ausente el gen que codifica al factor de transcripción T-box en las células T, causando una disminución en la producción de interferón gamma (IFN- γ), en varias poblaciones celulares, en especial las células NK (natural killer). Este estudio demostró las acciones mediadas por las células NK a nivel vascular ²⁴. Además del IFN- γ , las células NK producen otros mediadores inflamatorios tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y el factor estimulante de colonias monocito-granulocito. Las acciones directas son la activación y maduración de monocitos a macrófagos, activación de células dendríticas, y producción de otros mediadores de inflamación tales como IL-12, IL-15 e IL-18 ²⁵. Toda esta cascada de citoquinas va a promover la disfunción endotelial, a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) dependientes de la activación de la enzima nicotinamida adenosina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, y por incremento en la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) ²⁴.

Se ha demostrado que tanto macrófagos, neutrófilos y monocitos están presentes en las placas de ateroma de animales ApoE^{-/-} infundidos con ANG II ²⁶. Wenzel y col. reportaron que la disminución de macrófagos y monocitos a nivel del tejido vascular, atenúan significativamente la respuesta a la HTA, a la disfunción vascular y al estrés oxidativo ²⁶.

La activación crónica del sistema inmune exagera la respuesta de estos mediadores inflamatorios observando por ejemplo a nivel de pequeñas arterias y arteriolas, la formación de una capa que subyace a la capa íntima del vaso, y causa un engrosamiento de esa pared y con ello una disminución del diámetro de su luz, promueve un estado de fibrosis vascular, y todo esto culmina en la pérdida de elasticidad de los vasos y con ello en un incremento en la resistencia vascular ¹¹.

A nivel renal, ha sido posible demostrar por medio de distintos abordajes experimentales, bien sea por el uso de ANG II, empleando dietas con alto contenido de sodio, o animales que experimenten de manera espontánea elevados niveles de PA, que durante el desarrollo de la HTA ocurre una infiltración de macrófagos y linfocitos a nivel de la corteza tubulointersticial ²⁷. Uno de los mecanismos por los cuales se estaría exacerbando la respuesta inmune a nivel renal es a través de la activación del inflammasoma, específicamente el NLRP3. En el caso de la HTA, este complejo es activado por la presencia de ROS y altas concentraciones de Na⁺, que van a promover su oligomerización, autoclivaje y activación de la caspasa 1, lo que conduce al clivaje de la pro-interleuquina 1 β a su forma activa, potenciando una respuesta inflamatoria. El uso de un inhibidor específico del inflammasoma NLRP3, empleado en un modelo de HTA, no sólo disminuye los valores de PA, sino que además reduce de manera significativa la producción de moléculas de adhesión y citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, junto con una reducción en la acumulación de macrófagos y linfocitos T ²⁸.

Se ha observado también que a nivel renal, las citoquinas afectan la función tubular, incrementando la síntesis local de productos del RAAS como la ANG II, potente regulador de la PA. Además de citoquinas, el sistema inmune induce la producción de metaloproteinasas (MMPs), que estimulan la degradación de componentes de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), y esta respuesta trae consigo una mayor infiltración de células del sistema inmune, generando apoptosis, síntesis exacerbada de colágeno y un respectivo daño tisular ¹¹. Por otra parte, también es crucial la participación

de la respuesta inmune adaptativa en la HTA, en la cual gran parte de células T CD4⁺ y CD8⁺ sintetizan citoquinas tales como IFN- γ , IL-17A, e IL-6²⁹.

Otro mediador clave en la activación de la inflamación, es el factor de transcripción NF κ B, que regula la expresión de múltiples componentes del sistema inmune. Estimula la producción de potentes citoquinas como IL-1, TNF α , quimioquinas y moléculas de adhesión³⁰, así como las enzimas ciclooxigenasa 2 e iNOS. Además puede actuar sobre el complejo de histocompatibilidad y sobre moléculas coestimuladoras, mediadores importantes de la respuesta inmune específica³¹. Por otra parte también actúa sobre la diferenciación y maduración de linfocitos, por medio de la producción de IL-12 e INF- γ . Por último NF κ B, puede regular la expresión de proteínas antiapoptóticas promoviendo el proceso de supervivencia³¹.

Un estudio realizado con la finalidad de medir el impacto de NF κ B en la respuesta de daño renal promovido por la HTA, utilizó el inmunosupresor ácido micofenólico como tratamiento, en ratas hipertensas. Los resultados mostraron una disminución significativa en la producción de NF κ B a nivel renal, así como de macrófagos y monocitos, comparados con los animales hipertensos que recibieron un placebo. Estos eventos observados en las ratas que recibieron el inmunosupresor coincidieron además con una disminución en los valores de PA, así como de los niveles de proteinuria, y no presentaron daño ni pérdida de función renal²⁷.

El Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS)

El Na⁺ es un electrolito que ejerce una importante función como determinante de la volemia, y por lo tanto, de la PA. Altas concentraciones del mismo promueven la retención de agua, incrementando la volemia y la PA. El RAAS tiene una función crítica en el manejo de la natriuresis y de la fisiología cardiovascular, por medio de la regulación de la PA y del balance electrolítico¹¹. Su función la lleva a cabo gracias a una cascada de eventos coordinados donde participan un conjunto de hormonas. La vía canónica del RAAS comienza con la síntesis de prorenina, en las células yuxtaglomerulares del riñón, con subsecuente clivaje de su péptido señal, convirtiéndose en la molécula biológicamente activa, renina y por otro lado, el angiotensinógeno, que es producido en el hígado. Ambas moléculas son secretadas hacia el intersticio, y un vez que pasan al torrente sanguíneo, la renina actúa sobre el angiotensinógeno generando el péptido inactivo ANG I, que por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) que se encuentra presente en las CE, se convierte en el péptido biológicamente activo, la ANG

II. Esta última ejerce la mayor parte de sus funciones por intermedio de su interacción y señalización mediada por el Receptor de Angiotensina tipo 1 (AT1R) ^{32,33}.

La ANG II es considerada una hormona con una vasta diversidad de funciones, sin embargo, su principal efecto es el de regular positivamente la PA, y lo hace por medio de dos mecanismos. Por un lado, promueve la vasoconstricción arteriolar a través de la contracción de las VSMC, y por el otro, estimula la secreción de aldosterona por parte de la corteza de la glándula suprarrenal para promover la retención de Na⁺ en los riñones ³³.

A partir de la ANG II y ANG I se generan otros productos, encargados de contrarrestar las acciones de la ANG II que serán explicados con mayor detalle más adelante.

La ANG II tiene una vida media corta. En la circulación es de 30 segundos, mientras que a nivel tisular puede mantenerse activa hasta los 30 minutos ³⁴. Sin embargo, a pesar de esta característica, la ANG II no sólo ejerce sus funciones de manera directa, sino que la misma puede convertirse en otros productos, por acción de diferentes enzimas, potenciando o contrarrestando su efecto³⁵. En la figura 5 se describen los distintos componentes del RAAS.

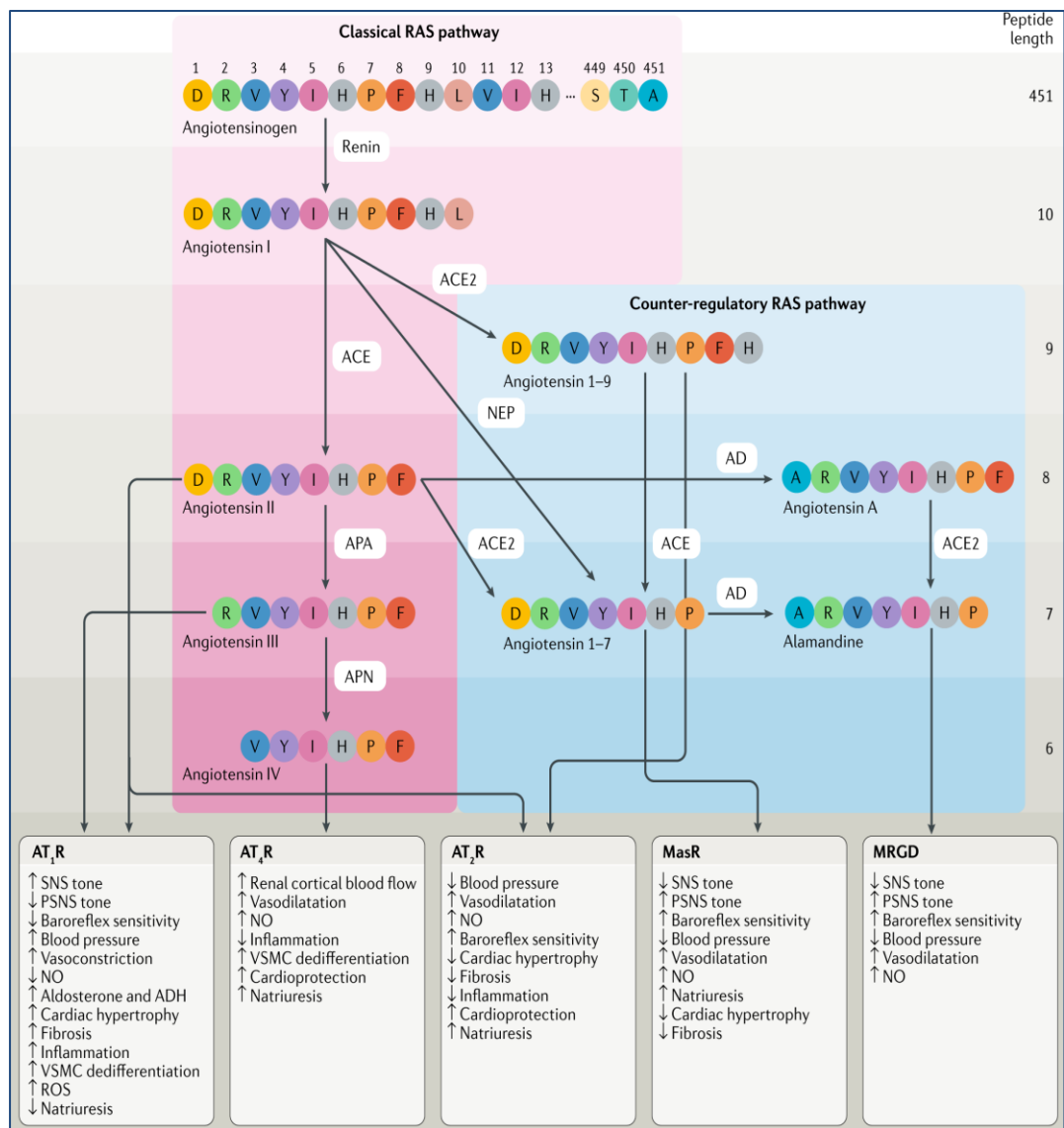


Figura 5. Elementos de las vías clásica y no clásica del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) ³⁵. Por la vía clásica se forma la ANG II por acción de ACE, ejerciendo sus acciones a través de su interacción con los receptores AT₁R y AT₂R. A su vez, la ANG II puede convertirse en la ANG III y ANG IV por acción de las enzimas Aminopeptidasa A (APA) y Alanil aminopeptidasa N (APN) respectivamente. Otros péptidos pueden generarse a partir de la ANG I con acciones opuestas a las de la ANG II. Por acción de la ACE2 se formará la ANG 1-9 y por acción de la Nefrilisina (NEP) se generará la ANG 1-7. Por último, otro producto derivado de la ANG II es la ANG A, que se forma por acción de la Aspartato descarboxilasa (AD), y a partir de ANG A se formará la Alamandina.

Señalización celular mediada por los componentes del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) en el sistema cardiovascular. Rutas canónica y no canónica.

Ruta canónica de RAAS mediada por el eje ANG II-AT1R.

El RAAS ha emergido como un blanco terapéutico ya que su actividad descontrolada promueve el desarrollo de patologías que van desde la aparición temprana de HTA, hasta el desarrollo de daño sobre órganos vitales como corazón, riñones y el sistema vascular ³⁵. La molécula que ha ganado la mayor atención dentro de este sistema es la ANG II, la cual ejerce a través de la vía del AT1R, una cascada de eventos que van a desencadenar el desarrollo de las patologías antes mencionadas. Por medio del uso de modelos experimentales en animales, sometidos a una infusión diaria con ANG II, así como empleando inhibidores tanto de la ACE responsable de su síntesis, o inhibidores del AT1R, se ha creado una línea terapéutica para el tratamiento de la HTA y enfermedades cardiovasculares ³³.

● **Receptor AT1R.**

Las principales acciones celulares mediadas por la ANG II, se deben en gran medida a su interacción con el AT1R, el cual es una proteína de 7 dominios transmembrana, perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteínas G ³². Está conformado por 359 aminoácidos y tiene un peso molecular de 41kDa. Algunos de los sitios de activación y unión entre el receptor y la ANG II ocurren entre la Phe8 y Tyr4 de la ANG II y la His226 y Asn111 del AT1R ³³. Este receptor está distribuido a lo largo del organismo desde el cerebro, corazón, riñones, hígado, glándulas suprarrenales y vasos sanguíneos, facilitando de esta manera las funciones mediadas por la ANG II ³⁶.

Dentro de los principales mecanismos de transducción llevados a cabo por el eje ANG II-AT1R, se encuentran:

1. La activación de la fosfolipasa C- β que actúa en la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-di-fosfato (PI[4,5]P2) generando los segundos mensajeros Ins(1,4,5)P3 y diacilglicerol, los cuales estimulan la liberación de Ca^{2+} de sus reservorios intracelulares y la activación de la proteína quinasa C, respectivamente, para de esta manera promover la contracción de la pared de los vasos sanguíneos ^{37,38}.

2. La activación de la fosfolipasas A2 y D, que estimulan la liberación del ácido araquidónico, siendo este último una molécula precursora necesaria para la formación de prostaglandinas ^{38,39}.
3. La inhibición de la enzima adenilato ciclasa que causa una disminución en la producción del nucleótido adenosin monofosfato cíclico (cAMP), el cual es un vasodilatador, favoreciendo de esta manera que ocurra el proceso de vasoconstricción ^{40,41}.
4. La activación de factores de crecimiento, y la fosforilación de tirosinas y fosfolipasa C- γ , que actúan sobre las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), Janus quinasas (JAK), así como proteínas transductoras de señal y activadores de la transcripción ⁴² incrementan la expresión de genes de respuesta temprana tales como c-fos, c-jun y c-myc, los cuales controlan los procesos de proliferación celular ⁴³.
5. Apertura de los canales de Ca^{2+} y la entrada de Ca^{2+} extracelular hacia las células de la corteza suprarrenal, lo que promueve la producción y secreción de aldosterona y subsecuente retención de Na^+ ⁴².
6. Activación de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa para la producción de las ROS que incluyen el superóxido y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ⁴⁴, entre otros.

La figura 6 ejemplifica las distintas vías de transducción activadas por la ANG II a través de su interacción con el AT1R. La figura 7 muestra la diversidad de proteínas quinasas intracelulares, de tipo receptores/no receptores de tirosina quinasas, y serinas/treoninas quinasas que van a controlar la activación específica de otras moléculas con la finalidad de desencadenar una respuesta celular, vinculada con procesos de hipertrofia, migración, contracción celular, apoptosis, entre otros ³².

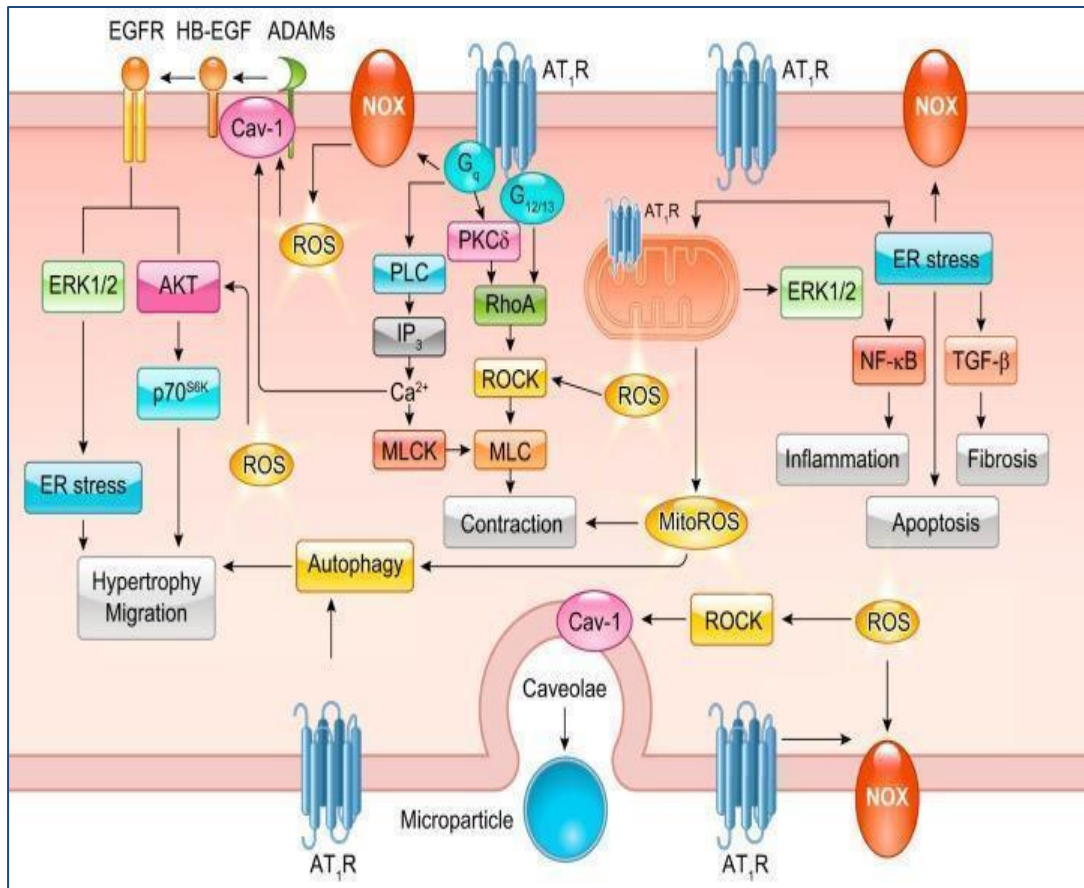


Figura 6. Transducción de la señalización clásica de la ANG II ³².

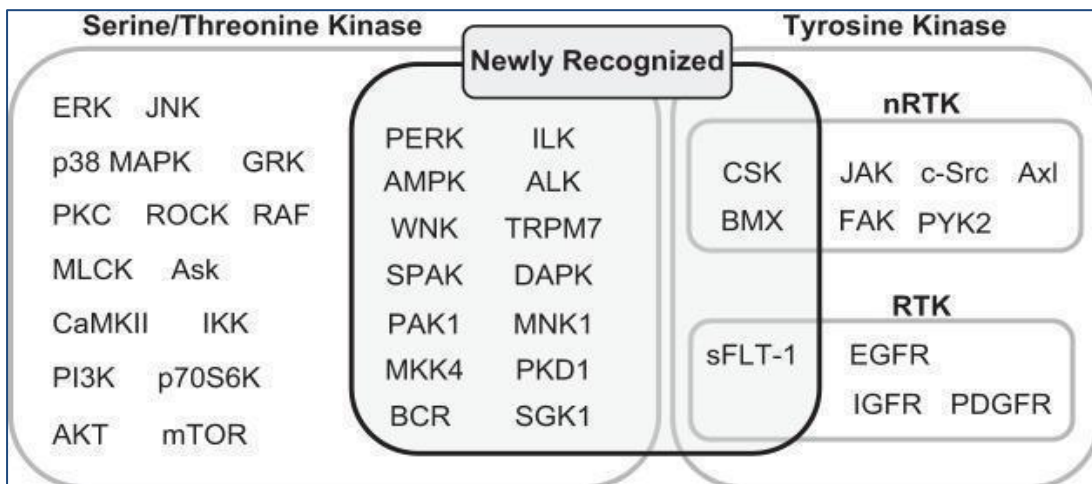


Figura 7. Lista de Serinas/treoninas y tirosinas quinasas, activadas por el AT1R ³².

Una vez que ocurre la unión entre la ANG II y el AT1R, este último es internalizado y va a interactuar con un complejo de proteínas de la vía endosomal para culminar en su degradación ⁴⁵.

En los roedores se han descrito 2 receptores AT1R que provienen de 2 genes cuyas secuencias son casi homólogas entre sí, pero cuyas funciones son distintas. El AT_{1A}R se encuentra expresado en la mayoría de los órganos, y es esencial para regular la PA mientras que el AT_{1B}R se encuentra expresado en la glándula suprarrenal y algunas regiones del sistema nervioso central y su función es mediar las respuestas de sed ²¹.

Ruta no canónica del RAAS. Elementos que contrarrestan las acciones del eje ANGIO-AT1R.

- **Receptor AT2R.**

A pesar de que las acciones de este receptor dentro del RAAS no están del todo dilucidadas, se observó que su interacción con la ANG II inhibe la actividad de las MAPK (ERK1/2), por medio de la activación de las fosfotirosinas fosfatasas, lo que implica que existe un rol opuesto en las acciones de este receptor con respecto a la acción de la ANG II mediada por el AT1R ⁴⁶.

En este sentido, es importante mencionar que la homología entre los dos tipos de receptores (AT1R y AT2R), es de apenas un 34%, y recientemente, por medio de estudios de cristalografía, se determinó que el mecanismo de activación del AT2R no depende de la interacción con subunidades de proteínas G ni β arrestinas, como en el caso del AT1R ⁴⁷, lo que habla de una ruta independiente a la vía del receptor clásico de ANG II.

Con respecto a su expresión, el AT2R es altamente expresado en tejido embrionario, y puede encontrarse expresado en menor medida, en la mayoría de los tejidos maduros, tales como, riñón, corazón, vasos sanguíneos y cerebro ³².

A nivel del sistema cardiovascular se ha observado que el AT2R media la vasorrelajación a través de la activación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), y por el eje bradikinina/guanosina monofosfato cíclica (cGMP)/ producción de NO ^{48,49}.

En un estudio realizado en un modelo murino transgénico, el cual presentaba distintos niveles de sobreexpresión del AT2R a nivel de cardiomiocitos ventriculares, se determinó que la modulación en la sobreexpresión de este receptor, atenúa la disfunción cardíaca y el remodelamiento post infarto del miocardio ⁵⁰.

- **Eje ACE2/ANG1-7/ANG1-9/MasR.**

La enzima ACE2, es una monocarboxipeptidasa que puede actuar sobre la ANG I y la ANG II, generando los péptidos ANG (1-9) y ANG (1-7) respectivamente ^{51,52}, los cuales van a cumplir una función como reguladores negativos del RAAS.

El eje ACE2/ANG (1-7)/receptor Mas (MasR) ha mostrado ser una de las principales vías por las cuales puede contrarrestarse los efectos de la ANG II. El mismo tiene efectos estimulatorios en la producción de prostaglandinas y NO, que presentan propiedades vasodilatadoras, antitrombóticas y antiproliferativas ^{53,54}

Son diversos los estudios que confirman el efecto cardioprotector mediado por ACE2. En este sentido, un estudio realizado en un modelo murino knock out (KO) para ACE2, sometido a un tratamiento crónico con ANG II, muestra un daño exacerbado a nivel de la estructura y función cardíaca, con respecto a los animales wild type (WT), observándose hipertrofia de los cardiomiocitos, y cambios en la composición de elementos de la ECM de la aorta, así como un incremento de ROS ⁵⁵. Otro estudio con la misma cepa de ratones ACE2 KO infundidos con ANGII demostró que el tratamiento con una ACE2 recombinante, fue capaz de revertir los efectos deletéreos causados por la ANG II a nivel cardiovascular ⁵⁶.

No sólo la ANG (1-7), posee efectos beneficiosos, sino que además, la ANG (1-9), posee efectos antihipertróficos y antifibróticos demostrado tanto *in vitro*, como en modelos *ex vivo* de cardiomiocitos de rata y conejo, a través del uso de proteínas de fusión que expresan ANGs (1-7)-(1-9) ⁵⁷, o por ensayos *in vitro* e *in vivo*, en modelos de hipertensión en ratas Sprague-Dawley ⁵⁸⁻⁶⁰.

- **Alamandina/Receptor MrgD.**

En 2008, estudios realizados por Jankowski y col.⁶¹ describieron un derivado nuevo de la ANG II, la ANG A que se formaba por la descarboxilación del residuo Asp por Ala, en la posición 1. Sin embargo, a pesar de que la ANG A tenía afinidad por el AT1R, carecía de las mismas propiedades vasoconstrictoras de la ANG II, razón por la cual se continuaron con estudios para discernir otros posibles intermediarios. Es así como Lautner y col. lograron identificar otro péptido derivado de la ANG A, [Ala1-ANG-(1-7)], denominándolo alamandina, cuya estructura es muy similar a la ANG (1-7) ⁶². Sin embargo, fue demostrado por medio de espectrometría de masa, que la alamandina interactúa con un receptor distinto a los demás, el receptor relacionado con la

oncoproteína Mas, del tipo G (MrgD), mediando a través de éste, acciones similares a las observadas por la ANG (1-7).

Fisiopatología de la ANG II a nivel vascular.

A continuación se describirán los procesos que son promovidos por la ANG II, y que forman parte de la fisiopatología de la HTA.

Vasoconstricción.

La ANG II estimula a la enzima NADPH oxidasa (expresada en CE y VSMC), por medio de la unidad catalítica de esta enzima, que está conformada por la familia de las NOX (Nox1-5) y de las duales oxidasas (Duox1 y Duox2), para producir ROS ⁴². El aumento en la formación de ROS, promovido por la ANG II se ha vinculado con una incrementada vasoconstricción, disfunción endotelial, remodelado vascular e HTA ³².

Estudios en modelos de ratones transgénicos a los cuales se les escinde de manera célula específica (tanto en CE como en células mieloides), el gen que codifica para la subunidad catalítica de NOX2, y se someten a una infusión diaria de ANG II, muestran una atenuación de la HTA con respecto a la cepa WT ⁶³. Del mismo modo, evaluando el rol del sistema inmune en la respuesta frente a la HTA, utilizando la misma ingeniería genética para silenciar la expresión génica, esta vez para el caso de monocitos y neutrófilos, en un modelo murino, y sometidos también a una infusión diaria de ANG II, se evidenció que la disminución de la infiltración de los monocitos, pero no de los neutrófilos, reduce la HTA y la formación de ROS ²⁶.

Hipertrofia e hiperplasia.

Uno de los principales mecanismos por los cuales la ANG II activa los procesos de hipertrofia e hiperplasia, es por intermedio de la estimulación de la vía de las quinasas regulada por señales extracelulares (ERK2/1), con la subsecuente activación de una metaloproteína de membrana, ADAM7, que promueve la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y de esta forma induce el estrés del retículo endoplasmático (ER) ⁶⁴. Un estudio utilizando un inhibidor específico del EGFR y una chaperona del ER, en un modelo murino sometido a una infusión de ANG II, demostró la importancia de esta vía de señalización sobre el proceso de remodelación vascular, atribuido a menor hipertrofia celular, sin interferir con el aumento de la presión causado por el tratamiento con ANG II ⁶⁵.

Incrementos en el grosor de la pared arterial son observados durante el desarrollo de la HTA, como producto de un desbalance entre los procesos de proliferación, apoptosis y recambio de los componentes de la ECM ⁶⁶. En concordancia con el proceso de proliferación, la ANG II, por intermedio de la estimulación de las vías de señalización del PI3K/Akt, ⁶⁷ y de las MAPKs, promueve la proliferación y migración de las VSMC ^{68,69}. Asimismo se demostró una vinculación entre una exacerbada proliferación de las VSMC y el desarrollo de la HTA ⁷⁰.

En vista de que los procesos de hipertrofia e hiperplasia son críticos para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y considerando que la ANG II ejerce un control sobre los mismos, Diep y col. estudiaron la expresión de proteínas del ciclo celular en un contexto de proliferación inducida por la ANG II, utilizando para ello un modelo de rata Sprague-Dawley sometidas a una infusión continua de ANG II con la intención de determinar la dependencia del AT1R sobre el ciclo celular, valiéndose del uso de un antagonista del mismo. Ellos demostraron que por vía del AT1R, la ANG II induce tanto un aumento en la proliferación de las VSMC como cambios en la expresión de algunas proteínas como la ciclina D1, la cual es una proteína del ciclo celular expresada durante la fase G1 ⁷¹.

En relación a los procesos de hipertrofia, otros estudios sobre el ciclo celular revelan que en VSMC en cultivo, un tratamiento con una dosis de ANG II, estimula la expresión de genes tempranos que regulan la fase G1 del ciclo celular, sin que exista una progresión hacia la fase S que determina un proceso de división celular ^{72,73}.

Fibrosis vascular y rigidez arterial.

La rigidez arterial es un evento que precede al desarrollo de la HTA, y está asociado con el envejecimiento ⁷⁴. Esto se debe a una excesiva fibrosis y a una reducida elasticidad, la cual se asocia con un incremento en la deposición del colágeno, degeneración de las fibras elásticas y una calcificación generada por la acumulación de minerales como Ca^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2+3} , fosfato inorgánico, y proteínas implicadas en la biogénesis ósea, como osteocalcina y osteonectina. ^{32,75}

La principal arteria responsable de la distribución de la sangre entre el corazón y los demás órganos vitales, es la aorta, y aunque los detalles en cuanto a su composición celular y estructura, se describirán más adelante, se puede decir que está conformada por

tres capas, denominadas íntima, media y adventicia, y a nivel celular, respetando el mismo orden, estas capas están conformadas por CE, VSMC y los fibroblastos.

Existen evidencias que muestran cómo la activación no controlada del RAAS puede ejercer efectos deletéreos en órganos vitales ⁷⁶. En relación a este punto, se pudo destacar el rol del AT1R expresado por el fibroblasto de la adventicia, en la contribución de la hiperplasia que ocurre en la capa media, demostrando una acción paracrina sobre las VSMC ⁷⁷.

En relación con una de las vías clásicas en la inducción de la fibrosis perivascular, destaca el Factor de crecimiento transformante beta (TGFβ, por sus siglas en inglés), el cual frente a un estímulo como ANG II activa a la proteína Smad3, desencadenando una respuesta vinculada con fibrosis vascular ⁷⁸.

Otra citoquina que media la acción de la ANG II es el TNFα, cuya expresión aumentada contribuye a un incremento en la PA y a una hipertrofia cardíaca ⁷⁹.

Por otra parte, se ha destacado la importancia de las MMPs y sus inhibidores endógenos (TIMP) en la homeostasis arterial, dada la función que poseen en el mantenimiento de los elementos de la ECM. En base a este punto, se ha descrito que durante la HTA, ocurre una degradación exacerbada de los componentes de la ECM por incrementos en la actividad de las MMPs, que favorece que las VSMC migren y proliferen ⁸⁰. Esto a su vez promueve la infiltración de células del sistema inmune en la pared arterial, y cambios estructurales que culminan en un engrosamiento de la pared arterial, fibrosis, y calcificación. Estos daños ocasionados en la pared de vaso traerán como consecuencia el desarrollo de patologías vasculares como aneurismas ⁸¹ y disecciones aórticas (AD, por sus siglas en inglés) ⁸². En un estudio utilizando un modelo de infusión de ANG II en ratones KO para TIMP3, se observa que la HTA es atenuada gracias a una disminución en la actividad de la MMP2 ⁸³.

Efectos fisiológicos y fisiopatológicos de la ANG II a nivel renal.

La principal función atribuida al RAAS es la regulación de la reabsorción de Na⁺ particularmente en condiciones de deshidratación e hipovolemia ⁸⁴, gracias a la acción mediada por la ANG II. Por tal razón, la desregulación del RAAS puede causar HTA, principalmente a causa de los elementos de este sistema a nivel renal ⁸⁵. En relación a este punto, Crowley y col. diseñaron una estrategia de trasplantes de riñón en ratones, para evaluar el aporte del AT1R expresado sólo a nivel renal comparado con el AT1R

expresado a nivel sistémico, demostrando que la presencia del AT1R a nivel renal es necesaria y suficiente para el desarrollo de HTA promovida por una infusión con ANG II ⁸⁶

Los receptores de ANG II se encuentran expresados a lo largo de la vasculatura renal, en las poblaciones de células epiteliales tubulares y aparato yuxtaglomerular, como en los podocitos y células mesangiales del glomérulo ⁸⁴. La ANG II tiene una acción directa sobre las VSMC causando la vasoconstricción de las arteriolas aferentes y eferentes lo cual conduce a la disminución del flujo sanguíneo renal, favoreciendo la reabsorción de Na⁺. En este sentido, un estudio realizado por Sparks y col. en el cual utilizan un modelo de ratón KO para AT1R específico de las VSMC que forman parte de la vasculatura renal, muestra como una disminución significativa del flujo sanguíneo renal, puede contribuir al desarrollo de hipertensión inducido por ANG II ⁸⁷.

A su vez, la vasoconstricción intrarrenal trae consigo un aumento de la resistencia en la arteriolas, pudiendo generarse un incremento de la presión de los capilares glomerulares, si el aumento ocurre a nivel de la arteriola eferente, activándose un sistema de retroalimentación negativo túbulo-glomerular, encargado de regular la tasa de filtración glomerular (TFG). El resultado será la disminución del flujo sanguíneo renal y la reducción de la TFG ³².

Otras funciones no hemodinámicas llevadas a cabo por la ANG II que alteran la homeostasis renal incluyen incrementos en la respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, disfunción endotelial, hiperplasia celular y fibrosis intersticial ³². El establecimiento de estos procesos de inflamación y fibrosis van a promover un daño renal crónico que conduce a una insuficiencia renal. En base a esto, uno de los factores que contribuye a la patología inducida por la ANG II es el TGFβ el cual promueve la transición celular epitelio- mesenquimal favoreciendo el proceso de fibrosis, generándose una gran cantidad de componentes intersticiales de la matriz incluyendo fibronectina, y colágenos de tipo I y III ^{32,88}. Casi todos los tipos celulares en el riñón incluyendo fibroblastos, células tubulares epiteliales, pericitos, células endoteliales, VSMC, células mesangiales y podocitos, así como células infiltradas del sistema inmune como linfocitos y macrófagos participan en este proceso de fibrosis ⁸⁸.

Durante el proceso de fibrosis existen cambios en el fenotipo celular, conocidos como transición epitelio-mesenquimal y recientemente se ha descrito la transición endotelio-mesenquimal ⁸⁹, generando a los miofibroblastos, los cuales promueven un

estado de proliferación, producción continua de elementos de la ECM, así como ROS, quimioquinas y citoquinas de la respuesta inmune innata. Una de las proteínas que se vincula con los procesos de fibrosis, es la proteína α de músculo liso (α SMA), que suele ser expresada tanto por los miofibroblastos como por las VSMC ⁹⁰.

Impacto de la HTA sobre el sistema vascular. Concepto y fisiopatología del proceso de remodelación vascular.

Las arterias, capilares y venas representan las principales vías por las cuales se distribuye a los tejidos y órganos los nutrientes que necesitan, y a su vez transportan sustancias de desechos que son producto del catabolismo. Las arterias cumplen dos funciones primordiales; son responsables de conducir la sangre oxigenada y los nutrientes hacia los órganos, y con cada latido del corazón, mantienen un flujo de sangre casi continuo hacia los capilares ⁹¹. En este sentido, la aorta, posee la habilidad de amortiguar el volumen de sangre obtenido con cada eyección ejercida por el ventrículo izquierdo del corazón durante la sístole, transformándolo en un flujo continuo ⁹². Este fenómeno es descrito como la función de Windkessel, y se basa en la relación entre el cambio de volumen en respuesta a un cambio de presión ⁹³, lo que implica que la aorta gracias a la elasticidad que posee es capaz de distenderse al recibir el volumen de eyección sistólica, y a continuación contraerse, funcionando como bomba accesoria.

La pared de la aorta está formada por la capa íntima, media y adventicia. La primera corresponde a una delgada túnica íntima compuesta por CE adyacentes al lumen arterial, que descansan sobre una membrana basal conformada por colágeno tipo IV, laminina y proteoglicanos ⁹⁴. A partir de los estudios realizados por Palade y Gowan en 1953 y citado por Alfred P. Fishman en su trabajo ⁹⁵, se describieron las propiedades hemodinámicas de este tejido, atribuyéndole un rol central en la regulación del tono vascular, así como también en el mantenimiento de la homeostasis de los elementos de la coagulación sanguínea, preservación del metabolismo de la ECM, regulación del crecimiento y migración de las VSMC (por medio de la liberación de sustancias vasoactivas) y regulación de la respuesta inflamatoria ⁹⁶.

La segunda capa correspondiente a la media, está a su vez subdividida en una estructura conformada por unidades lamelares de fibras elásticas las cuales forman láminas fenestradas que se encuentran separadas por una región compuesta por VSMCs, delgadas fibras elásticas, colágenos (principalmente de tipo I y III) y proteoglicanos ⁹⁷⁻¹⁰⁰.

La estructura mencionada se conoce como laminilla elástica, y su función es la de amortiguar la tensión recibida sobre la aorta como respuesta al pulso de la presión sistólica, por un lado, gracias a la flexibilidad y elasticidad de las fibras elásticas y por otro lado debido a la capacidad que poseen las VSMC de contracción y relajación ¹⁰¹. Es importante resaltar que la composición de los elementos de la túnica media, varía conforme las arterias van cambiando su calibre. Las arterias centrales, como la aorta y sus principales ramas, contienen principalmente elastina, elemento que es vital para el manejo de altas presiones en comparación con las arterias más distales y periféricas, como la braquial o radial, cuyo contenido es en gran parte de colágeno ⁹¹, cumpliendo en este caso el rol de conducción de nutrientes.

Por último, la tercera capa de la aorta, la adventicia, es la más externa, y está conformada principalmente de colágeno, fibroblastos, células del sistema inmune, y una pequeña población de células madre progenitoras, así como de terminaciones nerviosas y pequeños vasos sanguíneos (vasa vasorum) ¹⁰². Dentro de sus funciones principales destacan:

- Facilitar la comunicación entre las diferentes capas arteriales ¹⁰³.
- Controlar la formación y regresión de vasa vasorum que penetran y nutren la capa media y endotelial ¹⁰⁴.
- Controlar el remodelado arterial ¹⁰⁴.
- Modular la respuesta inmune innata gracias a las poblaciones celulares residentes ⁹¹.

Concepto del proceso de remodelación vascular.

La pared de los vasos sanguíneos se encuentra expuesta de forma continua a señales bioquímicas y biomecánicas que ejercen una respuesta funcional y adaptativa del vaso. En el caso de un incremento agudo del flujo sanguíneo, ocurre un aumento de la presión tangencial (o fricción), sobre las paredes de los vasos. Esto se traduce en una señal para las células endoteliales presentes en la capa íntima, que responden liberando sustancias vasodilatadoras como el NO ¹⁰⁵.

En el caso de la HTA, en donde el incremento de la PA es sostenido en el tiempo, se activará una cascada de eventos neurohormonales ¹⁰⁶ que, eventualmente ocasionarán daños sobre el sistema vascular por medio de dos mecanismos. En primer lugar, ocurre una disminución en la densidad de vasos sanguíneos de pequeño calibre, lo que se conoce

como rarefacción. En segundo lugar, ocurre un proceso de remodelación arterial ¹⁰⁷, que no es más que una respuesta adaptativa que implica una variedad de mecanismos fisiopatológicos que se interconectan entre sí, y que darán origen a procesos de hiperplasia, apoptosis, cambios en el contenido de colágeno y elastina, y síntesis y degradación de componentes de la ECM ⁹⁶, entre otros ⁹³.

El término de remodelación arterial fue descrito por primera vez en 1989 gracias a los trabajos de Baumbach y Heistad, quienes compararon la estructura de las arteriolas piales de ratas normotensas (Wistar-Kyoto) e hipertensas (stroke-prone spontaneously hypertensive). Estos investigadores observaron que las arteriolas de las ratas hipertensas presentaban cambios en el grosor de la pared del vaso, así como una oclusión del lumen ¹⁰⁸.

Casi veinte años después, Feihl y col. establecieron una clasificación en base a los cambios morfológicos que ocurren en la arteria, en respuesta a incrementos de la PA ¹⁰⁹ los cuales son descritos en la figura 8. Si los valores elevados de PA son sostenidos en el tiempo, el sistema vascular comienza a reorganizarse y a lo largo de este proceso de HTA, se pueden observar varios cambios, que de no resolverse van a ocasionar la disminución del lumen (L) y el incremento en el grosor entre la íntima y la media (I-M) ¹⁰⁹.

Durante el proceso de remodelación vascular puede ocurrir un incremento en la relación (I-M)/L a causa de un aumento de la masa muscular (figura 8A), sin cambios en la luz del vaso, o se puede dar una reorganización de los elementos celulares y no celulares sin cambios importantes en la masa muscular (figura 8B), pero sí una disminución del diámetro del lumen causando un aumento en la resistencia vascular periférica ¹⁰⁷.

Además, puede verse afectado el flujo sanguíneo como consecuencia de cambios en las dimensiones del lumen. El flujo disminuido puede generar una reducción en el diámetro de la luz y una disminución del grosor de la pared (figura 8C), o en el caso contrario, un aumento del flujo genera una vasodilatación sostenida del vaso (figura 8D), lo que acarrea un proceso de apoptosis y una proteólisis de la ECM, que resulta en la formación de aneurismas ⁹⁵.

Finalmente, la arquitectura de la pared vascular se encuentra también muy alterada en respuesta a la lesión vascular (figura 8E-F). Se forma una capa subyacente a la íntima (neoíntima) como parte de una respuesta reparadora a la lesión que implica trombosis,

migración y proliferación de las VSMC, producción de ECM e infiltración de células del sistema inmune ¹⁰⁷.

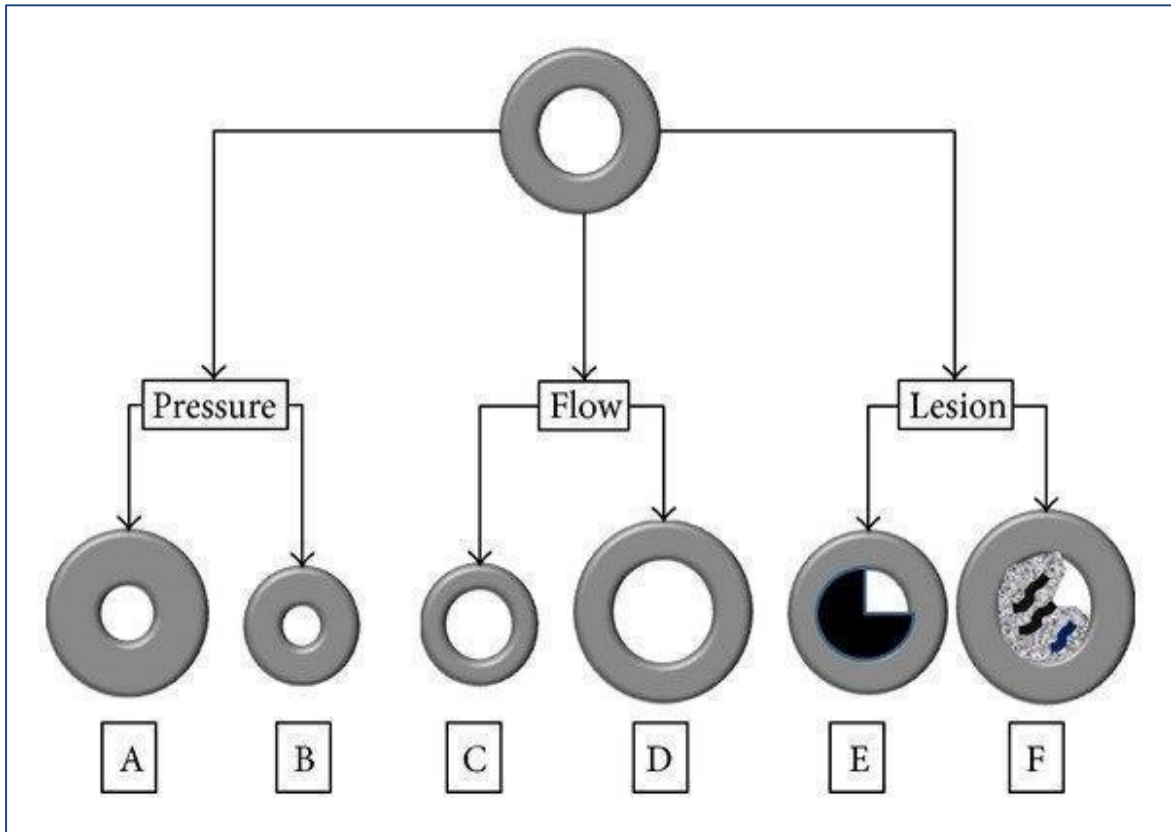


Figura 8. Cambios que ocurren durante el proceso de remodelación vascular ¹⁰⁷.

En relación a la capacidad que tienen las arterias de responder a los agentes estresores, las mismas pueden responder por un lado, incrementando el grosor de su pared, lo que se denomina hipertrofia, bien sea por un incremento en el grosor y en el área transversal de las capas íntima (remodelado hacia adentro) o media, (remodelado hacia afuera), y por otro lado, puede observarse el caso contrario en el cual ocurre una disminución en el espesor de la pared (hipotrofia). Como ejemplos de estos procesos, tenemos la aterosclerosis, en donde ocurre una hipertrofia, la cual puede ser hacia adentro o hacia afuera del vaso ¹¹⁰, y los aneurismas ¹¹¹, que se caracterizan por una hipotrofia. En el caso de que el grosor de la pared se mantenga constante, se denomina eutrófico. En la figura 9 se asocian algunas patologías con los tipos de remodelado vascular ¹⁰⁷.

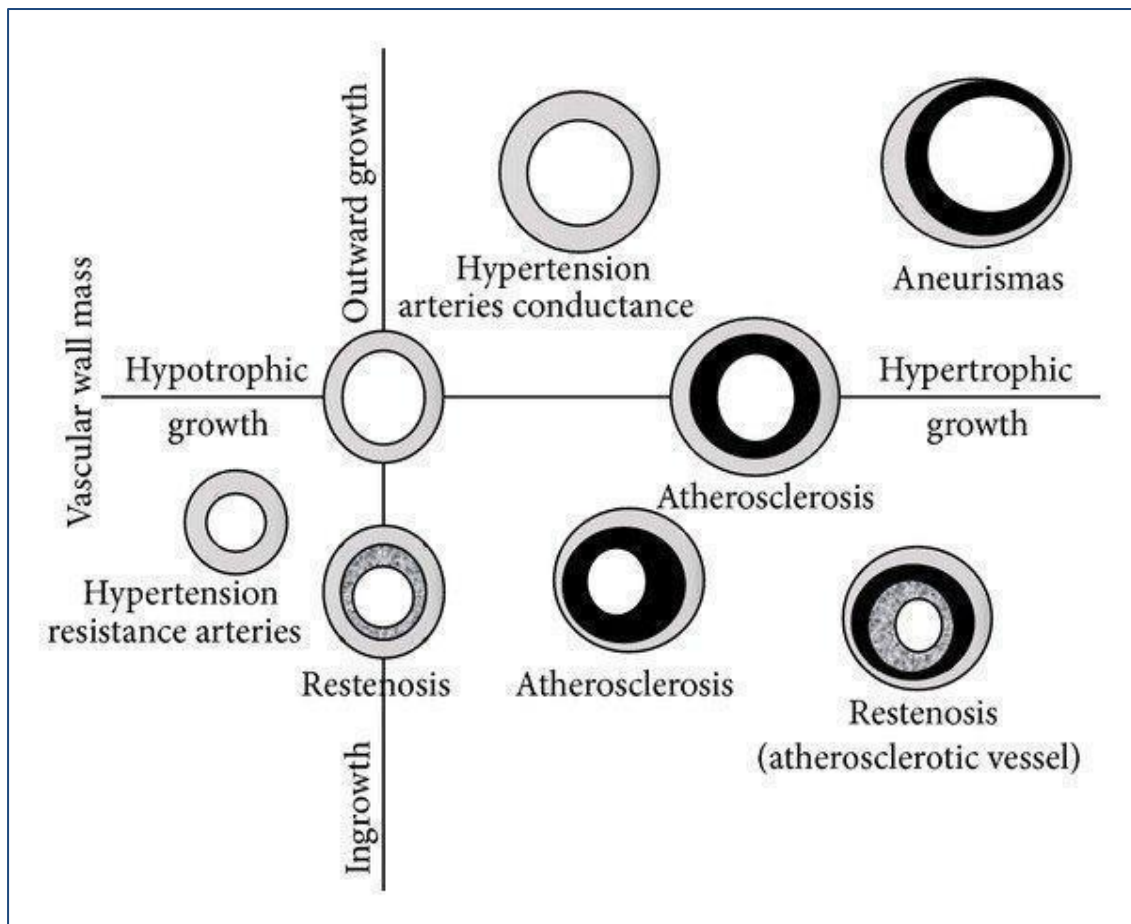


Figura 9. Distintas patologías asociadas con los tipos de remodelado vascular ¹⁰⁷.

Durante este proceso de remodelación, además de los cambios estructurales, pueden observarse cambios en la función vascular pudiendo describirse dos procesos: aterosclerosis, cuando existe un proceso inflamatorio local en el endotelio, dando origen a la formación de una placa de ateroma, y arterioesclerosis, un proceso asociado con el envejecimiento y enfermedades cardiovasculares, metabólicas o inflamatorias ¹¹², que implica alteraciones de la túnica media del vaso sanguíneo.

En resumen, el remodelado de la pared vascular es el resultado de una serie de eventos que van a desencadenarse con el propósito de restablecer la homeostasis. Algunos de estos eventos implican cambios en el crecimiento y migración de las VSMC, disfunción endotelial, procesos inflamatorios, y síntesis o degradación de los componentes de la ECM ⁹⁵.

Fisiopatología del proceso de remodelación vascular.

Como se mencionó anteriormente, durante el desarrollo de la HTA, ocurre un proceso de remodelación vascular, producto de la respuesta adaptativa de los vasos sanguíneos para contrarrestar los cambios de presión y volumen a los cuales están sometidos. Esto a su vez trae consigo un conjunto de eventos que serán definidos a continuación.

- **Proliferación y diferenciación de VSMC.**

Las VSMC poseen una remarcable plasticidad y representan un elemento clave en la regulación del tono vascular y en el mantenimiento de la integridad de la pared vascular ¹¹³. Es necesario que estas células posean un fenotipo contráctil para poder llevar a cabo esta función, sin embargo, una parte de la población de las VSMC tienen la habilidad de diferenciarse hacia un fenotipo sintético, que a su vez puede subdividirse en un fenotipo con características proliferativas y migratorias, un fenotipo secretor y un fenotipo osteogénico ¹¹⁴.

Durante el proceso de remodelación vascular promovido por HTA, las VSMC experimentan una disminución en la expresión de los genes que controlan el fenotipo contráctil, y reciben distintos estímulos por parte de factores de crecimiento y citoquinas tales como ANG II, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), TGF β , TNF, entre otros, así como componentes de la ECM como colágenos, fibronectina, trombospondina ¹¹³. Todas estas moléculas tienen funciones señalizadoras que causan la proliferación y migración de las VSMC hacia la capa íntima vascular originando, de esta manera, hiperplasia y engrosamiento del espesor de la pared arterial ¹¹².

Asimismo, las VSMC son capaces de liberar MMPs, las cuales representan un grupo de proteasas dependientes de Zinc, que poseen especificidad por los sustratos que forman parte de la ECM, especialmente colágenos y elastina. De esta manera, las MMPs se encargan del recambio y remodelado de la ECM ¹¹⁵, además de llevar a cabo otras funciones relacionadas con proliferación, migración, diferenciación y angiogénesis ¹¹⁶.

- **Desregulación de las MMPs.**

Las MMPs son un grupo de 28 endopeptidasas que fueron descritas por Gross y Lapiere en 1962 ¹⁰⁴ y pueden dividirse acorde con la especificidad de sustratos, estructura primaria y localización celular, pudiendo ser agrupadas en 5 grupos. Las colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13), estromielisinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11 y MMP-12), matrilisinas (MMP-7 y MMP-26), MMPs de tipo membrana (MT1-MMP –MT6-MMP) y gelatinasas (MMP-2 y MMP-9). Aunque la mayoría de estas enzimas poseen especificidad de sustrato ¹¹⁷, algunas comparten los mismos blancos tales como el colágeno y la elastina ¹¹⁵.

Todas estas enzimas tienen similitud en su estructura, conformada por un pre-péptido o secuencia señal, seguido por una región pro-péptido unida al sitio catalítico y un dominio hemopexina. El dominio pro-péptido protege el sitio catalítico de las MMPs de su activación o autólisis manteniendo a la enzima en una forma inactiva. Próximo al sitio catalítico, el dominio hemopexina es la región donde los inhibidores de MMPs (llamados TIMPs) se unen a las MMPs para inhibir su actividad ¹¹⁵.

La regulación y síntesis de las MMPs es extremadamente controlada. Tanto las ROS, así como factores de crecimiento, citoquinas, ANG II y otras hormonas pueden influenciar la transcripción de las MMPs, a través de la activación de las MAPK, inhibición de las MAPK fosfatasa, la inactivación de histonas desacetilasas ¹¹⁸ y modificaciones postraduccionales ^{119,120}, mientras que la unión de las MMPs con los TIMPs inhiben su actividad ¹²¹.

Se ha determinado que la pared vascular de pacientes hipertensos presenta un aumento de la actividad de las MMPs induciendo un incremento en la actividad elastolítica, así como la acumulación de productos de degradación de colágeno de la ECM, y de pequeños fragmentos de moléculas vasoactivas del endotelio, que van a promover la vasoconstricción de las VSMC ¹²². En este sentido son diversos los estudios que vinculan una relación entre el incremento en la actividad de las MMPs, especialmente las MMP-2 y MMP-9, con el desarrollo de hipertensión ^{123,124}, y otras patologías del sistema cardiovascular tales como falla cardíaca ¹²⁵, la disección aórtica (AD), en la cual ocurre un proceso degenerativo de la túnica media de la aorta ⁸², y aneurismas ¹²⁶.

- **Degradación y fragmentación de fibras de elastina.**

La elastina es una proteína de la ECM y principal componente de las fibras elásticas compuestas por polímeros de tropoelastina entrelazados con microfibrillas ricas en fibrilinas ¹¹², y su principal función es la de otorgar la elasticidad a las arterias de mayor calibre, permitiendo que las mismas se expandan o relajen con cada ciclo cardíaco ¹²⁷. Durante la HTA, ocurre un incremento en la tensión sobre la pared arterial a causa de una mayor presión ejercida durante la sístole (término conocido como presión de pulso), conllevando a una fatiga de las fibras elásticas y finalmente una fractura de las mismas, viéndose reflejado en una mayor rigidez en la pared del vaso ¹²⁷. Defectos en la formación o excesiva proteólisis de la elastina se han vinculado con algunos desórdenes cardiovasculares congénitos o adquiridos como consecuencia de una enfermedad preexistente como la HTA, obesidad, aneurismas o AD ¹²⁷

Gran parte del conocimiento de los mecanismos que regulan la PA, así como los aspectos de su fisiopatología y del tratamiento de la HTA, han sido posible gracias al uso de animales de experimentación. De hecho, en este proyecto de tesis se empleará un modelo murino para inducir HTA como parte del estudio de la regulación de una proteína (DBC1).

Enfermedades vasculares vinculadas con el desarrollo de la HTA.

La HTA promueve la remodelación arterial como un mecanismo compensatorio para el control de la PA. Algunos de los principales cambios que ocurren son el incremento de los elementos de la ECM, así como la pérdida del tono vascular y el aumento del grosor de la pared. Esta hiperplasia vascular se debe en gran medida a los cambios fenotípicos de las VSMC que dejan su perfil contráctil por un fenotipo sintético ¹¹⁴, y de esta manera incrementan su proliferación, hipertrofia y migración ¹²⁸. Estas alteraciones, van a promover una pérdida de funcionalidad aumentando así el factor de riesgo para el desarrollo de síndromes agudos aórticos (AAS, por sus siglas en inglés), los cuales son un conjunto de condiciones graves que incluyen disección aórtica (AD), hematoma intramural (IMH) y úlcera aterosclerótica penetrante.

Todas estas alteraciones causan una disección de la capa media de la aorta ¹²⁹. La fisiopatología responsable de ocasionar cada uno de estos eventos es diferente, sin embargo, algunos pacientes pueden presentar alguna o todas estas lesiones, lo que

demuestra la existencia de un vínculo entre ellas ¹³⁰ Por su parte, la AD es responsable de causar el 33% de muertes en pacientes no tratados, particularmente cuando la AD se localiza a la altura de la aorta ascendente ¹³⁰.

Además de los AAS, otra de las aortopatías vinculada con la HTA es el aneurisma aórtico abdominal (AAA), especialmente a nivel infrarrenal ¹³¹. El aneurisma es una dilatación localizada y permanente de la aorta, presentando un diámetro de 1.5 veces mayor con respecto al de una aorta normal ¹³². El mayor problema relacionado con los AAA en el ser humano, es que la mayoría no se diagnostican por ser asintomáticos, y el riesgo de ruptura incrementa de forma dramática cuando los diámetros exceden los 5.5 cm, presentando así una tasa de mortalidad mayor al 50% ¹³⁰.

A continuación se describirá más a profundidad la aortopatía vinculada con la AD.

Disecación aórtica (AD). Clasificación, patogenia y mecanismos moleculares responsables de su desarrollo.

La AD se describió por primera vez a mediados del siglo XVI, y la primera descripción hecha a nivel de anatomía patológica fue realizada por Morgani en el siglo XVIII. Un siglo más tarde, Maunier propuso el nombre de disecación y años más tarde, Laennec lo denominó aneurisma disecante ¹³³

La AD se define como la disrupción de la capa media de la arteria provocada por un sangrado intramural, lo que resulta en la separación de las capas de la pared del vaso, con la formación subsecuente de un verdadero o un falso canal ¹³⁰.

Esta disrupción de la media es ocasionada por el desgarro en la íntima, lo que causa la entrada de sangre hacia la media, forzando a que la íntima y la adventicia queden aparte. La figura 10a muestra la formación de AD observando la formación de un falso canal por donde va a fluir la sangre en el espacio donde se encuentra la media (AD comunicante).

En algunos casos la AD puede desarrollarse a partir de la ruptura de los vasa vasorum que se encuentran en la adventicia (figura 10b), y en este caso el sangrado origina la formación de un IMH (AD no comunicante). Las dos semanas posteriores al comienzo de la AD son consideradas la fase aguda, seguido por un estado subagudo (tres meses posteriores al comienzo) que de no ser diagnosticado puede pasar a un estado crónico y en este caso incrementan los riesgos de una ruptura de la aorta, cese circulatorio y muerte ^{134,135}.

El manejo terapéutico se basa en el criterio de clasificación anatómica de la lesión, tomando en cuenta la localización de la disección y/u origen de la lesión en la íntima y la extensión de la AD ¹³⁴. Existen dos métodos que definen la clasificación, el de Bakey y el de Stanford, siendo este último el más usado. El método de Stanford tipo A (o el de Bakey tipo I y II), ubica la AD en la aorta ascendente, y es de criterio quirúrgico, mientras que el de tipo B (o el de Bakey tipo IIIa y IIIb), localiza la lesión en la aorta descendente y son generalmente tratados por reparación endovascular. La figura 11 muestra un esquema de la aorta y los métodos de clasificación de las AD ¹³⁴.

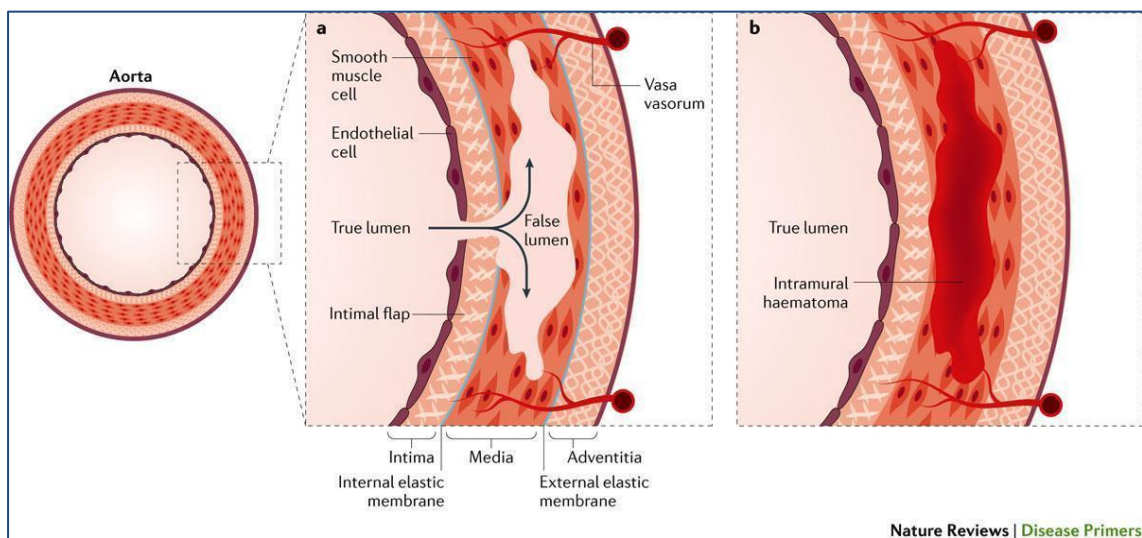


Figura 10. Las Disecciones Aórticas (AD) son causadas por una perfusión de sangre hacia la media, por una lesión en la íntima (a), o en los vasa vasorum de la adventicia (b) ¹³⁴.

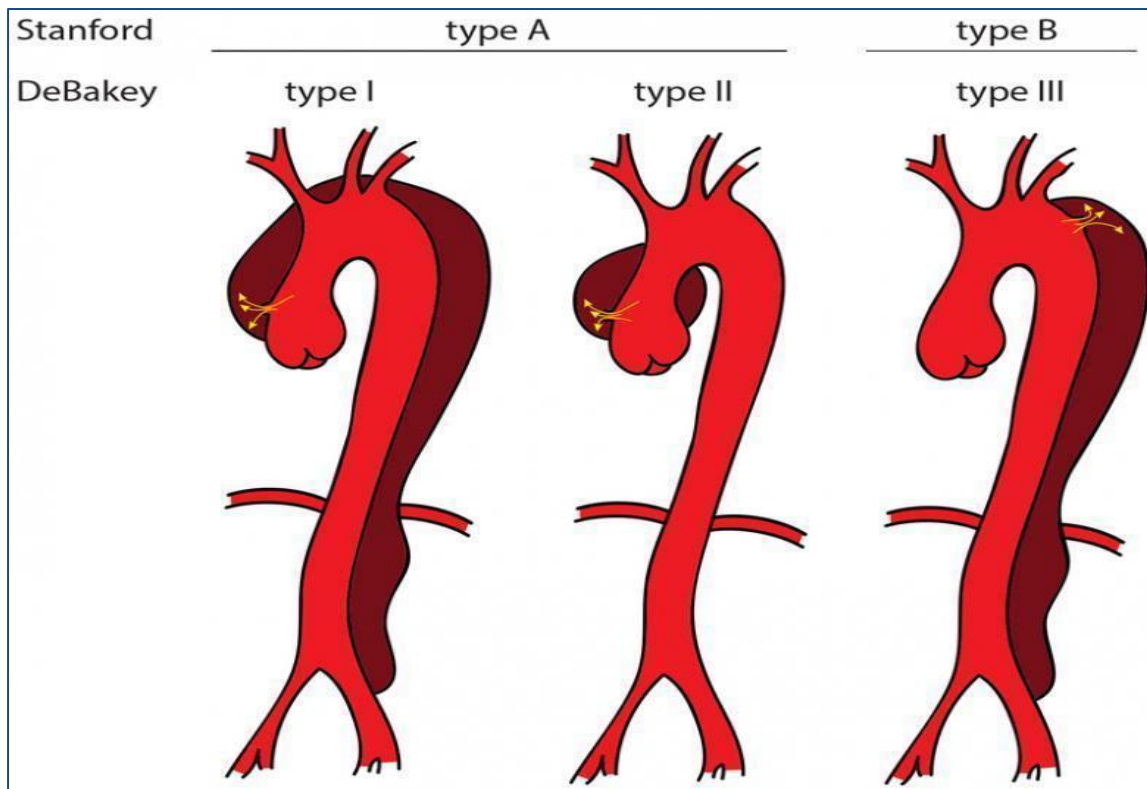


Figura 11. Clasificación de las Disecciones Aórticas (AD) ¹³.

Con respecto a las causas que originan la formación de AD pueden ser de origen genético, entre los que destacan los desórdenes autosómicos dominantes como los síndromes de Marfan, Loeys–Dietz, y Ehler–Danlos, caracterizados por defectos en el tejido conectivo ^{136,137}, o pueden ser ocasionados por otros factores como la HTA, edad avanzada, sexo, tabaquismo e incrementos de la apolipoproteína A1 (APO). La HTA está presente en el 80% de los pacientes que desarrollan AD ¹³⁸ y es responsable de promover un estado de fragilidad vascular que compromete la elasticidad de la pared arterial y favorece el engrosamiento de la íntima, fibrosis, calcificación, deposición de ácidos grasos y degradación de los elementos de la ECM. Además, la HTA contribuye a la producción de citoquinas proinflamatorias y MMPs que van a exacerbar la degradación de la ECM ¹³⁴.

A pesar de que a la fecha no están dilucidados completamente los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la AD, diversos estudios han mostrado que la desregulación de las MMPs, y de factores angiogénicos como el VEGF ¹³⁹ contribuyen a su desarrollo. En este sentido, utilizando un modelo murino KO para las MMP-9 y

MMP-2 se ha mostrado resistencia al desarrollo de lesiones ¹²⁶. En la misma línea de resultados, en un estudio donde se analizaron muestras de pacientes con AD se observó un aumento en la expresión tanto de la MMP-2 como de la MMP-9 ¹⁴⁰. Por último, también se ha destacado la presencia de la MMP-12 expresada por macrófagos que invaden la pared de la aorta, en pacientes con AD ¹⁴¹ lo que pone de manifiesto un rol de estas MMPs en la patogenia de la AD. Sin embargo, no se conocen los mecanismos que controlan la expresión de las MMPs y factores angiogénicos, durante la HTA, que van a conllevar al desarrollo de AD.

Modelos animales para el estudio de la hipertensión arterial (HTA) y disecciones aórticas (AD).

Estrategias para desarrollar hipertensión arterial (HTA) en animales

Los primeros estudios llevados a cabo se basaron en un modelo de obstrucción renovascular descrito por los trabajos de Goldblatt y col. en 1934, y fueron realizados en perros ¹⁴². Más adelante se sumaron otros animales como cerdos, gatos y primates ¹⁴³ y con los años el uso de animales más pequeños, como los roedores, ha ido creciendo gracias a ventajas que presentan por su bajo costo, rápida tasa de reproducción y la facilidad de ser manipulados genéticamente. Sin embargo, en lo que respecta a las desventajas se encuentran la dificultad para realizar procedimientos quirúrgicos y la escasa cantidad de sangre que puede extraérseles para los análisis clínicos.

Las implicaciones de la HTA en términos de su fisiopatología y daños promovidos en órganos vitales como corazón, cerebro, riñones y sistema circulatorio, traen consigo un desafío en el diseño de métodos que permitan reproducir en el animal, una situación lo más parecida a lo que ocurre en el ser humano, y es por ello que han surgido distintos abordajes experimentales. El primero de ellos se basa en la vía farmacológica, a través de una infusión crónica de ANG II, glucocorticoides y acetato de deoxicorticosterona (DOCA, por sus siglas en inglés). El segundo está relacionado con la edición génica, el cual permite el estudio más específico de la función de un gen dentro de una ruta de señalización. Y el tercero, a través del abordaje quirúrgico incluyendo la obstrucción de alguna de las ramas de la arteria renal o suprarrenal, por medio de dispositivos intravasculares u oclusores ¹⁴³, así como también por la remoción parcial o completa del riñón (nefrectomía), seguido por la ligación de la arteria renal del riñón restante ¹⁴⁴. Estos métodos quirúrgicos originan un daño renal crónico de tipo renovascular. A continuación

se describirán algunas de estas metodologías aplicadas en roedores, resaltando las ventajas y desventajas en cada.

- **Modelos basados en selección y modificación génica.**

La rata representa un buen modelo para el estudio de la HTA, ya que algunas cepas presentan de forma espontánea altos valores de PA, simulando el tipo de HTA primaria que ocurre en el humano, y compartiendo varios aspectos clínicos. Las líneas de ratas mayormente empleadas son la Wistar y la Sprague-Dawley (SD), y de ambas cepas se han ido seleccionando aquellas que sufren de HTA para generar otras líneas más susceptibles.

Para citar algunos ejemplos, destaca la cepa SHR la cual es procedente de Japón, y se generó a partir del cruzamiento entre hermanos homocigotos de la cepa Wistar, que presentaban niveles elevados de PA. Esta cepa es propensa al desarrollo de accidentes cerebrovasculares, condición que ha servido para estudiar la función vascular, regulación del sistema nervioso autónomo, así como genética de la HTA esencial ¹⁴³.

El modelo de rata Dahl fue descubierto por Lewis Dahl en la década de los 50 ¹⁴⁵ y tuvo un aporte importante en el conocimiento de efectos dañinos de la sal sobre la HTA. El modelo permite evaluar la función renal y vascular, así como el estudio de genes responsables de promover la HTA primaria ¹⁴⁵.

Un punto a considerar como posible desventaja de estos modelos es que debido al background genético pudieran presentar diferencias con el ser humano. El investigador debe de manejar un buen criterio a la hora de escoger el modelo de estudio ¹⁴³.

El uso de la tecnología de edición génica, permite conocer la función de un gen sobre un determinado órgano y de esta manera discernir su participación e impacto dentro de un contexto de enfermedad. Se han generado tanto ratas como ratones transgénicos. Por ejemplo, ratones KO para la renina promovieron una hipotensión severa, y gracias a esta herramienta se ha podido conocer las funciones llevadas a cabo por otros miembros del RAAS, como el del receptor de la ANG II, AT1R ¹⁴³.

- **Método de infusión de ANG II.**

La infusión subcutánea de ANG II representa uno de los principales métodos preclínicos de HTA ¹⁴³, y su empleo ha permitido discernir muchas de las funciones conocidas del RAAS ¹⁴⁶. Su uso en roedores simula la hipertensión tipo 2 no controlada observada en el humano. Usualmente se utiliza una dosis de ANG II que puede ir desde

los 490 ng/kg/min hasta los 1000 ng/Kg/min, administrada generalmente durante un lapso de 28 días, en los cuales, además de observarse un incremento de la PA, ocurre hipertrofia cardíaca, remodelado vascular y daño renal crónico, este último de acuerdo a la especie de ratón utilizada ^{86,147-149}. Sin embargo, para observar un daño más severo en el riñón es aconsejable alargar a 8 semanas el tratamiento con ANG II ¹⁵⁰.

Si bien la cepa de ratón C57BL/6 es empleada para estudiar los mecanismos de hipertensión dependientes del RAAS, la misma presenta resistencia al daño renal y a la sensibilidad por el sodio ¹⁵¹. En contraste, la cepa 129/Sv es sensible al sodio, y más susceptible al daño renal, presentando valores de PA superiores, con respecto a la cepa C57BL/6 ¹⁵¹.

Como vemos, la principal desventaja de este método es que exista una variabilidad en la respuesta al daño inducido por la infusión de ANG II, entre especies, sin embargo ofrece múltiples beneficios en cuanto a que permite analizar la respuesta en tiempo real de los distintos componentes del RAAS, proporcionando una valiosa información sobre sus acciones a nivel vascular y renal. Y por último, este modelo se puede reproducir en una variedad de especies, tanto en pequeños como grandes animales ¹⁴³.

El uso de la infusión por ANG II, junto con una nefrectomía unilateral y un suplemento dietario con un alto contenido de sal, puede emplearse para estudiar los mecanismos de sensibilidad al sodio y al daño renal crónico. Por otro lado, una infusión de ANG II por un largo periodo (8 semanas) sumado a una dieta con baja concentración de sodio, es útil para entender los mecanismos por los cuales durante la HTA inducida por la ANG II, se observa una mayor capacidad de promover la retención de Na⁺ ¹⁵².

- **Empleo de mineralcorticoides y alta ingesta de sal.**

El uso de acetato de deoxicorticosterona (DOCA), en combinación con un alto contenido de sal en la dieta, simula la HTA secundaria al hiperaldosteronismo en el ser humano, causando una retención de Na⁺ y agua, promoviendo un incremento del volumen intravascular, y con ello una HTA. El empleo de este método es útil para estudiar las razones por las cuales los pacientes con hiperaldosteronismo primario presentan una variabilidad en sus valores de PA, y son más propensos a padecer de enfermedades cardiovasculares, con respecto a aquellos pacientes hipertensos que manejan cifras de PA más estables ¹⁴³.

La aplicación combinada de mineralcorticoides, alta ingesta de sal y una nefrectomía unilateral, lo convierte en un modelo para estudiar el proceso de HTA severa con algunas características observadas en el ser humano, como los bajos niveles de renina circulantes¹⁴³.

Estrategias para el estudio de disecciones aórticas (AD) en animales.

- **La infusión de ANG II como modelo para el desarrollo AD.**

Por más de 15 años, el uso de infusión con ANG II en ratones hipercolesterolémicos ApoE^{-/-} se ha considerado una técnica útil para generar lesiones a nivel de la aorta abdominal. Estos hallazgos surgieron gracias a los trabajos de Daugherty que estaban centrados en el estudio de la aterosclerosis, y que demostraron que estos ratones además de desarrollar placas de ateroma, presentaban casi en un 100% de los casos¹⁵³, lesiones de la aorta abdominal a nivel suprarrenal, caracterizadas por una inflamación crónica localizada, una degeneración de la estructura de las fibras elásticas en la capa media, y un incremento en el diámetro de la aorta¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

A partir de ahí los estudios en este modelo continuaron, permitiendo seguir con el proceso de caracterización de la lesión. Años más tarde, el mismo grupo de Daugherty reportó una disrupción de la capa media de la aorta con infiltración de macrófagos, y formación de un IMH^{156,157}. Todas estas características eran similares a lo que ocurre en los aneurismas abdominales en humanos, concluyendo que estos eventos observados en los ratones hipercolesterolémicos ApoE^{-/-} precedían a la formación de aneurismas abdominales aórticos (AAA)¹⁵⁷.

El avance tecnológico ha permitido el desarrollo de técnicas microscópicas que permiten no sólo obtener una mejor resolución de la imagen, sino realizar mediciones morfométricas más exactas^{158,159}. Estudios más recientes han demostrado que la infusión con ANG II administrada por un periodo de 28 días, causa una AD y no un AAA, tal como se había descrito^{77,154,155,160}. Es por ello que de ahora en más, a pesar de que algunos de los trabajos que se citen a lo largo de esta tesis tengan por nombre AAA, se referirán como AD, para no generar confusiones.

Para citar algunas investigaciones actuales que refieren directamente el modelo de infusión por ANG II, con la formación de AD, Wanjun Liu y col., demostraron que una reducción del estrés oxidativo producto del tratamiento con ANG II, disminuye de manera significativa la incidencia de AD¹⁶¹. Por otra parte, Hu Xu y col., reportaron la

importancia de las prostaglandinas en la homeostasis vascular, y su rol en la formación de AD ¹⁶². Por último, Sohei Ito y col., quienes también usaron el modelo de infusión con ANG II, mostraron una reducción en la formación de AD, al reducir la respuesta humoral, y con ella la inflamación por medio del bloqueo de un factor de transcripción ¹⁶³.

Cabe destacar, que existen otras metodologías aplicadas en modelos de animales en los cuales se logra desarrollar un AAA verdadero, y que permitieron discernir algunos mecanismos moleculares implicados en la patogenia del proceso, y que además son comunes con las AD. Por tal motivo vale la pena describir algunos de ellos.

- **Infusión de Elastasa pancreática porcina (PPE).**

La infusión de elastasa pancreática porcina (PPE) ha sido frecuentemente usada como un modelo de AAA ¹⁶⁴ en distintas especies de animales ¹⁶⁵. El procedimiento implica la introducción de un catéter sobre la bifurcación ilíaca de la aorta y el aislamiento de un segmento por medio de una sutura distal, lo que promueve la destrucción de las fibras elásticas y una respuesta inflamatoria aguda ¹⁶⁶.

El uso de ese modelo permitió discernir el rol de las MMPs en la patogenia de los AAA. En este sentido, la aplicación de PPE en ratones KO tanto para la MMP-9 como para la MMP-12 confirmó el aporte de las MMPs en la destrucción de las fibras elásticas ¹⁶⁷. En otro estudio se observó que la formación de AAA inducida por elastasa se atenuó con un inhibidor de las MMPs de amplio espectro ¹⁶⁸. Con estos y otros reportes se ha creado una hipótesis común de las acciones deletéreas que tienen las MMPs en el desarrollo de los AAA, particularmente la MMP-2 y la MMP-9, cuya abundancia se ha visto incrementada en los AAA, tanto a nivel de mRNA como en la expresión de proteínas, reflejándose en una incrementada actividad ^{169,170}.

- **Infusión de CaCl₂.**

Gracias a los trabajos hechos por Gertz y col. en 1988, quienes basándose en investigaciones previas sugirieron una conexión entre la deposición de calcio y la formación de AAA, se empezó a utilizar la infusión periarterial de una solución de CaCl₂ en conejo ¹⁷¹. Años más tarde, los investigadores Chiou y col. adaptaron la infusión de CaCl₂ a un modelo murino reportando una similitud en las características macroscópicas e histológicas del AAA entre el ratón y el humano, tales como deposición de calcio en la capa media de la aorta, con destrucción de VSMC y de las fibras elásticas ¹⁷².

- **Uso combinado de agentes químicos.**

Recientemente ha sido reportado un modelo que permite estudiar el estado crónico de un aneurisma utilizando un modelo de ratón. Este se basa en la administración combinada de β -aminopropionitrilo (BAPN) y elastasa permitiendo estudiar los elementos del remodelado arterial, así como la formación del trombo y la ruptura del aneurisma ¹⁷³.

El uso de esta técnica hizo posible conocer los cambios relacionados con el remodelado arterial, así como además profundizar en los distintos mecanismos moleculares implicados. En este sentido cabe destacar la importancia que han cobrado las sirtuinas, las cuales son un conjunto de proteínas pertenecientes a las histonas desacetilasas (HDAC) de clase III, por su vasta participación en procesos celulares tales como proliferación, diferenciación, apoptosis, metabolismo, regulación del ciclo celular y envejecimiento ¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

Asimismo, la desregulación de las sirtuinas se ha vinculado con el desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad, diabetes mellitus, hígado graso; así como enfermedades cardiovasculares como HTA, disfunción endotelial, síndrome cardíaco agudo, arritmias, infarto, y aortopatías como la aterosclerosis, AD y AAA ¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

Histonas desacetilasas (HDACs) y su rol en la HTA y aortopatías.

Los procesos epigenéticos son modificaciones que se llevan a cabo sobre el DNA e histonas, con la finalidad de regular de una manera rápida y precisa, la transcripción génica. Uno de los principales mecanismos es a través de la acetilación y desacetilación de histonas, por las histonas acetiltransferasas (HATs) e histonas desacetilasas (HDACs), respectivamente ¹⁸⁰. Las HDACs son enzimas que se encargan de escindir los grupos acetilos del aminoácido lisina, de las histonas, silenciando en la mayoría de los casos, la expresión génica ¹⁸¹.

En humanos se han descrito 18 miembros de esta familia de HDACs agrupadas en 4 grupos (I, II, III y IV). A nivel vascular, las HDACs de clase I y III han sido vinculadas con procesos de aterosclerosis, HTA y otras enfermedades cardiovasculares ¹⁸⁰. A continuación se definirán con mayor detalle las sirtuinas (HDACs tipo III) y las HDACs de clase I.

Sirtuinas.

A las sirtuinas (HDACs tipo III) de mamíferos, se les atribuyó dicho nombre por presentar una homología con la proteína Sir2 de *Saccharomyces cerevisiae*, vinculada con la longevidad¹⁷⁵. Originalmente descritas como desacetilasas de histonas¹⁸⁰, hoy se las conoce como proteínas deacilasas dependientes de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido) siendo esta última la principal característica que las diferencia del resto de las HDACs¹⁸².

Esta familia de deacilasas está formada por siete miembros en mamíferos (SIRT1-7), que comparten un dominio catalítico altamente conservado, y un sitio de unión para el sustrato NAD⁺. Su principal función es remover grupos acilo de residuos de lisina en sus proteínas blanco, siendo importantes reguladores epigenéticos y transcripcionales. Las funciones de las sirtuinas abarcan longevidad, metabolismo energético, reparación del ADN, respuestas al estrés oxidativo, y además se han destacado por su rol protector en enfermedades vinculadas con el envejecimiento tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedades neurodegenerativas^{175,183,184}.

Las sirtuinas pueden encontrarse en el núcleo y citoplasma (SIRT1-2), núcleo y eventualmente citoplasma (SIRT6), en núcleos y nucléolos (SIRT7), o en mitocondrias (SIRT3-5), presentando especificidad de tejido, actividad y blancos moleculares^{185,186}. Algunas de estas enzimas pueden actuar como ADP-ribosyltransferasas, lipoamidasa (SIRT4), hidrolasa (SIRT6), demalonilasa, decrotonilasa (SIRT3)¹⁸⁷ y desuccinilasa (SIRT5)^{184,188} lo que habla de una diversidad de funciones y un estricto control en la regulación celular.

De todas las sirtuinas, SIRT1 es el miembro que ha sido mejor caracterizado, y se encuentra altamente expresado en células vasculares¹⁸⁹. Dentro de sus funciones se encuentra regular los procesos de proliferación, apoptosis, inflamación, senescencia y metabolismo, llevados a cabo por medio de la desacetilación de factores de transcripción como Forkhead (FOXOs), el NF-kB, p53, el coactivador transcripcional peroxisome proliferator-activated receptor-g co-activator-1a (PGC-1a), entre otros^{174,190,191}.

Existen numerosas evidencias que vinculan a SIRT1 con la regulación de la función de CE y VSMC relacionada con el tono vascular. Además durante el proceso de remodelación arterial producto de la HTA, ocurren una serie de eventos que van desde procesos de hiperplasia, disfunción endotelial, y apoptosis celular, hasta la desregulación

de las MMPs, producción de ROS y citoquinas proinflamatorias ¹⁸⁶. SIRT1 actúa contrarrestando algunos de estos eventos. Por ejemplo, se ha demostrado que SIRT1 actúa sobre las CE modulando la actividad de la eNOS, y con ello favoreciendo la disponibilidad de NO el cual es un potente vasodilatador ¹⁹² Por otra parte, SIRT1 desacetila a p53, favoreciendo la progresión del ciclo celular. La inhibición de SIRT1 genera un incremento en la acetilación de p53 y un cambio en el fenotipo celular de tipo senescente ¹⁹³. Además, SIRT1 controla la expresión de algunas proteínas implicadas en el proceso de estrés oxidativo, por medio de la desacetilación de la familia de los factores de transcripción FOXO ^{190,194}. Por otro lado, SIRT1 actúa en la vía del NFκ-B, desacetilando e inhibiendo la actividad transcripcional de la subunidad RelA/p65, disminuyendo de esta forma la respuesta inflamatoria ¹⁹⁵.

En relación al papel que juega SIRT1 en el control de las VSMC, por medio del eje SIRT1/FOXO se observó que las VSMC mantienen su fenotipo contráctil, luego de exponerlas a un estímulo fisiológico de estiramiento mecánico, manteniendo de este modo la homeostasis vascular ¹⁹⁴. A su vez, se observó que la sobreexpresión de SIRT1 en un modelo murino de injuria vascular, inhibió la formación de la capa neoíntima, presentando una reducida expresión de la proteína del ciclo celular Ciclina D1, y de la MMP9, lo que se traduce respectivamente, en una menor proliferación y migración celular ¹⁹⁶.

Un estudio donde se utilizó un modelo de HTA por infusión con ANG II sobre un ratón transgénico que sobreexpresa SIRT1, demostró que estos ratones presentan una atenuación de los niveles de PA, mitigación de los efectos sobre el remodelado vascular, disminución tanto de componentes de estrés oxidativo (ROS), como de fibrosis e inflamación. Además, estos ratones estuvieron protegidos contra la hipertrofia de las VSMC. Todas estas acciones se deben en parte al efecto inhibitorio de SIRT1 sobre TGFβ, así como de la vía de NFκB ¹⁹⁷.

En la misma línea con estos resultados, otro estudio utilizó un activador de SIRT1 (resveratrol), en un modelo murino de infusión con ANG II, hallando tanto *in vivo* como *in vitro*, que el tratamiento con el activador de SIRT1, en presencia de ANG II, causó una disminución de la expresión tanto a nivel transcripcional como traduccional del AT1R. Estos resultados van en el mismo sentido que los reportes previos en los cuales se observa una atenuación en la subida de la PA en animales que sobreexpresan SIRT1 ^{197,198}.

Una de las consecuencias de la HTA es el desarrollo de AD, y en este sentido SIRT1, como se ha venido mencionando, tiene una acción sobre distintos mecanismos del proceso de remodelación vascular. En relación a este punto, dos trabajos demostraron recientemente, que ratones SIRT1 KO específicos para VSMC, como SIRT1 KO específicos para macrófagos, sometidos a una infusión con ANG II, están propensos a desarrollar AD con un porcentaje de incidencia mayor con respecto a los WT, mostrando además los ratones KO, una incrementada mortalidad causada por la formación de AD^{178,199}.

Resultados similares fueron observados utilizando otro modelo de generación de AD en ratones, en cuyo caso se detectaron bajos niveles transcripcionales de SIRT1, y una disminución significativa en la incidencia de AD, cuando el tratamiento fue combinado con un activador de SIRT1, demostrando así el rol fundamental de SIRT1 en la protección contra estas aortopatías. Además, en este mismo estudio, se analizaron aortas de pacientes con AD, mostrando también una disminución en los niveles de SIRT1²⁰⁰.

Histonas desacetilasas de clase I.

Así como las sirtuinas, otro grupo de histonas desacetilasas (HDAC) de tipo I se han visto implicadas en el desarrollo de HTA y enfermedades cardiovasculares²⁰¹⁻²⁰³, presentando un rol dual frente a estas enfermedades. Las HDAC representan un conjunto de enzimas encargadas de modular la expresión génica por medio de modificaciones epigenéticas²⁰⁴, principalmente suprimiendo de manera rápida y reversible a un conjunto de genes que se encuentren expresados. La manera de hacerlo es por medio de la remoción del grupo 1-N-acetilo del aminoácido lisina de las histonas y otras proteínas no vinculadas al ADN²⁰⁵.

Uno de los miembros de esta familia es la HDAC3, la cual pertenece al grupo de las HDAC de clase I y se encuentra expresada tanto a nivel nuclear como citoplasmático. Su función está relacionada con eventos de proliferación y supervivencia celular¹⁸². Estudios realizados por Zeng y col., demostraron la importancia de HDAC3 en la diferenciación de las células endoteliales, en un modelo *in vitro* a partir de un cultivo de células embrionarias prediferenciadas²⁰⁶

El uso de inhibidores de HDAC, ha permitido discernir las funciones vinculadas con enfermedades cardiovasculares, y en base a esto, se reportó recientemente que tanto

HDAC3 como HDAC4 median el proceso de HTA en un modelo de rata hipertensa y sometida a un tratamiento con DOCA ²⁰⁷ Además, por medio del uso de un inhibidor específico para HDAC3, se pudo demostrar una atenuación tanto de la hipertensión como de la hiperglicemia, en un modelo de síndrome de Cushing ²⁰².

Resultados similares en un modelo murino de hipertensión inducida por ANG II, pudieron constatar que el uso de un inhibidor específico de HDAC3 atenúa el proceso de HTA, por un lado, suprimiendo la producción de citoquinas proinflamatorias, así como disminuyendo el proceso de remodelación vascular característico de la HTA y la proliferación de las VSMC ²⁰⁸.

Con respecto a la función de las HDAC y formación de AD, se reportó recientemente, que la disminución en la expresión de las HDAC de tipo I y II, por medio de un inhibidor específico en un modelo murino de infusión con ANG II, atenuó la formación de AD ²⁰⁹ Estos resultados sugieren una diferencia en las funciones que llevan a cabo los distintos grupos de HDACs, las cuales pueden tener efectos opuestos, dentro del contexto de la HTA y AD.

DBC1: un regulador epigenético de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT).

Deleted in breast cancer 1 (DBC1), también conocida como CCAR2, p30 DBC, o KIAA1967 es una proteína nuclear de expresión ubicua que fue descrita hace más de una década, y se localiza en la región cromosómica 8p22, originalmente identificada como ausente en algunos tipos de cáncer de mama ²¹⁰. Esta proteína está implicada en la regulación de los procesos de transcripción ya que actúa directamente sobre algunas enzimas responsables del remodelado de la cromatina y sobre algunos factores de transcripción, desencadenando respuestas celulares que incluyen la reparación de daño al ADN, metabolismo, proliferación, apoptosis, ciclo circadiano, splicing de ARN, entre otras ²¹¹.

A nivel estructural presenta varios dominios (ver figura 12). En el extremo C-terminal contiene una región “coiled coil” que se presume importante para la interacción con otras proteínas. DBC1 también contiene un dominio Nudix de unión a nucleótidos ²¹². Este dominio caracteriza a una familia de hidrolasas con baja especificidad de sustratos, aunque es probable que DBC1 no presente actividad enzimática. Se determinó que por la unión de este dominio con el NAD⁺, DBC1 regula la función de PARP1

[poli(adenosina difosfato-ribosa) polimeasa], una proteína clave en la reparación al daño del ADN²¹³.

DBC1 también presenta un dominio tipo S1 de unión a ARN. De hecho, DBC1 es parte de un complejo que asocia la transcripción dependiente de la ARN polimerasa II con el splicing de los ARNs^{212,214}. Además se ha mostrado que este dominio de DBC1 es un sitio de unión con el ARN no codificante de cadena larga, MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1)²¹⁵. Finalmente, el dominio N-terminal de DBC1, que contiene un cierre de leucina (leucine zipper, LZ), es el responsable de la interacción con varios receptores nucleares y enzimas²¹⁶⁻²¹⁹.

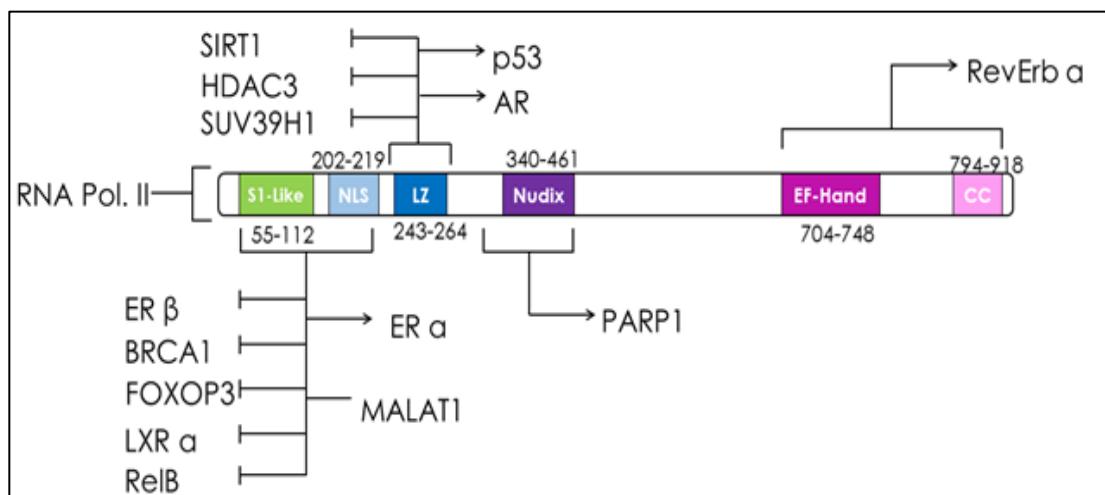


Figura 12. Esquema de la estructura de DBC1 (modificado por Leonardo Santos).

DBC1 modula la transcripción y actividad biológica de diversos factores de transcripción y reguladores epigenéticos incluyendo SIRT1^{216,217,220}, HDAC3²²¹, p53²¹⁶, BRCA1²²², receptor de andrógeno²²³, receptor de estrógeno^{224,225}, Rev-erb-alpha²²⁶ y PARP1²¹³, entre otros.

Los sitios de unión de DBC1 con la mayoría de sus interactores ha sido bien documentada, y ocurre en su región amino terminal^{218,216,223,225,215}.

Como se mencionó anteriormente, DBC1 está implicada en una diversidad de procesos celulares, y la mayoría de trabajos reportados están vinculados con el rol de DBC1 en el cáncer, en donde esta proteína presenta un papel dual, ya que dependiendo del tipo de cáncer y localización, puede actuar tanto como supresora o promotora de tumores; en ambos casos, como consecuencia de un desbalance en el ciclo celular y por

ende, en el proceso de apoptosis. Además, se ha estudiado la función de DBC1 en los procesos de reparación del ADN frente al estímulo de daño y, más recientemente, se han reportado distintos trabajos que muestran una vinculación de esta proteína con el metabolismo celular ^{217,227,228}.

En relación con el metabolismo celular, Escande y col. demostraron que DBC1 es un regulador negativo de SIRT1 *in vivo*, y que la interacción entre ambas proteínas es regulada por el balance energético del individuo. En condiciones de ayuno, ambas proteínas no interactúan; lo que aumenta la actividad enzimática y biológica de SIRT1. Por otro lado, esta situación se revierte con un incremento de la ingesta energética ^{217,229}. Siguiendo el contexto metabólico, ratones KO para DBC1 sometidos a una dieta con alto contenido lipídico están protegidos contra la resistencia a la insulina, la esteatosis hepática ²¹⁷ y la aterosclerosis ²²⁹. A su vez, se demostró a nivel del tejido graso de estos animales, que DBC1 regula la senescencia celular a través de la actividad de la HDAC3 ²³⁰, mientras que en el hígado, DBC1 participa en el control de la gluconeogénesis regulando la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) ²²⁸.

Por otra parte, está bien establecido que DBC1 actúa en el proceso de reparación al ADN, por medio de la inhibición de SIRT1. Esta sirtuina posee la habilidad de inhibir al factor de transcripción p53, desacetilándolo, y este factor es clave en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, por lo cual, frente a un proceso de daño, p53 regula la transcripción de genes relacionados con procesos de arresto del ciclo celular, senescencia o apoptosis ²³¹. Asimismo, se descubrió que frente a un estímulo genotóxico, DBC1 favorece la acetilación de p53 de forma dependiente de SIRT1 desencadenando un proceso de apoptosis ^{216,220}. Sin embargo, DBC1 también puede regular el proceso de apoptosis mediado por p53, pero en este caso de una forma independiente de SIRT1, compitiendo con la ubiquitina ligasa E3 murine double minute 2 (MDM2), por el sitio de unión al ADN de p53, evitando de esta manera su degradación por la vía del proteosoma ²¹⁶.

En otro estudio relacionado con la progresión del ciclo celular, se demostró que a nivel *in vitro*, empleando células de cáncer de mama, sometidas a un estímulo genotóxico por radiación, que la ausencia de DBC1 provoca un desbalance de las proteínas implicadas en el control del ciclo celular, resultando en la deficiencia del proceso de apoptosis ²³².

Como se puede apreciar, la regulación de DBC1 es compleja, y como hemos visto, puede estar implicado en diversos destinos celulares, y en este sentido, se le ha atribuido una función en el proceso de proliferación celular. Por un lado, estudios realizados en líneas celulares tumorigénicas, han permitido conocer que la ausencia de DBC1 previno la proliferación de estas células, por medio de la inhibición de la vía de señalización PI3K-AKT, la cual está implicada en los procesos de supervivencia, proliferación y migración celular²³³. Sin embargo, por otro lado, otros estudios demostraron que DBC1, por medio de la regulación de la vía de las Wnt/ β -catenina, exacerbó la respuesta de hiperplasia celular lo que derivó en una progresión a un cáncer colorrectal^{234,235}. Más recientemente se demostró que esta ambigüedad de DBC1 en la regulación del proceso de proliferación dentro del contexto del cáncer, puede deberse a la ocurrencia de mutaciones del gen que codifica para esta proteína, o a cambios postraduccionales que generen otras variables de DBC1, complejizando así el entendimiento de sus funciones.

Debido a que uno de nuestros objetivos en este trabajo es evaluar el rol de DBC1 durante un contexto de proliferación celular, es importante describir cómo se desarrolla el ciclo celular, y cuáles son sus principales componentes.

DBC1 y la regulación del ciclo celular.

Como se ha comentado, DBC1 actúa sobre diversas proteínas que regulan la progresión normal del ciclo celular, como p53. Recientemente fue demostrado que DBC1 puede ser regulado por la proteína reguladora de los puntos de control G1/S y G2/M del ciclo celular, la ATM. Esto ocurre por medio de la fosforilación de una treonina (T454) de DBC1 potenciando su interacción con SIRT1, y de esta manera generando una respuesta celular mediada por p53²³⁶. Si bien este sitio de fosforilación para ATM en DBC1 fue descrito en células humanas y ratas, y no está presente en ratón, esto no descarta otro sitio de regulación similar.

El Ciclo celular.

Para que una célula pueda duplicarse y dar origen a dos células hijas, es necesario que ocurra una fase de replicación de su ADN, la cual ocurre bajo estrictos controles. La primera etapa de este proceso es conocida como fase de síntesis (S), y está separada de la fase de mitosis por dos puntos de control referidos como gap 1 (G1) y gap 2 (G2). En G1, la célula se prepara para la síntesis de su ADN mientras que en G2, ocurre la preparación para el proceso de mitosis o duplicación. Para que ocurran estos procesos

deben generarse señales específicas que lleven a la transcripción de genes cuyos productos son las ciclinas. Estas proteínas van a ser muy dinámicas, ya que a lo largo del desarrollo de un ciclo celular sus concentraciones van a ir aumentando o disminuyendo

237 .

A su vez las ciclinas van a formar complejos con diferentes proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, por su siglas en inglés), las cuales fosforilan a sustratos específicos que van a ser esenciales para que se lleve a cabo cada una de las fases del ciclo celular. Una de las primeras ciclinas que aparece en las fases iniciales del ciclo celular es la ciclina D en el punto de control G1, y aquí va a activar a las CDK4 y CDK6 formando un complejo, el cual va a permitir fosforilar a la proteína retinoblastoma (Rb), la cual mantiene reclutado al factor de transcripción E2F que es indispensable para que se inicie la transcripción de genes necesarios para la fase S. Otra ciclina que se expresa en la fase G1 tardía es la ciclina E que es rápidamente degradada luego de formar un complejo con la CDK2, y al quedar libre esta última, se une a la ciclina A, secuencia necesaria para que ocurra el inicio de la fase de síntesis del ADN (fase S). Por otro lado, se forma un complejo entre la ciclina B y la CDK1, el cual representa un paso limitante para la transición entre el punto de control G2 y la fase M (G2/M) ²³⁷.

Considerando la diversidad de rutas celulares vinculadas con DBC1, nos vamos a centrar principalmente en el proceso de proliferación celular. Por otra parte, a pesar de que existe evidencia de que algunos blancos moleculares que son regulados por DBC1, tales como la SIRT1 y HDAC3, se encuentran desregulados en algunas patologías como la hipertensión arterial y aortopatologías, no existen evidencias que vinculen la participación directa de DBC1 en el desarrollo de estas enfermedades, y es por ello que nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo.

Hipótesis

La hipótesis de este trabajo es que DBC1 a través de su interacción con sus ligandos, regula la función vascular en un modelo de HTA inducida por ANG II.

Objetivos

Objetivo General:

Comprender el posible rol que cumple DBC1 a nivel vascular y renal durante la hipertensión.

Objetivos específicos:

1. Evaluar si DBC1 regula la respuesta vascular frente a la HTA inducida por ANG II.
2. Estudiar la expresión de DBC1 y de blancos relacionados con el proceso de angiogénesis y remodelado vascular, en aortas procedentes de ratones WT o DBC1 KO, durante la HTA inducida por ANG II.
3. Estudiar si la ausencia de DBC1 o de algunos de sus blancos moleculares promueven cambios en la expresión de mensajeros relacionados con el proceso de remodelado vascular, empleando para ello knockdown específicos para estas proteínas, en VSMC.
4. Determinar los niveles de fibrosis y de proliferación celular a nivel vascular *in vivo* e *in vitro* a partir del modelo de HTA inducido por ANG II.
5. Evaluación primaria del rol de DBC1 en la regulación renal a partir del modelo de HTA inducido por ANG II, por medio del estudio de los parámetros fisiológicos, determinación de fibrosis y medición de marcadores de fibrosis, en riñones de animales WT y DBC1 KO y cultivos celulares.

Animales.

Se utilizaron ratones machos de 3-5 meses de edad de la cepa C57BL6/J (WT) y DBC1 KO generados a partir de 10 generaciones de cruzamientos con la cepa C57BL6/J, para garantizar la pureza genética. Los ratones de este estudio fueron provistos por la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo (IPMON). El protocolo experimental fue aprobado por el comité de ética del IPMON (CEUA. #014-14). Los animales se mantuvieron en cajas de hasta 5 animales, con agua y comida "ad libitum". Además se garantizaron las condiciones de temperatura y luz (14 horas de luz y 10 horas de oscuridad). Todos los experimentos se realizaron con dieta estándar.

Tratamiento con ANG II en ratones.

Los ratones fueron implantados a nivel subcutáneo con unas mini bombas osmóticas (Alzet, modelo 2004, 28 días de liberación) utilizando isoflurano como anestesia inhalatoria. Las bombas osmóticas contenían una solución de ANG II con una concentración tal que permitía una dosis de 1 mg/kg/día de ANG II (#A9525, Sigma, St. Louis Mo, EEUU) o una solución NaCl 0.9% (vehículo). Por diferencia de presión osmótica, la solución era liberada con una tasa promedio de 0.25 ± 0.01 μ l/h. El inicio de la liberación de la solución ocurrió a los 2 días post implante. Las bombas fueron mantenidas durante 9 o 30 días, tiempo en los cuales se realizaron los experimentos. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. En total se utilizaron 101 ratones infundidos con el vehículo o con ANG II (50 WT y 51 DBC1 KO).

Mediciones de presión arterial (PA).

El registro de la PA se llevó a cabo utilizando un sistema no invasivo (HT 4, versión 1.06; CODA PCS40 software, versión 4.1; Kent Scientific), que presenta una elevada precisión y hasta un 99% de correlación con los registros de telemetría, por lo que ha sido validado por muchos laboratorios. Para restringir el movimiento del animal, se lo ubica en un cepo que deja afuera la cola. En la cola se coloca un manguito ocluser y un

sensor de volumen y presión (VPR). Esta técnica tiene como desventaja que subestima la PA diastólica (PAD) en 12.2 mmHg, pero por otra parte la variación en la PA sistólica es de apenas un 0.25 mmHg, razón por la cual el criterio de selección fue quedarnos con los valores de PAS²³⁸. El manguito ocluye el flujo sanguíneo y al desinflarse, el sensor VPR sensa el volumen sanguíneo en la cola en un determinado valor de presión. Los valores de PAS obtenidos con valores de volumen menores a 15µl fueron descartados, de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. A partir de este registro, además de obtener la PAS y PAD se puede calcular la PA media, frecuencia cardíaca, volumen y flujo de sangre. Este método es preciso y ampliamente usado ya que las mediciones se hacen en el animal consciente, y por esta razón es necesario realizar un periodo de aclimatación en el animal para que se habitúe a esta actividad. Para ello durante las 4 semanas previas a la implantación de las bombas osmóticas, se realizan mediciones de PA (las 2 primeras semanas con el fin de habituar al ratón al sistema de registro y 2 semanas más para obtener los registros basales). Asimismo, es importante incorporar la adaptación del ratón en el ambiente en el cual se van a realizar las mediciones y para ello, los animales deben de mantenerse durante un 1 h a 30 °C, cada vez que se vaya a realizar esta rutina de registro de PA. Posterior al implante de las bombas osmóticas se siguen realizando las mediciones 2 veces por semana durante las 4 semanas de tratamiento (vehículo y ANG II). Los valores de PA de cada semana corresponden a la media de los valores de los dos días de la semana y a su vez el valor de cada día surge del promedio de las 15 mediciones que se realizan por sesión (se toman las 15 si todas fueron validadas por el sistema en forma automática y por el operador, es decir con volúmenes mayores a 15 µl, sin ruidos por movimiento y con variaciones menores a 2 desvíos estándares en relación al valor promedio del día de registro).

Cajas metabólicas.

Una vez finalizado el tratamiento (vehículo o ANG II), los ratones fueron colocados de forma individual en cajas metabólicas (Tecniplast), las cuales permiten obtener por separado la materia fecal y la orina así como controlar la ingesta de comida y agua. El primer día correspondió al periodo de aclimatación, y en las siguientes 24 h se hicieron los registros correspondientes. La orina recogida fue medida (para calcular la diuresis), centrifugada y congelada para su posterior procesamiento.

Cuantificación de albúmina urinaria y confirmación de identidad por Espectrometría de Masa.

El contenido de proteínas totales de la orina fue cuantificado mediante la comparación de la turbidez de las muestras en presencia de ácido 5-sulfosalicílico al 3% con respecto a un estándar de albúmina de suero bovino (BSA) a una longitud de onda de 620 nm. Iguales cantidades de proteínas totales fueron cargadas en un gel de poliacrilamida 12.5 % con SDS (SDS-PAGE), luego de la electroforesis fueron fijadas y teñidas con azul de Coomassie. Las bandas de proteínas fueron cuantificadas por densitometría usando como estándar una mezcla comercial de proteínas (LMW cal. kit for SDS electrophoresis, Amersham, GE Healthcare). El análisis de imagen se realizó con el programa ImageQuant TL 8.1. Para el análisis por espectrometría de masa (MS) las proteínas de la orina fueron resueltas completamente (para el análisis por MALDI TOF/TOF) o sólo 1 cm (para el análisis por LC/MS); la banda de 69 kDa o la banda total de 1 cm respectivamente fueron cortadas de cada carril de muestra. Las bandas de gel fueron desteñidas con 50% de acetonitrilo (ACN) en 100 mM de bicarbonato de amonio (AMBIC), pH 8.0. Los puentes disulfuro fueron reducidos con 10mM de ditioneitol (DTT) durante 1 h a 56°C y luego carbamidometilados con 55 mM de iodoacetamida (IAA) durante 45 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. La digestión en gel de las proteínas se realizó con tripsina (sequencing grade, Promega) en una relación enzima:proteína de 1:50 (w:w) durante toda la noche a 37°C. Los péptidos resultantes se extrajeron del gel con una solución del ACN 60%/ ácido trifluoroacético 0.1% en agua ultrapura y fueron desalados usando micro-columnas C18 (Merck, Millipore).

Para el análisis por MALDI-MS los péptidos tripticos fueron cargados en la placa de MALDI con una solución saturada de ácido α -cyano-4-hidroxicinámico. Los espectros de masa fueron adquiridos en un MALDI TOF/TOF 4800 (Abi Sciex) en modo reflector positivo previo a la fragmentación (MS/MS) de péptidos seleccionados. La identificación de las proteínas se realizó mediante la búsqueda contra una base de datos de SwissProt (2016_09) usando el programa Mascot (Matrix Science). Para la búsqueda se permitió una tolerancia en la masa del precursor de 0.05 Da y para los fragmentos de 0.6 Da. La oxidación de metionina y la carbamidometilación de cisteína fueron consideradas como modificaciones variable y fija respectivamente. Se permitió un máximo de cortes salteados de 1 y no se restringió la taxonomía. Se tomaron como identificaciones positivas las proteínas identificadas con al menos un péptido e identificadas de manera significativa ($p < 0.05$) por el programa.

Para el análisis por LC-MS/MS se utilizó nano HPLC EASY-nLC 1000 HPLC (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masa LTQ Velos mediante una fuente Easy-Spray (Thermo Fisher Scientific). Las muestras fueron cargadas en una precolumna (Acclaim PepMap™ 100, C18, 75 µm X 2 cm, 3 µm) y separadas con una columna analítica Easy-Spray (PepMap™ RSLC, C18, 75 µm X 50 cm, 2 µm) a 45 °C usando un sistema de dos solventes: (A) ácido fórmico 0.1% en agua, (B) ácido fórmico 0.1% en ACN. La columna fue equilibrada a 4% B seguido de un gradiente de elución como sigue: 4% a 55% B por 70 min, 55% a 99% B por 15 min, 99% B por 5 min y 1% A por 15 min, a un flujo constante de 250 nL/min.

El espectrómetro de masa fue operado en modo positivo, con un voltaje de espray de ionización de 2.3 kV y una temperatura de capilar de 260°C. Para la adquisición se utilizó un método dependiente de datos (DDA) controlado por el programa Xcalibur 2.1 (Thermo Scientific). Se adquirieron espectros de MS en un rango de m/z entre 400 y 1200 seguidos de la fragmentación (MS/MS) de los 10 iones más intensos usando disociación inducida por colisión (CID) con un nivel de energía de 35, activación Q: 0.25 y tiempo de activación de 15 ms

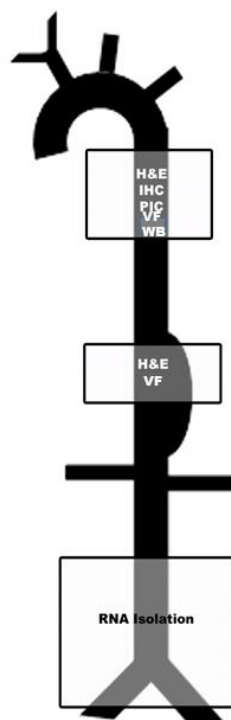
Análisis computacional de las proteínas diferenciales detectadas en orina.

La identificación de proteínas y el análisis cuantitativo (libre de marcaje), se realizó con el programa PatternLab for Proteomics 4.0 (PatternLab)²³⁹. Se utilizó una base de datos de *Mus musculus* de UniProt (<https://www.uniprot.org>, 26/08/2020). Los parámetros de búsqueda se configuraron como sigue: especificidad enzimática triptica, oxidación de metionina como modificación variable y carbamidometilación de cisteína como modificación fija. Tolerancia de m/z para el precursor de 800 ppm y parámetros predeterminados de baja resolución para el análisis de los MS/MS. Las identificaciones se filtraron por un nivel de FDR ≤ 1% a nivel de proteínas y con un mínimo de 2 péptidos por proteína. Los módulos de diagrama de Venn y TFold del PatternLab se usaron para determinar las proteínas diferenciales entre condiciones biológicas con un nivel de significancia $p < 0.05$.

Aislamiento de tejidos y diagnóstico de Disección Aórtica (AD).

Los ratones fueron anestesiados con una dosis intraperitoneal de 180 y 24 mg/kg ketamina-xilacina, respectivamente. Antes de proceder con el aislamiento de tejidos, se extrajo sangre por punción cardíaca (que más tarde se centrifugó para obtener el plasma y

almacenarlo a -80°C). Se aislaron aortas bajo la observación de microscopio de disección, haciendo un análisis macroscópico de la aorta completa, para posteriormente seccionarla en varios fragmentos. Las disecciones aórticas se evidenciaron *in situ* por la dilatación de un segmento de la aorta a nivel abdominal (y en contados casos también a nivel de la aorta torácica), y por encima de las arterias suprarrenales, con presencia de un coágulo adherido a un tejido adventicial fibrótico y vascularizado, expandido y de difícil remoción. Para confirmar la naturaleza de la lesión este segmento de la aorta fue cortado, fijado en PFA al 4% y procesado para histología. La región previa a la lesión correspondiente a una sección de la aorta torácica descendente, fue fijada en PFA al 4%, y procesada para inmunohistoquímica e histología empleando las coloraciones de Hematoxilina & Eosina (H&E), Verhoeff (VF), picrosirius red (colágenos), o congelada en nitrógeno líquido para su posterior procesamiento por Western Blot (WB). El fragmento de la aorta abdominal ubicado por debajo de la lesión (en los casos en los cuales se detectó), y hasta las arterias ilíacas inclusive, fue congelado en nitrógeno líquido para su posterior procesamiento por real time qPCR. Los riñones de los ratones fueron fijados al 4% PFA e incluidos en parafina para su procesamiento histológico, e inmunohistoquímico, o criopreservados para WB o biología molecular. A continuación se muestra un esquema, ilustrando las diferentes porciones de aorta que fueron procesadas.



Cultivos de células.

Células embrionarias de ratón (MEFs) fueron aisladas de una hembra preñada de 14.5 días de gestación. El medio utilizado para crecerlas fue DMEM (glucosa 4.5g/L), suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), 2 mmol/L glutamina, 100 U/mL penicilina-estreptomicina. Células musculares lisas vasculares (VSMCs) fueron obtenidas a partir de explantos de aortas abdominales de ratones machos WT y DBC1 KO, siguiendo la metodología descrita por otros ²⁴⁰. Brevemente, las aortas fueron disecadas y cortadas en aproximadamente 0.1mm y colocadas en alfa MEM (glucosa 1g/L), 10% FBS, 2 mmol/L glutamina, 100 U/mL penicilina-estreptomicina y al cabo de 4 días empezaron a verse pequeños cúmulos de células que empezaron a proliferar. Para confirmar la pureza y homogeneidad del cultivo se realizó una IF para α SMA. Células epiteliales de túbulo proximal renal humanas (HK-2), fueron adquiridas a ATCC y crecidas en medio de queratinocitos suplementado con 2% FBS y 100 U/mL penicilina-estreptomicina. Todos los cultivos fueron mantenidos en una incubadora con temperatura y CO₂ controlado (37°C y 5%, respectivamente). Todos los experimentos fueron realizados con células con un máximo de 4 pasajes.

Procedimiento de transfección de siRNA.

VSMC y HK-2 fueron sembradas en placas de 6 pocillos usando el medio de cultivo correspondiente a cada línea. Cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia fueron transfectadas con 25 pmol Lipofectamina RNAiMax + 30nM de oligos siRNA inespecífico (para el control), o específicos para DBC1, SIRT1 y HDAC3. Pasadas las 24 h el procedimiento fue repetido, y las células se tripsinizaron 48h después de la segunda transfección. (SiRNAs Ambion. Control negativo 4390843; HDAC3 4390771) o Invitrogen (DBC1 MSS211964, Hss126769 y SIRT1 MSS23495, Hss1187299). Los controles de silenciamientos fueron corroborados a través de un WB.

Western Blot (WB).

Células o tejidos (50–100 mg) fueron lisados en buffer NETN (25 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP40 RIPA (25 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS), respectivamente. Luego se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Se realizaron geles de electroforesis de SDS-PAGE

para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética, y luego los geles fueron transferidos a membranas de Fluoruro de polivinilideno (PVDF) y posteriormente bloqueadas en un buffer Tris-0.2% Tween 20 y 5% leche descremada. Las membranas fueron incubadas toda la noche con anticuerpos anti DBC1 (Bethyl, 434 A), Ciclina D1 (Cell Signaling, 9262), Ciclina A (Abcam, 181591), PCNA (Cell Signaling, 92552), o tubulina (Abcam, 7291). Por último, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios y las bandas fueron detectadas usando quimioluminiscencia. La densitometría de las bandas fue realizada usando el software Image J.

Incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU).

Se inyectaron 100mg/kg, IP, de 5 Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Abcam 142567) en la primera y cuarta semana de tratamiento. Los ratones fueron sacrificados y un segmento de la aorta torácica descendente y una mitad de uno de los riñones fueron fijados en PFA 4% por 24h a temperatura ambiente, para inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica para Bromodeoxuridina (BrdU).

Secciones de aorta torácica y de riñones marcadas con BrdU fueron embebidas en parafina y cortadas a 5µm. Seguidamente el tejido fue desparafinado, rehidratado e incubado con 2% H₂O₂ por 20 min para bloquear la señal no específica de la peroxidasa. Luego las muestras fueron incubadas con 2 M HCl por 15 min a 37 °C, para la hidrólisis del DNA, bloqueadas con 2% BSA-0.03% Triton X-100 por 1 h, incubadas con un anticuerpo anti BrdU (129956), y reveladas usando un anticuerpo secundario anti rata-HRP-Diaminobenzidina. La Hematoxilina fue usada como contratinción.

Arresto del ciclo celular.

MEFs y VSMC fueron sembradas en placas de 6 cm y cultivadas en sus respectivos medios de cultivo. Una vez que alcanzaron el 60% de confluencia, las placas de células fueron lavadas con PBS y al medio de cultivo se le privó de FBS. Las células fueron incubadas por 48 h y posteriormente, lavadas con PBS y mantenidas en medio de cultivo con FBS, durante distintos periodos de tiempo y tripsinizadas para su procesamiento por WB e inmunofluorescencia (IF) para la detección de marcadores de viabilidad celular.

Inducción de apoptosis celular.

MEFs WT y DBC1 KO fueron sembradas en placas de 6 cm y sometidas a un arresto celular. Posteriormente las células fueron incubadas en presencia o ausencia de FBS, y ausencia de FBS más etopósido 150 µM durante 1h, para promover la apoptosis.

Luego las células fueron lisadas y procesadas por WB o IF, para detectar la presencia de caspasa 3 activa.

Inmunofluorescencia (IF).

Las MEFs y VSMCs fueron incubadas con 2% BSA-0.03% Triton X-100 durante 1 h para bloquear uniones no específicas e incubadas a 4°C toda la noche con un anti Caspasa 3 (Sigma, AB3623) y anti KI67 (Abcam, 16667), respectivamente. Por último se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a un Alexa fluor 488 (Invitrogen) y las muestras fueron analizadas usando el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81.

Evaluación histológica de los tejidos.

Secciones de aortas y riñones de 5 µm fueron teñidas con H&E para identificación de estructuras, Picrosirius red (PIC) para colágenos y Verhoeff (VF) para fibras elásticas (aortas). Los especímenes fueron observados utilizando un microscopio de luz (magnificación 40x, 200x y 400x). Para proceder con la medición del grosor de la pared de los anillos aórticos, se diseñó un plugin en Image J. Para empezar se localiza el centro del lumen de la aorta y automáticamente se trazan 4 líneas que pasan a través de este punto, marcando la pared de la aorta en 8 lugares diferentes tomando en cuenta el mismo criterio de selección en todos, localizando la capa íntima y el límite externo de la media, sin considerar la capa adventicia. El grosor de la pared es automáticamente obtenido por el promedio de estas 8 mediciones. Por otra parte, para la medición de deposición de colágeno en aortas y riñones, se utilizó el plugin de Image J Wake Segmentation reportando el área ocupada por el colágeno (%). En las aortas se excluyó la capa adventicia para el análisis.

Contaje celular por citometría de flujo

Las VSMCs fueron contadas, sembradas en placas de cultivo de 10 cm y mantenidas en cultivo hasta que alcanzaran un 60% de confluencia. Seguidamente, el FBS fue removido del medio y se incubaron por 48 h para inducir la quiescencia. Luego el FBS fue nuevamente restaurado en el medio, y las células fueron colectadas a distintos tiempos, marcadas con yoduro de propidio para discriminar entre las células viables de las apoptóticas. Entonces las células fueron contadas utilizando el citómetro de flujo BD Accuri C6.

Tratamiento con ANG II en células.

Las células VSMC y HK-2 fueron crecidas hasta alcanzar un 90% de confluencia y mantenidas en medio al 0.1% FBS por 48 h. Entonces, las células fueron incubadas con 100nM ANG II (Sigma) para el caso de las VSMC y 24 h para el caso las HK-2, como ha sido descrito por otros ^{241,242}.

Aislamiento de RNA y qPCR.

Se homogeneizaron células y tejidos en Trizol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones e instrucciones del fabricante. Como paso previo a la elución del RNA, se hizo un tratamiento con una DNAsa para eliminar la posible contaminación con DNA genómico. Luego se realizó la transcripción reversa para pasar el RNA a DNA copia usando la enzima Superscript II (Invitrogen). Seguidamente se empleó la técnica de la reacción de la cadena polimerasa cuantitativa de transcripción reversa, y se realizó la PCR cuantitativa empleando el mix de Syber Green (Rocha). Los cambios relativos en la expresión de genes fueron expresados con respecto al control. Todos los primers fueron diseñados usando el programa primer3 determinando sus eficiencias. Las secuencias de los primers fueron sintetizadas por Integrated DNA Technology (IDT). A continuación se muestra una tabla con las secuencias de los cebadores.

Primers. Ratón		
DBC1	CTGTGCCAACAGAAAGCCAC	GAGACAGGTTGACACAGCGA
Metalloproteinase 2	ACCTGAACACTTTCTATGGCTG	CTCCGCATGGTCTCGATG
Metalloproteinase 9	GCAGAGGCATACTTGTACCG	TGATGTTATGATGGTCCCCTTG
Metalloproteinase 12	GCTGTCACAACAGTGGGAGA	ATGCTCCTGGGATAGTGTGG
VEGF-A	CAGGCTGCTGTAACGATGAA	TTTGACCCTTTCCCTTTCCT
β -Actin	AGCCATGTACGTAGCCATCC	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA
SIRT1	ATGACGCTGTGGCAGATTGTT	CCGCAAGGCGAGCATAGAT

HDAC3	ATGCCTTCAACGTGGGTGAT	AGAAGCCAGAGGCCTCAAAT
Fibronectina 1 (Fnt1)	AGACCATACCTGCCGAATGTAG	GAGAGCTTCCTGTCCTGTAGAG
α SMA	AGAGGCACCACTGAACCCTA	CCAGCACAATACCAGTTGTACG
Primers Humanos		
Fibronectin 1 (Fnt1)	AGCAAGCCCGGTTGTTATGA	CCCACTCGGTAAGTGTTCCC
α SMA	TATCCCCGGGACTAAGACGG	CACCATCACCCCCTGATGTCT
DBC1	CATGGACGGTTGGATCAGGG	TGAGGTGGACCCGGTAAGG
SIRT1	TGACCTTGTCAGATAAGGAAGG	ACAGCTTCACAGTCAACTTTGT
β -Actin	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
HDAC3	GAGTGGCCGCTACTACTGTC	TTCATATGTCCAGCAGCGG

Determinación de los niveles de creatinina.

Las muestras de orina de los ratones que se mantuvieron en cajas metabólicas fueron colectadas en las últimas 24 h previo a la eutanasia y junto con las muestras de sangre, fueron usadas para medir los niveles de creatinina empleando el reactivo de Wiener basado en la reacción de Jaffe ²⁴³. A partir de los datos de creatinina en sangre y orina, y conociendo el volumen de orina excretado, se calculó la tasa de filtración glomerular ²⁴⁴.

Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media \pm error estándar de la media. Para confirmar que las muestras siguieran una distribución normal, se aplicó el análisis de Shapiro Wilk. El test de t no pareado fue usado para comparar dos grupos independientes. El test de Mann-Whitney U fue usado para comparar dos muestras independientes en casos donde no se pudo demostrar una distribución normal. Para comparaciones múltiples,

se realizó el análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test de Bonferroni. Para las comparaciones de proporciones se usó el test exacto de Fisher. En todos los casos, los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Los resultados de este trabajo están divididos en dos bloques. Ambos se centran en el estudio de DBC1 tomando como base un modelo de HTA promovido por la ANG II. El primer bloque corresponde al objetivo principal, que es evaluar el rol de DBC1 a nivel vascular, mientras que un segundo bloque, está relacionado con la evaluación primaria del papel que juega DBC1 a nivel renal.

Evaluar la función de DBC1 sobre el sistema vascular, utilizando un modelo de HTA promovido por la ANG II.

La ANG II promueve HTA en ratones WT y DBC1 KO.

Con el objetivo de estudiar la regulación de DBC1 en la vasculatura, se utilizó un modelo de HTA inducido por ANG II. Ratones WT y DBC1 KO fueron tratados con una solución subcutánea de ANG II (1mg/Kg/día) o con el vehículo (solución salina), por 4 semanas. Durante ese tiempo fueron monitoreados los valores de PA, y una vez culminados los tratamientos, los ratones fueron colocados en cajas metabólicas donde se realizaron las mediciones de otros parámetros fisiológicos, como peso, diuresis e ingesta de agua. Como podemos apreciar en la figura **13A** el valor de presión arterial sistólica (PAS) registrada al culminar los tratamientos (ANG II o vehículo) fue aproximadamente de 140 mmHg en ambos genotipos (Fig. **13A**). Si observamos el registro de PAS a lo largo del tiempo, se aprecia que tanto los animales WT como los DBC1 KO, no presentaron diferencias en cuanto al desarrollo de la HTA (Fig. **13A**). Los ratones WT y DBC1 KO tratados con ANG II mostraron de modo similar, una pérdida significativa de peso (Fig. **13B**) y un incremento significativo de la diuresis y la ingesta de agua (Fig. **13C,D**), comparados con el grupo control (C). El tratamiento con ANG II también causó una hipertrofia cardíaca que fue más acentuada en los ratones WT con respecto a los ratones DBC1 KO (Fig. **13E**). Tanto la puesta a punto de este modelo de infusión con ANG II, como los resultados obtenidos de las mediciones de registro de PAS y parámetros fisiológicos, fueron realizados por la Dra. María Caggiani en el marco de su proyecto de maestría.

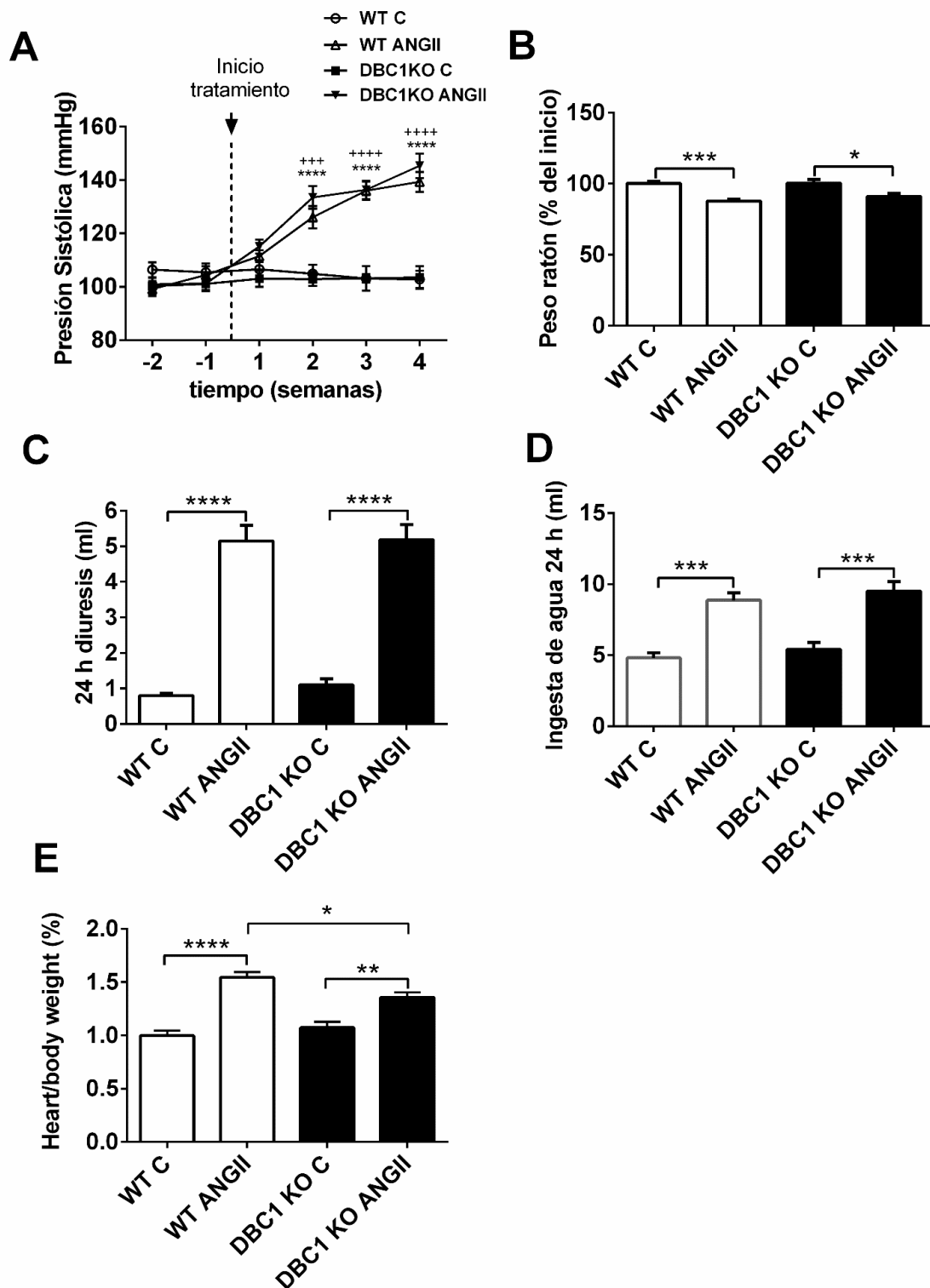


Figura 13. La ANG II induce hipertensión en ratones WT y DBC1 KO. (A) Medida de la presión sistólica en ratones WT y DBC1 KO tratados con una infusión de 1mg/Kg/día de ANG II o con el vehículo (C, grupo control). (B) Peso de los ratones WT o DBC1 KO tratados con ANG II o con el vehículo. Diuresis (C) e ingesta de agua (D) medidos después de 4 semanas de infusión con ANG II o con el vehículo. (E) Peso de los corazones de ratones WT y DBC1 KO sacrificados luego de las 4 semanas de tratamiento con

ANG II o vehículo. Se utilizó un ANOVA de una vía y el test de Bonferroni para hacer comparaciones múltiples entre el grupo tratado con ANG II y el grupo control. Los grupos experimentales estuvieron comprendidos entre 7 y 10 animales por cada grupo. En (A) 3 o 4 símbolos en cada semana significan $P < 0.001$ o 0.0001 respectivamente. (* WT y + DBC1 KO). En (B–E) *, **, *** y **** significan $P < 0.05$, 0.01 , 0.001 y 0.0001 , respectivamente.

Los ratones DBC1 KO son más susceptibles al desarrollo de disección aórtica (AD), en respuesta a una infusión con ANG II.

Finalizadas las 4 semanas de tratamiento con ANG II o vehículo, los ratones fueron sacrificados. Las aortas fueron disecadas para evaluar daño a nivel vascular, y macroscópicamente se observó una dilatación en algunas zonas del vaso, principalmente a nivel de la aorta abdominal descendente, por encima de las arterias renales. Todo el tejido adiposo perivascular que formaba parte de la lesión se encontraba fibrótico hasta el punto de tener dificultades durante la disección en esta zona. En algunos casos también se observó la aparición de pequeños coágulos adosados al segmento dilatado de la aorta. (Fig. 14A. Izquierda, la flecha blanca indica el sitio dilatado por encima de los riñones y un pequeño trombo adherido en la superficie externa). Una segunda lesión a nivel de la aorta torácica descendente se desarrolló en algunos ratones DBC1 KO tratados con ANG II (Fig. 14A. Derecha, la flecha blanca muestra un corazón con la aorta aislada). No se observaron lesiones en la porción de la aorta ascendente. Cabe destacar que el sitio descrito donde se desarrolló la lesión, ha sido reportado previamente en ratones Apo E, utilizando el mismo modelo de infusión con ANG II ¹⁵⁹.

El análisis histológico permitió hacer una descripción de la lesión, la cual presentó grandes similitudes con respecto a los reportes hechos por el grupo de Daugherty y col. ²⁴⁵. Se pudieron observar microrrupturas en los límites entre la túnica media y la adventicia [Fig. 14B. Se muestra una imagen panorámica de la lesión desarrollada en un ratón DBC1 KO (14B izquierda), y otra lesión más en detalle (14B centro), de la cual se selecciona el sector del recuadro negro, para mostrar una imagen con mayor aumento (14B derecha), donde las flechas negras indican la zona donde ocurre la disección de la media]. Además hubo extravasación de eritrocitos a nivel de las ramas arteriales laterales de la aorta abdominal. En algunas zonas hubo una mayor acumulación de estos glóbulos rojos, formando un falso canal. Mientras que en casos más severos, se observó una lesión caracterizada por una disección de la adventicia y la formación de un hematoma intramural (IMH, por sus sigla en inglés), como consecuencia de un coágulo de sangre, sin cambios aparentes en el diámetro del lumen de la aorta (Fig. 14B. Panel izquierdo, imagen

panorámica de la lesión desarrollada en un ratón DBC1 KO. Fig. **14B**. Panel derecha y Fig. **16E**. extravasación de eritrocitos).

A medida que el IMH comienza a formarse, como parte del proceso patológico, el espacio que lo bordea es ocupado por fibrina y sólo una capa de eritrocitos intactos es observada en la periferia. En lesiones más avanzadas, los eritrocitos ya no son visibles y en su lugar son reemplazados por células más alargadas, así como por tejido granuloso y colágeno, como consecuencia de una mayor deposición de elementos de matriz extracelular (ECM) (Fig. **14B**. Izquierda. Imagen panorámica de la lesión que desarrolló un ratón DBC1 KO). En algunos casos también se pudo apreciar una ruptura de la túnica íntima-media, que causó la dilatación del lumen (Fig. **14D**, flecha negra, panel izquierdo). Esto además fue acompañado por una interrupción parcial o total en la continuidad de las fibras elásticas (Fig. **14D**, flechas rojas, panel derecho). Esta interrupción de las fibras elásticas estuvo localizada principalmente, en los lugares donde un IMH estaba presente (Fig. **14D**, panel izquierdo). El análisis histopatológico fue realizado por nuestro grupo de trabajo bajo el asesoramiento del Dr. Mazal.

El próximo paso fue definir el nombre de la aortopatía observada. En este sentido muchas de las características de nuestro modelo coincidían con aquellas publicadas por el grupo de Daugherty y col. hace más de una década, y más recientemente los de Trachet y col. ^{157, 158}. Esta información nos permitió establecer el criterio para definir que el tipo de lesión que sufrieron principalmente los ratones DBC1 KO que fueron infundidos con ANG II, fue una disección aórtica (AD), en primer lugar porque las características que la definen son la separación de la capa media de la capa íntima, la ruptura de las fibras elásticas y la formación de un IMH ^{159,157}.

En este punto es importante hacer una aclaración entre lo que se entiende por aneurisma abdominal aórtico (AAA) y disección aórtica (AD). El primero hace mención a una dilatación de la aorta a un tamaño de su diámetro de 1.5 veces mayor mientras que la AD, se define como una disección de la túnica media, como producto de una lesión que surge en la íntima o en los vasa vasorum de la adventicia ^{132,134}. Estudios recientes basados en mediciones morfométricas más exactas, confirman que la lesión vascular causada por una infusión con ANG II en el ratón, es más una disección que un aneurisma ¹³⁴. De hecho, publicaciones más recientes dejan atrás el término de aneurisma, por el de AD ^{162, 161,246}.

El grupo de Daugherty propone que la AD es un paso previo al desarrollo de AAA ¹⁵⁷. Sin embargo, el término de AAA en el ratón no es del todo aceptado, debido a que

gracias al adelanto en las técnicas de imagenología, las mediciones morfométricas permitieron conocer que no en todos los casos ocurre una dilatación aórtica verdadera, sugiriendo que la fisiopatología de la lesión aórtica que prevalece en el ratón es más parecida a un proceso de AD ^{158,247}.

Una vez descrito y definido el tipo de lesión, se procedió a realizar el análisis estadístico del porcentaje de incidencia de AD entre los ratones WT y DBC1 KO, tratados con ANG II durante 4 semanas. Se observó una marcada diferencia significativa entre ambos genotipos. Los ratones WT tuvieron una incidencia de AD del 15%, mientras que en los ratones DBC1 KO la incidencia de AD rondó el 40% de los casos (Fig. **14C**). No se observó AD en ninguno de los ratones (WT o DBC1 KO) infundidos con el vehículo.

Para poder discernir los mecanismos por los cuales los ratones DBC1 KO presentaban una mayor susceptibilidad a padecer AD, nos centramos en estudiar uno de los factores claves para el establecimiento de este tipo de lesión. La elastina es una de las proteínas más abundantes de la pared de la aorta, y uno de los principales elementos de la ECM ²⁴⁸. La pérdida de continuidad de las fibras elásticas como consecuencia de un aumento en la degradación de elastina está vinculada con la fisiopatología de las AD ²⁴⁷, y esta proteólisis es llevada a cabo por parte de las MMP9 y MMP2 ¹¹⁵. Se ha visto que ambas enzimas se encuentran sobreexpresadas en el tejido aneurismal, tanto en humanos como en roedores ^{126,170}.

Se ha establecido que una de las respuestas mediadas por la ANG II es la inflamación ²⁴⁹, y esta última es un factor preponderante en el desarrollo de AD, y a nivel de la producción de las MMPs, se ha demostrado que los macrófagos son una fuente importante de la MMP9 ¹²⁶. La importancia biológica de la MMP9 y MMP2 en el desarrollo de AD, ha sido estudiada. Utilizando un ratón MMP9 y MMP2 KO, se logró atenuar la formación de AD ²⁵⁰. A su vez, se ha propuesto la MMP9 como un biomarcador de AD en humanos ⁸². Más recientemente, otra de las MMPs que ha cobrado importancia es la MMP12, expresada por macrófagos que invaden la pared de la aorta en pacientes con AD ¹⁴¹.

Así como durante el desarrollo de AD ocurre una degradación exacerbada de elementos de la ECM por parte de las MMPs, esta respuesta sirve como estímulo para promover la neovascularización en la zona de la pared de la aorta afectada, y este proceso puede ser potenciado por estímulos inflamatorios que causan a su vez la activación de las células endoteliales que proliferan y generan más angiogénesis. En este sentido, el factor

endotelial vascular (VEGF), se ha visto incrementado en aneurismas humanos, a nivel de la túnica media y adventicia ²⁵¹.

De igual modo, en los ratones también se observa el mismo fenómeno. El uso de un anticuerpo VEGF recombinante, en ratones infundidos con ANG II, exacerbó la formación de aneurismas ²⁵².

Dada la importancia de las MMPs y factores angiogénicos en el establecimiento de la AD ^{126,252}, nos planteamos evaluar el nivel de expresión de los mensajeros de algunas MMPs y de VEGF. En nuestro modelo de infusión con ANG II durante 4 semanas, se observó un incremento en la expresión del mensajero de la MMP9 sólo en los animales DBC1 KO (Fig. **14E**), al igual que el factor pro angiogénico VEGF (Fig. **14F**). La expresión de MMP12 y MMP2 estuvo también incrementada en los ratones tratados con ANG II, pero no hubo diferencias significativas entre WT y DBC1 KO (Fig. **14G,H** respectivamente).

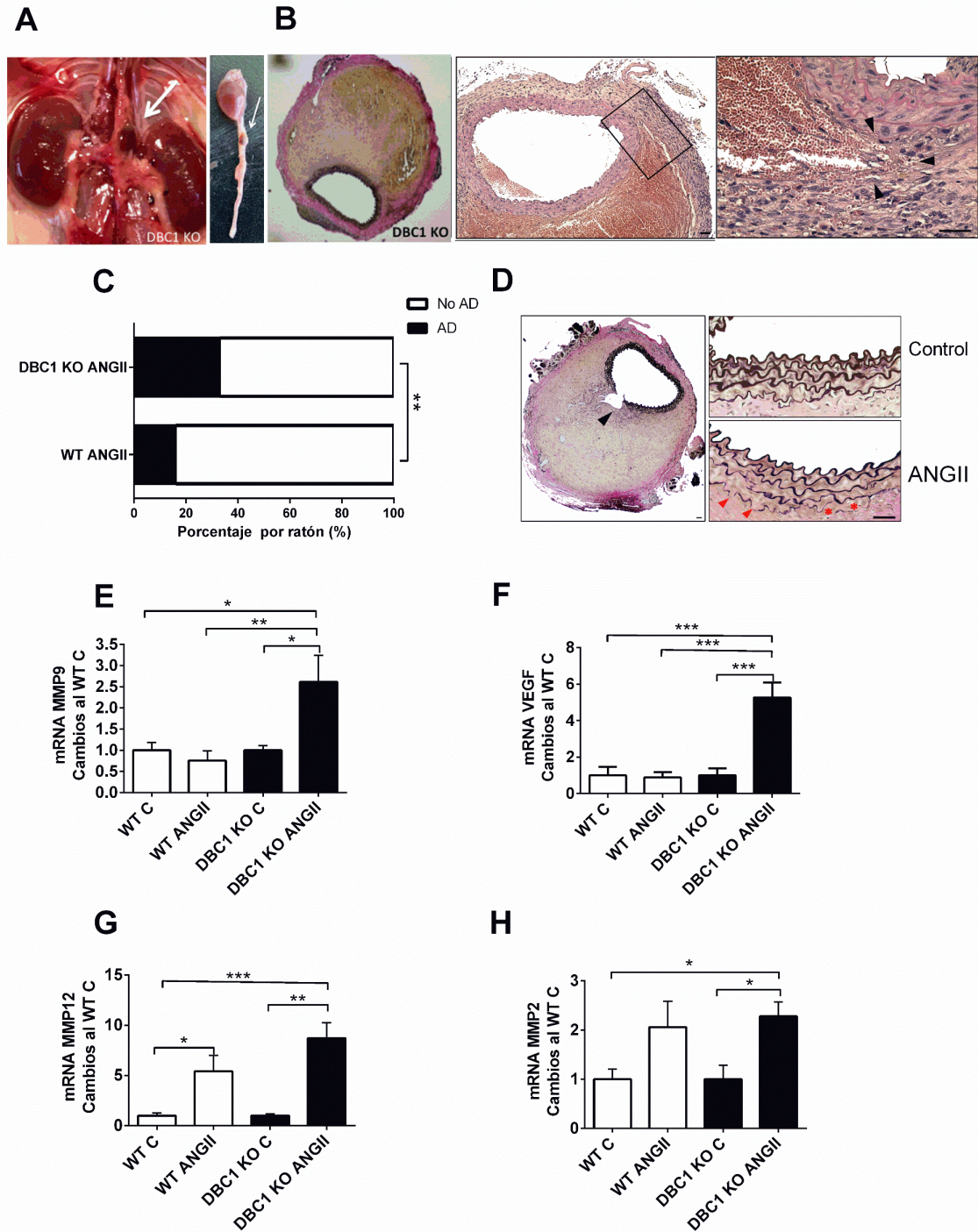


Figura 14. La ausencia de DBC1 incrementa la incidencia de disección aórtica (AD), en respuesta a un tratamiento con ANG II. (A,B) Caracterización macroscópica e histológica de la AD. **(A)** Aorta descendente *In Situ* y corazón aislado con su aorta. Las flechas muestran ejemplos de AD a nivel de la aorta abdominal descendente (panel izquierdo), así como un caso de AD a nivel de la aorta torácica, que fue observado en los ratones DBC1 KO (aorta con corazón aislado). **(B)** Análisis histológico de un hematoma intramural (IMH) causante de la AD. La imagen de la izquierda muestra una foto panorámica de un IMH de un corte transversal de una sección de aorta abdominal coloreada con Verhoeff. Las imágenes del centro y

de la derecha son secciones de la aorta teñidas con H&E. La imagen del centro muestra una panorámica de una zona de la aorta que presenta un trombo, mientras que la imagen de la derecha es una magnificación de la imagen del centro. Las flechas negras indican una zona donde ocurre la disección entre las capas íntima-media y adventicia, separadas por un espacio intramural donde hay presencia de eritrocitos intactos en la zona más periférica del hematoma. Barra de escala 40 μm . (C) Incidencia de AD en ratones WT y DBC1 KO tratados con ANG II (n = 37 y 36, WT y DBC1 KO respectivamente). El test exacto de Fisher fue usado para la comparación de los grupos. (D) Imagen representativa de una AD coloreada con la tinción de Verhoeff. Las flechas negras y rojas indican la disección de las capa íntima-media (como posible consecuencia de la expansión de un IMH) y ruptura de fibras elásticas, respectivamente. Barra de escala 40 y 500 μm , paneles izquierdo y derecho, respectivamente. (E–H) Expresión de mRNAs de MMP9, VEGF, MMP12 y MMP2 en aortas de ratones WT y DBC1 KO extraídas luego de 4 semanas de tratamiento con ANG II o vehículo (C). Se utilizó el test de ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni para múltiples comparaciones entre los grupos experimentales. *, ** y *** significan $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente (n = 8 por grupo).

El desarrollo de AD antecede a la hipertensión arterial (HTA).

Con el fin de establecer si el desarrollo de AD era una consecuencia del proceso de HTA más que una causa del tratamiento con ANG II, ratones WT y DBC1 KO fueron infundidos con una dosis de ANG II (1mg/kg/día) por una semana, y sacrificados para la evaluación post-mortem de las aortas. Si bien durante la primera semana de tratamiento con ANG II la PA se incrementa, (valores de PAS <120 mmHg), el aumento no es estadísticamente significativo con respecto a los controles que recibieron el vehículo (Fig. **13A**), y es a partir de la semana 2 donde comienzan a verse diferencias significativas entre los grupos tratados con ANG II y los controles. Durante las semanas siguientes los valores de PAS siguen subiendo (por encima de los 140 mm Hg), y estos valores son sostenidos en el tiempo, estableciéndose así una HTA (Fig. **13A**).

Como puede apreciarse en la figura **15A**, el tratamiento por una semana con ANG II promovió la formación de AD, y nuevamente los ratones DBC1 KO presentaron un mayor porcentaje de incidencia con respecto a los animales WT. Por otra parte, si comparamos la semana 1 y la semana 4 observamos que se mantiene la tendencia en estos porcentajes de incidencia (Fig. **14C**, **15A**), pudiendo concluir que efectivamente la ANG II promueve la formación de este tipo lesiones de manera independiente a la HTA. Los animales WT o DBC1 KO que recibieron el vehículo no formaron AD.

Estos resultados respaldan reportes previos que afirman que la ANG II es la principal causa de AD y antecede a la HTA^{253–255}. La figura **15B** muestra una imagen panorámica de un corte transversal de una aorta abdominal teñida con H&E, característica de una AD

con presencia de un IMH, que fue observada en algunos ratones que recibieron el tratamiento con ANG II por una semana.

El próximo paso fue confirmar si la expresión de la MMP9 y la MMP2 ya se encontraba incrementada en las aortas abdominales de los ratones que fueron infundidos con ANG II por 1 semana. Al igual que lo que ocurre a la semana 4, la MMP9 sólo se encuentra sobreexpresada en el grupo DBC1 KO tratado con ANG II (Figs. **14E**, **15C**), mientras que la MMP2 incrementa en todos los grupos que fueron infundidos con ANG II, con respecto a sus controles (Figs. **14H**, **15D**).

Por otra parte, se quiso investigar si una dosis menor de ANG II era capaz de inducir AD en los ratones, y para ello se utilizó una dosis de 0.6 mg/kg/día, durante 4 semanas. Si bien esta dosis no generó AD en los animales WT, sí lo hizo en los ratones DBC1 KO, mostrando una incidencia de AD de un 20% (Fig. **15E**), pudiendo así concluir que dosis más bajas de ANG II, son capaces de promover AD sólo en los animales DBC1 KO. Ninguno de los grupos que recibieron el vehículo formó AD espontáneos.

Debido a que el objetivo principal de este trabajo es evaluar el rol de DBC1 a nivel vascular, dentro de un contexto de HTA promovida por la ANG II, y para nuestra sorpresa, los ratones DBC1 KO presentaron una mayor incidencia de AD, con respecto a los animales WT (Figs. **14C**, **15A,E**), se quiso evaluar la expresión de esta proteína en los ratones WT, luego del tratamiento con ANG II.

Como se observa en la figura **15 (F,G)**, la expresión de DBC1 se vio significativamente aumentada en los ratones WT infundidos con ANG II, mientras estuvo prácticamente ausente en los animales control. Como era de esperar, las aortas de los ratones DBC1KO no mostraron expresión alguna de esta proteína (Fig. **15F,G**). Este resultado sugiere que DBC1 es regulada de forma dinámica durante el tratamiento con ANG II, y su ausencia, podría estar vinculada con el desarrollo de AD.

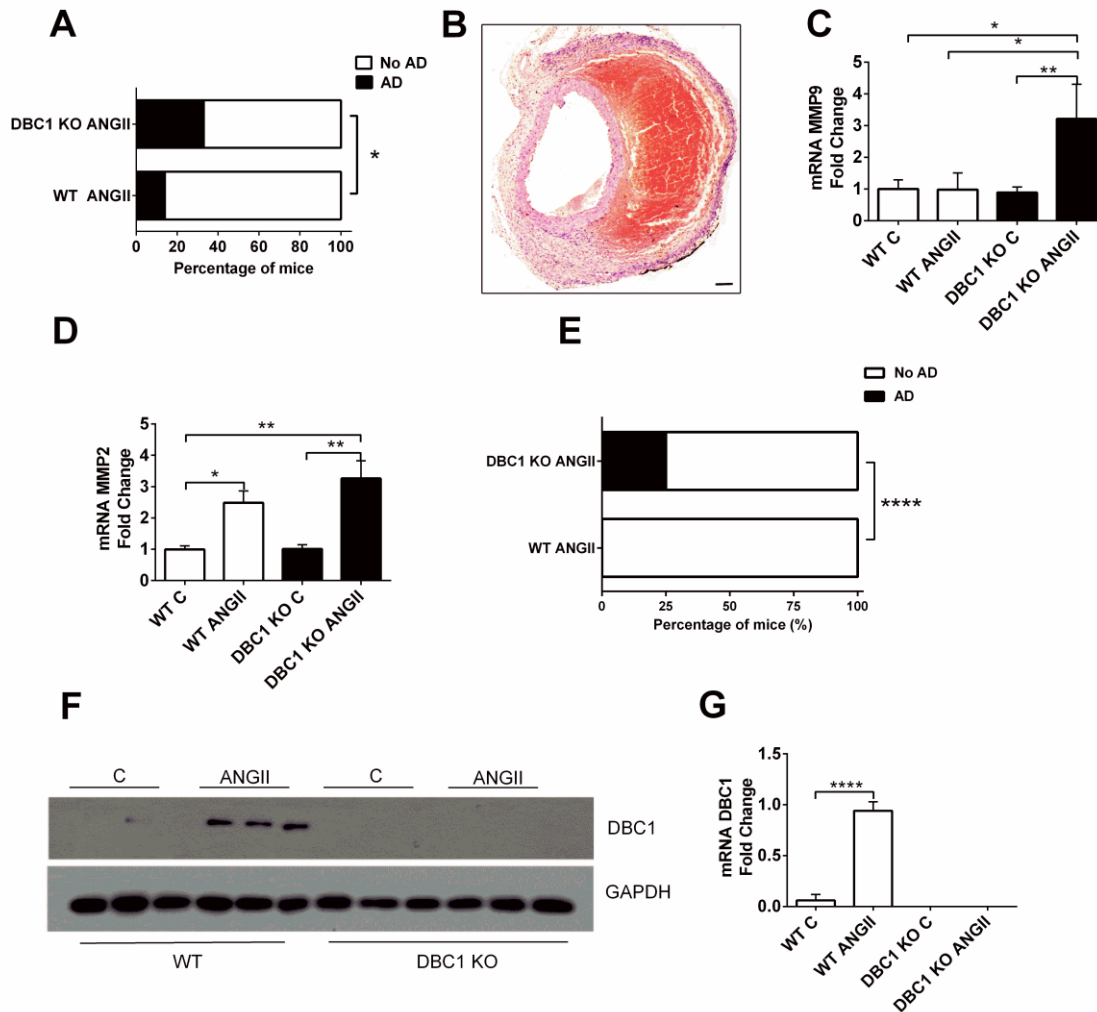


Figura 15. La formación de disección aórtica (AD) es independiente de la hipertensión arterial. El tratamiento con ANG II por 1 semana es suficiente para inducir la formación de AD y aumentar los marcadores de remodelado vascular. (A) La incidencia de AD en los ratones tratados con ANG II es mayor en el grupo DBC1 KO con respecto al WT (n= 7 y 8, ratones WT y DBC1 KO respectivamente). Se usó el test exacto de Fisher para la comparación de los grupos. (B) Tinción de H&E de una sección de aorta abdominal que presenta AD. Barra de escala 40 μ m. (C,D) Expresión de mRNA de MMP9 y MMP2 en aortas de ratones WT y DBC1 KO en controles (C) o después de 1 semana de tratamiento con ANG II. (E) Incidencia de AD en ratones WT y DBC1 KO tratados con una dosis de ANG II menor (0.6 mg/kg/día), por 4 semanas. Se observa una incidencia de AD solo en los ratones DBC1 KO con respecto a los ratones WT, ambos tratados con ANG II. No se observaron AD espontáneos en los grupos control (WT o DBC1 KO). (F) Niveles de expresión de DBC1 en los riñones de ratones WT y DBC1 KO. (G) Cuantificación de (F). Se utilizó el test exacto de Fisher (A-E) y el test de ANOVA de una vía (C,D), con el post test de Bonferroni, para múltiples comparaciones entre los grupos experimentales. *, ** y *** significan $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente (n = 8 por grupo).

El incremento de la expresión de MMP9 se correlaciona positivamente con el desarrollo de AD.

Existe una gran cantidad de hallazgos que muestran cómo la dinámica de los elementos de la ECM, así como la presencia de factores angiogénicos, favorece el desarrollo de AD ^{126,167,256-258} y en este sentido, la proteína MMP9 ha cobrado atención por su acción de degradar filamentos de elastina ²⁵⁹ y se ha propuesto como un marcador de AD en pacientes ⁸². En nuestro trabajo, la MMP9 estuvo sobreexpresada en las aortas de los animales DBC1 KO, tratados con ANG II (Figs. **14E** y **15C**). Con la finalidad de discernir si la elevación de esta MMP fue una consecuencia de la AD más que un efecto causal, se comparó la expresión del mensajero de MMP9 en animales WT y DBC1 KO tratados con ANG II que habían presentado o no AD.

En ambos genotipos la expresión del transcrito de MMP9 fue mayor en los animales que desarrollaron AD (Fig. **16A,B**), y comparando entre genotipos en ausencia de lesión, hubo mayor expresión en los animales DBC1 KO con respecto a los WT (Fig. **16C**). Asimismo, cuando se analizó un segmento de la aorta torácica descendente, nuevamente se observó un incremento de la expresión de MMP9 en los ratones DBC1 KO tratados con ANG II, con respecto a los WT que también recibieron el mismo tratamiento, o con respecto al grupo control que fue infundido con el vehículo (Fig. **16D**).

En el mismo sentido, uno de los principales factores angiogénicos que resultó elevado sólo en los animales DBC1 KO tratados con ANG II fue el VEGF (Fig. **14F**), que junto con las MMPs, participa en el proceso de remodelación vascular, por medio de la activación, migración y proliferación de CE y VSMC ²⁶⁰.

En algunos cortes de aortas de ratones DBC1 KO infundidos con ANG II se pudieron apreciar microrrupturas de la vasa vasorum en el límite entre las capas media y adventicia, así como la presencia de extravasación de eritrocitos (Fig. **16E**). Estos resultados son consistentes con otros estudios que describen este tipo de lesiones en humanos ¹³⁰, y sugieren que los ratones DBC1 KO presentan una mayor susceptibilidad a generar AD al menos en parte, debido a una desregulación en la expresión de MMPs y factores angiogénicos, como consecuencia del tratamiento con ANG II.

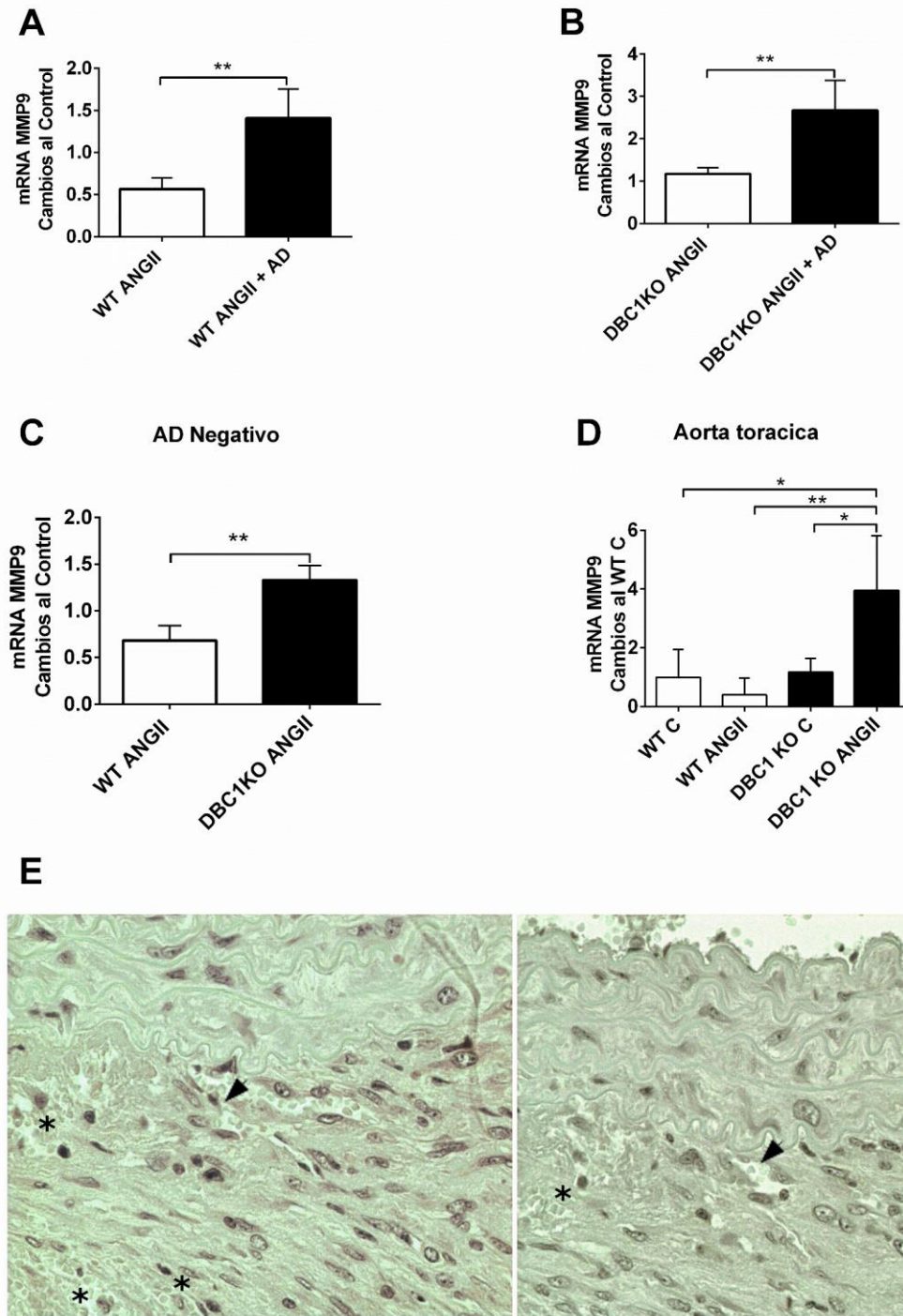


Figura 16. La ausencia de DBC1 incrementa la expresión de MMP9 en presencia de ANG II, y este aumento es mayor en los ratones que forman disección aórtica (AD). (A-C) Expresión de mRNA de MMP9 en aortas abdominales (evitando aislar las zonas que presentan AD), de ratones WT y DBC1 KO tratados con ANG II, que desarrollaron o no desarrollaron AD. (D) Expresión de mRNA de MMP9 en aortas torácicas de ratones WT y DBC1 KO, aisladas luego de 4 semanas de tratamiento con ANG II o con el vehículo (C). (E) Imagen representativa de una sección de aorta torácica teñidas con DAB, y contrateñidas con hematoxilina, de un ratón DBC1 KO tratado con ANG II durante 4 semanas. (*) Muestra

extravasación de eritrocito, mientras que las flechas negras indican puntos de ruptura del *vasa vasorum*. Barra de escala 10 μ m. Se utilizó el t-test para la comparación de dos grupos, o el test de ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni para múltiples comparaciones entre los grupos experimentales. * y ** significan $P < 0.05$ y 0.01 respectivamente (n = 4 por grupo).

• La ausencia completa o transitoria de DBC1 *in vitro* reproduce los efectos observados *in vivo*.

Con la idea de determinar si los cambios en la expresión de las MMPs y factores angiogénicos eran una consecuencia directa de la ausencia de expresión de DBC1, se purificaron y cultivaron VSMC a partir de aortas abdominales de ratones WT y DBC1 KO. La pureza de los cultivos de estas células fue confirmada mediante una IF para la α actina la cual es una proteína usada como marcador de las VSMC (Fig. 17A). La expresión de DBC1 fue confirmada por WB (Fig. 17B). De manera similar a lo que ocurrió en los experimentos *in vivo* pero en este caso en condiciones basales, las VSMC purificadas a partir de los ratones DBC1 KO tenían una sobreexpresión de la MMP9 (Fig. 17C), MMP12 (Fig. 17D) y MMP2 (Fig. 17E). Cuando se procedió a incubar estas células con una dosis de ANG II (100 nM), las VSMC WT mostraron un incremento de la MMP9 a causa del tratamiento, mientras que las VSMC KO no mostraron ningún cambio bajo las mismas condiciones (Fig.17F), muy probablemente porque ya en condiciones basales la expresión de la MMP9 se encontraba sobrerregulada (Fig. 17C).

Sin embargo, la MMP12, también se encontraba sobreexpresada en condiciones basales en las VSMC KO con respecto a las VSMC WT, y el tratamiento con ANG II causó un incremento aún mayor en las VSMC KO (Fig. 17G). Estos resultados sugieren que existe una desregulación en la expresión de las MMPs en las VSMC KO.

Para darle fortaleza a estos resultados, y comprender si la desregulación de las MMPs observada en las VSMC KO era una consecuencia de la naturaleza de nuestro ratón transgénico, se utilizó la técnica de silenciamiento transitorio por medio del uso de un pequeño RNA de interferencia (siRNA), para disminuir la expresión génica de DBC1 en las VSMC WT, y de esta manera medir la expresión basal de las MMPs. Nuevamente la ausencia transitoria de DBC1 promovió la sobrerregulación de VEGF (Fig. 17J), MMP9 (Fig. 17K), MMP2 (Fig. 17L) y MMP12 (Fig. 17M). Las figuras 17H y 17I representan los controles del silenciamiento de DBC1, a nivel de mensajero (17H) o de la proteína (17I).

El próximo paso fue evaluar si la acción ejercida por DBC1 sobre las VSMC WT, ocurría por medio de su interacción con dos principales blancos moleculares de DBC1, como son SIRT1 y HDAC3 ^{219,261}. Las células WT fueron transfectadas con un siRNA específico para ambas. La figura **18A-G** muestra los niveles de expresión de marcadores de AD que fueron analizados al silenciar de forma transitoria la expresión génica de DBC1, SIRT1, HDAC3 o las combinaciones DBC1/SIRT1 y DBC1/HDAC3. Pese a que hubo un buen nivel de transfección, y la expresión de estas proteínas logró ser disminuida, no se observó una dependencia directa de ninguna de ellas con DBC1 (Fig. **18A-G**), por lo cual, se sugiere que DBC1 estaría ejerciendo su función a través de una vía molecular distinta. Estos resultados obtenidos *in vitro*, apoyan los resultados obtenidos *in vivo* y sugieren que DBC1 estaría participando en la regulación a nivel vascular de las MMPs y factores angiogénicos.

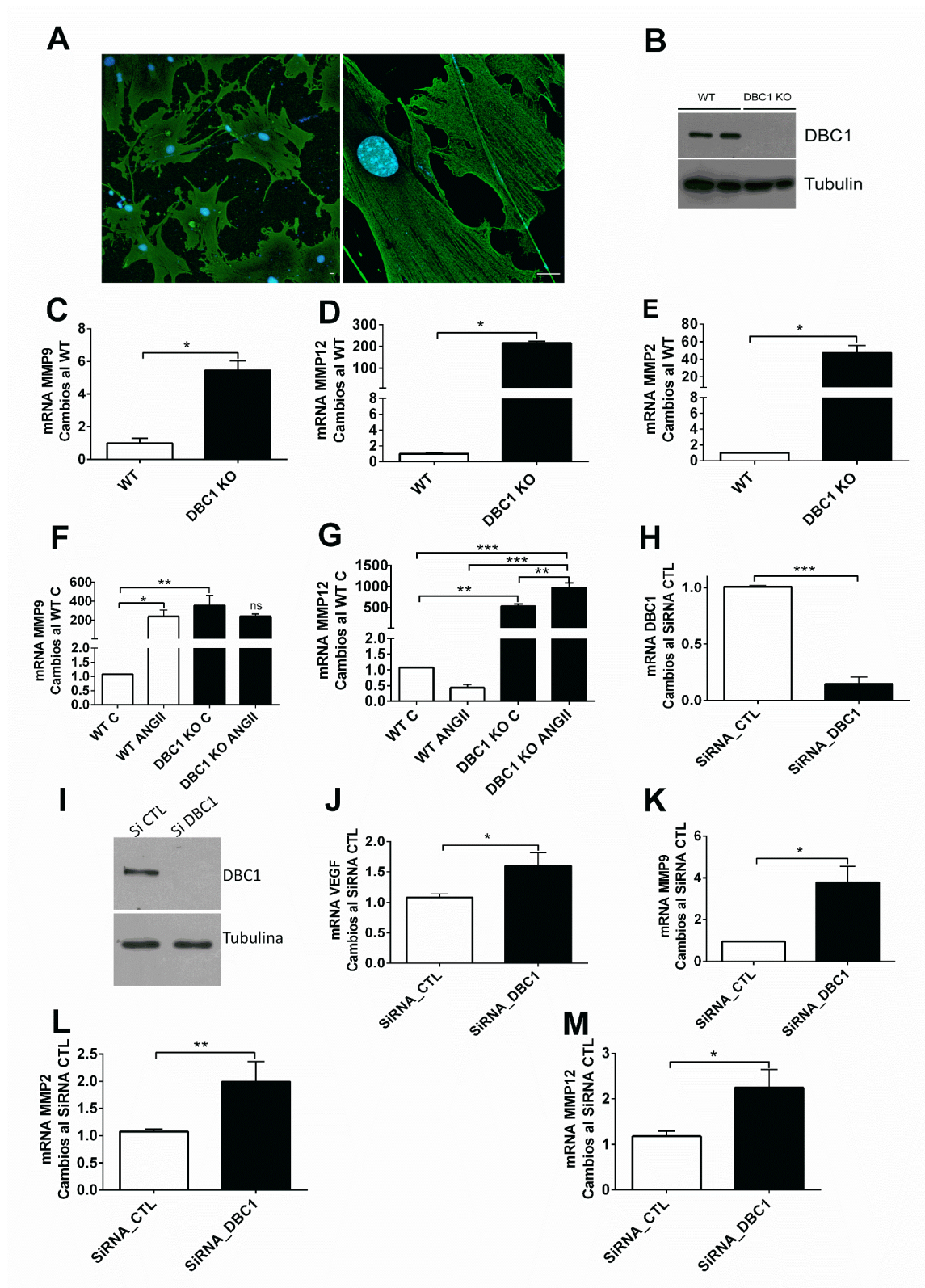


Figura 17. La ausencia o disminución transitoria de la expresión de DBC1 en células musculares lisas vasculares (VSMC), incrementa la expresión de marcadores de disección aórtica (AD). (A) IF de un cultivo de VSMC, purificadas a partir de una aorta abdominal, usando la alfa actina como marcador de estas células. La imagen de la izquierda muestra una vista panorámica de un cultivo homogéneo de VSMC (100x).

La imagen de la derecha muestra una magnificación (630x) de los filamentos de alfa actina en las VSMC. Barra de escala: 15 μ m. **(B)** Expresión de DBC1 por WB, en VSMC proliferantes, purificadas a partir de aortas abdominales de ratones WT y DBC1 KO. **(C-E)** Expresión basal de MMP9, MMP12 y MMP2 en VSMC WT y DBC1 KO. **(F,G)** Expresión de mRNA de MMP9 y MMP12 en VSMC WT y DBC1 KO, tratadas con 100 nM ANGII por 12 h o con vehículo (C). **(H,I)** Control del silenciamiento de DBC1 medido por Real time PCR o WB, respectivamente. **(J-M)** Expresión de mRNA de VEGF, MMP9, MMP2 y MMP12 en VSMC WT, silenciadas con un SiRNA para DBC1. Los resultados son mostrados como la media \pm desviación estándar, de 3 experimentos independientes utilizando un t-test para la comparación de dos grupos experimentales. *, ** y *** significan $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente.

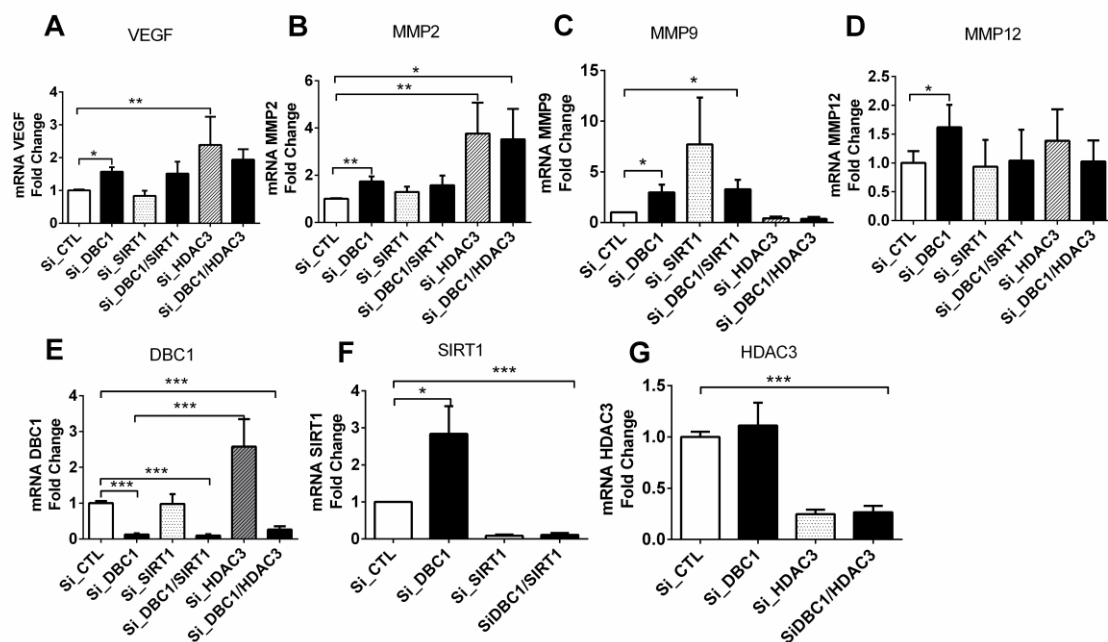


Figura 18. El incremento de la expresión de marcadores de disección aórtica (AD) promovidos por la disminución de la expresión transitoria de DBC1 en las VSMC, es independiente de la interacción de DBC1 con sus principales blancos moleculares. **(A-G)** Expresión de mRNA de VEGF **(A)**, MMP2 **(B)**, MMP9, **(C)** MMP12 **(D)**, DBC1 **(E)**, SIRT1 **(F)** y HDAC3 **(G)** en VSMC WT, silenciadas con un SiRNA para DBC1, SIRT1 y HDAC3. Los resultados son mostrados como la media \pm desviación estándar, de 3 experimentos independientes usando el test de ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni para múltiples comparaciones entre los grupos experimentales. **(A-G)** *, ** y *** significa $P < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente.

Los ratones DBC1 KO muestran una pérdida en el recambio de colágeno y una defectuosa tasa de proliferación a nivel vascular, en respuesta a la hipertensión promovida por la ANG II.

Como hemos podido observar en este trabajo, tanto a nivel *in vivo* como *in vitro*, la ausencia de DBC1 promueve el incremento en la expresión de las MMPs, principalmente la MMP9, y ésta a su vez se encarga de degradar tanto filamentos de elastina como el colágeno a nivel de la pared arterial ²⁵⁹. En este sentido, existe una asociación entre la disminución en la deposición de colágeno y el debilitamiento de la pared vascular, conllevando una mayor susceptibilidad para el desarrollo de AD ⁸². Es por ello que se quiso medir el contenido de colágeno en la pared arterial de los animales WT y DBC1 KO.

En los ratones WT hubo un incremento significativo en el contenido de colágeno en la capa íntima-media (I-M) con respecto a su control, ya a partir de la semana 1 de tratamiento con ANG II, y este aumento se hace mayor a la semana 4, en relación no sólo con los controles que recibieron el vehículo, sino con los DBC1 KO infundidos con ANG II. Consistente con el incremento de la expresión de la MMP9, los animales DBC1 KO tuvieron una disminuida deposición de colágeno en la capa I-M en respuesta al tratamiento con ANG II (Figs. **19A,B** y **20A,B**).

Así como ocurre un recambio de los elementos de la ECM, otro de los eventos observados durante el proceso de remodelación vascular causado por la HTA, es el incremento en el grosor de la capa I-M como consecuencia de una hiperplasia celular, principalmente causada por el aumento en la tasa proliferativa de las VSMC ^{14,262,263}. Con respecto a este punto se ha reportado que en pacientes con AD el grosor de la capa I-M está reducida en comparación con sujetos sanos ¹³⁴, y que además la capacidad proliferativa de las VSMC se encuentra vinculada con la patogenia de los aneurismas aórticos y AD ^{264,265}. Si bien en ambos genotipos no se observan diferencias significativas en el grosor de la I-M a la semana 1 de tratamiento con ANG II (Fig. **20C**), en la semana 4 de tratamiento, con un proceso de HTA establecido en ambos genotipos (Fig. **13A**), se observó una marcada diferencia en el grosor de la I-M entre los animales WT y los DBC1 KO (Fig. **19C**). A pesar de que las mediciones del grosor que se realizaron estuvieron centradas en las capas I-M, se debe resaltar que a simple vista, el tratamiento con ANG II también causó un incremento en el grosor de la capa adventicia, siendo esta hiperplasia más evidente en los animales WT con respecto a los ratones DBC1 KO (Fig. **19A**).

De manera de poder evaluar la capacidad proliferativa de las VSMC, ya que se ha observado una participación activa de estas células durante el proceso de remodelación observado en la HTA ²⁶⁶, que promueve su proliferación, se midió la incorporación de BrdU luego de la primera semana de tratamiento con ANG II. Si bien en este tiempo los

ratones DBC1 KO presentaron una incidencia de AD mayor con respecto a los animales WT (Fig. **15A**), no se observaron diferencias en cuanto a la proliferación celular entre ambos genotipos (Fig. **20D**), ni tampoco se vieron diferencias en el grosor I-M entre ambos (Fig. **20C**). Sin embargo, cuando la medida fue realizada en días posteriores (semanas 2 y 3) en los cuales se evidencia un ascenso importante en los valores de PAS tanto en los animales WT como DBC1 KO (Fig. **13A**) sólo hubo un mayor número de células marcadas con BrdU en la capa I-M de los ratones WT con respecto a los ratones DBC1 KO (Fig. **19D,E**).

Es importante recordar que el proceso de hiperplasia se lleva a cabo como un mecanismo compensatorio a la HTA ¹⁰⁷. La pérdida de plasticidad de células vasculares de los animales DBC1 KO por no responder de la misma manera a estímulos proliferativos, como la ANG II (Fig. **19D,E**) pudiera promover un debilitamiento de su pared arterial, y en su defecto, los ratones DBC1 KO estarían más propensos al desarrollo de AD.

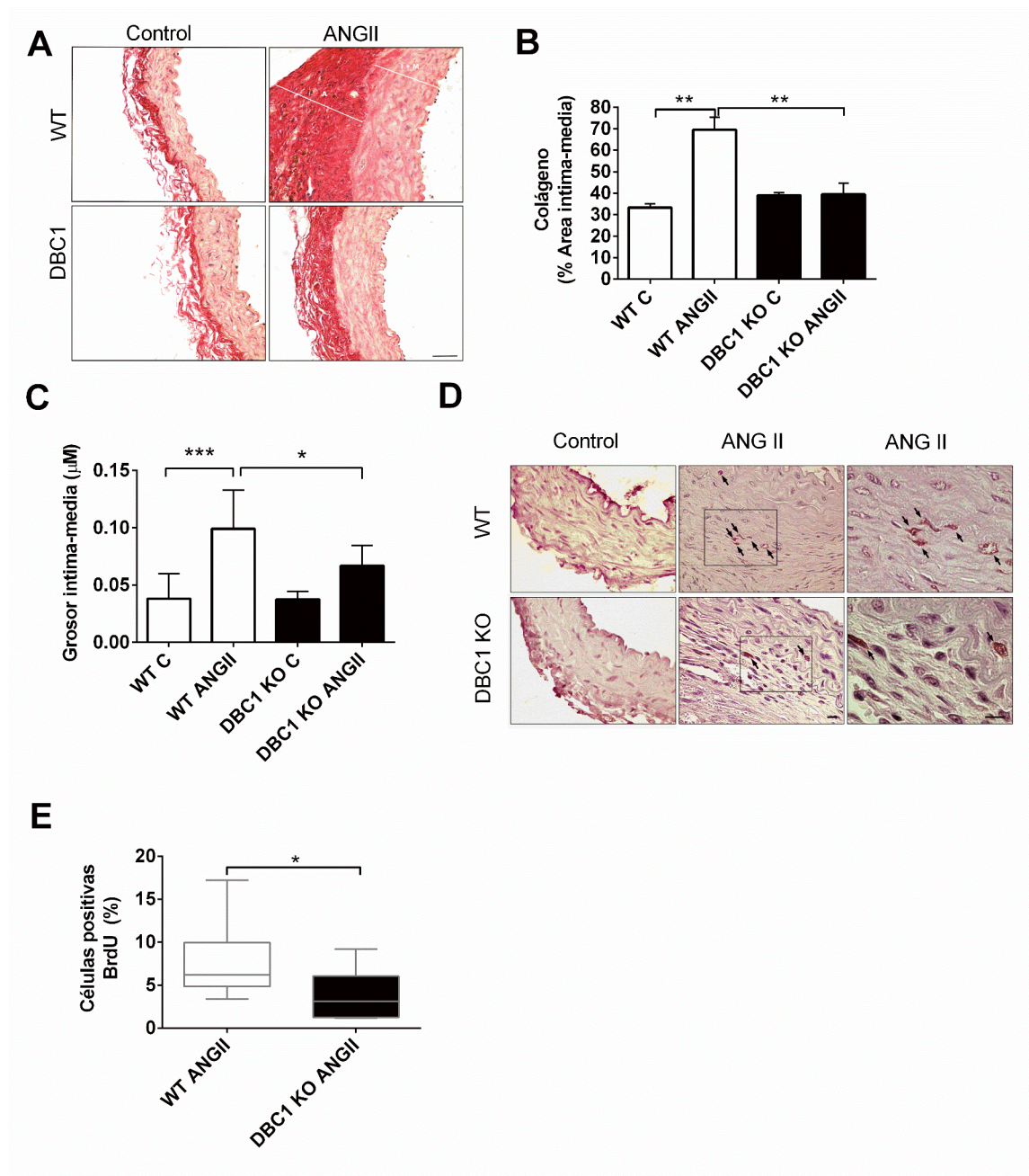


Figura 19. La ausencia de DBC1 conlleva a una pérdida en el recambio de colágeno y a una defectuosa tasa de proliferación a nivel vascular, en respuesta a la hipertensión promovida por la ANG II. (A) Imagen representativa de una sección de aorta abdominal teñida con picrosirius red, aislada de ratones WT y DBC1 KO tratados con vehículo o con ANG II durante 4 semanas. Las fibras de colágeno se colorean en rojo. Se observa la capa adventicia (rojo) y la capa I-M (rosado). Barra de escala 40 µm. (B) Cuantificación de las fibras de colágeno de la túnica íntima-media (I-M) (n = 3 y 4 para los grupos de ratones tratados con vehículo (C) o con ANG II, respectivamente). (C) Cuantificación del grosor de la túnica I-M en WT y DBC1 KO tratados con el vehículo o con ANG II, tomando como referencia la figura (A). (D) Imagen representativa de la incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU) en aortas de ratones WT y DBC1 KO del grupo control (C) o tratados con ANG II. Las flechas indican las células positivas a BrdU (teñidas con DAB, y contrateñidas con hematoxilina). Barra de escala 20 µm. (E) Cuantificación de la incorporación de BrdU

de la figura (D). Se utilizó el test de ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni para múltiples comparaciones entre los grupos experimentales. (B,C) *, ** y *** significa $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente. (E) El test de la U de Mann Whitney de una vía fue utilizado para el análisis de los grupos. La frecuencia de la mediana del grupo DBC1 KO = 2.8%; mientras que la del WT es de 6.2% y el valor de $U = 7$. No se detectó señal en los grupos WT o DBC1 KO control ($n = 7$ por grupo). * significa $P < 0.05$.

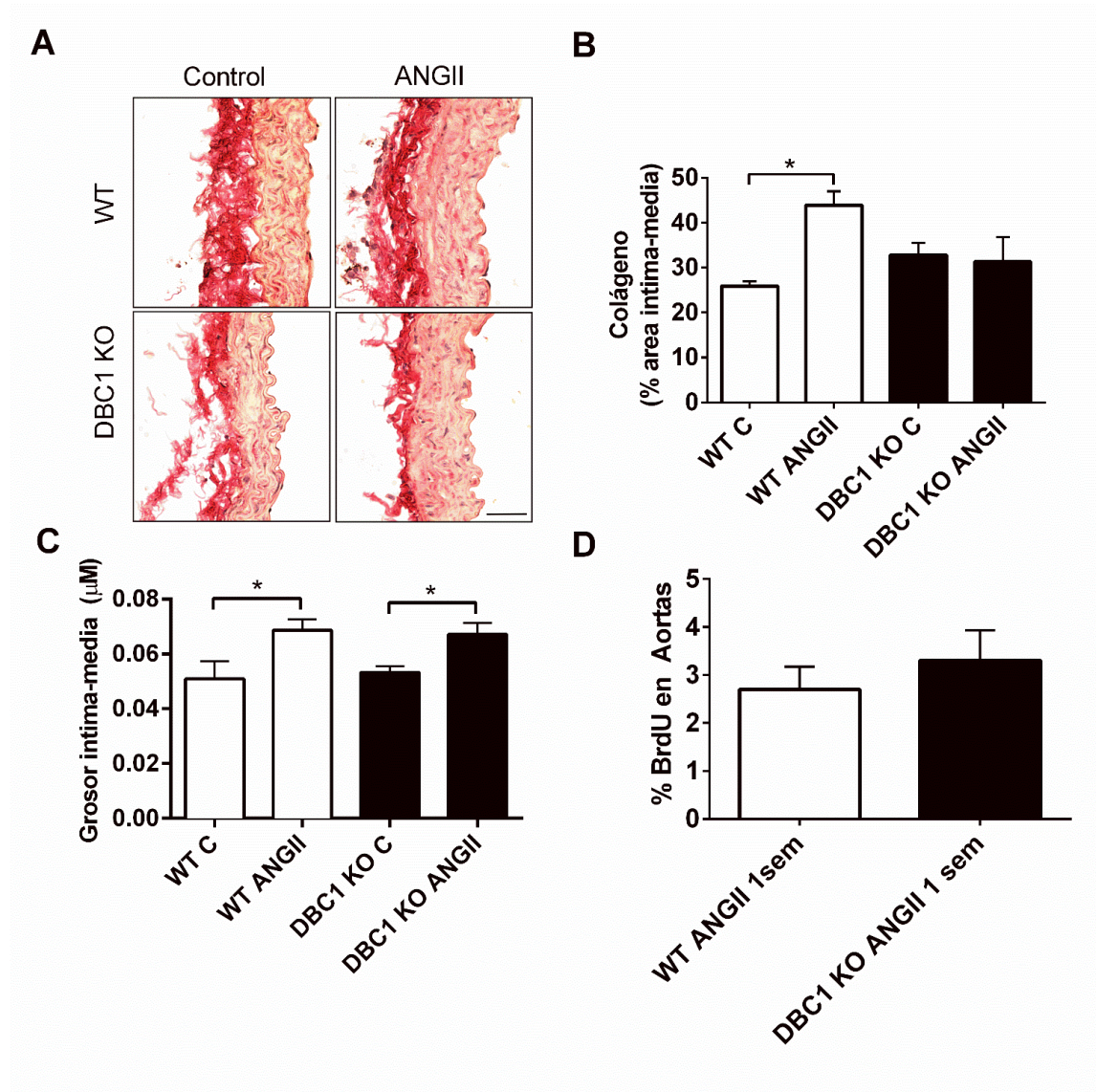


Figura 20. La ANG II promueve el recambio de los elementos de la ECM sólo en animales WT. (A) Imagen representativa de una sección de aorta abdominal teñida con picrosirius red, aislada de ratones WT y DBC1 KO tratados con vehículo o con ANG II durante 1 semana. Las fibras de colágeno se observan en rojo. Barra de escala 40 μm . (B) Cuantificación de las fibras de colágeno de la túnica íntima-media. ($n = 3$ para los grupos de ratones tratados con el vehículo (C) o con ANG II). (C) Cuantificación del grosor de la túnica íntima-media en los ratones WT y DBC1 KO tratados con el vehículo (C) o con ANG II. (D)

Cuantificación de la incorporación de BrdU en aortas de ratones WT y DBC1 KO tratados con ANG II (n= 4 y 3, WT y DBC1 KO, respectivamente). No se detectó señal positiva en los grupos control (n=7). El test de la U de Mann Whitney de una vía fue utilizado para el análisis de los grupos, $P > 0.05$. (B,C) Se utilizó el test de ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni para múltiples comparaciones entre los grupos experimentales. * significa $P < 0.05$.

La Deficiencia de DBC1 retrasa la progresión del ciclo celular no solo a nivel *in vivo* sino también *in vitro*.

DBC1 está estrechamente implicado en el control del ciclo y en la proliferación celular, regulando a p53 que es un factor de transcripción encargado de regular procesos claves en el control de ciclo celular, como la apoptosis y la senescencia²¹⁶. Así que frente a un daño del DNA, una de las principales respuestas generadas por este eje, DBC1-p53, es el de detener la progresión del ciclo celular en uno de los puntos de control del checkpoint (G1/G2) e iniciar la activación de reparación del daño o en su defecto apoptosis. Por otro lado, la desacetilasa SIRT1 se encarga de mediar funciones opuestas, inhibiendo a p53, desencadenando señales de supervivencia y proliferación, y como se ha descrito, también es regulada por DBC1, el cual inhibe su actividad desacetilasa²²¹.

Por medio de ensayos *in vitro* generando respuestas de estrés celular y daño genotóxico al DNA, se evidenció un sitio de fosforilación de DBC1, a través del cual esta proteína puede ser regulada. La fosforilación de DBC1 sobre la Thr454, potencia su interacción con SIRT1, permitiendo que se activen rutas celulares mediadas por p53^{236,267}. La enzima ATM responsable de la regulación forma parte de un complejo de fosfoquinasas que se encarga de regular los puntos de control G1/S y G2/M²⁶⁸. A pesar de que este sitio de fosforilación de DBC1 no ha sido definido en el ratón, no descarta que DBC1 pueda estar siendo modificada por ATM en otro residuo aminoacídico. Por lo cual no sería despreciable el papel que juega DBC1 durante la progresión del ciclo celular.

Por otro lado, se ha observado a nivel de cultivos celulares tumorigénicos, que la ausencia de DBC1 previno la proliferación de estas células. Sin embargo, las acciones de esta proteína en el ámbito del cáncer son contradictorias y ameritan un mayor abordaje.

En este sentido, muchos de los estudios vinculados con DBC1 en el cáncer, utilizan líneas celulares inmortalizadas cuyas propiedades genotípicas no representan un buen modelo para estudiar proteínas claves del ciclo celular, ya que carecen de una estricta regulación en los procesos de proliferación y apoptosis²⁶⁹. Es así que uno de los abordajes llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo, el cual fue reportado recientemente²⁷⁰, fue

el de estudiar la regulación de DBC1 utilizando un modelo de hepatectomías en ratón. Usando esta herramienta es posible evaluar la dinámica de la proteína, ya que los hepatocitos en condiciones normales se encuentran en un estado de quiescencia (G0), representando ésta una situación control. Al inducir un daño removiendo parte del tejido, el hígado posee la propiedad de regenerarse, con lo cual los hepatocitos van a escapar de G0 y comenzarán a duplicarse, pasando por las distintas fases de ciclo celular, hasta que se restablezca la masa de tejido original, con lo cual las células volverán a estar en G0 ²⁷¹.

A nivel *in vivo* se detectó que en un estado de quiescencia, se observa una nueva forma de DBC1 (DN-DBC1), generada a partir de su clivaje proteolítico sobre los residuos 124-138 perteneciente al dominio S1-like de la región amino terminal. Una vez que las células empiezan a proliferar, esta nueva forma de la proteína es reemplazada por la forma completa DBC1. Uno de los hallazgos que atrajo nuestra atención, fue el hecho de que esta nueva forma de DBC1, es incapaz de unirse a SIRT1, por lo que pudiera tener un impacto biológico. De hecho, se pudo demostrar que ambas formas de DBC1 pueden coexistir, pero a lo largo de la progresión del ciclo celular, prevalecerá una de ellas, estableciéndose un proceso dinámico en la relación DN-DBC1/DBC1.

Los resultados de este trabajo mostraron que los ratones DBC1 KO sometidos a una hepatectomía, sufren un retraso en el proceso de regeneración hepática, comparados con los animales WT, en las mismas condiciones experimentales. Por medio del estudio de proteínas que son reguladas durante la progresión del ciclo celular, fue posible determinar que muy probablemente el retraso en la progresión se deba, a que las células de los animales DBC1 KO luego de que salen de la fase S, son retenidas en el punto de control G2/M, y de esta manera sufren un retraso en la duplicación de su DNA ²⁷⁰.

Los resultados de la parte *in vitro* del trabajo que fue publicado por nuestro grupo de investigación, serán mostrados a continuación, ya que fueron parte de los experimentos realizados en el marco de mi proyecto de tesis, y permitirán comprender en parte, los motivos por los cuales los ratones DBC1 KO muestran fallas en el proceso de remodelación vascular, durante la HTA promovida por la ANG II.

A partir de cultivos primarios, se aislaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) y VSMC, las cuales al no ser inmortalizadas, poseen intacta toda la maquinaria del ciclo celular. Tanto las MEFs como las VSMC fueron sincronizadas en G0, por medio de la privación de FBS, y posteriormente, restableciendo este último, se indujo la progresión del ciclo.

Lo primero que evaluamos fue la expresión de DBC1 en condiciones de proliferación o quiescencia, y posteriormente la salida de este estado G0 para entrar nuevamente en un nuevo ciclo celular (Fig. **21A**). La condición denotada como C representa células proliferantes, mientras que el tiempo 0 corresponde a las células en G0, y los tiempos 6, 12, 24 y 30 representan células que salieron de la fase G0 y comenzaron a dividirse). Tal y como ocurrió en los ensayos *in vivo* del modelo de hepatectomías, identificamos una nueva forma de la proteína de menor peso molecular, denotada como DN-DBC1, que perdió los residuos aminoacídicos 124-138 localizados en la región N-terminal de la proteína, específicamente de la región del dominio S-like, conservando tanto el dominio de localización nuclear (NLS) como el dominio LZ ²⁷⁰.

Una vez que se repuso FBS en el medio de cultivo, esta forma DN-DBC1 desapareció y fue reemplazada por la forma completa de DBC1 (Fig. **21A**). Este mismo fenómeno fue observado al realizar los mismos experimentos pero en VSMC (Fig. **22B**).

La relevancia biológica de esta forma más corta de DBC1, se puso de manifiesto cuando se analizó la expresión de las ciclinas D1 y A. En condiciones de quiescencia (G0), tanto en las MEFs WT como DBC1 KO, presentaban una expresión basal de ambas ciclinas y esto coincidió con la aparición de la forma DN-DBC1 en las células WT (Fig. **21A**). Una vez que las células salieron de la fase G0 y empezaron a proliferar, como respuesta a la adición de FBS en el medio de cultivo, la forma DN-DBC1 fue reemplazada por la variante completa de DBC1. A su vez, este evento coincidió con la sobreexpresión de la ciclina D1, a partir de las 6 horas de restaurado el FBS en el medio, coincidiendo con el incremento en la expresión de la ciclina A (Fig. **21A**). El tiempo en el cual la ciclina A alcanza su máximo ocurre en la fase S/G2 del ciclo celular (Fig. **21A**). Sin embargo, las MEFs DBC1 KO mostraron un retraso en los tiempos en los que fueron alcanzados los picos máximos de las ciclinas D1 y A en comparación con las MEFs WT (Fig. **21A**). Además de medir las ciclinas por WB, se cuantificó el número total de células en los mismos tiempos corroborando que las células WT empiezan a dividirse mucho más temprano que las células DBC1 KO (Fig. **21B,C**).

En el caso de los experimentos realizados en VSMC WT, observamos la misma situación que en el caso de las MEFs WT (Fig. **22 B**). Las dos proteínas D1 y PCNA, utilizadas como marcadores de progresión de ciclo, correlacionaron positivamente con la sustitución de DN-DBC1 por la forma completa de DBC1, durante la salida de la fase G0.

A su vez, la respuesta de las VSMC DBC1 KO fue más marcada, fallando completamente en la salida de G0 y entrada en un nuevo ciclo celular. La figura **22A-C** muestra la ausencia de expresión de las proteínas del ciclo celular como Ki67, ciclina D y PCNA, lo que indica la ausencia de proliferación celular. Este resultado fue confirmado además, por medio de la cuantificación celular usando un citómetro de flujo, y el yoduro de propidio (IP), como un marcador de viabilidad celular. La cuantificación hecha por el citómetro confirmó que efectivamente las VSMC DBC1 KO no se dividieron, pero tampoco sufrieron apoptosis, manteniéndose en un estado de quiescencia (Fig. **22D**).

Estos resultados permiten inferir que el reemplazo de DN-DBC1 por la proteína completa, tanto en las MEFs como en las VSMC WT, ocurre después de la salida de la fase G0 y entrada de un nuevo ciclo celular, y que probablemente lo que sucede con las MEFs y VSMC DBC1 KO, es que quedan retrasadas en la fase de control, G1, donde la célula se está preparando para sintetizar su DNA. Estos resultados fueron también confirmados por nuestro grupo de investigación, utilizando el modelo *in vivo* de hepatectomía en ratones WT y DBC1 KO ²⁷⁰.

Otro de los hallazgos obtenidos durante la caracterización de esta nueva forma de DBC1, fue que la aparición de DN-DBC1 durante la quiescencia, vino acompañada por un aumento en la actividad de SIRT1, lo que hablaría de que esta nueva forma DN-DBC1 es incapaz de unirse a la desacetilasa, y por consiguiente, no inhibe su actividad ²²¹.

Otro de los aspectos que se quiso investigar, fue si esta nueva forma de DBC1, se originaba como consecuencia de un clivaje proteolítico de la proteína, durante el proceso de apoptosis, como ha sido sugerido previamente por otros grupos ²⁷². La incubación de MEFs en fase G0, con una dosis de una droga inductora de apoptosis como el etopósido, no generó la forma DN-DBC1 (FIG.**21D**), pero sí promovió la apoptosis en estas células, observada por la aparición de la proteína proapoptótica, la caspasa 3 activa, la cual fue detectada tanto por IF como por Western Blot (Fig. **21E,F**). Estos resultados sugieren que la forma DN-DBC1 tiene una relevancia biológica, apareciendo sólo en las células quiescentes, y con ello retrasando la transición hacia una fase de síntesis y división celular. Otra posibilidad sería que la desaparición de DN-DBC1 sea un requisito para que la célula pueda salir de G0 y retomar el ciclo celular.

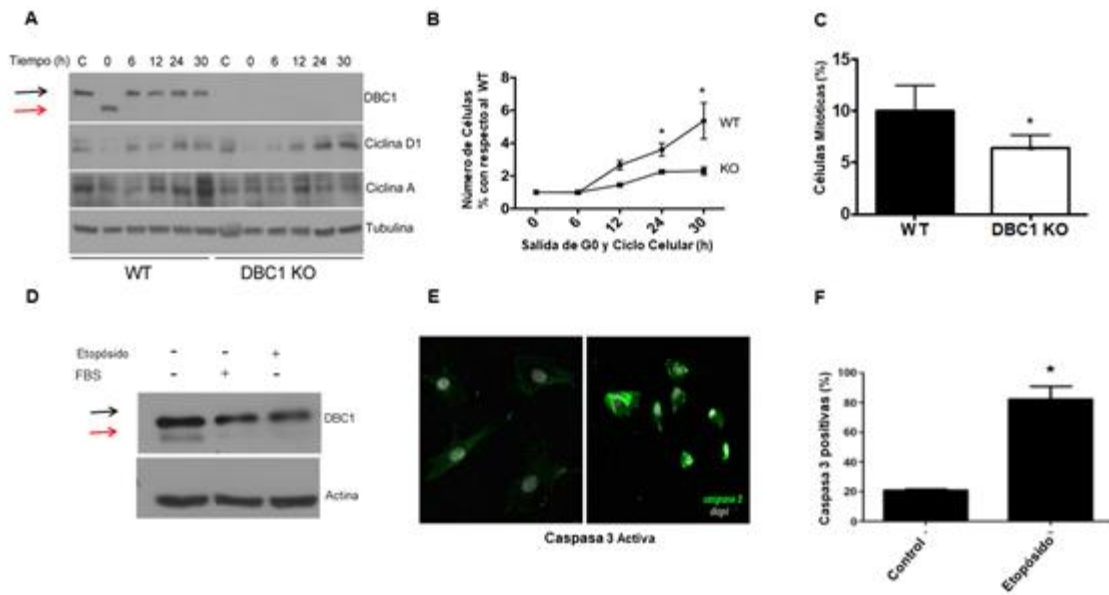


Figura 21. Células quiescentes expresan de forma dinámica una forma de DBC1 de menor peso molecular. Fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), fueron aislados de hembras WT y DBC1 KO y mantenidos en medio completo al 10% FBS. (A-C) El cultivo de MEFs fue sincronizado para mantener las células en un estado de quiescencia (G0) durante 48 h, por medio de la privación de suero fetal bovino (FBS). Posteriormente, se añadió FBS al medio, y se procedió a medir la progresión del ciclo celular a las 6, 12, 24 y 30 h por medio de los marcadores de ciclo Ciclina D1 y Ciclina A (A) o realizando un conteo celular para medir proliferación y determinar % células mitóticas (B,C). (D) Las flechas negra y roja indican la forma completa de DBC1 o la forma de menor peso molecular (DN-DBC1) respectivamente. Las MEF WT fueron tratadas con 150µM Etopósido por 6 h y posteriormente lisadas para su procesamiento por WB para determinar la expresión de DBC1 (D), o fijadas e incubadas con un anticuerpo anti caspasa 3 activa y procesadas por IF (E). (F) Cuantificación de la IF de la imagen (E). Los resultados son mostrados como la media \pm desviación estándar, de 3 experimentos independientes utilizando un t-test para la comparación de dos grupos experimentales. * significa $P < 0.05$.

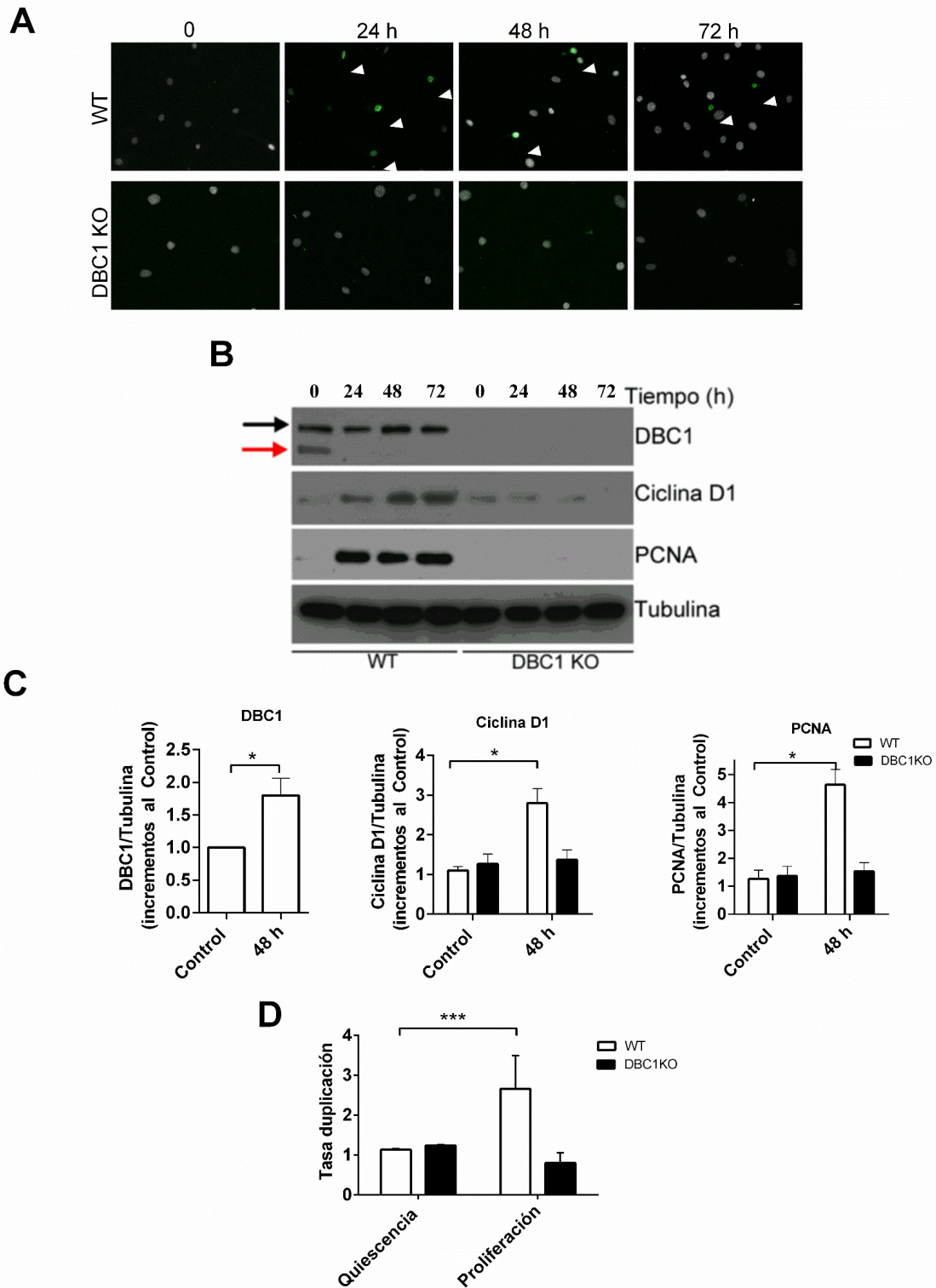


Figura 22. Las células musculares lisas vasculares (VSMC) provenientes de aortas de ratones DBC1 KO, presentan un retraso en la proliferación celular *in vitro*. VSMC de aortas abdominales aisladas de ratones WT y DBC1 KO fueron crecidas y sincronizadas para mantenerlas en un estado de quiescencia durante 48 h, por medio de la privación de suero fetal bovino (FBS). Posteriormente, se añadió FBS al medio, y se procedió a medir la progresión del ciclo celular a las 24, 48 y 72 h, a través de distintos

marcadores de ciclo celular (A-C) o cuantificando el número de células por citometría de flujo (D). (A) Marcador de proliferación Ki67. Las flechas blancas indican las células positivas a Ki67 (verde), mientras que el DAPI fue usado para marcar los núcleos de todas las células (gris). Barra de escala: 15 μ m. (B) Imagen representativa de un WB de DBC1 y los marcadores de ciclo celular Ciclina D1 y PCNA. La expresión de DBC1 es específica de las VSMC de aortas de animales WT. (C) Cuantificación del WB de la figura (B), en la condición de quiescencia (C, control o tiempo 0) y a las 48 h posteriores al restablecimiento de FBS en el medio. (D) Cuantificación de la tasa de proliferación de VSMC WT o DBC1 KO quiescentes o post quiescentes de 72 h. Las células fueron mantenidas en un estado de proliferación por medio del uso de un medio completo (DMEM + 10% FBS), y luego incubadas con medio sin FBS (quiescencia) durante 48 h. Luego las células fueron incubadas en medio completo por 72 h y las células fueron cuantificadas usando un citómetro de flujo, utilizando como control de viabilidad el marcador de yoduro de propidio (IP). Las células negativas al IP, fueron seleccionadas y contadas durante la quiescencia o a las 72 h posteriores al restablecimiento de FBS en el medio de cultivo. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes. Se utilizó el test de ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni para múltiples comparaciones entre los grupos experimentales o el t-test para comparaciones entre dos grupos. * y *** significan $P < 0.05$ y 0.001 , respectivamente.

Evaluación primaria del rol que juega DBC1 a nivel renal, en el modelo de HTA inducida por ANG II.

Una de las complicaciones de la HTA es el desarrollo de insuficiencia renal crónica la cual se caracteriza por presentar hipertrofia, hiperplasia y fibrosis túbulo-glomerular, inadecuada irrigación sanguínea e inflamación²⁷³.

Hoy en día es más frecuente el uso combinado de técnicas para inducir un daño renal en el animal, que reproducen varias de las características que se manifiestan en el humano. La razón obedece a las propiedades intrínsecas que posee cada cepa de una misma especie, en responder de forma distinta frente a un estímulo. En roedores, por ejemplo, la cepa C57BL/6 presenta resistencia al daño renal y tratamiento con altos niveles de sodio¹⁵¹, mientras que la cepa 129/Sv es sensible al sodio, y más susceptible al daño renal, presentando valores de PA superiores, con respecto a la cepa C57BL/6¹⁵¹.

Por lo antes mencionado, y conociendo las limitaciones de nuestro modelo de trabajo en cuanto a generar un daño crónico a nivel renal, nos centraremos en evaluar la función que puede tener DBC1 en los procesos de proliferación y fibrosis renal que son alterados durante la HTA.

Los ratones DBC1 KO poseen menores niveles de albuminuria y creatinemia, en comparación a los ratones WT, como consecuencia de la hipertensión arterial inducida por la ANG II.

Los riñones juegan un rol fundamental en el control a largo plazo de la regulación de la PA. Cuando existe un incremento de la PA, se va a promover el aumento de la excreción de Na⁺ y agua por la orina (natriuresis y diuresis respectivamente), y por otro lado, se va a disminuir la producción de renina para que cese la producción de ANG II y de esta manera se restablezcan los valores normales de PA ²¹.

A su vez, los capilares glomerulares en la cápsula de Bowman se encargan de filtrar grandes cantidades de líquidos y solutos (tales como el Na⁺ y glucosa), lo cual representa el primer paso para la formación de la orina. Una propiedad intrínseca de los capilares, y en especial de los capilares glomerulares, es que son impermeables a ciertas proteínas plasmáticas, entre ellas la albúmina ²¹

Es por ello, que como parte del estudio de DBC1 a nivel renal, se pretendió evaluar el grado de integridad de la membrana basal glomerular, de los riñones de los ratones WT y DBC1 KO infundidos con ANG II, basándonos en la medición de albúmina en orina (albuminuria) de 24h.

Como puede apreciarse en la figura **23A-C**, una de las consecuencias de la HTA inducida por la ANG II, fue la pérdida de la integridad de la barrera de los capilares glomerulares, observando en la orina de estos ratones presencia de albúmina. Si bien en ambos genotipos se observa albuminuria, los ratones WT mostraron una mayor cantidad de albuminuria con respecto a los ratones DBC1 KO. La confirmación y cuantificación de la albuminuria fue realizada por el Lic. Alejandro Leyva de la unidad de Proteómica del IPMON. Otro hallazgo que permitió el análisis proteómico fue la detección de otras proteínas que fueron exclusivas de las orinas de los animales WT ANG II, y que están relacionadas con productos de la vía de la coagulación y fibrinólisis. Sin embargo, estos resultados no excluyen la posibilidad de que la aparición de estas proteínas detectadas sólo en las orinas de los ratones WT, obedezcan a que se produjo una mayor permeabilidad glomerular a causa de un mayor daño renal, y por consiguiente no se detectaron en los animales DBC1 KO. La lista de proteínas es ilustrada en el Anexo I. Si estos resultados logran confirmarse tienen una implicancia biológica importante, ya que se ha demostrado que durante la HTA la vía de la coagulación se encuentra activada y es capaz de promover

un proceso inflamatorio ²⁷⁴. En el capítulo de la discusión se hará un análisis en relación a los procesos de hemostasia.

Por otro lado, fueron determinados los niveles de creatinina en plasma, observando sólo un incremento en los animales WT tratados con ANG II, con respecto a los ratones DBC1 KO o al grupo control (Fig. **23D**). Revisando los datos reportados en la literatura, los valores de creatinina mostrados son superiores con respecto a otros trabajos que utilizan métodos de detección más sensible. A pesar de que el método de Jaffe es usado para los análisis clínicos en el laboratorio, carece de sensibilidad y especificidad ²⁷⁵.

Uno de los principales parámetros que es considerado crítico para establecer una insuficiencia renal crónica, es medir la tasa de filtración glomerular ²⁷⁶. La creatinina es el producto de degradación de la creatina liberada a nivel muscular, a una tasa casi constante, y suele ser empleada por los laboratorios clínicos como parámetro para determinar la tasa de filtración glomerular (TFG). Como esperábamos, se obtuvieron valores de TFG en el rango de la normalidad con respecto a lo reportado ²⁷⁵ y no se observaron diferencias entre los genotipos tratados con ANG II (Fig. **23E**). Tal y como se ha descrito en la literatura, la cepa C57BL/6 es resistente a padecer daño renal crónico ²⁷⁷.

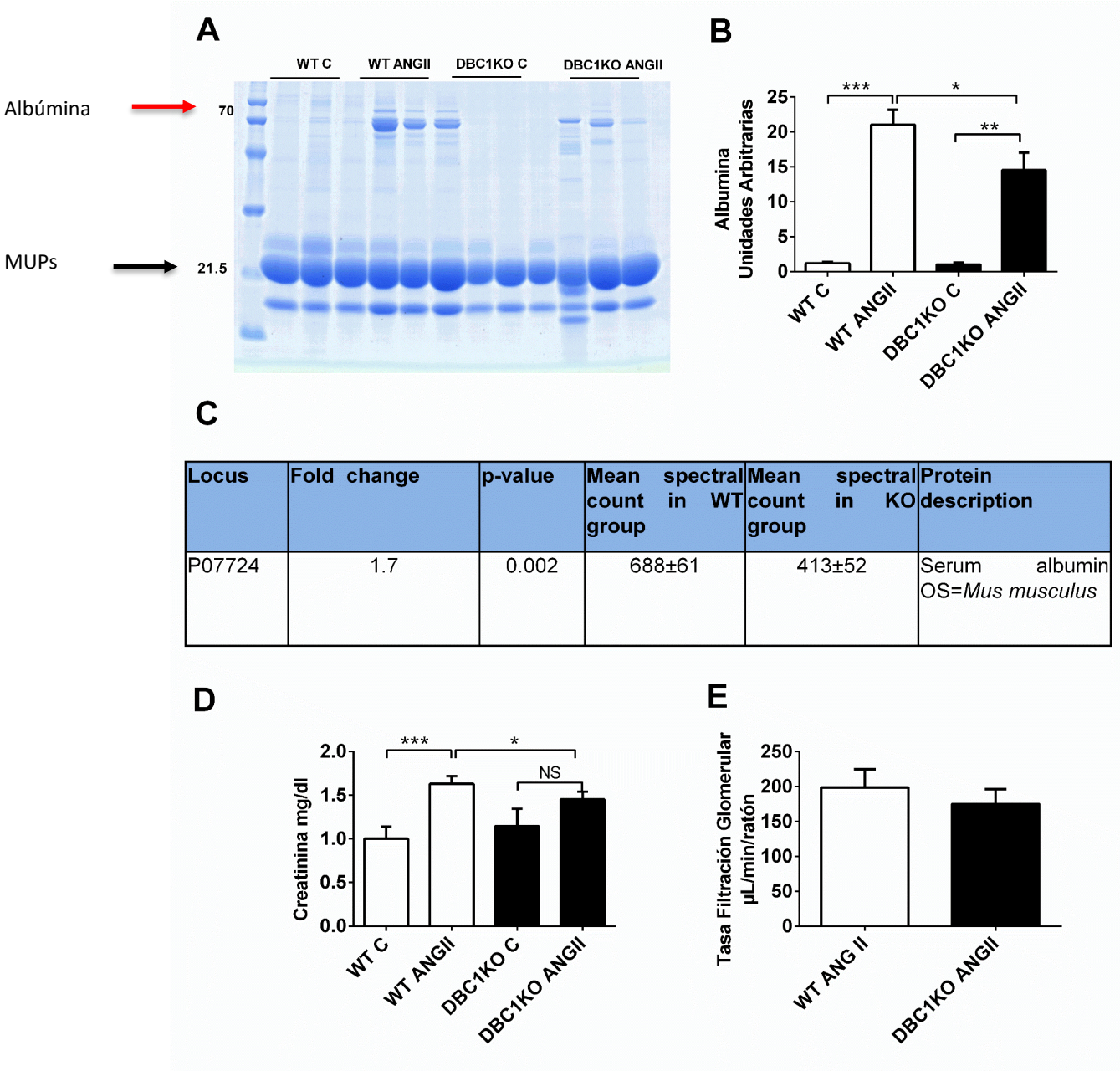


Figura 23. Los ratones WT muestran mayor albuminuria y creatinemia como producto del proceso de HTA promovido por la ANG II. (A) Gel de electroforesis representativo de muestras de orinas de 24 h de ratones WT y DBC1 KO tratados con el vehículo (control, C) o ANG II y teñido con Comassie Blue. Se muestra una banda de 70KDa sugestiva de albúmina. (B) Cuantificación hecha por densitometría, de las bandas observadas en el gel de la figura (A). (C) Confirmación de la banda de 70KDa (A), basada en la determinación por LC/MS de la abundancia relativa de albúmina, hecha a partir de orina de ratones WT y DBC1 KO. La abundancia relativa es indicada por el número de espectros identificados para la proteína (spectral count). (D) Cuantificación de los niveles plasmáticos de creatinina. (E) Determinación de la tasa de filtración glomerular. Los resultados son mostrados como la media y desviación estándar de 5 animales por grupo control y 7 animales por grupo tratado con ANG II. Se utilizó el test de ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni para múltiples comparaciones entre los grupos. *, ** y *** significa P < 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente.

La ausencia de DBC1 protege contra la hipertrofia glomerular, la hiperplasia renal y la fibrosis intersticial, generada como consecuencia del proceso de hipertensión arterial inducido por la ANG II.

La ANG II actúa como un potente vasoconstrictor de las arteriolas renales aferentes y eferentes, y a nivel glomerular, actúa modulando la presión y la tasa de filtrado ⁸⁴. Por otra parte, dentro de sus roles no hemodinámicos, esa citoquina puede causar hipertrofia e hiperplasia de las poblaciones celulares renales como los túbulos proximales que conforman la corteza renal, así como de las células mesangiales que se encargan de mantener y dar soporte estructural a la red de capilares dentro del glomérulo ²⁷⁸.

Además, la ANG II promueve fibrosis intersticial como consecuencia de un incremento en la deposición de elementos de la ECM por parte de los fibroblastos ³². Es por ello que el próximo objetivo fue determinar los niveles de hipertrofia, hiperplasia y fibrosis a nivel de la corteza renal.

Utilizando cortes histológicos de riñones de los ratones WT y DBC1 KO, tratados con el vehículo o con ANG II, y teñidos con H&E, se analizaron los glomérulos por medio del cálculo del área glomerular así como el radio entre la red glomerular (tuft) y la cápsula de Bowman, para determinar si había presencia de hipertrofia glomerular. El tratamiento con ANG II causó una sutil pero significativa hipertrofia de algunos glomérulos sólo en el grupo WT, con respecto a los DBC1 KO en las mismas condiciones, o a los controles que recibieron sólo el vehículo (Fig.24A,B).

Por otra parte, para determinar si la hipertrofia glomerular estaba acompañada de una hiperplasia, se realizó una IF utilizando un anticuerpo contra la BrdU. Como se detalla en los materiales y métodos, se inyectaron 3 dosis de BrdU en todos los grupos de ratones experimentales, en distintos periodos de los 28 días que duró el tratamiento (solución fisiológica o ANG II).

La incorporación de BrdU al DNA de las células que se están dividiendo es una forma de medir proliferación celular ²⁷⁹. Nos concentramos en analizar los cambios ocurridos a nivel túbulointersticial y glomerular de la corteza debido a que es una de las zonas que suele afectarse de manera más temprana durante la HTA ²⁸⁰. La figura 24C muestra una imagen representativa de un corte de un riñón en donde se detecta la señal de BrdU en un ratón tratado con ANG II, tanto a nivel de los túbulos (proximal y distal), así como en los glomérulos, de la corteza renal. Esta imagen fue provista con la intención de ilustrar la zona en la cual se procedió a realizar la cuantificación de las células positivas a

BrdU en ambos genotipos tratados con ANG II. Cuando se realizó la comparación entre los ratones WT y DBC1 KO tratados con ANG II, se observó un incremento significativo en el porcentaje de células BrdU en los animales WT con respecto a los DBC1 KO (Fig. **24D**). Estos resultados van en el mismo orden que los obtenidos cuando se analizaron las aortas de estos mismos animales (Fig. **19E**), demostrando un retraso en el proceso de proliferación por parte de los ratones DBC1 KO.

Para medir el grado de fibrosis, lo primero que se hizo fue analizar los cortes de riñones de los ratones WT y DBC1 KO tratados con el vehículo o con ANG II, teñidos con una coloración utilizada para detectar la presencia de fibras de colágeno y tejido conjuntivo en general. La figura **25 A,B** muestra fibrosis intersticial sólo en los animales WT que fueron infundidos con ANG II. Por otra parte se realizó una IHC para detectar la presencia de la proteína α SMA la cual suele expresarse principalmente en las VSMC, y es utilizada como un marcador para detectar cambios de transición epitelio-mesenquimal ²⁸¹. La figura **25 C** muestra la presencia de esta proteína sólo en el intersticio de un riñón de un ratón WT infundido con ANG II, lo que sugiere un cambio de fenotipo de tipo mesenquimal. Por último, se procesaron los riñones de estos ratones WT y DBC1 KO, y se realizaron qPCRs para medir la expresión de los mensajeros de α SMA y fibronectina (Fn1). Sólo se detectaron incrementos en los mensajeros responsables de transcribir ambas proteínas en los animales WT (Fig. **25 D,E**). Todos estos resultados demuestran que los animales DBC1 KO están protegidos contra la fibrosis renal como consecuencia de la HTA promovida por la ANG II.

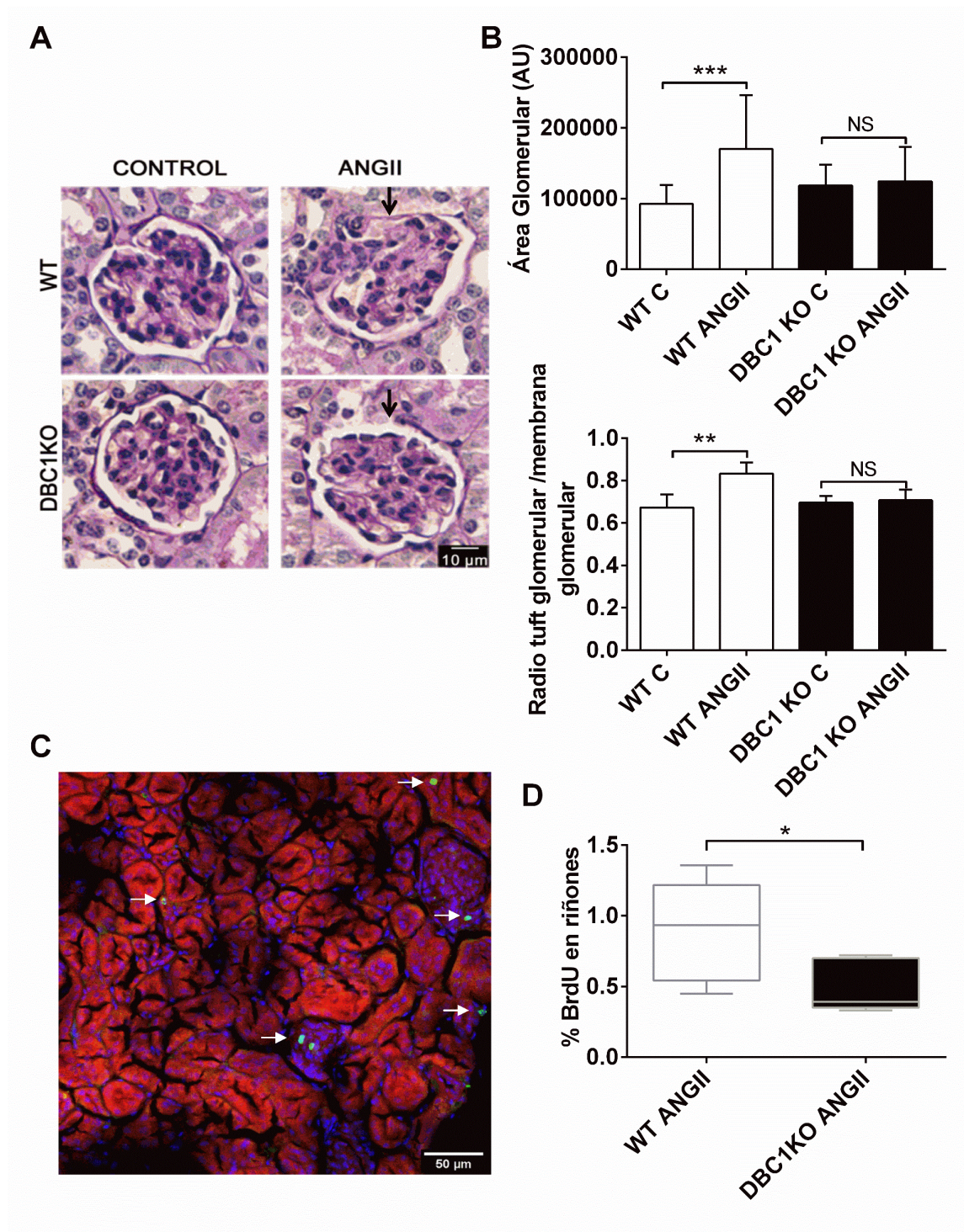


Fig. 24. La ausencia de DBC1 protege en contra de la hipertrofia glomerular y la hiperplasia renal. (A) Imagen representativa de cortes histológicos de riñones procedentes de ratones WT y DBC1 KO teñidos con H&E. (B) Medición del tamaño glomerular y del radio tuft glomerular/membrana glomerular. (C) Imagen representativa de una IF de BrdU de un riñón de un animal tratado con ANG II. (D) Cuantificación de IF de BrdU que fueron procesadas de ratones WT y DBC1 KO. Los resultados son mostrados como la media y desviación estándar de 3 animales por grupo (A) o 5 animales tratados con ANG II. (D) Se utilizó

el test de ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni para múltiples comparaciones entre los grupos o el test de Mann Whitney para comparar 2 grupos. *, ** y *** significa $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente

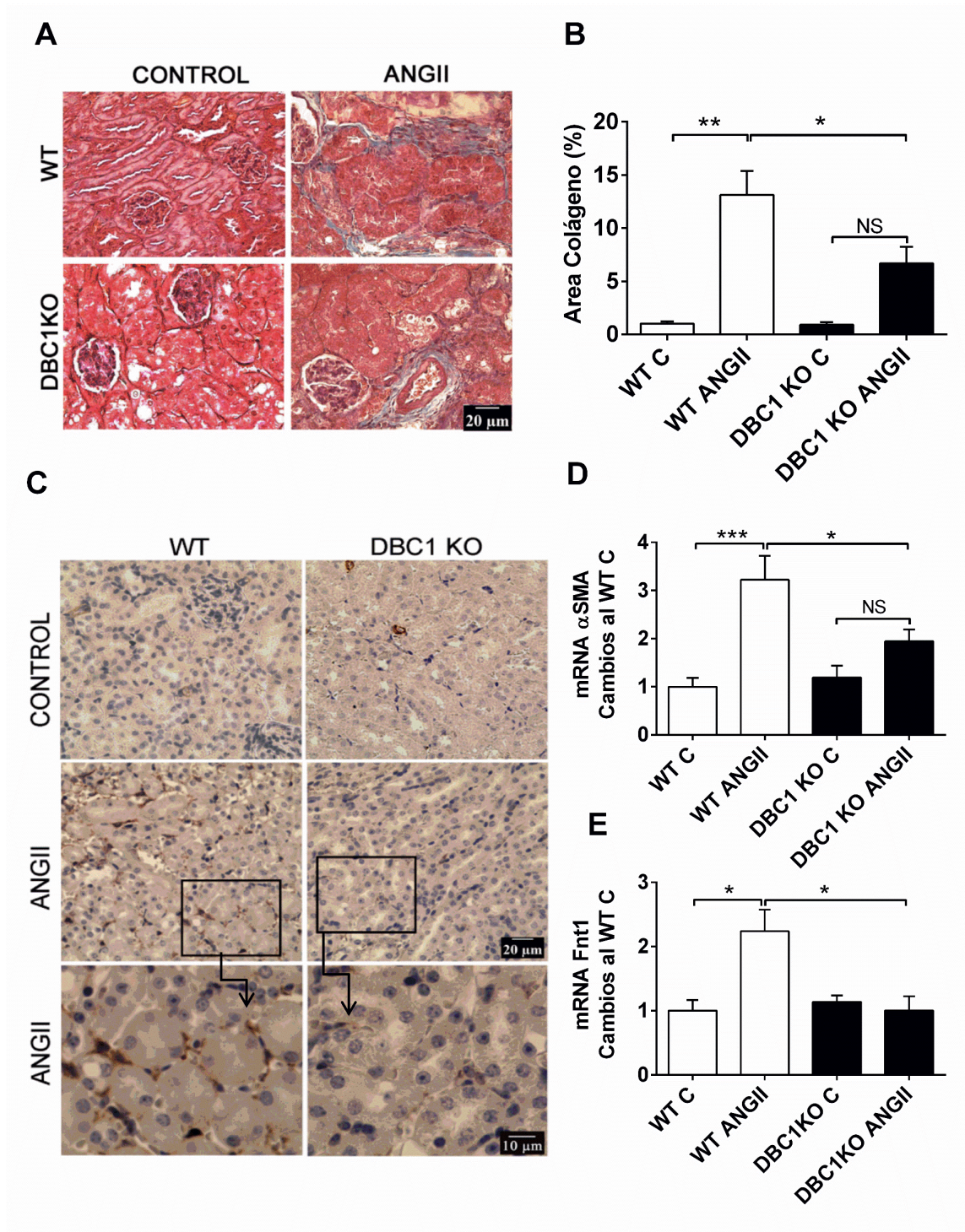


Fig. 25. La ausencia de DBC1 protege contra la fibrosis renal. (A) Imagen representativa de cortes histológicos de riñones procedentes de ratones WT y DBC1 KO teñidos con la coloración tricrómica de Masson. (B). Cuantificación de (A), 3 animales por grupo. (C) IHC de αSMA de 2 ratones WT y DBC1

KO control o tratado con ANGII. **(D,E)** Niveles de expresión de mRNA de α SMA y Fnt1 a partir de riñones de animales WT y DBC1 KO (5 animales por grupo control y 9 animales por grupo tratado). Los resultados son mostrados como la media y desviación estándar. Se utilizó el test de ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni para múltiples comparaciones entre los grupos. *, ** y *** significa $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente.

La expresión de DBC1 a nivel renal incrementa durante la hipertensión arterial promovida por la ANG II.

Con el fin de determinar el rol de DBC1 a nivel renal en el modelo de HTA, en primer lugar se analizó por IF el patrón de expresión de esta proteína en un corte de riñón de un ratón WT sano, pudiendo observar que a nivel de la corteza renal, DBC1 se encuentra bien distribuido y posee una expresión bastante heterogénea (Fig. **26A**). Luego se midió la expresión de la proteína por Western blot a partir de los riñones de ratones WT o DBC1 KO tratados o no con ANG II. De manera similar a lo que ocurre en el caso de las células que fueron arrestadas en G0 en condiciones de privación de FBS (Fig. **21 A y 22 B**), o a lo reportado en los experimentos *in vivo* en un modelo de hepatectomías²⁷⁰, en condiciones normales (control, C), los riñones de los ratones WT coexpresan basalmente la forma DN-DBC1 y la forma completa, y luego de recibir un estímulo proliferativo (ANG II), las células empiezan a proliferar y la forma completa de DBC1 se hace más evidente (Fig. **26 B,C**). Sin embargo, siguen coexistiendo ambas formas, lo que sugiere que las distintas poblaciones celulares poseen una heterogeneidad en su fase de ciclo celular.

Por otra parte, se quiso evaluar si la ausencia de DBC1 promovía un incremento en la expresión de SIRT1 como consecuencia del tratamiento con ANG II. A nivel renal se ha demostrado que SIRT1 se encuentra expresada en podocitos, así como en células tubulares de las nefronas distales de rata, donde actúa disminuyendo la reabsorción de Na^+ por lo que pudiera tener un efecto sobre la PA²⁸². A su vez, SIRT1 actúa disminuyendo la fibrosis y la inflamación en un modelo de obstrucción renal²⁸³. Por tanto, sería plausible que los efectos protectores en cuanto a fibrosis e hiperplasia observados en los ratones DBC1 KO, se debieran a que presentan mayor nivel de expresión de SIRT1.

Sin embargo, a nivel de la proteína total, SIRT1 sólo se observa incrementada en los ratones DBC1 KO controles (Fig. **26D,E**) hecho que ya ha sido observado previamente. Tampoco se observó un incremento en la expresión de los transcritos de DBC1 o SIRT1²¹⁷ (Fig. **26 F,G**). Pero en vista que las acciones mediadas por esta desacetilasa es por vía de su acción enzimática, se tendrían que evaluar cómo se encuentran los niveles de su

actividad enzimática de manera directa o indirecta a través de alguno de sus sustratos específicos²²⁰.

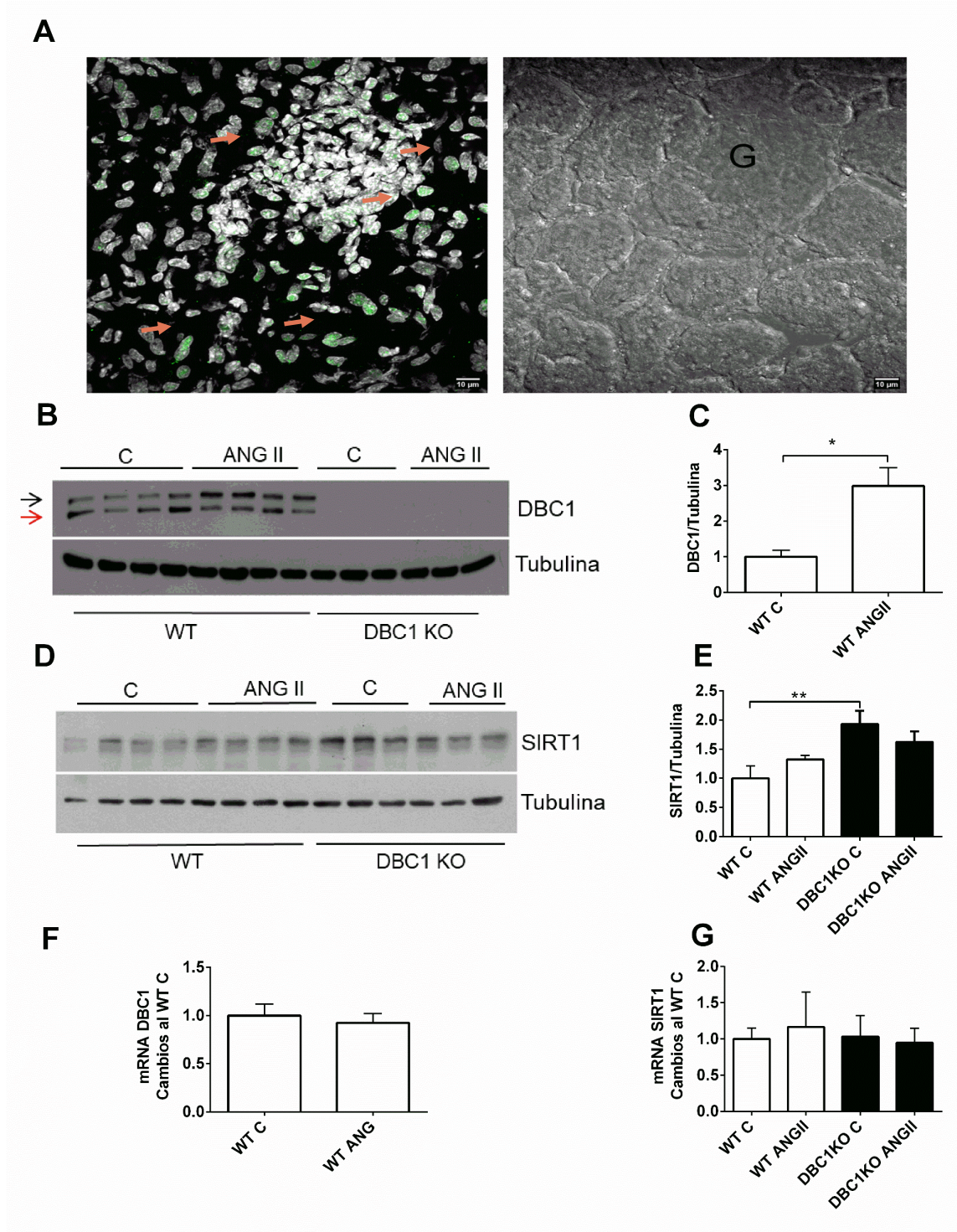


Figura 26. La expresión de DBC1 a nivel renal incrementa durante la hipertensión arterial promovida por la ANG II. (A) Imagen representativa de una IF de DBC1 en la corteza renal de un animal WT no tratado. (B) Imagen representativa de un WB de DBC1 en riñones de ratones WT y DBC1 KO. El tratamiento

con ANG II incrementa la expresión de la banda completa de DBC1. Como era de esperarse, los ratones DBC1 KO no expresan la proteína. (C) Cuantificación por densitometría de (B). (D) WB de SIRT1 a partir de riñones de los grupos WT y DBC1 KO. (E) Cuantificación de (D). (F,G) Niveles de expresión medidos por qPCR de los transcritos DBC1 y SIRT1. (B-G) Los resultados son mostrados como la media y desviación estándar. WT y DBC1 KO n=5 por condición. Se utilizó el t-test para la comparación de dos grupos o el test de ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni para múltiples comparaciones entre los grupos. *, ** y *** significa P < 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente.

La ausencia de DBC1 protege contra el incremento de marcadores de fibrosis promovidos por la ANG II, en un modelo *in vitro*.

Para finalizar con el estudio de DBC1 a nivel renal, el último objetivo fue corroborar los efectos observados en el modelo *in vivo* en cuanto a la fibrosis promovida por la ANG II y explorar los posibles blancos moleculares por los cuales DBC1 causa su efecto. Para ello se utilizaron siRNA específicos para DBC1, SIRT1 y HDAC3, y un siRNA inespecífico, que fue usado como control de la transfección.

La figura 27 (A,B) muestra la expresión de mRNA para α SMA y Fnt1, usando el siRNA específico para DBC1. El tratamiento de ANG II promovió un incremento significativo en la expresión de ambos marcadores, y este efecto fue contrarrestado cuando las células disminuyeron la expresión de DBC1 (Fig. 27 A,B y 27 E, control del silenciamiento). Por otra parte, cuando se utilizaron los siRNA para SIRT1 y HDAC3, sólo en el caso de α SMA, el silenciamiento doble entre DBC1 y SIRT1, pareciera contrarrestar el incremento de α SMA cuando se disminuyó la expresión de SIRT1 (Fig. 27C y 27F, control del silenciamiento). Utilizando modelos de obstrucción unilateral de riñón, se ha reportado una disminución en la expresión de SIRT1 y como consecuencia un aumento en la expresión de α SMA²⁸⁴, por tanto nuestros resultados preliminares estarían yendo en la misma línea.

Asimismo, el silenciamiento de HDAC3 no promovió ningún cambio importante en la expresión de los dos marcadores de fibrosis analizados (Fig. 27C,D y 27G, control del silenciamiento). Sin embargo, estos resultados son tomados como preliminares ya que son la sumatoria de dos experimentos independientes y por tal motivo no se realizó ningún test estadístico con SIRT1 ni tampoco con HDAC3 (Fig. 27 C).

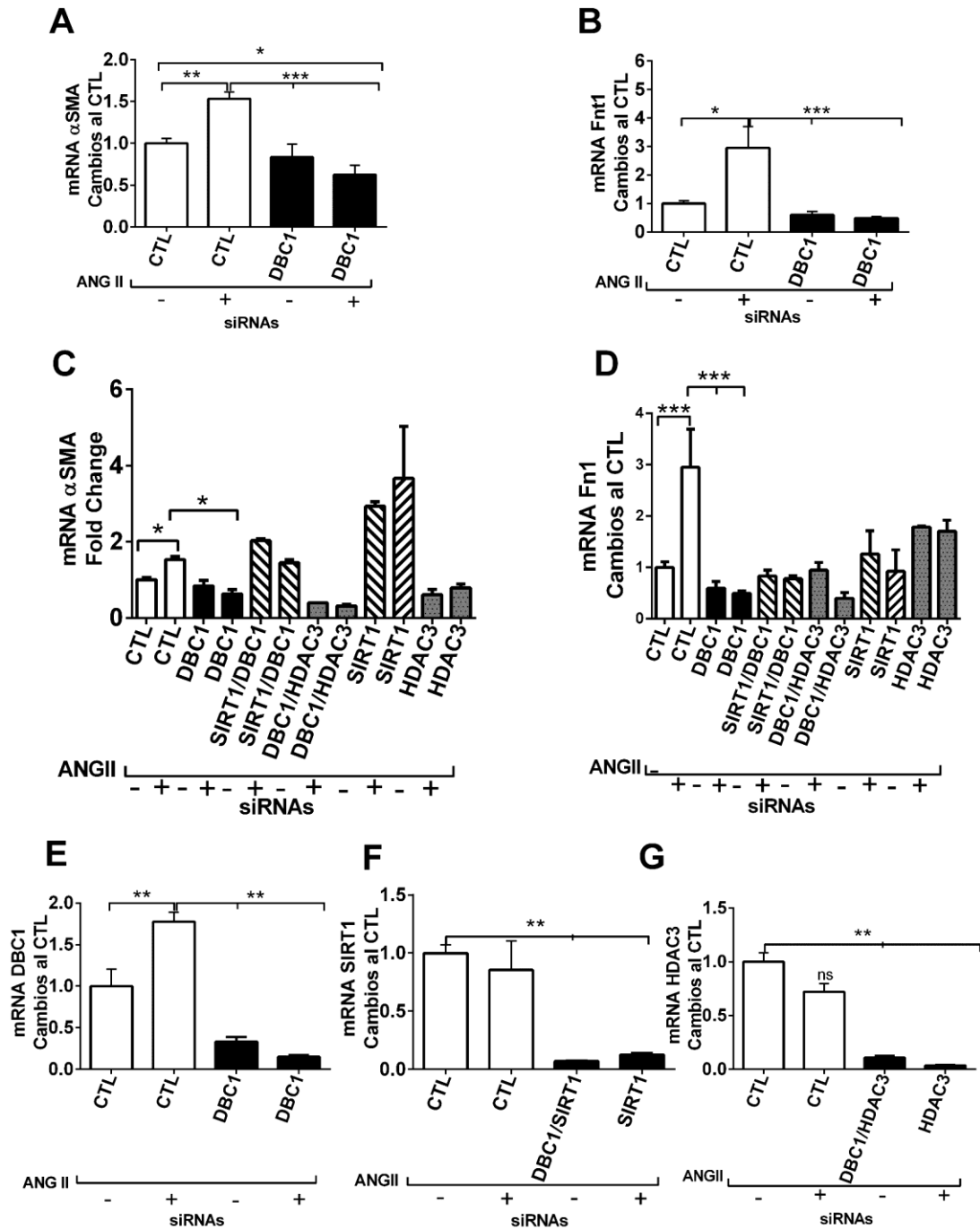


Figura 27. El tratamiento con ANG II induce la expresión de marcadores de fibrosis, *in vitro*, y este efecto es contrarrestado por la disminución transitoria en la expresión de DBC1. (A-D) Niveles de expresión de α SMA y Fnt1 medidos por qPCR. Las células HK2 fueron tratadas con los distintos siRNA y posteriormente incubadas con 100 nM ANG II durante 24 h. (E-G) Controles de silenciamiento para DBC1, SIRT1 y HDAC3, respectivamente. Los resultados son mostrados como la media más desviación estándar de 3 experimentos independientes. Se utilizó el test de ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni para múltiples comparaciones entre los grupos. *, ** y *** significa $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente.

Los resultados obtenidos de este trabajo de investigación muestran una vinculación de la proteína DBC1 en la regulación vascular, en un modelo de HTA promovido por la ANG II. Como se pudo observar, los ratones DBC1 KO son más susceptibles a la formación de AD que los animales WT, a pesar de que ambos genotipos desarrollan HTA, manejando valores de PA similares. Como las posibles causas de esta susceptibilidad destacan la presencia de los marcadores aneurismales, MMPs 9, 2 y 12 y angiogénicos como el VEGF, fragmentación de las fibras elásticas, y una defectuosa tasa de proliferación de las VSMC. Por otra parte, a nivel renal la ausencia de DBC1 previene la fibrosis intersticial y la hiperplasia. Sin embargo, considerando que el modelo utilizado no causa un daño renal crónico, se hace necesario profundizar en el estudio de esta proteína utilizando un modelo de enfermedad renal más robusto.

A continuación se discutirán algunos aspectos que son considerados claves acerca de la utilidad del modelo y para comprender los mecanismos por los cuales DBC1 podría mediar las acciones a nivel del sistema vascular.

El modelo de infusión con ANG II

El uso de esta herramienta permitió conocer una nueva función de DBC1 en una patología cardiovascular. Estudios previos habían reportado que ratones DBC1 KO sometidos a una dieta rica en grasas, presentaban un fenotipo de "obesidad saludable" ya que tenían un mejor manejo de la gluconeogénesis²²⁸, y estaban protegidos contra la resistencia a la insulina, esteatosis hepática, inflamación, senescencia y aterosclerosis²²⁸⁻²³⁰, todas estas condiciones que predisponen al síndrome metabólico. Sin embargo, durante el proceso de desarrollo de HTA hallamos que la ausencia de DBC1 condiciona al desarrollo de lesiones vasculares, y si consideramos que la HTA está directamente relacionada con el síndrome metabólico, DBC1 estaría jugando roles opuestos.

Por más de 15 años el modelo de ANG II en ratones ApoE^{-/-} se ha venido utilizando para estudiar la fisiopatología de enfermedades como aterosclerosis y AD²⁸⁵. Los ratones machos ApoE^{-/-} pueden presentar incidencias de AD de un 80% o más de acuerdo a la dosis usada de ANG II²⁴⁵. Sin embargo, cuando este mismo protocolo experimental fue usado en otra cepa como la C57BL/6 la incidencia de AD cayó a un 39%²⁸⁶. Estos valores reportados para la cepa C57BL/6 son superiores a los obtenidos en esta tesis, y se pudieran deber a dos razones fundamentales: la primera es que esos ensayos utilizaron ratones que presentaban una edad superior a los 6 meses; y la segunda, que la dosis de ANG II administrada fue mayor a la empleada en este trabajo.

Un hecho importante a considerar, es que los ratones DBC1 KO son más susceptibles al desarrollo de AD con respecto a los WT. Incluso con dosis muy bajas de ANG II hubo presencia de AD sólo en los animales DBC1 KO. Tomando en cuenta la participación de esta proteína en el metabolismo celular, y en vista de la vulnerabilidad que presenta esta cepa transgénica, pudiera considerarse su uso para estudiar más a fondo la patología de las AD. Haciendo algunos reajustes en el modelo experimental, como la selección de animales más longevos y dosis de ANG II que partan de concentraciones muy bajas, quizás sea posible estudiar esta condición desde una fase muy temprana, e ir evaluando la progresión de la lesión.

En términos de la fisiopatología de la lesión en el ratón, la AD suele aparecer a nivel de la aorta suprarrenal entre las arterias celíaca y mesentérica²⁸⁷. La principal causa que desencadena la aparición de la AD es la pérdida de integridad de la pared del vaso, que ocasiona una ruptura de las fibras elásticas y una disección de la capa media que con los días puede propagarse presentándose extravasación de eritrocitos que pudieran formar un falso canal culminando en la aparición de un IMH. Con el tiempo, la capa adventicia también se verá comprometida producto de la dilatación y ruptura de los vasa vasorum¹³⁴.

Las MMPs están directamente vinculadas con el desarrollo de AD y aneurismas abdominales, principalmente la MMP9, la cual incluso se ha propuesto como un biomarcador en humanos⁸². Un estudio demostró que el empleo de un inhibidor para las MMPs de amplio espectro, fue capaz de evitar la formación de aneurismas abdominales²⁸⁸. Asimismo, el uso de un ratón KO para la MMP9 atenuó la formación de AD en estos ratones, por lo cual pone a las MMPs como posibles blancos terapéuticos para el manejo de estas aortopatías²⁸⁸. Las CE juegan un papel fundamental en el desarrollo de la AD debido a que secretan sustancias que van a atraer macrófagos y linfocitos a las adyacencias del vaso, creando un ambiente inflamatorio que por un lado favorece la proliferación de las CE dando origen a un proceso de neovascularización, y por otro lado, los macrófagos van a desencadenar un proceso de apoptosis de las VSMC a través de la producción de TNF α y activación de la vía del NO²⁸⁹. A su vez, los macrófagos van a producir y promover la producción de IL-6 y MCP-1, favoreciendo la infiltración de linfocitos T y B en el sitio de la lesión con la producción de otros mediadores proinflamatorios¹⁵⁷. Por otra parte, los macrófagos son una fuente importante de MMP9, MMP12 así como de otras sustancias como el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), que van a exacerbar la degradación de elementos de la ECM²⁸⁶. Toda esta cascada de eventos

ocasiona disfunción endotelial, apoptosis de VSMC, fragilidad vascular y genera un ambiente propicio para la formación de AD ¹³⁴.

Otro rasgo característico asociado con las AD es la activación de la coagulación. En este sentido, la trombina es la enzima clave de la cascada de coagulación ya que actúa sobre el fibrinógeno para generar fibrina. Sin embargo, la trombina al igual que otros elementos de la coagulación, puede activar al sistema inmune a través de receptores activados por proteasas que se encuentran en la superficie del endotelio, y de moléculas de adhesión atrayendo leucocitos y produciendo una inflamación local ²⁷⁴ Uno de los anticoagulantes naturales, que contrarresta el efecto de la trombina es la antitrombina III, el cual es un inhibidor de tipo serina proteasa que forma un complejo con la trombina, inactivándola.

Recientemente se demostró que un grupo de pacientes con AD que iban a ser sometidos a una cirugía, tenían alterado el sistema de hemostasia, observando alteraciones tanto en elementos de la cascada de la coagulación como de la fibrinólisis ²⁹⁰. La trombina y el complejo trombina-antitrombina III se encontraban elevados en estos pacientes, con respecto a personas sanas, mientras que los valores de la antitrombina III y del plasminógeno (este último responsable de la vía fibrinolítica), estaban por debajo de los límites considerados normales. Los investigadores postularon que el estado procoagulante podría ser responsable de la trombosis micro o macrovascular que se observa en pacientes que sufren de AD ²⁹⁰.

Si bien en esta tesis no se estudiaron los procesos de hemostasia, como parte de la caracterización del modelo de HTA inducido por ANG II se procesaron las orinas de los ratones WT y DBC1 KO, por MS/LC, detectando un conjunto de proteínas exclusivas de los animales WT, entre las cuales destacaron la antitrombina III y el plasminógeno. Este hallazgo abre una nueva puerta de estudio que explicaría otra de las razones por las cuales los ratones WT estuvieron protegidos contra la AD. Sin embargo es necesario un abordaje más profundo para poder corroborar esta hipótesis.

Durante el desarrollo de la HTA ocurre un proceso de remodelación vascular, como consecuencia de los cambios de presión y volumen que experimentan las arterias trayendo como consecuencia el engrosamiento de los vasos y la pérdida del tono vascular. Nuestros resultados apuntan a que DBC1 estaría regulando parte de este proceso de remodelación, a través de dos vías; la primera por medio de una desregulación de las MMPs cuya implicancia se vería reflejada en la pérdida del tono vascular por exacerbada actividad

elastolítica, y la segunda; por una falla en los procesos de hiperplasia a causa de la ausencia de proliferación de las VSMC, evitando así que ocurra un incremento en el grosor de la pared vascular. Otra posibilidad que no podemos descartar es el hecho de que las VSMC de los DBC1 KO experimenten un proceso de apoptosis o senescencia, dado que la muerte celular programada es uno de los eventos observados en las AD¹³⁴. Debido a que en esta tesis nos centramos en medir la respuesta proliferativa frente a la HTA, es necesario un estudio que vaya en esa otra línea.

A continuación se mencionarán los posibles blancos por los cuales DBC1 podría estar causando la fragilidad vascular y la falla en el engrosamiento de la pared vascular, ambos procesos implicados en el desarrollo de AD promovida por el tratamiento con ANG II.

Aumento de la fragilidad vascular por aumento de la degradación de elastina y colágeno.

Los ratones DBC1 KO mostraron un incremento de los transcritos de las MMP2, MMP9 y MMP12 junto con una pérdida en el recambio de colágeno, lo que demuestra una exacerbada degradación de los elementos de la matriz extracelular, principalmente de elastina y colágenos. Estos resultados también fueron confirmados *in vitro* utilizando cultivos de VSMC WT y KO, o cultivos de VSMC WT a las cuales se les realizó un silenciamiento transitorio para disminuir la expresión proteica de DBC1. En ausencia de DBC1, existe un incremento basal de los transcritos de la MMP9 y MMP12, sin necesidad de recibir un estímulo de ANG II, hecho que no ocurrió en las VSMC WT en las cuales sólo el estímulo con ANG II causó un incremento de las MMP9 y MMP12.

En el caso del silenciamiento transitorio para DBC1, se observó también un incremento de las MMP9, MMP12 y MMP2. Si bien no podemos explicar las razones por las cuales existen diferencias entre los ensayos *in vitro* e *in vivo*, en cuanto al aumento de la expresión basal de las MMPs en los animales DBC1 KO, una de las razones podría ser el hecho de que en el tejido existe una heterogeneidad de poblaciones celulares además de las VSMC, que estarían influenciando la expresión de estos marcadores. La MMP9 fue la enzima que se encontró sobreexpresada a nivel transcripcional sólo en los animales DBC1 KO, y fue detectada incluso en ratones que no desarrollaron AD, lo que sugiere que la aparición de este marcador en fases previas al desarrollo de la lesión actuaría más bien como un agente causal de la enfermedad, y la regulación de su expresión pudiera estar mediada a través de alguno de los blancos vinculados con DBC1.

Por otra parte, al igual que en los ensayos *in vivo* se observó a nivel *in vitro* un incremento en la expresión del mensajero de VEGF, cuando se utilizó un siRNA para DBC1 en las VSMC WT. Este factor es considerado un potente estimulador de la angiogénesis, y puede activarse como un mecanismo compensatorio para suplir el proceso de rarefacción que sufren las arteriolas y capilares durante el proceso de HTA ²⁹¹.

Se ha demostrado que SIRT1 actúa atenuando el daño vascular promovido durante la HTA, por medio de la inhibición de la formación de la capa neoíntima, a través de la regulación de los procesos de migración y proliferación de las VSMC mediados por la MMP9 y la proteína del ciclo celular Ciclina D1, respectivamente ¹⁹⁶. Otro estudio demostró que SIRT1 previene la formación de AD inducida por ANG II, en ratones sometidos a una restricción calórica, y el KO para SIRT1 revierte el efecto protector ²⁹².

Con respecto a las HDACs de clase I y II, se han descrito inhibidores de estas enzimas que actúan atenuando la respuesta inflamatoria y disminuyendo la proliferación de las VSMC, durante la HTA ²⁰⁸, así como previenen el riesgo de padecer de AD ²⁰⁹. A pesar de que tanto SIRT1 como HDAC3 son regulados por DBC1, los resultados *in vitro* no muestran una dependencia directa de estas proteínas en la modulación de los marcadores de remodelación vascular.

Como se ha mencionado, DBC1 es una proteína nuclear que actúa en la regulación de factores de transcripción, reguladores epigenéticos ²²¹, moléculas RNA no codificantes de gran tamaño (lncRNA, por sus siglas en inglés) ²¹², y receptores nucleares ²²³⁻²²⁵. La diversidad de interactores complejiza el estudio de DBC1, siendo imposible atribuirle una función específica.

A nivel del metabolismo se han logrado discernir algunos mecanismos por los cuales DBC1 estaría mediando sus funciones. En este sentido, Escande y col. demostraron que de acuerdo al estado energético de la célula, DBC1 modula la actividad de SIRT1. Este hecho fue comprobado usando ratones WT y DBC1 KO que fueron sometidos a una dieta con un alto contenido calórico (HFD). Los ratones WT alimentados durante 20 semanas con HFD mostraron signos de esteatosis hepática, y de inflamación, lo cual se correlacionó con una disminuida actividad de SIRT1. Sin embargo, los animales DBC1 KO en las mismas condiciones experimentales, no mostraron ningún signo de daño. Si bien no se detectaron incrementos significativos en cuanto a la actividad de SIRT1 en los hígados de los animales DBC1 KO, sí se observó la activación de algunos blancos moleculares que son regulados por SIRT1, como el caso de la enzima AMPK (proteína

quinasa activada por 5 adenosina monofosfato), la cual fosforila a la enzima ACC (Acetil coA corboxilasa) inhibiendo la lipogénesis, promoviendo la β -oxidación y evitando la acumulación de lípidos que causan finalmente la esteatosis. Por otro parte, los ratones DBC1 KO mostraron una incrementada expresión de la enzima antioxidante MnSOD (manganeso superóxido dismutasa) y una disminución de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF α ²⁶¹.

En la misma línea de estos resultados también fue demostrado que la ausencia de DBC1 protege a los animales del desarrollo de aterosclerosis. Utilizando ratones ApoE^{-/-} DBC1^{+/+} y ApoE^{-/-} DBC1^{-/-} sometidos a 20 semanas de dieta HFD, Escande y col. demostraron que en las aortas de los ratones ApoE^{-/-} DBC1^{-/-} se habían formado escasas placas de ateroma y presentaban una disminuida expresión de marcadores de inflamación y de daño tisular, tales como MCP1, VCAM, p53 y F4/80, con respecto a los ratones ApoE^{-/-} DBC1^{+/+} que mostraron un marcado proceso inflamatorio y presencia de abundantes placas de ateroma ²²⁹.

Si bien durante el desarrollo de esta tesis esperábamos encontrarnos con una situación similar con respecto a SIRT1 en el metabolismo, nuestros resultados demuestran que DBC1 estaría ejerciendo sus acciones de forma independiente de SIRT1, destacando la complejidad en cuanto a la regulación de DBC1.

Existen otras vías por las cuales DBC1 podría estar mediando sus acciones a nivel de los procesos de remodelación vascular. Uno de ellos pudiera ser a través de p53, cuyos niveles endógenos son necesarios para evitar la apoptosis de las VSMC ²⁹³. Este regulador de ciclo es necesario para mantener el equilibrio entre proliferación y apoptosis, y en este sentido se demostró en ratones ApoE^{-/-}/p53^{-/-} que fueron sometidos a una infusión de ANG II bajo un régimen de restricción calórica, que presentaron mayor incidencia de AD comparados con animales ApoE^{-/-}/p53^{+/+} ²⁹⁴. En biopsias de lesiones aneurismales humanas se ha detectado que p53 colocaliza con los núcleos de las VSMC.

Otra molécula recientemente vinculada con DBC1 es el lncRNA MALAT1 (Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) ²⁹⁵, el cual es un RNA de larga cadena que no codifica a proteína. Por este motivo, durante muchos años este tipo de moléculas no se consideraron importantes en la regulación celular. Hoy en día, esto ha cambiado y se han descrito una abundancia de moléculas de RNA de corta y larga secuencia nucleotídica, que regulan distintos procesos celulares ²⁹⁶. Incluso, a nivel de patologías vasculares y cardiovasculares, están siendo postuladas como marcadores de

pronóstico y/o tratamiento. De hecho en la actualidad algunos de estos RNAs no codificantes se encuentran en estudios de fase clínica ²⁹⁶.

MALAT1 se encuentra sobreexpresada en algunos tipos de cáncer, y actúa promoviendo la migración y proliferación tanto *in vivo* como *in vitro* ²⁹⁷. Además actúa en la regulación del proceso de diferenciación de CE ²⁹⁸. Recientemente se reportó que MALAT1 a través de su interacción con los modificadores epigenéticos HDAC9 y BRAG1 (Brahma-related gene 1) con los que forma un complejo ternario, actúa sobre las VSMC promoviendo un cambio en su fenotipo contráctil que a la larga conlleva una disfunción vascular ²⁹⁹. El bloqueo en la expresión de MALAT1 resulta en la desestabilización del complejo ternario, evitando la transformación en el fenotipo de las VSMC, con lo cual se mantiene su carácter contráctil, permitiendo que cumplan con la función de conservar el tono de la pared del vaso ²⁹⁹.

Como se ha evidenciado en esta tesis así como en otros reportes ^{134,250,300}, tanto un incremento en la expresión de MMPs, en especial la MMP9, como la presencia de mediadores proinflamatorios, predisponen al desarrollo de AD. En base a esto, se ha reportado que la ANG II, a través de su interacción con el receptor AT1R, activa la vía de NFκB que a su vez es responsable de regular la expresión de la MMP9 ³⁰¹.

A su vez, se ha descrito que DBC1 frente a un estímulo de apoptosis por anoikis, interacciona con la quinasa IKK-β para que esta fosforile a la subunidad IκB del complejo de NFκB, permitiendo que este se transloque al núcleo y se una a sitios de promotores específicos de genes implicados en los procesos de supervivencia ³⁰². Sin embargo, también se ha visto, en otras condiciones, que la presencia de DBC1 puede favorecer la transcripción de genes proinflamatorios también a través de la activación de NFκB ³⁰³. Por consiguiente, y en vista de esta ambigüedad, sería posible que la ausencia de DBC1 pudiera promover de forma indirecta la activación de NFκB y con esto la sobreexpresión de MMP9.

En vista del abanico de posibilidades que surgen en cuanto a cómo DBC1 podría estar mediando sus acciones a nivel vascular, se hace necesario profundizar en el estudio de estos y otros interactores de la proteína.

Falla en el engrosamiento de la pared vascular por defectuosa tasa de proliferación celular.

La respuesta proliferativa que culmina en el engrosamiento de la pared vascular es un proceso inducido por la ANG II ⁶⁶. Un reporte previo por nuestro grupo de

investigación ²⁷⁰, así como los resultados de este trabajo, muestran una marcada diferencia entre los ratones WT y DBC1 KO, en manejar la respuesta proliferativa frente una injuria tisular. Frente a un estímulo de daño, las células tienen la capacidad de salir de su estado de quiescencia y empezar a proliferar para compensar el deterioro causado en el tejido. A nivel *in vitro* el estímulo de injuria se generó por un estrés celular causado por la privación y posterior reposición de FBS en el medio de cultivo. Lo que observamos, fue que las células de los ratones DBC1 KO presentaron problemas en salir de ese estado de quiescencia y retomar el ciclo celular. Cuando analizamos las células de ratones WT para evaluar el estado de DBC1, hallamos que en condiciones de quiescencia aparece una forma más corta de DBC1 (DN-DBC1) que pierde parte de su dominio N-terminal, el cual es el sitio de unión con muchos de sus interactores, en especial de SIRT1. Esta forma desaparece luego de que las células retoman el ciclo celular al añadir nuevamente FBS, y empiezan a expresar los marcadores de ciclo relacionados con la proliferación. Ahora bien, en el caso de las células DBC1 KO se observa un retraso en el cambio de transición de G0 y progresión en el ciclo celular.

A nivel vascular, durante el funcionamiento normal del tejido, las VSMC presentan un fenotipo contráctil y se encuentran en un estado quiescente, Si bien presentan una plasticidad, estas células no proliferan a menos de que reciban un estímulo. Por tal motivo, fueron escogidas para evaluar de forma *in vitro* la causa por la cual durante la HTA, no estaría ocurriendo una respuesta proliferativa. A continuación se muestra una tabla con las diferencias encontradas entre las células de los animales WT y DBC1 KO.

	WT	DBC1KO
Adición FBS	Proliferación	Proliferación
Deprivación FBS	Arresto G0	Arresto G0
Adición FBS	Paso a fase S y progresión	Retraso en retomar fase S
1 ^{er} round ciclo	Finalizado	En proceso

Recientemente se reportó, que ratones modificados genéticamente por el uso de la tecnología Cre/loxP con una delección específica de la enzima NAMPT (nicotinamida fosforibolistransferasa) en VSMC, y sometidas a una infusión de ANG II, fueron susceptibles a desarrollar AD, y una de las características comunes que presentaron con respecto a nuestro modelo del ratón DBC1 KO, es que también presentaron fallas en la proliferación de las VSMC que forman parte de la capa media vascular ³⁰⁴.

La importancia de la NAMPT es que representa una enzima clave para la síntesis de NAD⁺, siendo este último sustrato de SIRT1 y PARP [(poly(ADP-ribose) polymerase-1)], ambos interactores de DBC1 ³⁰⁵. Otro de los hallazgos que mostraron, fue que las VSMC presentaban un fenotipo senescente y acumulaban daños al DNA como consecuencia de la pérdida de actividad de la enzima reparadora del DNA, PPAR ³⁰⁴. Se ha reportado que DBC1 se une a PPAR inactivándolo, y el paso limitante para que esto ocurra son los niveles de NAD⁺ ³⁰⁵.

Como vemos, los hallazgos de esta tesis muestran una susceptibilidad de los ratones DBC1 KO a padecer AD durante la HTA. Sin embargo, resta un largo camino para poder comprender los mecanismos por los cuales esto ocurre.

Acciones mediadas por DBC1 a nivel renal, en el modelo de infusión con ANG II.

La complejidad del tejido renal aunado a las limitaciones por el modelo utilizado, sólo permiten afirmar que la ausencia de DBC1 ejerce una protección en los procesos de hiperplasia y fibrosis que ocurren durante el desarrollo de la HTA.

Los ratones WT tratados con ANG II presentaron una incrementada expresión de DBC1 a expensas de su forma completa, y además, mostraron una mayor tasa de proliferación a nivel de las distintas poblaciones celulares de los glomérulos, túbulos e intersticio, de la corteza renal, con respecto a los animales DBC1 KO. Asimismo, sólo los animales WT mostraron indicadores moleculares de fibrosis, medida por la expresión del mensajero de Fnt1 y del mensajero y proteína de α SMA, así como también un incremento en la deposición de colágeno. De igual forma, a pesar de que en ambos genotipos se observó presencia de albuminuria, esta fue significativamente mayor en los animales WT con respecto a los DBC1 KO. A nivel *in vitro*, la ANG II causó un incremento en la

expresión de marcadores de fibrosis en la condición control, y esta situación se revirtió al transfectar las células con un siRNA para DBC1.

La ANG II a nivel celular se encarga de activar vías de señalización que promueven el desarrollo de inflamación, generación de ROS, y fibrosis. Este proceso de fibrosis es mediado a través de la vía de TGF β , favoreciendo la deposición de fibronectina, colágenos, α SMA y otros elementos de la matriz extracelular, y a su vez propiciando el proceso de transdiferenciación epitelio-mesenquimal, con el que se exacerbará la producción de moléculas profibróticas e inflamatorias ²⁴². De no resolverse, este proceso de fibrosis culminará en una enfermedad renal crónica ³⁰⁶ .

Recientemente fue publicado que la activación farmacológica de SIRT1 atenúa la apoptosis tubular renal y la fibrosis túbulointersticial, mediado por la vía de TGF β ³⁰⁶ .Si bien los hallazgos *in vitro* en nuestro modelo de HTA no apuntan a un mecanismo directo dependiente de SIRT1, al igual que en el caso de lo que ocurre a nivel vascular, es necesario profundizar en tratar de comprender los mecanismos por los cuales DBC1 estaría mediando sus acciones.

La selección de un modelo para evaluar la función renal debe seguir un criterio lógico en cuanto al mecanismo que se desee estudiar. Lo más desafiante para el investigador es lograr reproducir en el animal todo lo que ocurre en el ser humano, y conociendo la complejidad de la enfermedad renal crónica, el empleo de un solo modelo puede ser insuficiente para lograr el objetivo.

En conjunto, todos estos resultados sugieren que en un contexto de injuria tisular DBC1 estaría actuando en la regulación del ciclo celular, por medio de su interacción con sus blancos moleculares sobre su región N-terminal, permitiendo que las células puedan dividirse y pasar por las distintas fases del ciclo celular. La ausencia de DBC1, evita su unión con sus principales interactores lo cual se ve reflejado en un retraso en la progresión del ciclo celular, y a nivel vascular esto se traduce en una fragilidad de la pared del vaso y un mayor riesgo de desarrollar AD. Se reportó que la sobreexpresión de SIRT1 inhibe la proliferación de las VSMC posterior a un proceso de daño ¹⁹⁶. En nuestro modelo de HTA, la ausencia de DBC1 podría causar una respuesta acentuada promovida por una incrementada actividad de SIRT1. Sin embargo, esto no es más que una posibilidad y amerita un estudio más exhaustivo.

La figura 28 muestra un esquema propuesto que resume los eventos de la HTA tanto en el ratón WT como en el ratón DBC1 KO a nivel vascular.

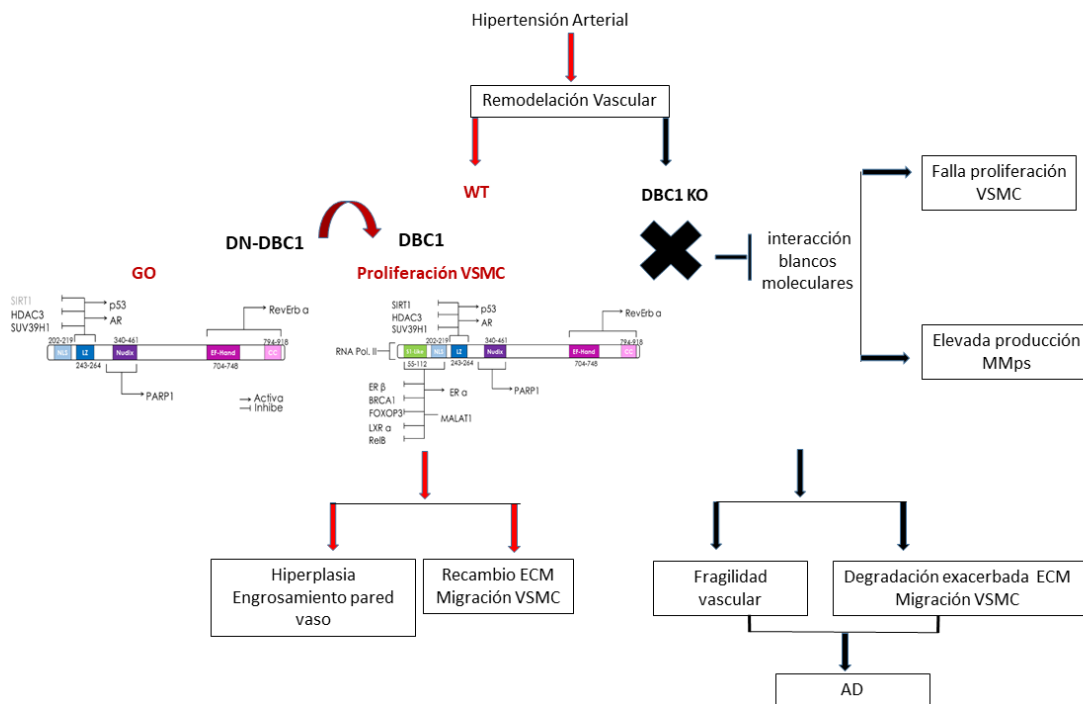


Figura 28. Modelo propuesto de la acción mediada por DBC1 a nivel vascular, durante la hipertensión. Durante el proceso de remodelación vascular promovido por la HTA, la pared vascular sufre algunos cambios estructurales y funcionales para contrarrestar el incremento de presión arterial. El resultado será un engrosamiento de la pared de los vasos y un recambio de la ECM que permite que las VSMC puedan migrar y dividirse, y DB1 parece regular este proceso, por medio de su interacción con blancos moleculares. Sin embargo, la ausencia DBC1 evitará la unión con sus interactores lo que ocasiona una pérdida en la proliferación celular, y una incrementada producción de MMPs que degradarán de forma exacerbada los elementos de la ECM, lo que culmina en el desarrollo de AD.

En resumen podemos observar el complejo escenario que se nos presenta. Por un lado destacan los diversos mecanismos que son activados durante el desarrollo de la HTA y por el otro, la manera de cómo DBC1 está mediando sus acciones. Si bien el uso de animales knock out para silenciar la expresión de un gen a nivel de todos los tejidos, ha permitido deducir muchas de las funciones por la pérdida de la función de la proteína codificada por ese gen, el hecho de bloquear su expresión a nivel sistémico y desde el desarrollo embrionario, puede conducir a que se activen mecanismos compensatorios y lo que veamos reflejado no sea exactamente atribuible a la ausencia de la proteína como tal. Sobre todo considerando la complejidad celular que está implicada en el proceso de injuria promovida por la HTA. Es por ello, que el uso de un animal knock out completo está

siendo reemplazado por un knock out condicional tejido específico y que se pueda inducir cuando sea necesario . En este sentido, en nuestro laboratorio se logró crear un ratón con estas características, de manera tal, que nos será de gran ayuda para estudiar por ejemplo, lo que ocurra cuando silenciemos la expresión de DBC1 específicamente en las VSMC en relación con la formación de AD *in vivo*.

Los hallazgos de esta investigación nos permitieron conocer otra función de DBC1, ahora resta entender los mecanismos que se están llevando a cabo. A continuación se hace un cierre general con las conclusiones a las que llegamos y se mencionan algunas estrategias que deberían abordarse para continuar con el estudio de DBC1 durante la HTA.

En este trabajo se demostró una nueva función de DBC1 vinculada con el proceso de remodelación vascular en la HTA, que predispone al desarrollo de AD en ausencia de la proteína. Por otra parte, a nivel renal, DBC1 podría estar vinculada con el proceso de fibrosis, razón por la cual los ratones DBC1 KO mostraron una atenuación al daño renal inducido por el tratamiento con ANG II.

Hasta la fecha el conocimiento que tenemos acerca de DBC1 nos habla de que su función está estrictamente condicionada en tiempo y espacio. Dependiendo del tipo celular y las señales que la célula perciba, DBC1 podría promover efectos completamente opuestos. Por ejemplo, frente a un estímulo de daño al DNA, determinará el arresto del ciclo celular o por otra parte, podría estar mediando los procesos de proliferación asociados con el cáncer.

En este sentido, nuestros resultados van a permitir el abordaje de esta nueva función de DBC1 en la regulación de las MMPs, directamente relacionadas con el proceso de migración y por tanto, elementos claves en el proceso de carcinogénesis.

Si bien es mucho lo que falta para comprender los mecanismos por los cuales DBC1 estaría mediando sus funciones, profundizando por un lado, en el estudio de la regulación de las MMPs, y por otro lado, en las proteínas implicadas en las distintas fases del ciclo celular, pudiéramos conocer la manera en la cual DBC1 estaría interactuando con sus blancos moleculares, considerando también, que ella misma está siendo regulada durante el proceso de HTA.

A continuación se mencionan algunas estrategias propuestas para el abordaje del estudio de DBC1 en la HTA.

Los hallazgos de esta investigación abren un camino para profundizar en el estudio de DBC1 en síndromes vasculares, donde sea posible conocer los mecanismos por los cuales esta proteína estaría mediando sus acciones. Esto permitiría no sólo utilizar a DBC1 como un marcador de riesgo y/o progresión de la enfermedad, sino como un blanco terapéutico.

A continuación se mencionarán algunos aspectos que deberían ser tomados en consideración para el abordaje del estudio de DBC1.

Estudio de DBC1 a nivel vascular.

1. La regulación en la expresión de las MMPs se lleva a cabo por un balance entre la síntesis y degradación de estas enzimas, y en este sentido los inhibidores de las MMPs participan activamente. Se ha reportado que durante el desarrollo de la HTA existe un incremento no sólo en la actividad de ciertas MMPs, sino de sus inhibidores endógenos. Es por ello que se hace necesario ampliar nuestro rango de estudio en conocer el estado en el que se encuentran estos inhibidores en las distintas fases del desarrollo de la AD.

Por otra parte, se observó una correlación entre DBC1 y las MMPs, así que para determinar si existe una implicación directa de DBC1, se podría utilizar un inhibidor de MMPs de amplio espectro como la doxiciclina, para analizar si en nuestro modelo de infusión por ANG II se revierte el efecto observado en los animales DBC1 KO.

2. Las VSMC forman un pilar importante durante el proceso de hiperplasia observado en la HTA. En condiciones normales estas células mantienen un fenotipo contráctil y su principal función es la de mantener el tono vascular pero poseen la propiedad de cambiar su fenotipo frente a condiciones de injuria, de contráctil a sintético, dejando su estado de quiescencia y empezando a proliferar. Sin embargo, también pueden volverse senescentes y apoptóticas, y en conjunto todo esto conlleva fragilidad vascular y riesgo de ruptura de la capa media. En vista de la plasticidad

que presentan estas células se hace indispensable estudiar los procesos de senescencia y apoptosis en nuestro modelo de ratón.

Para poder profundizar aún más en los cambios que ocurren sobre estas VSMC durante la HTA, tendríamos la posibilidad de silenciar DBC1 específicamente en estas células *in vivo* y evaluar lo que ocurre a nivel de su fenotipo. Además esta herramienta también nos permitiría medir el impacto de estas VSMC (que no expresan DBC1), en la formación de AD.

3. La respuesta inflamatoria es una de las características presentes en la AD, aunque todavía existen dudas con respecto a si es un proceso previo al desarrollo de la lesión. Los hallazgos de DBC1 dentro de esta área son controversiales, y dependiente del contexto celular pueden estar mediando la activación de mediadores pro o antiinflamatorios. Durante la caracterización de nuestro modelo de HTA no abordamos el estudio de DBC1 en la respuesta inmune, por lo que se hace de vital importancia el abordaje en esta área.
4. Profundizar en el estudio de las fases del ciclo celular durante el proceso de injuria, permitiría conocer exactamente donde estaría ocurriendo el retraso en la progresión del ciclo celular observado en ausencia de DBC1, predisponiendo el destino celular. Asimismo se debería evaluar la participación de sus principales blancos moleculares.
5. Debido a que ninguno de los blancos de DBC1 que fueron abordados en este estudio, SIRT1 y HDAC3, parecen estar mediando la expresión de las MMPs, se hace necesario ampliar el estudio de otros interactores de DBC1 para comprender el mecanismo por el cual esta proteína ejerce sus efectos. De igual manera, sería importante conocer a su vez quién y cómo estaría regulando a DBC1.

Estudio de DBC1 a nivel renal

Si bien el modelo utilizado en este trabajo tiene como desventaja que la cepa de ratón es resistente a padecer de daño renal crónico, nuestros resultados apuntan a que DBC1 estaría ejerciendo un efecto deletéreo durante la HTA. Una de las maneras de poder corroborar estos resultados es utilizando una metodología que permita simular un daño renal crónico, como por ejemplo, el uso combinado de una infusión de ANG II y una nefrectomía. Asimismo habría que evaluar bajo este nuevo escenario, si alguno de los blancos de DBC1 que ya fueron estudiados, SIRT1 y HDAC3, están implicados.

Como se mencionó antes, recientemente fue generado en nuestro laboratorio un ratón condicional para DBC1, por medio de la tecnología Cre-loxP, que bajo el promotor de un gen tejido específico, se hace posible silenciar la expresión de la proteína a nivel de un solo tejido, de manera tal que se pueda medir el impacto de la ausencia de DBC1 por ejemplo, a nivel renal, y estudiar lo que ocurre durante el curso de la HTA, empleando para ello además, una metodología que permita generar un daño renal crónico más robusto . De esta manera se pudiera realizar un análisis exhaustivo del rol de DBC1 y sus blancos moleculares en los procesos de hiperplasia, fibrosis e inflamación.

Todavía quedan muchas interrogantes por responder y un largo camino por recorrer, para lograr comprender cómo DBC1 se encuentra regulando sus acciones tanto a nivel vascular como renal, durante la HTA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roth, G. A. *et al.* Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015 -ScienceDirect. *J. Am. Coll. Cardiol.* **70**, 1–25 (2020).
2. Organization, W. H. *Noncommunicable diseases country profiles 2018*. (World Health Organization, 2018).
3. Marinou, K., Tousoulis, D., Antonopoulos, A. S., Stefanadi, E. & Stefanadis, C. Obesity and cardiovascular disease: From pathophysiology to risk stratification. *Int. J. Cardiol.* **138**, 3–8 (2010).
4. OMS. Información general sobre la hipertensión en el mundo. *OMS* 40 (2013).
5. OMS. Hipertensión. *OMS* (2019).
6. Ministerio Salud Pública. Recomendaciones para el abordaje de la hipertensión arterial sistémica en el primer nivel de atención. *MSP* 64 (2017).
7. Kearney, P. M. *et al.* Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet (London, England)* **365**, 217–223 (2005).
8. Ramos, D. M. V. Hipertensión arterial: novedades de las guías 2018. 8 (2018).
9. Organization, W. H. A global brief on hypertension : silent killer, global public health crisis: World Health Day. (2013).
10. OMS. ¿Qué son las enfermedades cardiovasculares? *OMS* (2020).
11. Oparil, S. *et al.* Hypertension. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **4**, 18014 (2018).
12. Choke, E. *et al.* A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* **30**, 227–244 (2005).
13. Gawinecka, J., Schönraht, F. & von Eckardstein, A. Acute aortic dissection: pathogenesis, risk factors and diagnosis. *Swiss Med. Wkly.* **147**, (2017).
14. Mikael, L. de R. *et al.* Vascular Aging and Arterial Stiffness. *Arq. Bras. Cardiol.* **109**, 253–258 (2017).
15. Jordan, J., Kurschat, C. & Reuter, H. Arterial Hypertension. *Dtsch. Arztebl. Int.*

- 115**, 557–568 (2018).
16. Buford, T. W. Hypertension and Aging. *Ageing Res Rev.* 96–111 (2017).
 17. Woodard, G. E. & Rosado, J. A. Natriuretic peptides in vascular physiology and pathology. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **268**, 59–93 (2008).
 18. Spieker, L. E., Flammer, A. J. & Lüscher, T. F. The vascular endothelium in hypertension. *Handb. Exp. Pharmacol.* 249–283 (2006). doi:10.1007/3-540-36028-x_8
 19. Zhou, B. *et al.* Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. *Lancet* **389**, 37–55 (2017).
 20. Maguire, J. J. & Davenport, A. P. Endothelin Receptors and Their Antagonists. *Semin. Nephrol.* **35**, 125–136 (2015).
 21. Guyton y Hall. *Tratado de Fisiología Médica..* Decimotercera edición.
 22. Grassi Guido, Mark Allyn & Esler Murray. The Sympathetic Nervous System Alterations in Human Hypertension. *Circ. Res.* **116**, 976–990 (2015).
 23. Mian, M. O. R., Paradis, P. & Schiffrin, E. L. Innate Immunity in Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **16**, 413 (2014).
 24. Kossmann, S. *et al.* Angiotensin II–Induced Vascular Dysfunction Depends on Interferon γ Driven Immune Cell Recruitment and Mutual Activation of Monocytes and NK-Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 1313–1319 (2013).
 25. D’Andrea, A. *et al.* Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* **176**, 1387–1398 (1992).
 26. Wenzel, P. *et al.* Lysozyme M Positive Monocytes Mediate Angiotensin II Induced Arterial Hypertension and Vascular Dysfunction. *Circulation* **124**, 1370–1381 (2011).
 27. Tian, N. *et al.* Immune suppression prevents renal damage and dysfunction and reduces arterial pressure in salt-sensitive hypertension. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **292**, H1018–H1025 (2007).
 28. Krishnan, S. M. *et al.* Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive

- hypertension. *Cardiovasc. Res.* **115**, 776–787 (2019).
29. Wenzel, U. *et al.* Immune Mechanisms in Arterial Hypertension. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 677–686 (2016).
 30. Lawrence, T. The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a001651–a001651 (2009).
 31. Moynagh, P. N. The NF- B pathway. *J. Cell Sci.* **118**, 4589–4592 (2005).
 32. Forrester, S. J. *et al.* Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **98**, 1627–1738 (2018).
 33. Karnik, S. S. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. *Pharmacol. Rev.* **67**, 754–819 (2015).
 34. Wang, Y. & Zhao, S. *Vasoactivators and Placental Vasoactivity*. (Morgan & Claypool Life Sciences, 2010).
 35. Paz Ocaranza, M. *et al.* Counter regulatory renin angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **17**, 116–129 (2020).
 36. de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. & Unger, T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* **52**, 415–472 (2000).
 37. Griendling, K. K., Ushio-Fukai, M., Lassègue, B. & Alexander, R. W. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **29**, 366–373 (1997).
 38. Capponi, A. M. Distribution and signal transduction of angiotensin II AT1 and AT2 receptors. *Blood Press. Suppl.* **2**, 41–6 (1996).
 39. Griendling, K. K., Lassègue, B. & Alexander, R. W. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 281–306 (1996).
 40. Jard, S., Cantau, B. & Jakobs, K. H. Angiotensin II and alpha-adrenergic agonists inhibit rat liver adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **256**, 2603–6 (1981).
 41. Pobiner, B. F., Hewlett, E. L. & Garrison, J. C. Role of Ni in coupling angiotensin receptors to inhibition of adenylate cyclase in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **260**,

16200–16209 (1985).

42. Mehta, P. K. & Griendling, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Physiol.* **292**, C82–C97 (2007).
43. Sadoshima, J. & Izumo, S. Signal transduction pathways of angiotensin II--induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers. *Circ. Res.* **73**, 424–438 (1993).
44. Meissner, A. *et al.* Sphingosine-1-phosphate signalling a key player in the pathogenesis of Angiotensin II induced hypertension. *Cardiovasc. Res.* **113**, 123–133 (2017).
45. Paek, J. *et al.* Multidimensional tracking of GPCR signaling via peroxidase catalyzed proximity labeling. *Cell* **169**, 338--349.e11 (2017).
46. Padia, S. H. & Carey, R. M. AT2 receptors: beneficial counter-regulatory role in cardiovascular and renal function. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **465**, 99–110 (2013).
47. Zhang, H. *et al.* Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. *Nature* **544**, 327–332 (2017).
48. Siragy, H. M. & Carey, R. M. The subtype-2 (AT2) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT1 receptor-mediated prostaglandin E2 production in conscious rats. *J. Clin. Invest.* **97**, 1978–1982 (1996).
49. Siragy, H. M., Jaffa, A. A., Margolius, H. S. & Carey, R. M. Renin-angiotensin system modulates renal bradykinin production. *Am. J. Physiol.* **271**, R1090--1095 (1996).
50. Xu, J. *et al.* Effects of Cardiac Overexpression of the Angiotensin II Type 2 Receptor on Remodeling and Dysfunction in Mice Post–Myocardial Infarction. *Hypertension* **63**, 1251–1259 (2014).
51. Patel, V. B., Lezutekong, J. N., Chen, X. & Oudit, G. Y. Recombinant Human ACE2 and the Angiotensin 1-7 Axis as Potential New Therapies for Heart Failure. *Can. J. Cardiol.* **33**, 943–946 (2017).
52. Patel, V. B., Zhong, J.-C., Grant, M. B. & Oudit, G. Y. Role of the

- ACE2/Angiotensin 1-7 Axis of the Renin Angiotensin System in Heart Failure. *Circ. Res.* **118**, 1313–1326 (2016).
53. Ferrario, C. M. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J. renin-angiotensin-aldosterone Syst. JRAAS* **7**, 3–14 (2006).
54. Jiang, T., Gao, L., Lu, J. & Zhang, Y.-D. ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in Brain: A Potential Target for Prevention and Treatment of Ischemic Stroke. *Curr. Neuropharmacol.* **11**, 209–217 (2013).
55. Alghamri, M. S. *et al.* Enhanced angiotensin II induced cardiac and aortic remodeling in ACE2 knockout mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **18**, 138–151 (2013).
56. Zhong, J. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. *Circulation* **122**, 717–728, 18 p following 728 (2010).
57. Flores-Muñoz, M., Godinho, B. M. D. C., Almalik, A. & Nicklin, S. A. Adenoviral delivery of angiotensin-(1-7) or angiotensin-(1-9) inhibits cardiomyocyte hypertrophy via the mas or angiotensin type 2 receptor. *PLoS One* **7**, e45564 (2012).
58. Flores-Munoz, M. *et al.* Angiotensin-(1-9) attenuates cardiac fibrosis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat via the angiotensin type 2 receptor. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **59**, 300–307 (2012).
59. Ocaranza, M. P. *et al.* Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *J. Hypertens.* **28**, 1054–1064 (2010).
60. Ocaranza, M. P. *et al.* Rho kinase inhibition activates the homologous angiotensin-converting enzyme-angiotensin-(1-9) axis in experimental hypertension. *J. Hypertens.* **29**, 706–715 (2011).
61. Jankowski, V. *et al.* Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 297–302 (2007).
62. Lautner, R. Q. *et al.* Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ. Res.* **112**, 1104–1111 (2013).
63. Sag, C. M. *et al.* Distinct Regulatory Effects of Myeloid Cell and Endothelial Cell

- NAPDH Oxidase 2 on Blood Pressure. *Circulation* **135**, 2163–2177 (2017).
64. Forrester, S. J. *et al.* EGFR transactivation: mechanisms, pathophysiology and potential therapies in cardiovascular system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **56**, 627–653 (2016).
 65. Takayanagi, T. *et al.* Role of epidermal growth factor receptor and endoplasmic reticulum stress in vascular remodeling induced by angiotensin II. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **65**, 1349–1355 (2015).
 66. Intengan, H. D. & Schiffrin, E. L. Vascular Remodeling in Hypertension. *Hypertension* **38**, 581–587 (2001).
 67. Dugourd Céline, Gervais Marianne, Corvol Pierre & Monnot Catherine. Akt Is a Major Downstream Target of PI3-Kinase Involved in Angiotensin II Induced Proliferation. *Hypertension* **41**, 882–890 (2003).
 68. Xi, X. P. *et al.* Central role of the MAPK pathway in ang II mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 73–82 (1999).
 69. Shen, Y.-J. *et al.* Cardamonin inhibits angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration by downregulating p38 MAPK, Akt, and ERK phosphorylation. *J. Nat. Med.* **68**, 623–629 (2014).
 70. Ragolia, L., Palaia, T., Paric, E. & Maesaka, J. K. Prostaglandin D2 synthase inhibits the exaggerated growth phenotype of spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 22175–22181 (2003).
 71. Diep, Q. N., El Mabrouk, M., Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. Expression of cell cycle proteins in blood vessels of angiotensin II infused rats: role of AT1 receptors. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **37**, 604–608 (2001).
 72. Geisterfer, A. A., Peach, M. J. & Owens, G. K. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.* **62**, 749–756 (1988).
 73. Naftilan, A. J., Pratt, R. E. & Dzau, V. J. Induction of platelet-derived growth factor A chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **83**, 1419–1424 (1989).
 74. DuPont, J. J., Kenney, R. M., Patel, A. R. & Jaffe, I. Z. Sex differences in

- mechanisms of arterial stiffness. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 4208–4225 (2019).
75. Joh, J. H. & Kim, D. I. Quantitative analysis of vascular calcification. *Exp. Ther. Med.* **7**, 23–26 (2014).
76. Patel, S., Rauf, A., Khan, H. & Abu-Izneid, T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed. Pharmacother.* **94**, 317–325 (2017).
77. Poduri, A. *et al.* Fibroblast Angiotensin II Type 1a Receptors Contribute to Angiotensin II-Induced Medial Hyperplasia in the Ascending Aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1995–2002 (2015).
78. Wang, W. *et al.* Essential role of Smad3 in angiotensin II induced vascular fibrosis. *Circ. Res.* **98**, 1032–1039 (2006).
79. Sriramula, S., Haque, M., Majid, D. S. A. & Francis, J. Involvement of tumor necrosis factor alpha in angiotensin II mediated effects on salt appetite, hypertension, and cardiac hypertrophy. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **51**, 1345–1351 (2008).
80. Beamish, J. A., He, P., Kottke-Marchant, K. & Marchant, R. E. Molecular Regulation of Contractile Smooth Muscle Cell Phenotype: Implications for Vascular Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* **16**, 467–491 (2010).
81. Wang, M., Kim, S. H., Monticone, R. E. & Lakatta, E. G. Matrix metalloproteinases promote arterial remodeling in aging, hypertension, and atherosclerosis. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **65**, 698–703 (2015).
82. Wu, D., Shen, Y. H., Russell, L., Coselli, J. S. & LeMaire, S. A. Molecular mechanisms of thoracic aortic dissection. *J. Surg. Res.* **184**, 907–924 (2013).
83. Basu, R. *et al.* TIMP3 is the primary TIMP to regulate agonist-induced vascular remodelling and hypertension. *Cardiovasc. Res.* **98**, 360–371 (2013).
84. Sparks, M. A., Crowley, S. D., Gurley, S. B., Mirotsov, M. & Coffman, T. M. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr. Physiol.* **4**, 1201–1228 (2014).
85. Coffman, T. M. The inextricable role of the kidney in hypertension. *J. Clin. Invest.* **124**, 2341–2347 (2014).
86. Crowley, S. D. *et al.* Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy

- through its receptors in the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17985–17990 (2006).
87. Sparks, M. A. *et al.* Vascular Type 1A Angiotensin II Receptors Control BP by Regulating Renal Blood Flow and Urinary Sodium Excretion. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **26**, 2953–2962 (2015).
 88. Liu, Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **7**, 684–696 (2011).
 89. He, J., Xu, Y., Koya, D. & Kanasaki, K. Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. *Clin. Exp. Nephrol.* **17**, 488–497 (2013).
 90. Campanholle, G., Ligresti, G., Gharib, S. A. & Duffield, J. S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **304**, C591–603 (2013).
 91. Steppan, J., Barodka, V., Berkowitz, D. E. & Nyhan, D. Vascular Stiffness and Increased Pulse Pressure in the Aging Cardiovascular System. *Cardiol. Res. Pract.* **2011**, (2011).
 92. Mitchell, G. F. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. *J. Appl. Physiol. (Bethesda, Md. 1985)* **105**, 1652–1660 (2008).
 93. Westerhof, N., Lankhaar, J.-W. & Westerhof, B. E. The arterial Windkessel. *Med. Biol. Eng. Comput.* **47**, 131–141 (2009).
 94. Yurchenco, P. D. & O’Rear, J. J. Basal lamina assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 674–681 (1994).
 95. Fishman, A. P. Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **401**, 1–8 (1982).
 96. Cahill, P. A. & Redmond, E. M. Vascular endothelium Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis* **248**, 97–109 (2016).
 97. Davis, E. C. Smooth muscle cell to elastic lamina connections in developing mouse aorta. Role in aortic medial organization. *Lab. Invest.* **68**, 89–99 (1993).
 98. Dingemans, K. P., Teeling, P., Lagendijk, J. H. & Becker, A. E. Extracellular matrix of the human aortic media: An ultrastructural histochemical and

- immunohistochemical study of the adult aortic media. *Anat. Rec.* **258**, 1–14 (2000).
99. Howard, P. S. & Macarak, E. J. Localization of collagen types in regional segments of the fetal bovine aorta. *Lab. Invest.* **61**, 548–555 (1989).
 100. O’Connell, M. K. *et al.* The Three Dimensional Micro and Nanostructure of the Aortic Media Lamellar Unit Measured Using 3D Confocal & Electron Microscopy Imaging. *Matrix Biol.* **27**, 171–181 (2008).
 101. Rachev, A. & Hayashi, K. Theoretical study of the effects of vascular smooth muscle contraction on strain and stress distributions in arteries. *Ann. Biomed. Eng.* **27**, 459–468 (1999).
 102. Cabrera-Fischer, D. E. I., Zócalo, Y., Lascano, E. C., Negroni, J. A. & Wray, I. S. La adventicia arterial: actor olvidado del sistema cardiovascular. **8** (2015).
 103. Pagano, P. J. & Gutterman, D. D. The Adventitia: The Outs and Ins of Vascular Disease. *Cardiovasc. Res.* **75**, 636–639 (2007).
 104. Maiellaro, K. & Taylor, W. R. The Role of the Adventitia in Vascular Inflammation. *Cardiovasc. Res.* **75**, 640–648 (2007).
 105. Jaminon, A., Reesink, K., Kroon, A. & Schurgers, L. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in Arterial Remodeling: Focus on Calcification Related Processes. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
 106. Cortese, F. *et al.* Vascular, cardiac and renal target organ damage associated to arterial hypertension: which noninvasive tools for detection. *J. Hum. Hypertens.* (2020).
 107. Renna, N. F., de Las Heras, N. & Miatello, R. M. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int. J. Hypertens.* **2013**, 808353 (2013).
 108. Baumbach, G. L. & Heistad, D. D. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **13**, 968–972 (1989).
 109. Feihl, F., Liaudet, L., Waeber, B. & Levy, B. I. Hypertension: a disease of the microcirculation. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **48**, 1012–1017 (2006).
 110. O’Rourke, M. F. Pulsatile arterial haemodynamics in hypertension. *Aust. N. Z. J. Med.* **6 suppl 2**, 40–48 (1976).
 111. Mulvany, M. J. *et al.* Vascular remodeling. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **28**,

- 505–506 (1996).
112. van Varik, B. J. *et al.* Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front. Genet.* **3**, (2012).
 113. Gerthoffer, W. T. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ. Res.* **100**, 607–621 (2007).
 114. Alexander, M. R. & Owens, G. K. Epigenetic Control of Smooth Muscle Cell Differentiation and Phenotypic Switching in Vascular Development and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **74**, 13–40 (2012).
 115. Parente, J. M. & Castro, M. M. Matrix metalloproteinase in the cardiovascular remodeling of hypertension: current insights and therapeutic potential. *Metalloproteinases In Medicine* (2018). doi:10.2147/MNM.S104793
 116. Wang, X. & Khalil, R. A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv. Pharmacol.* **81**, 241–330 (2018).
 117. Clark, I., Swingler T., Sampieri, C. & Edwards, D. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1362–1378 (2008).
 118. Kar, S., Subbaram, S., Carrico, P. M. & Melendez, J. A. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: a critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **174**, 299–306 (2010).
 119. Jacob-Ferreira, A. L. *et al.* Phosphorylation Status of 72 kDa MMP2 Determines Its Structure and Activity in Response to Peroxynitrite. *PLoS One* **8**, e71794 (2013).
 120. Sariahmetoglu, M. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity by phosphorylation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **21**, 2486–2495 (2007).
 121. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **69**, 562–573 (2006).
 122. Martinez-Lemus, L. A. & Galiñanes, E. L. Matrix metalloproteinases and small artery remodeling. *Drug Discov. Today. Dis. Models* **8**, 21–28 (2011).
 123. Tayebjee, M. H. *et al.* Matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk

- and treatment: a substudy of the Anglo Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am. J. Hypertens.* **17**, 764–769 (2004).
124. Gkaliagkousi, E. *et al.* Elevated levels of MMP-9 in untreated patients with stage I essential hypertension. *Clin. Exp. Hypertens. (New York, N.Y. 1993)* **34**, 561–566 (2012).
 125. Bergman, M. R. *et al.* Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H1847--1860 (2007).
 126. Longo, G. M. *et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* **110**, 625–632 (2002).
 127. Cocciolone, A. J. *et al.* Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **315**, H189--H205 (2018).
 128. Tajsic, T. & Morrell, N. W. Smooth muscle cell hypertrophy, proliferation, migration and apoptosis in pulmonary hypertension. *Compr. Physiol.* **1**, 295–317 (2011).
 129. Clough, R. E. & Nienaber, C. A. Management of acute aortic syndrome. *Nat. Rev. Cardiol.* **12**, 103–114 (2015).
 130. Vilacosta, I. Acute aortic syndrome. *Heart* **85**, 365–368 (2001).
 131. Tromp, G., Kuivaniemi, H., Hinterseher, I. & Carey, D. J. Novel genetic mechanisms for aortic aneurysms. *Curr. Atheroscler. Rep.* **12**, 259–266 (2010).
 132. Shimizu, K., Mitchell, R. N. & Libby, P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 987–994 (2006).
 133. Clouse, W. D. *et al.* Acute Aortic Dissection: Population-Based Incidence Compared With Degenerative Aortic Aneurysm Rupture. *Mayo Clin. Proc.* **79**, 176–180 (2004).
 134. Nienaber, C. A. *et al.* Aortic dissection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 1–18 (2016).
 135. Erbel, R. *et al.* 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases. *Eur. Heart J.* **35**, 2873–2926 (2014).

136. Milewicz, D. M. & Regalado, E. S. Use of genetics for personalized management of heritable thoracic aortic disease: How do we get there? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **149**, S3–S5 (2015).
137. Ziganshin, B. A. *et al.* Routine Genetic Testing for Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection in a Clinical Setting. *Ann. Thorac. Surg.* **100**, 1604–1611 (2015).
138. Landenhed, M. *et al.* Risk profiles for aortic dissection and ruptured or surgically treated aneurysms: a prospective cohort study. *J. Am. Heart Assoc.* **4**, e001513 (2015).
139. Porto, F. Del *et al.* The Multitasking Role of Macrophages in Stanford Type A Acute Aortic Dissection. *Cardiology* **127**, 123–129 (2014).
140. Koullias, G. J., Ravichandran, P., Korkolis, D. P., Rimm, D. L. & Elefteriades, J. A. Increased tissue microarray matrix metalloproteinase expression favors proteolysis in thoracic aortic aneurysms and dissections. *Ann. Thorac. Surg.* **78**, 2106–2111 (2004).
141. Proietta, M. *et al.* MMP-12 as a new marker of Stanford A acute aortic dissection. *Ann. Med.* **46**, 44–48 (2014).
142. Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R. F. & Summerville, W. W. Studies on Experimental Hypertension. *J. Exp. Med.* **59**, 347–379 (1934).
143. Lerman, L. O. *et al.* Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension* **73**, (2019).
144. Hamzaoui, M. *et al.* 5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6JRj mice. *Sci. Rep.* **10**, 1524 (2020).
145. Bashyam, H. Lewis Dahl and the genetics of salt-induced hypertension. *J. Exp. Med.* **204**, 1507–1507 (2007).
146. Olsen, M. E. *et al.* Mechanisms of angiotensin II natriuresis and antinatriuresis. *Am. J. Physiol. Physiol.* **249**, F299–F307 (1985).
147. Guzik, T. J. *et al.* Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J. Exp. Med.* **204**, 2449–2460 (2007).
148. Crowley, S. D. *et al.* Stimulation of lymphocyte responses by angiotensin II promotes kidney injury in hypertension. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **295**, F515–F524 (2008).

149. Crowley, S. D. *et al.* Role of AT₁ receptor mediated salt retention in angiotensin II dependent hypertension. *Am. J. Physiol. Physiol.* **301**, F1124–F1130 (2011).
150. Lautrette, A. *et al.* Angiotensin II and EGF receptor cross talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nat. Med.* **11**, 867–874 (2005).
151. Hartner, A., Cordasic, N., Klanke, B., Veelken, R. & Hilgers, K. F. Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **18**, 1999–2004 (2003).
152. Crowley, S. D. *et al.* Role of AT₁ receptor-mediated salt retention in angiotensin II dependent hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **301**, F1124–1130 (2011).
153. Deng, G. G. *et al.* Urokinase-type plasminogen activator plays a critical role in angiotensin II induced abdominal aortic aneurysm. *Circ. Res.* **92**, 510–517 (2003).
154. Rateri, D. L. *et al.* Prolonged Infusion of Angiotensin II in apoE^{-/-} Mice Promotes Macrophage Recruitment with Continued Expansion of Abdominal Aortic Aneurysm. *Am. J. Pathol.* **179**, 1542–1548 (2011).
155. Daugherty, A. & Cassis, L. A. Mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation. *Curr. Atheroscler. Rep.* **4**, 222–227 (2002).
156. Daugherty, A., Manning, M. W. & Cassis, L. A. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E deficient mice. *J. Clin. Invest.* **105**, 1605–1612 (2000).
157. Saraff, K., Babamusta, F., Cassis, L. A. & Daugherty Alan. Aortic Dissection Precedes Formation of Aneurysms and Atherosclerosis in Angiotensin II Infused, Apolipoprotein E Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1621–1626 (2003).
158. Trachet, B., *et al.* Ascending Aortic Aneurysm in Angiotensin II Infused Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 673–681 (2016).
159. Trachet, B. *et al.* Angiotensin II infusion into ApoE^{-/-} mice: a model for aortic dissection rather than abdominal aortic aneurysm. *Cardiovasc. Res.* **113**, 1230–1242 (2017).
160. Daugherty, A. & Cassis, L. Chronic angiotensin II infusion promotes atherogenesis in low density lipoprotein receptor ^{-/-} mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*

892, 108–118 (1999).

161. Liu, W. *et al.* Ursodeoxycholic Acid Attenuates Acute Aortic Dissection Formation in Angiotensin II-Infused Apolipoprotein E-Deficient Mice Associated with Reduced ROS and Increased Nrf2 Levels. *Cell. Physiol. Biochem.* **38**, 1391–1405 (2016).
162. Xu, H. *et al.* VSMC specific EP4 deletion exacerbates angiotensin II induced aortic dissection by increasing vascular inflammation and blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 8457–8462 (2019).
163. Ito, S. *et al.* MRTFA promotes angiotensin II induced inflammatory response and aortic dissection in mice. *PLoS One* **15**, e0229888 (2020).
164. Anidjar, S. *et al.* Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation* **82**, 973–981 (1990).
165. Patelis, N. *et al.* Animal models in the research of abdominal aortic aneurysms development. *Physiol. Res.* **66**, 899–915 (2017).
166. Daugherty, A., & Cassis, L. A. Mouse Models of Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 429–434 (2004).
167. Pyo, R. *et al.* Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* **105**, 1641–1649 (2000).
168. Nishijo, N. *et al.* Salt-sensitive aortic aneurysm and rupture in hypertensive transgenic mice that overproduce angiotensin II. *Lab. Invest.* **78**, 1059–1066 (1998).
169. Goodall, S., Cowther, M., Hemingway, D. M., Bell P. R. & Thompson M. M. Ubiquitous Elevation of Matrix Metalloproteinase 2 Expression in the Vasculature of Patients With Abdominal Aneurysms. *Circulation* **104**, 304–309 (2001).
170. Thompson, R. W. *et al.* Production and localization of 92 kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J. Clin. Invest.* **96**, 318–326 (1995).
171. Gertz, S. D., Kurgan, A. & Eisenberg, D. Aneurysm of the rabbit common carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride in vivo. *J. Clin. Invest.* **81**, 649–656 (1988).

172. Chiou, A. C., Chiu, B. & Pearce, W. H. Murine Aortic Aneurysm Produced by Periarterial Application of Calcium Chloride. *J. Surg. Res.* **99**, 371–376 (2001).
173. Lu, G. *et al.* A novel chronic advanced stage abdominal aortic aneurysm murine model. *J. Vasc. Surg.* **66**, 232-242.e4 (2017).
174. Chung, S. *et al.* Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch. Biochem. Biophys.* **501**, 79–90 (2010).
175. Kaeberlein, M., McVey, M. & Guarente, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* **13**, 2570–2580 (1999).
176. Villalba, J. M. & Alcáín, F. J. Sirtuin activators and inhibitors. *BioFactors* **38**, 349–359 (2012).
177. Kane, A. E. & Sinclair, D. A. Sirtuins and NAD⁺ in the Development and Treatment of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Circ. Res.* **123**, 868–885 (2018).
178. Fry, J. L. *et al.* Vascular Smooth Muscle Sirtuin1 Protect Against Aortic Dissection During AngiotensinII Induced Hypertension. *J. Am. Hear. Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* **4**, e002384 (2015).
179. Chen, H.-Z. *et al.* Age Associated Sirtuin 1 Reduction in Vascular Smooth Muscle Links Vascular Senescence and Inflammation to Abdominal Aortic Aneurysm. *Circ. Res.* **119**, 1076–1088 (2016).
180. Zhou, B., Margariti, A., Zeng, L. & Xu, Q. Role of histone deacetylases in vascular cell homeostasis and arteriosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **90**, 413–420 (2011).
181. Wang, Y. *et al.* Dysregulation of Histone Acetyltransferases and Deacetylases in Cardiovascular Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 1–11 (2014).
182. Gray, S. G. & Ekström, T. J. The Human Histone Deacetylase Family. *Exp. Cell Res.* **262**, 75–83 (2001).
183. Herranz, D. *et al.* Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat. Commun.* **1**, 3 (2010).
184. Haigis, M. C. & Sinclair, D. A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 253–295 (2010).

185. Frye, R. A. Phylogenetic Classification of Prokaryotic and Eukaryotic Sir2-like Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 793–798 (2000).
186. D’Onofrio, N., Servillo, L. & Balestrieri, M. L. SIRT1 and SIRT6 Signaling Pathways in Cardiovascular Disease Protection. *Antioxid. Redox Signal.* **28**, 711–732 (2018).
187. Bao, X. *et al.* Identification of ‘erasers’ for lysine crotonylated histone marks using a chemical proteomics approach. *Elife* **3**, (2014).
188. Huang, J.-Y., Hirschey, M. D., Shimazu, T., Ho, L. & Verdin, E. Mitochondrial sirtuins. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1804**, 1645–1651 (2010).
189. Potente, M. *et al.* {SIRT1} controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev.* **21**, 2644–2658 (2007).
190. Brunet, A. *et al.* Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303**, 2011–2015 (2004).
191. Zeng, H.-T. *et al.* SIRT1 prevents atherosclerosis via liver X receptor and NFκB signaling in a U937 cell model. *Mol. Med. Rep.* **8**, 23–28 (2013).
192. Chen, K., Pittman, R. N. & Popel, A. S. Nitric Oxide in the Vasculature: Where Does It Come From and Where Does It Go A Quantitative Perspective. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1185–1198 (2008).
193. Ota, H. *et al.* Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **43**, 571–579 (2007).
194. Huang, K. *et al.* SIRT1 and FOXO Mediate Contractile Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells under Cyclic Stretch. *Cell. Physiol. Biochem.* **37**, 1817–1829 (2015).
195. Stein, S. *et al.* SIRT1 decreases Lox-1-mediated foam cell formation in atherogenesis. *Eur. Heart J.* **31**, 2301–2309 (2010).
196. Li, L. *et al.* SIRT1 acts as a modulator of neointima formation following vascular injury in mice. *Circ. Res.* **108**, 1180–1189 (2011).
197. Gao, P. *et al.* Overexpression of SIRT1 in vascular smooth muscle cells attenuates angiotensin II-induced vascular remodeling and hypertension in mice. *J. Mol. Med. (Berl)*. **92**, 347–357 (2014).
198. Miyazaki, R. *et al.* SIRT1, a Longevity Gene, Downregulates Angiotensin II Type

- 1 Receptor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 1263–1269 (2008).
199. Zhang, Z. *et al.* Mouse macrophage specific knockout of SIRT1 influences macrophage polarization and promotes angiotensin II induced abdominal aortic aneurysm formation. *J. Genet. Genomics* **45**, 25–32 (2018).
200. Zhang, K., Pan, X., Zheng, J., Liu, Y. & Sun, L. SIRT1 protects against aortic dissection by regulating AP-1/decorin signaling-mediated PDCD4 activation. *Mol. Biol. Rep.* **47**, 2149–2159 (2020).
201. Zhang, J. *et al.* HDAC3 inhibition in diabetic mice may activate Nrf2 preventing diabetes-induced liver damage and FGF21 synthesis and secretion leading to aortic protection. *Am. J. Physiol. Metab.* **315**, E150–E162 (2018).
202. Lee, H.-A. *et al.* Histone deacetylase inhibition ameliorates hypertension and hyperglycemia in a model of Cushing’s syndrome. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **314**, E39–E52 (2018).
203. Zhang, L., Chen, Y., Jiang, Q., Song, W. & Zhang, L. Therapeutic potential of selective histone deacetylase 3 inhibition. *Eur. J. Med. Chem.* **162**, 534–542 (2019).
204. Pons, D. & Jukema, J. W. Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling new targets for therapy in cardiovascular disease. *Netherlands Hear. J.* **16**, 30–32 (2008).
205. Chen, L. Duration of Nuclear NF-kappa B Action Regulated by Reversible Acetylation. *Science.* **293**, 1653–1657 (2001).
206. Zeng, L. *et al.* HDAC3 is crucial in shear and VEGF-induced stem cell differentiation toward endothelial cells. *J. Cell Biol.* **174**, 1059–1069 (2006).
207. Usui, T. *et al.* HDAC4 mediates development of hypertension via vascular inflammation in spontaneous hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **302**, H1894–H1904 (2012).
208. Ryu, Y. *et al.* Class I histone deacetylase inhibitor MS-275 attenuates vasoconstriction and inflammation in angiotensin II-induced hypertension. *PLoS One* **14**, e0213186 (2019).
209. Galán, M. *et al.* Induction of histone deacetylases (HDACs) in human abdominal

- aortic aneurysm: therapeutic potential of HDAC inhibitors. *Dis. Model. Mech.* **9**, 541–552 (2016).
210. Hamaguchi, M. *et al.* DBC2, a candidate for a tumor suppressor gene involved in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13647–13652 (2002).
211. Joshi, P., Quach, O. L., Giguere, S. S. B. & Cristea, I. M. A {Functional} Proteomics Perspective of DBC1 as a Regulator of Transcription. *J. Proteomics Bioinform.* **Suppl 2**, (2013).
212. Anantharaman, V. & Aravind, L. Analysis of DBC1 and its homologs suggests a potential mechanism for regulation of Sirtuin domain deacetylases by NAD metabolites. *Cell Cycle* **7**, 1467–1472 (2008).
213. Li, J. *et al.* A conserved NAD⁺ binding pocket that regulates protein-protein interactions during aging. *Science* **355**, 1312–1317 (2017).
214. Close, P. *et al.* DBIRD complex integrates alternative mRNA splicing with RNA polymerase II transcript elongation. *Nature* **484**, 386–389 (2012).
215. Chen, R. *et al.* Quantitative proteomics reveals that long non-coding RNA MALAT1 interacts with DBC1 to regulate p53 acetylation. *Nucleic Acids Res.* **45**, 9947–9959 (2017).
216. Qin, B. *et al.* DBC1 functions as a tumor suppressor by regulating p53 stability. *Cell Rep.* **10**, 1324–1334 (2015).
217. Escande, C. *et al.* Deleted in breast cancer 1 regulates SIRT1 activity and contributes to high fat diet induced liver steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 545–558 (2010).
218. Li, Z. *et al.* Inhibition of SUV39H1 methyltransferase activity by DBC1. *J. Biol. Chem.* **284**, 10361–10366 (2009).
219. Chini, C.C.S., Escande, C., Nin, V., & Chini, E.N. HDAC3 is negatively regulated by the nuclear protein DBC1. *J Biol Chem.* **285**(52): 40830–40837 (2010).
220. Zhao, W. *et al.* Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* **451**, 587–590 (2008).
221. Kim, J.-E., Chen, J. & Lou, Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* **451**, 583–586 (2008).

222. Hiraïke, H. *et al.* Identification of DBC1 as a transcriptional repressor for BRCA1. *Br. J. Cancer* **102**, 1061–1067 (2010).
223. Fu, J. *et al.* Deleted in Breast Cancer 1, a Novel Androgen Receptor AR Coactivator That Promotes AR DNA-binding Activity. *J. Biol. Chem.* **284**, 6832–6840 (2009).
224. Ji Yu, E. *et al.* Reciprocal roles of DBC1 and SIRT1 in regulating estrogen receptor α activity and co-activator synergy. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6932–6943 (2011).
225. Trauernicht, A. M., Kim, S. J., Kim, N. H. & Boyer, T. G. Modulation of estrogen receptor alpha protein level and survival function by DBC-1. *Mol. Endocrinol.* **21**, 1526–1536 (2007).
226. Chini, C. C. S., Escande, C., Nin, V. & Chini, E. N. DBC1 Deleted in Breast Cancer 1 modulates the stability and function of the nuclear receptor Rev-erba. *Biochem. J.* **451**, 453–461 (2013).
227. Qiang, L. *et al.* Brown Remodeling of White Adipose Tissue by SirT1-Dependent Deacetylation of Ppar γ . *Cell* **150**, 620–632 (2012).
228. Nin, V., Chini, C. C. S., Escande, C., Capellini, V. & Chini, E. N. Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1) Protein Regulates Hepatic Gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* **289**, 5518–5527 (2014).
229. Escande, C. *et al.* Deleted in breast cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype. *Diabetes* **64**, 12–22 (2015).
230. Escande, C. *et al.* Deleted in Breast Cancer 1 regulates cellular senescence during obesity. *Aging Cell* **13**, 951–953 (2014).
231. Roos, W. P., Thomas, A. D. & Kaina, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 20–33 (2016).
232. Kim, W. & Kim, J.-E. Deleted in breast cancer 1 (DBC1) deficiency results in apoptosis of breast cancer cells through impaired responses to UV induced DNA damage. *Cancer Lett.* **333**, 180–186 (2013).
233. Restelli, M. *et al.* A novel crosstalk between CCAR2 and AKT pathway in the regulation of cancer cell proliferation. *Cell Death Dis.* **7**, e2453–e2453 (2016).

234. Yu, E. J. *et al.* Positive regulation of β catenin PROX1 signaling axis by DBC1 in colon cancer progression. *Oncogene* **35**, 3410–3418 (2016).
235. Pangon, L. *et al.* MCC inhibits beta catenin transcriptional activity by sequestering DBC1 in the cytoplasm. *Int. J. Cancer* **136**, 55–64 (2015).
236. Zannini, L., Buscemi, G., Kim, J.-E., Fontanella, E. & Delia, D. DBC1 phosphorylation by ATM/ATR inhibits SIRT1 deacetylase in response to DNA damage. *J. Mol. Cell Biol.* **4**, 294–303 (2012).
237. Murray, R. K., Daryl K. Granner, Mayes, P. A. & Rodwell, V. W. *Harper's Illustrated Biochemistry.* (2003).
238. Feng, M. & DiPetrillo, K. Non-invasive Blood Pressure Measurement in Mice. in 45–55 (2009). doi:10.1007/978-1-60761-247-6_3
239. Carvalho, P. C. *et al.* Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat. Protoc.* **11**, 102–117 (2016).
240. Nilsson, L. M. *et al.* Novel blocker of NFAT activation inhibits IL-6 production in human myometrial arteries and reduces vascular smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C1167--1178 (2007).
241. Browatzki, M. *et al.* Angiotensin II Stimulates Matrix Metalloproteinase Secretion in Human Vascular Smooth Muscle Cells via Nuclear Factor- κ B and Activator Protein 1 in a Redox-Sensitive Manner. *J. Vasc. Res.* **42**, 415–423 (2005).
242. Lavozy, C. *et al.* Angiotensin II Contributes to Renal Fibrosis Independently of Notch Pathway Activation. *PLoS One* **7**, e40490 (2012).
243. Delanghe, J. R. & Speeckaert, M. M. Creatinine determination according to Jaffe--what does it stand for? *Clin. Kidney J.* **4**, 83–86 (2011).
244. Takahashi, N., Boysen, G., Li, F., Li, Y. & Swenberg, J. A. Tandem mass spectrometry measurements of creatinine in mouse plasma and urine for determining glomerular filtration rate. *Kidney Int.* **71**, 266–271 (2007).
245. Manning, M. W., Cassis, L. A., Huang, J., Szilvassy, S. J. & Daugherty, A. Abdominal aortic aneurysms: fresh insights from a novel animal model of the disease. *Vasc. Med.* **7**, 45–54 (2002).
246. Laroumanie, F. *et al.* LNK deficiency promotes acute aortic dissection and rupture. *JCI Insight* **3**, (2018).

247. Trachet, B. *et al.* Dissecting abdominal aortic aneurysm in Ang II infused mice: suprarenal branch ruptures and apparent luminal dilatation. *Cardiovasc. Res.* **105**, 213–222 (2015).
248. Parks, W. C., Pierce, R. A., Lee, K. A. & Mecham, R. P. Elastin. *Adv. in Mol and Cell Biol.* **6**, 133–181 (1993).
249. Daugherty, A., Manning, M. W. & Cassis, L. A. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E deficient mice. *J. Clin. Invest.* **105**, 1605–1612 (2000).
250. Longo, G. M. *et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* **110**, 625–632 (2002).
251. Kobayashi, M. *et al.* Expression of Angiogenesis and Angiogenic Factors in Human Aortic Vascular Disease. *J. Surg. Res.* **106**, 239–245 (2002).
252. Choke, E. *et al.* Vascular endothelial growth factor enhances angiotensin II-induced aneurysm formation in apolipoprotein E deficient mice. *J. Vasc. Surg.* **52**, 159--166.e1 (2010).
253. Cassis, L. A. *et al.* ANG II infusion promotes abdominal aortic aneurysms independent of increased blood pressure in hypercholesterolemic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**, H1660--1665 (2009).
254. Gavrilu, D. *et al.* Vitamin E Inhibits Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Angiotensin II Infused Apolipoprotein E Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1671–1677 (2005).
255. King, V. L., Trivedi, D. B., Gitlin, J. M. & Loftin, C. D. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition With Celecoxib Decreases Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1137–1143 (2006).
256. Longo, G. M., Buda, S. J. & Fiotta, N. MMP-12 has a role in abdominal aortic aneurysms in mice. *J. Vasc. Surg.* **42**, 1037 (2005).
257. Vijaynagar, B., Bown, M. J., Sayers, R. D. & Choke, E. Potential role for anti-angiogenic therapy in abdominal aortic aneurysms. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**, 758–765 (2013).
258. Xu, B. *et al.* Inhibition of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor A) or its

- Receptor Activity Suppresses Experimental Aneurysm Progression in the Aortic Elastase Infusion Model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 1652–1666 (2019).
259. ISHII, T. & ASUWA, N. Collagen and elastin degradation by matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in aortic dissection. *Hum. Pathol.* **31**, 640–646 (2000).
260. Wang, Z., Castresana, M. R. & Newman, W. H. Reactive Oxygen and NFκB in VEGF-Induced Migration of Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 669–674 (2001).
261. Escande, C. *et al.* Deleted in breast cancer 1 regulates SIRT1 activity and contributes to high fat diet-induced liver steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 545–558 (2010).
262. Sung, C. P., Arleth, A. J., Storer, B. L. & Ohlstein, E. H. Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**, 429–437 (1994).
263. Nagata, D. *et al.* AMP-Activated Protein Kinase Inhibits Angiotensin II Stimulated Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Circulation* **110**, 444–451 (2004).
264. Clément, M. *et al.* Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Autophagy in Dissecting Aortic Aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 1149–1159 (2019).
265. López-Candales, A. *et al.* Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am. J. Pathol.* **150**, 993–1007 (1997).
266. Sumida, T. *et al.* Complement C1q induced activation of β catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nat. Commun.* **6**, 6241 (2015).
267. Yuan, J., Luo, K., Liu, T. & Lou, Z. Regulation of SIRT1 activity by genotoxic stress. *Genes Dev.* **26**, 791–796 (2012).
268. Abraham, R. T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* **15**, 2177–2196 (2001).
269. Lin, A. & Karin, M. NFκB in cancer: a marked target. *Semin. Cancer Biol.* **13**, 107–114 (2003).

270. Santos, L. *et al.* A novel form of Deleted in breast cancer 1 (DBC1) lacking the N-terminal domain does not bind SIRT1 and is dynamically regulated in vivo. *Sci. Rep.* **9**, 14381 (2019).
271. Forbes, S. J. & Newsome, P. N. Liver regeneration mechanisms and models to clinical application. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 473–485 (2016).
272. Sundararajan, R., Chen, G., Mukherjee, C. & White, E. Caspase dependent processing activates the proapoptotic activity of deleted in breast cancer 1 during tumor necrosis factor alpha mediated death signaling. *Oncogene* **24**, 4908–4920 (2005).
273. Campanholle, G., Ligresti, G., Gharib, S. A. & Duffield, J. S. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am. J. Physiol. Physiol.* **304**, C591–C603 (2013).
274. Esmon, C. T. Role of coagulation inhibitors in inflammation. *Thromb. Haemost.* **86**, 51–6 (2001).
275. Dunn, S. R., Qi, Z., Bottinger, E. P., Breyer, M. D. & Sharma, K. Utility of endogenous creatinine clearance as a measure of renal function in mice. *Kidney Int.* **65**, 1959–1967 (2004).
276. Thomas, C. & Thomas, L. Renal Failure. *Dtsch. Aerzteblatt Online* (2009). **106**, 849–854.
277. Hartner, A. Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 1999–2004 (2003).
278. Hilgers, K. F. & Mann, J. F. E. Role of Angiotensin II in Glomerular Injury: Lessons from Experimental and Clinical Studies. *Kidney Blood Press. Res.* **19**, 254–262 (1996).
279. Levkoff, L. H. *et al.* Bromodeoxyuridine Inhibits Cancer Cell Proliferation In Vitro and In Vivo. *Neoplasia* **10**, 804-IN13 (2008).
280. Mai, M. *et al.* Early interstitial changes in hypertension-induced renal injury. *Hypertension* **22**, 754–765 (1993).
281. Rastaldi, M. P. *et al.* Epithelial mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int.* **62**, 137–146 (2002).

282. Morigi, M., Perico, L. & Benigni, A. Sirtuins in Renal Health and Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **29**, 1799–1809 (2018).
283. Huang, X.-Z. *et al.* Sirt1 Activation Ameliorates Renal Fibrosis by Inhibiting the TGF β /Smad3 Pathway. *J. Cell. Biochem.* **115**, 996–1005 (2014).
284. Ren, Y. *et al.* CTGF siRNA ameliorates tubular cell apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in obstructed mouse kidneys in a Sirt1-independent manner. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 4155–4171 (2015).
285. Saraff, K., Babamusta, F., Cassis, L. A. & Daugherty, A. Aortic Dissection Precedes Formation of Aneurysms and Atherosclerosis in Angiotensin II-Infused, Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1621–1626 (2003).
286. Deng, G. G. *et al.* Urokinase-Type Plasminogen Activator Plays a Critical Role in Angiotensin II Induced Abdominal Aortic Aneurysm. *Circ. Res.* **92**, 510–517 (2003).
287. Trachet, B. *et al.* Angiotensin II infusion into ApoE^{-/-} mice: a model for aortic dissection rather than abdominal aortic aneurysm *Cardiovasc. Res.* **113**, 1230–1242 (2017).
288. Pyo, R. *et al.* Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase 9 gelatinase B suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* **105**, 1641–1649 (2000).
289. Luo, F., Zhou, X.-L., Li, J.-J. & Hui, R.-T. Inflammatory response is associated with aortic dissection. *Ageing Res. Rev.* **8**, 31–35 (2009).
290. Guan, X., Li, J., Gong, M., Lan, F. & Zhang, H. The hemostatic disturbance in patients with acute aortic dissection. *Medicine (Baltimore)*. **95**, e4710 (2016).
291. Humar, R., Zimmerli, L. & Battegay, E. Angiogenesis and hypertension: an update. *J. Hum. Hypertens.* **23**, 773–782 (2009).
292. Liu, Y. *et al.* Calorie restriction protects against experimental abdominal aortic aneurysms in mice. *J. Exp. Med.* **213**, 2473–2488 (2016).
293. Mercer, J., Figg, N., Stoneman, V., Braganza, D. & Bennett, M. R. Endogenous p53 protects vascular smooth muscle cells from apoptosis and reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Circ. Res.* **96**, 667–674 (2005).

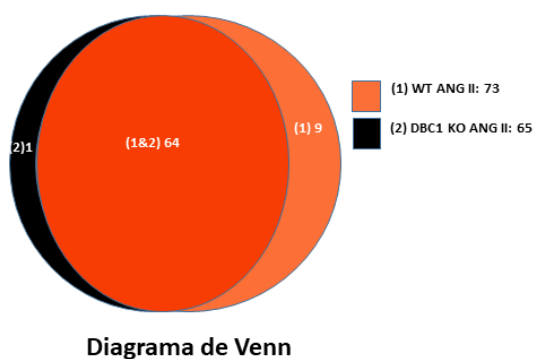
294. Gao, P. *et al.* Caloric Restriction Exacerbates Angiotensin II Induced Abdominal Aortic Aneurysm in the Absence of p53. *Hypertension* **73**, 547–560 (2019).
295. Chen, R. *et al.* Quantitative proteomics reveals that long non-coding RNA MALAT1 interacts with DBC1 to regulate p53 acetylation. *Nucleic Acids Res.* **45**, 9947–9959 (2017).
296. Wu, Z., Trenner, M., Boon, R. A., Spin, J. M. & Maegdefessel, L. Long noncoding RNAs in key cellular processes involved in aortic aneurysms. *Atherosclerosis* **292**, 112–118 (2020).
297. Yoshimoto, R., Mayeda, A., Yoshida, M. & Nakagawa, S. MALAT1 long non-coding RNA in cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1859**, 192–199 (2016).
298. Michalik, K. M. *et al.* Long Noncoding RNA MALAT1 Regulates Endothelial Cell Function and Vessel Growth. *Circ. Res.* **114**, 1389–1397 (2014).
299. Lino Cardenas, C. L. *et al.* An HDAC9-MALAT1-BRG1 complex mediates smooth muscle dysfunction in thoracic aortic aneurysm. *Nat. Commun.* **9**, 1009 (2018).
300. Wu, D., Shen, Y. H., Russell, L., Coselli, J. S. & LeMaire, S. A. Molecular mechanisms of thoracic aortic dissection. *J. Surg. Res.* **184**, 907–924 (2013).
301. Guo, R., Yang, L., Wang, H., Liu, B. & Wang, L. Angiotensin II induces matrix metalloproteinase-9 expression via a nuclear factor kappaB dependent pathway in vascular smooth muscle cells. *Regul. Pept.* **147**, 37–44 (2008).
302. Park, S. H., Riley, P. & Frisch, S. M. Regulation of anoikis by deleted in breast cancer 1 (DBC1) through NF- κ B. *Apoptosis* **18**, 949–962 (2013).
303. Moreno-Navarrete, J. M. *et al.* DBC1 is involved in adipocyte inflammation and is a possible marker of human adipose tissue senescence. *Obesity* **23**, 519–522 (2015).
304. Watson, A. *et al.* Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Smooth Muscle Cells Maintains Genome Integrity, Resists Aortic Medial Degeneration, and Is Suppressed in Human Thoracic Aortic Aneurysm Disease. *Circ. Res.* **120**, 1889–1902 (2017).
305. Mendelsohn, A. R. & Larrick, J. W. The NAD⁺/PARP1/SIRT1 Axis in Aging.

Rejuvenation Res. **20**, 244–247 (2017).

306. Ren, Y. *et al.* The Sirt1 activator, SRT1720, attenuates renal fibrosis by inhibiting CTGF and oxidative stress. *Int. J. Mol. Med.* **39**, 1317–1324 (2017).

ANEXO I. LISTA DE PROTEÍNAS DETECTADAS POR LC/MS EN ORINA DE RATONES WT Y DBC1 KO

Proteínas exclusivas del WT/DBC1 KO ANG II



ID	Replicate count	Total signal	Protein description
P07309	3	26	Transthyretin OS=Mus musculus
P20918	3	18	Plasminogen OS=Mus musculus
P32261	3	14	Antithrombin-III OS=Mus musculus
Q64176	3	12	Carboxylesterase 1E OS=Mus musculus
P07361	3	10	Alpha-1-acid glycoprotein 2 OS=Mus musculus
Q99L44	3	9	Prostasin OS=Mus musculus
Q5BLK4	2	8	Terminal uridylyltransferase 7 OS=Mus musculus
Q3UTR7	3	7	Angiotensin 1-10 OS=Mus musculus
Q91YL3	2	7	Uridine-cytidine kinase-like 1 OS=Mus musculus

ID	Replicate count	Total signal	Protein description
Q3UV17	3	7	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral OS=Mus musculus

La identificación de las proteínas detectadas en las orinas de los animales WT y DBC1 KO tratados con ANG II fue realizado usando el programa de PatternLab y posteriormente se hizo un análisis de fenotipo utilizando el programa webgestalt. Los módulos de diagrama de Venn y TFold del PatternLab se usaron para determinar las proteínas diferenciales entre condiciones biológicas con un nivel de significancia $p < 0.05$.

ANEXO II ARTÍCULOS PUBLICADOS EN EL MARCO DE ESTA TESIS DE DOCTORADO.

A continuación se adjuntan los trabajos que fueron publicados durante el transcurso de este proyecto de doctorado. Los dos primeros artículos están directamente relacionados con esta investigación, mientras que el tercero es producto de una colaboración con otro grupo de trabajo, cuya participación se basó en la puesta a punta de de un modelo de diferenciación *in vitro*.



OPEN

The protein Deleted in Breast Cancer-1 (DBC1) regulates vascular response and formation of aortic dissection during Angiotensin II infusion

Laura Colman¹, Maria Caggiani^{1,4}, Alejandro Leyva^{2,3}, Mariana Bresque¹, Sally Liechocki⁶, Clarissa M. Maya-Monteiro⁶, Daniel Mazal⁵, Carlos Batthyany², Aldo Calliari^{1,7}, Paola Contreras^{1,4} & Carlos Escande¹✉

Cardiovascular diseases are among the main causes of morbimortality in the adult population. Among them, hypertension is a leading cause for stroke, heart disease and kidney failure. Also, as a result of arterial wall weakness, hypertension can lead to the development of dissecting aortic aneurysms, a rare but often fatal condition if not readily treated. In this work, we investigated the role of DBC1 in the regulation of vascular function in an ANGII-induced hypertension mouse model. We found that WT and DBC1 KO mice developed hypertension in response to ANGII infusion. However, DBC1 KO mice showed increased susceptibility to develop aortic dissections. The effect was accompanied by upregulation of vascular remodeling factors, including MMP9 and also VEGF. Consistent with this, we found decreased collagen deposition and elastic fiber fragmentation, suggesting that increased expression of MMPs in DBC1 KO mice weakens the arterial wall, promoting the formation of aortic dissections during treatment with ANGII. Finally, DBC1 KO mice had reduced cell proliferation in the intima-media layer in response to ANGII, paralleled with an impairment to increase wall thickness in response to hypertension. Furthermore, VSMC purified from DBC1 KO mice showed impaired capacity to leave quiescence, confirming the *in vivo* results. Altogether, our results show for the first time that DBC1 regulates vascular response and function during hypertension and protects against vascular injury. This work also brings novel insights into the molecular mechanisms of the development of aortic dissections.

Metabolic and aging diseases have become a main health concern worldwide. The increase in life expectancy, together with changes in lifestyle, mainly sedentarism, obesity and smoking have led to a dramatic increase in chronic non-infectious diseases, such as cardiovascular diseases (i.e. atherosclerosis, hypertension). Altogether, these diseases constitute the main causes of morbimortality worldwide¹. Sustained hypertension can lead to heart attack and stroke, kidney failure, aortic dissections and aneurysms¹⁻³. In this regard, Angiotensin-II (ANGII), one of the key mediators of the renin-angiotensin system (RAS), is known to play a crucial role in the development of hypertension. ANGII, acting mainly through AT1 receptor, promotes a variety of cellular responses, including hypertrophy, fibrosis, reactive oxygen species (ROS) production and tissue remodeling⁴.

¹Laboratory of Metabolic Diseases and Aging, INDICyO Program, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay. ²Laboratory of Vascular Biology and Rational Drug Design, INDICyO Program, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay. ³Analytical Biochemistry and Proteomics Unit, Institut Pasteur Montevideo and Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. ⁴Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay. ⁵Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de la República (UdelaR) and C.H Pereira Rossell, Montevideo, Uruguay. ⁶Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. ⁷Departamento de Biociencias, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay. ✉e-mail: escande@pasteur.edu.uy

Animal models have proved to be extremely useful for understanding the pathogenesis of hypertension. There are several animal models available to study vascular and renal hypertension and they all have their advantages and limitations in terms of recapitulating the human disease⁵. ANGII-mediated hypertension in mice by subcutaneous administration is by far the most widely used animal model for primary hypertension, accounting for nearly 50% of NIH-funded hypertension research⁵. This model has several distinctive advantages. First, it is possible to study the direct effect of ANGII on the vascular system. Second, it is useful to gain comprehensive insights into the molecular mechanisms of the RAS. Third, it is a very strong model in terms of reproducibility among species⁵. Also, animal models of ANGII-infusion are the best characterized and most widely used models of abdominal aortic aneurysms (AAA) or aortic dissections (AD)^{6–12}.

In the vascular system, ANGII-mediated hypertension leads to remodeling of the arterial wall in order to cope with increased blood pressure. These changes involve, among others, extracellular matrix remodeling and increase in wall thickness. The latter is mainly caused due to proliferation and hypertrophy of vascular smooth muscle cells (VSMC)¹³. Alterations in normal vessel remodeling during hypertension can lead to abnormal and life-threatening responses. One of them is the generation of aortic dissection (AD), a condition in which patients are highly vulnerable to life-threatening complications and death, particularly when the ascending aorta is involved. In humans, AD pathogenesis is mostly associated with a tear of the arterial wall, where blood dissects in intima-media, creating a “false lumen”. Based on their localization, the Stanford classification differentiates between type A and B aortic dissections. A-type dissections occur in the ascending aorta, while B-type ones localize in the descending portion of the aorta. AD is often fatal within the first hours to days after the onset (acute stage). Alternatively, it may evolve to a subacute stage (months since onset) and then to a chronic stage. The diversion of blood flow into the false lumen can cause hemodynamic alterations leading to ischemia, malperfusion, aortic valve insufficiency and tamponade (compression of the heart). These can lead to sudden aortic rupture, circulatory failure and death in the majority of patients without timely treatment^{3,14,15}.

It is important to notice that several lesions described previously as AAA, mainly in the model of ApoE-/- mice treated with ANGII, have been recently called into question as models of AD rather than AAA^{11,12}. Despite reproducing several of the pathological features of human AAA such as elastin degradation, formation of intramural hematoma, aortic dissection, macrophage infiltration or thrombus formation, the ANGII-infused model of aneurysm in mice seems triggered by different pathological mechanisms^{11,12}. The most consistent lesion associated to ANGII-infusion models are the micro-ruptures of the vasa vasorum in the boundary of the tunica media with the adventitia, accompanied by a false channel formation with varying degrees of severity, and in some cases a lesion characterized by a dissected adventitia and an intramural hematoma (IMH). We therefore described these lesions as AD, a term that is currently used by other researchers^{11,12}. Notably this pathogenic mechanism differs from the ones described for most of the AD seen in humans, where aortic dissection is characterized by development of an intimal flap caused by blood flowing into the media and forcing the intima and the adventitia apart (communicating AD). This intimal flap separates the true lumen (the normal pathway of blood flow in the aorta) from a false lumen. It is worth noting, bleeding of the vasa vasorum with formation of IMH may evolve into non-communicating AD in 30–40% of patients with IMH^{16,17}.

Genetics, family history, age and gender, atherosclerosis and hypertension predispose to their development and progression¹⁴. Importantly, the molecular mechanisms that operate in the development of AD are still not completely elucidated. Several studies have shown that dysregulation of Matrix Metalloproteinases (MMPs), as well as angiogenic factors like VEGF¹¹, contribute to the development of AD¹⁸. In particular, MMP-9 has been shown to play an important role in this condition¹⁸. Considering that mice models of ANGII recapitulate AD, also, MMP12 seems to be involved in the AD progression⁹. In addition, it has been reported that MMP-9 and MMP-2 knockout mice were resistant to develop such lesions⁸. However, it is unclear which are the molecular pathways controlling MMPs and angiogenic factors expression during hypertension and how they lead to the formation of AD.

Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1; also known as CCAR2) is a nuclear protein that has many different functions in the regulation of metabolism¹⁹. DBC1 binds and regulates the biological activity of several transcription factors and epigenetic regulators, including SIRT1^{20–22}, HDAC3²³, p53²⁴, BRCA1²⁵, AR²⁶, ER^{27,28}, Rev-erb-alpha²⁹ and PARP1³⁰, among others.

Many lines of research support that DBC1 is involved in the control of metabolism and metabolic diseases^{19,22,31–34}. We also showed that DBC1 KO mice have increased SIRT1 activity *in vivo* in liver and they are protected against non-alcoholic fatty liver disease²². In regards to cardiovascular diseases, we previously showed that DBC1 KO mice are protected against high-fat diet induced atherosclerosis³⁵. However, our findings proved that protection against atherosclerosis was a consequence of increased lipid storage capacity in fat tissue rather than a local effect in blood vessels. Currently, there is no knowledge about the role of DBC1 in cardiovascular function.

In this work, we investigated the role of DBC1 in the regulation of vascular structure using a mouse model induced by ANGII infusion and hypertension. Both WT and DBC1 KO mice developed hypertension to a similar extent. However, we found a higher incidence of AD in DBC1 KO mice in response to ANGII infusion. Absence of DBC1 led to up-regulation of MMPs *in vivo* and *in vitro* in VSMC, including MMP9, which has been linked to the development of AD. These changes were accompanied by decreased collagen levels and elastin fibers fragmentation, suggesting that DBC1 regulates extracellular matrix dynamics during hypertension. Finally, we also found that DBC1 KO mice failed to augment wall thickness in response to ANGII treatment, which was accompanied by decreased VSMC proliferation *in vivo* and *in vitro*. Altogether, our results constitute the first *in vivo* evidence that DBC1 is implicated in the tissue remodeling in response to ANGII, and also brings novel insights into the molecular mechanisms that regulate the development and progression of aortic dissections.

Materials and Methods

General reagents and antibodies. All general reagents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, including angiotensin II (ANGII, A9525), unless otherwise specified. Lipofectamine RNAiMax, Bradford protein assay reagent, Trizol and SuperScript II RT were bought from Invitrogen. SiRNAs oligos were purchased from Ambion (Negative Control 4390843; HDAC3 4390771) or Invitrogen (DBC1 MSS211964 and SIRT1 MSS234959). Antibodies were purchased from Bethyl (anti DBC1, 434 A), Abcam (anti tubulin 7291, anti BrdU 6326, anti KI67 16667), or Cell Signaling (anti Cyclin D1 9262, anti PCNA 92552). DNase I and Fast SYBR Green were purchased from Roche.

Animal handling and experiments. All mice used in this study were maintained at the Institut Pasteur de Montevideo Animal facility (UATE). The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Institut Pasteur de Montevideo (CEUA, Protocol number 014–14). All the studies described were performed according to the methods approved in the protocol and following all international guidelines and legal regulations. WT and whole-body DBC1 KO mice were in a C57BL/6J pure background. DBC1 KO mice were backcrossed into C57BL/6J for more than 10 generations in order to ensure genetic purity. Mice received standard chow and water *ad libitum*.

Angiotensin II treatment in mice. Alzet mini-osmotic pumps (model 2004, 28 days delivery) were subcutaneously implanted in mice under isoflurane anesthesia. Prior to the implant, pumps were filled either with ANGI (1 mg/kg/day) or vehicle (NaCl 0.9%) and left for 7 and 28 days. All the results are representative of at least 3 independent experiments. Each group contained at least 5 mice per group. A total of 101 mice were infused with either ANGI or vehicle (50 WT and 51 DBC1 KO).

Blood pressure measurements. Blood pressure (BP) in mice was measured by a non-invasive CODA system (HT 4, version 1.06; CODA PCS40 software, version 4.1; Kent Scientific), using a Volume Pressure Recording (VPR) sensor. This methodology consists of a cuff placed on the tail to occlude the blood flow. Upon deflation, the VPR sensor uses a specially designed differential pressure transducer to measure the blood volume in the tail. Before recording, animals were allowed to acclimate (1 h at 30 °C). BP was registered in the afternoon, twice a week for two consecutive days during 6 weeks (2 weeks before the pumps implantation and during the 4 weeks of treatment). BP values for each week correspond to the mean value of both days (15 recordings per session). When Systolic BP values were obtained with a tail blood volume below 15 μ l they were discarded.

Metabolic cages. Mice were placed in individual metabolic cages for 48 h at the fourth week of treatment. The first day was for acclimatization and the following 24 h were the ones considered for the analysis of urine and water intake. Urine production was measured and centrifuged and the supernatant was frozen for subsequent procedures.

In vivo Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation. 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) was injected into mice (100 mg/kg, IP, single dose) at the first, second and third week of treatment. At the first or fourth week, mice were sacrificed and a segment of descending thoracic aorta was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 24 h for immunohistochemistry.

BrdU Immunohistochemistry. Aortic sections were obtained from paraffin-embedded tissue and BrdU immunolabel were performed according to standard procedure. The paraffin sections (5 μ m) were deparaffinized and rehydrated, incubated with 2% H₂O₂ for 20 minutes to block non-specific peroxidase signals. Briefly, samples were incubated with 2 M HCl for 15 minutes at 37 °C, blocked with 2% BSA-0.03% Triton x-100 during 1 h, incubated with BrdU antibody and revealed using an anti-rat -HRP-diaminobenzidine. Hematoxylin was used as counterstaining.

Tissue isolation and AD diagnosis. Mice were anesthetized with intraperitoneal ketamine and xylazine (180 and 24 mg/kg, respectively). Depth of anesthesia was assessed by toe-pinch procedure and absence of muscular tone. Aortas were isolated after the first or fourth week of ANGI infusion, and either frozen in liquid nitrogen for subsequent molecular biology methods or fixed in 4% PFA. The presence of AD was evidenced *in situ* by macroscopic analysis of the whole aorta (ascending and descending). Once identified, AD was diagnosed under stereoscopic microscopy, as a blood clot surrounded by greatly expanded adventitial tissue and neovasculation on the outer surface, that made the artery difficult to remove. In all cases, the nature of the lesion was confirmed by histological analysis. Aorta scheme is illustrated to show different portions used for analysis (Supplementary methods). A portion of thoracic aorta was used to immunohistochemistry and staining techniques: Hematoxylin & Eosin (H&E) and Verhoeff (VF). In the cases when AD was observed macroscopically, tissue was processed to histological analysis stained with H&E and VF. Finally, a section of abdominal aorta below AD was used for molecular biology processing.

Cell culture. Vascular smooth muscle cells (VSMCs) were obtained by outgrowth from abdominal aorta explants from WT or DBC1 KO male mice as previously described by others³⁶. VSMCs were cultured in full medium containing DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mmol/L glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin. Cells were cultured in a water-jacketed incubator at 37 °C and 5% CO₂.

Transfection procedure. For siRNA experiments, cells were plated in six well plates in medium used for VSMCs. When cultures reached 80% confluence, cells were transfected with 30 nM siRNA oligos (non-targeting

Gene target	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
DBC1	CTGTGCCAACAGAAAGCCAC	GAGACAGGTTGACACAGCGA
Metalloproteinase 2	ACCTGAACACTTTCTATGGCTG	CTTCCGCATGGTCTCGATG
Metalloproteinase 9	GCAGAGGCATACTTGTACCG	TGATGTTATGATGGTCCCCTTG
Metalloproteinase 12	GCTGTCACAACAGTGGGAGA	ATGCTCCTGGGATAGTGTGG
VEGF-A	CAGGCTGCTGTAACGATGAA	TTTGACCCTTCCCTTTCCT
β -Actin	AGCCATGTACGTAGCCATCC	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA
SIRT1	ATGACGCTGTGGCAGATTGTT	CCGCAAGGCGAGCATAGAT
HDAC3	ATGCCTTCAACGTGGGTGAT	AGAAGCCAGAGGCCTCAAAT

Table 1. List of primers used for qPCR.

negative control, DBC1, HDAC3 and SIRT1 using 25 pmol Lipofectamine RNAiMax. After 24 h post transfection this procedure was repeated. Cells were harvested 72 h after the first transfection.

Western Blotting. Cells or tissues (50–100 mg tissue) were lysed using NETN buffer (25 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP40) or RIPA buffer (25 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS), respectively. Protein concentrations were determined using the Bradford protein assay reagent. Proteins were separated in SDS-PAGE gels and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes, which were then blocked in Tris-buffered saline containing 0.2% Tween 20 and 5% nonfat milk. Membranes were then incubated overnight with anti DBC1, Cyclin D1, PCNA, P27 or tubulin. After that, secondary antibodies were incubated 1 h, washed and detected using chemiluminescence. Densitometry of bands was analyzed using Image J.

Histological Evaluation of tissues. Paraffin sections (5 μ m) were stained with H&E, Picrosirius red (PIC) for collagen and Verhoeff (VF) for elastic fibers stain. The specimens were observed under a light microscope (40 \times , 200 \times , 400 \times magnification). In order to measure the wall thickness of the aortic rings, we used a custom designed plugin for Image J. The procedure starts by clicking in the center of the aorta lumen. Then, 4 lines passing at that point are drawn, marking the aorta wall at 8 different places. Those are the 8 places where the wall is measured by clicking at the intima and at the outer limit of the media without considering the adventitia layer. The wall thickness is automatically obtained as the average of those 8 measurements. Collagen deposition was evaluated in intima-media aortic ring using the Wake Segmentation plugin from Image J, reporting results as area (%) occupied by collagen.

Cell proliferation. VSMCs were counted, plated in 10 cm plate and cultured to 60% confluence. After that, FBS was removed for 48 h to induce cellular quiescence. Later, FBS was restored and cells collected at different time points. Total viable cells were selected by propidium iodide exclusion and counted by flow cytometry using BD Accuri C6 cytometer. Cell proliferation state under described experimental conditions was further confirmed by quantification of Ki67-positive cells, using immunofluorescence.

ANGII Treatment of VSMC. Cells were grown until 90% confluence and then incubated with 0.1% FBS for 48 h. After that, cells were treated with 100 nm ANGII (or vehicle) for 12 h as previously described by others³⁷.

RNA Isolation and qPCR. Cells and tissues, were homogenized in Trizol for RNA extraction according to manufacturer's protocol. DNase I treatment was used to eliminate genomic DNA contamination. Reverse transcription was done using SuperScript II RT and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed using Fast SYBR Green Mix. Relative quantification of changes in gene expression were expressed in relation to a housekeeping gene. Expression was calculated as fold increase with respect to control condition. Primers containing the following sequences were synthesized by Integrated DNA Technology (IDT) and listed in Table 1.

Statistical analysis. Results are expressed as mean \pm SEM unless otherwise specified. Shapiro Wilk Analysis were performed to confirm normal distributions. Unpaired t-test was used to compare two independent groups. In multiple comparisons, analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test, $P < 0.05$ was considered to be significant. Mann-Whitney U test was used to compare two independent samples (groups) in cases where sample distribution was not normal. For comparisons of proportions, Fisher's exact test was used.

Results

ANGII promotes hypertension to a similar extent in WT and DBC1 KO mice. In order to investigate the role of DBC1 on vascular function, we used the model of ANGII-induced vascular hypertension. WT and DBC1 KO mice were exposed to subcutaneous infusion of ANGII (1 mg/kg/day) for 4 weeks. Under these conditions, we found that both WT and DBC1 KO mice developed hypertension in a similar manner (140 mm Hg, measured by systolic blood pressure, Fig. 1A). We also measured body weight (Fig. 1B), diuresis (Fig. 1C), and water intake (Fig. 1D). In all groups ANGII had a significant effect in all these parameters and there was no difference between WT and DBC1 KO mice. ANGII treatment also induced cardiac hypertrophy both in WT and DBC1 KO mice; however, DBC1 KO mice were partially protected against hypertrophy (Fig. 1E).

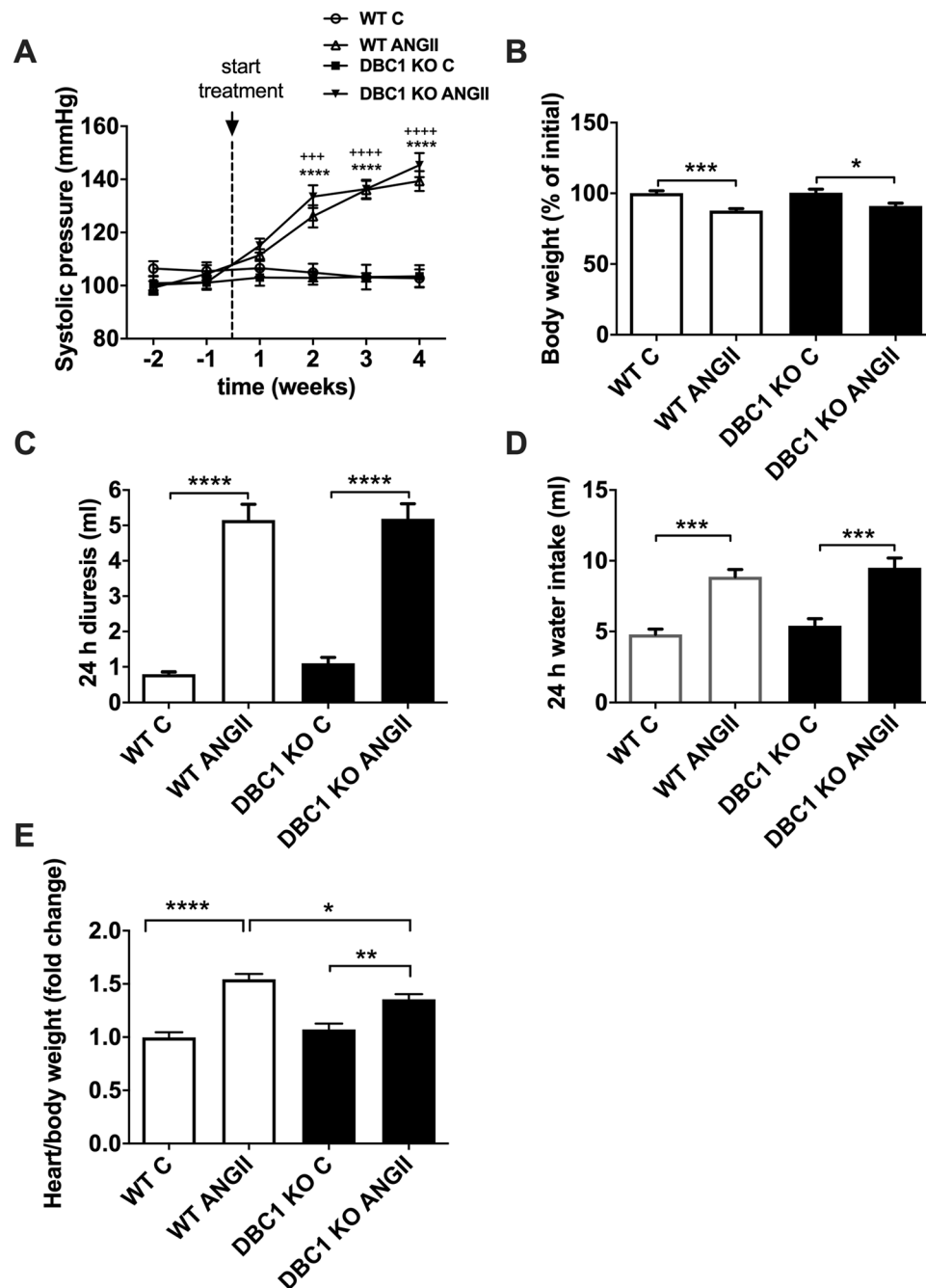


Figure 1. ANGII induces arterial hypertension in WT and DBC1 KO mice (A) Systolic blood pressure measured in WT and DBC1 KO mice treated with 1 mg/kg/day ANGII infusion or vehicle (C, control group). (B) Body weight measured in WT and DBC1 KO mice treated with ANGII or vehicle (C, control group). Mice treated with ANGII lost weight during the treatment while their littermate controls treated with vehicle did not. Diuresis (C) and Water intake (D) measured after 4 weeks treatment increased in WT and DBC1 KO mice treated with ANGII. (E) Hearts weights from WT and DBC1 KO treated with ANGII were measured after treatment. WT and DBC1 KO hearts treated with ANGII were heavier than those from control mice. Two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test were done for comparisons between ANGII and control groups in (A). Three or four symbols at week comparisons mean $P < 0.001$ or 0.0001 , respectively (* for WT and + for DBC1 KO). In (B–E) *, **, *** and **** mean $P < 0.05$, 0.01 , 0.001 and 0.0001 , respectively. One-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test were done for comparisons between experimental groups ($n = 7–10$).

DBC1 KO mice show increased incidence of aortic dissections (AD) in response to ANGII infusion.

When we performed post-mortem analysis of vascular injury in aortas, we found that the DBC1 KO mice showed increased susceptibility to the development of AD (Fig. 2A–D and Supplementary Fig. 1). The presence of AD evidenced after ANGII treatment was detected by macroscopic analysis in the descending aorta (Fig. 2A). In most

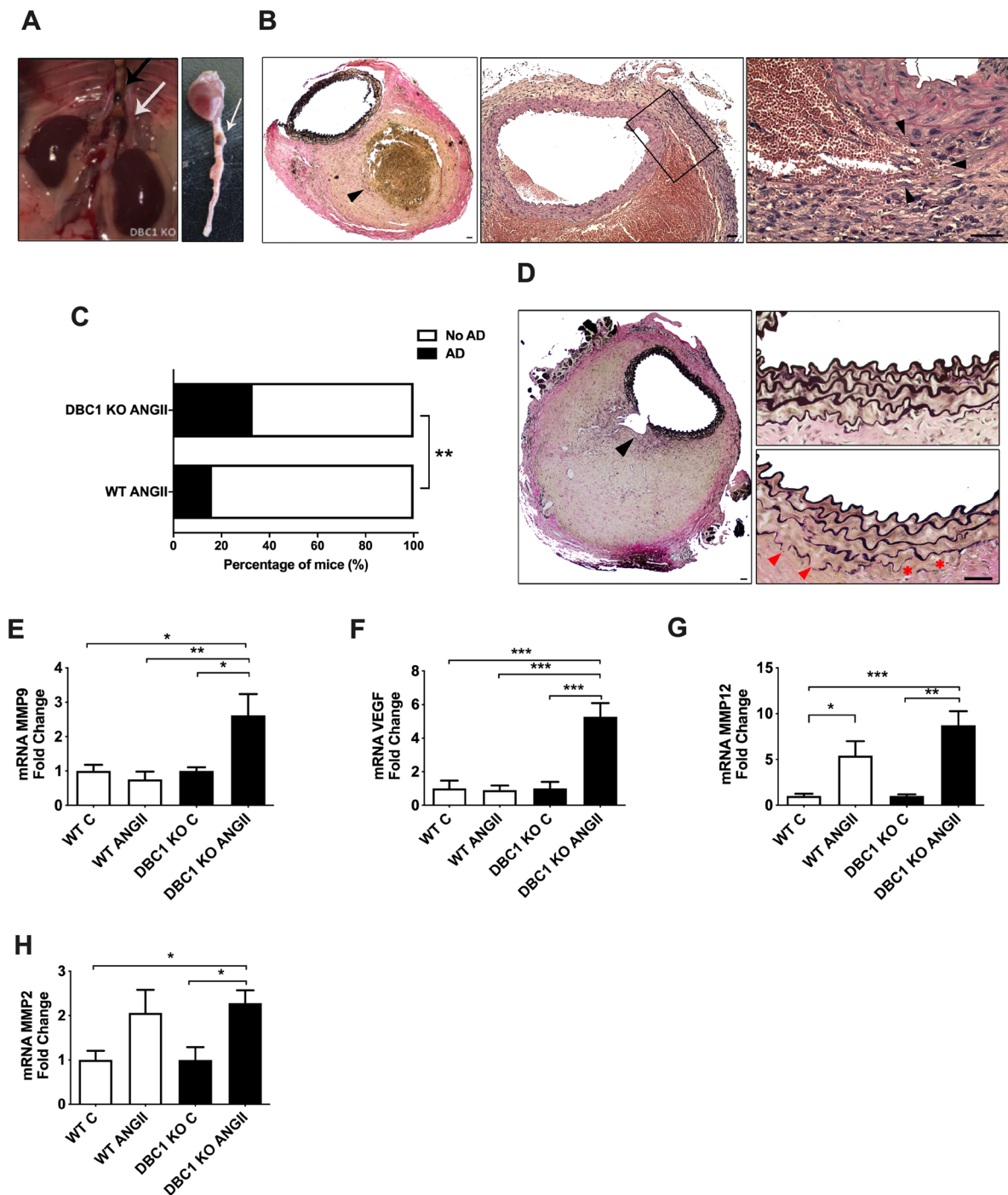


Figure 2. Absence of DBC1 increases the incidence of aortic dissection (AD) in response to ANGII. (A–B) Macroscopic and histological characterization of AD. (A) *In situ* descending aorta and isolated heart with aorta. Arrows show examples of AD. A case of a secondary thoracic AD identified in DBC1 KO mouse is also shown (black arrow, left panel). (B) Histological analysis of intra mural hematoma (IMH) leading to an AD. Left, panoramic representative of IMH. Verhoeff staining of the cross section of the aorta is shown. Black arrowhead indicates the thrombus. Center and right, H&E staining of the cross section of the aorta is shown. Right image shows a higher magnification of the center image, highlighting the dissected adventitia and an intramural space filled with blood. Note the presence of intact erythrocytes at the periphery of the hematoma. Arrowheads indicate a point to tearing of the intima media. Scale bar: 40 μ m. (C) Incidence of AD in WT and DBC1 KO mice treated with ANG II (n = 37 and 36, WT and DBC1 KO mice, respectively). Fisher's exact test was used to compare groups. (D) Representative Verhoeff staining of AD. Black and red arrowheads indicate intima media wall disruption (plausible a late effect consequence of IMH expansion) and ruptured elastic fibers, respectively. Scale bar: 40 and 500 μ m, left and right panel, respectively. (E–H) mRNA expression of MMP9, VEGF, MMP12 and MMP2 in WT and DBC1 KO mice aortas after 4 weeks of treatment with ANGII or vehicle (C). One-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test for multiple comparisons were done. *, ** and *** means $P < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively (n = 8 per group).

cases, AD developed in the abdominal portion of the aorta, close to the renal arteries (Fig. 2A, left, white arrow). In some rare cases, a second lesion was observed in the descending thoracic aorta (Fig. 2A, left, black arrow). No lesions were detected in the ascending portion of the aorta. Histological analysis of the tissue confirmed the nature of the lesions. Consistent with previous reports, we found evidence of micro-ruptures in the boundary of the tunica media with the adventitia, such as presence of extravasated erythrocytes (Supplementary Fig. 2), occurring mostly in close proximity to the orifice of side arterial branches of abdominal aorta. More important, collections of extravasated red cells, suggestive of a false channel formation were also present. In most severe cases we observed a lesion characterized by a dissected adventitia and an intramural space filled with coagulated blood, without apparent increase of the aortic lumen diameter (Fig. 2B). In some cases, the margins of the thrombus penetrated into the adventitia and periaortic adipose tissue. As the IMH start to remodel, the space become filled of fibrin with only a small layer of still intact erythrocytes at the periphery. In more older lesions, no red blood cells were visible as they were replaced by spindle cells, granulation tissue and collagen deposition. To our knowledge, these pathological findings are compatible with virtually all existing literature on the abdominal lesions of ANG II-infused ApoE^{-/-} mice. When the mice were examined after 4 weeks of ANGII treatment, WT mice showed a scarce incidence of such lesions (15% of the mice treated with ANGII). However, nearly 40% of the DBC1 KO mice developed AD in response to ANGII infusion (Fig. 2C). Interestingly, DBC1 KO mice showed higher incidence of AD as early as 1 week after the onset of ANGII infusion (Supplementary Fig. 1), when blood pressure was beginning to rise (Fig. 1A). When ANGII dose was lowered from 1 mg/kg/day to 0.6 mg/kg/day, WT mice did not develop AD, but DBC1 KO mice still had around 20% of AD incidence (Supplementary Fig. 1). No spontaneous ADs were detected either in WT or DBC1 KO mice in control conditions.

In some cases a partial intima-media layer break that resulted in marked dilation of the lumen was observed. This was accompanied by an interruption in the continuity of the elastic fibers (Fig. 2D, left panel). Also, we observed intermediate stages of extracellular matrix re arrangements characterized by weakening and partial breakdown of elastic fibers localized mainly in close proximity to intramural hematoma (arrowheads, Fig. 2D, right panel).

It is well known that alteration of the dynamics of the extracellular matrix, including changes in the expression of several matrix MMPs as well as pro-angiogenic factors are involved in the development of AD^{8–10,38,39}. Moreover, MMP9 a protein that has been shown to degrade elastic fibers⁴⁰, and proposed biomarker of AD in patients¹⁸ was differentially up-regulated in the aortas from DBC1 KO mice treated with ANGII (Fig. 2E). This difference was also seen when mice were treated with ANGII for only one week (Supplementary Fig. 1). In order to rule out that elevation of MMP9 expression in DBC1 KO mice was a consequence of AD rather than a causative effect, we analyzed its expression in those treated with ANGII that did not develop AD. In these mice, MMP9 expression was increased in DBC1 KO mice compared to WT, although for both genotypes there was a further increase when AD was present (Supplementary Fig. 2). Furthermore, when we analyzed MMP9 expression in the descending thoracic aorta, we also found increased expression of MMP9 in DBC1 KO mice treated with ANGII (Supplementary Fig. 2). Also, VEGF, a pro-angiogenic factor that has been linked to the development of AD (reported originally as AAA)⁴¹ was also significantly increased in the aortas from DBC1 KO mice treated with ANGII compared to WT mice (Fig. 2F). The expression of MMP12 and MMP2 was also increased in response to ANGII, but there was no significant difference between WT and DBC1 KO mice (Fig. 2G,H, respectively).

Down-regulation of DBC1 in vascular smooth muscle cells *in vitro* recapitulates the *in vivo* effects. In order to determine if changes in the expression of MMPs and angiogenic factors were a direct consequence of DBC1 down-regulation, we purified and cultured abdominal VSMC from WT and DBC1 KO mice. Purity of cells was confirmed by alpha-actin expression (Fig. 3A). DBC1 expression in WT VSMC was confirmed by western blot (Fig. 3B). Similar to what happened *in vivo*, we found that cells purified from DBC1 KO mice had increased expression of MMP9, MMP2 and MMP12 (Supplementary Fig. 3). Also, treatment of WT cells with ANGII *in vitro* promoted an increase in MMP9 expression to a similar extent of DBC1 KO cells in basal conditions. In DBC1 KO cells ANGII treatment did not further increase MMP9 expression, suggesting that in these cells MMP9 expression was constitutively up-regulated (Fig. 3C). Moreover, in the case of MMP12, ANGII promoted a further increase in DBC1 KO cells (Fig. 3D). To further confirm our results, we knocked-down DBC1 by siRNA in WT VSMC (Supplementary Fig. 3). We found that knock-down of DBC1 promoted the up-regulation of VEGF, MMP9, MMP12, and MMP2, further supporting the results obtained *in vivo* and *in vitro* comparing WT and DBC1 KO. We also analyzed if SIRT1 or HDAC3, two of the main targets of DBC1^{22,23} were involved in this regulation. Neither SIRT1 nor HDAC3 downregulation by siRNA affected the DBC1-dependent response on MMPs expression, suggesting that DBC1 is being targeted through a different molecular pathway (Supplementary Fig. 3).

DBC1 KO mice show decreased collagen deposition and impaired arterial wall thickening in response to ANGII treatment. MMP9 degrades not only elastic fibers but also collagen fibers in the arterial wall⁴⁰. Since decreased collagen deposition has also been linked to weakening of the arterial wall and increased susceptibility to AD¹⁸, we also measured collagen content in the arterial wall in WT and DBC1 KO mice. Consistent with the increased MMP9 expression, we found decreased collagen deposition in the intima-media layer in the DBC1 KO mice in response to ANGII (Fig. 4A,B and Supplementary Fig. 1). Consistently, we also observed a clear difference in the thickness of the intima media between WT and DBC1 KO mice after the treatment with ANGII (Fig. 4C). One of the main responses to hypertension is the cellular proliferation of the intima-media cells, mainly VSMC, with a consequent thickening of the arterial wall^{42–45}. Interestingly, it has been shown that in patients with AD, the thickness of the intima-media layer is reduced compared to control subjects^{14,46} and that VSMC proliferation capacity is involved in the pathogenesis of aortic aneurysms and AD^{46,47}. Recently, we showed that deletion of DBC1 delays cell cycle progression in previously quiescent cells, both *in vitro*

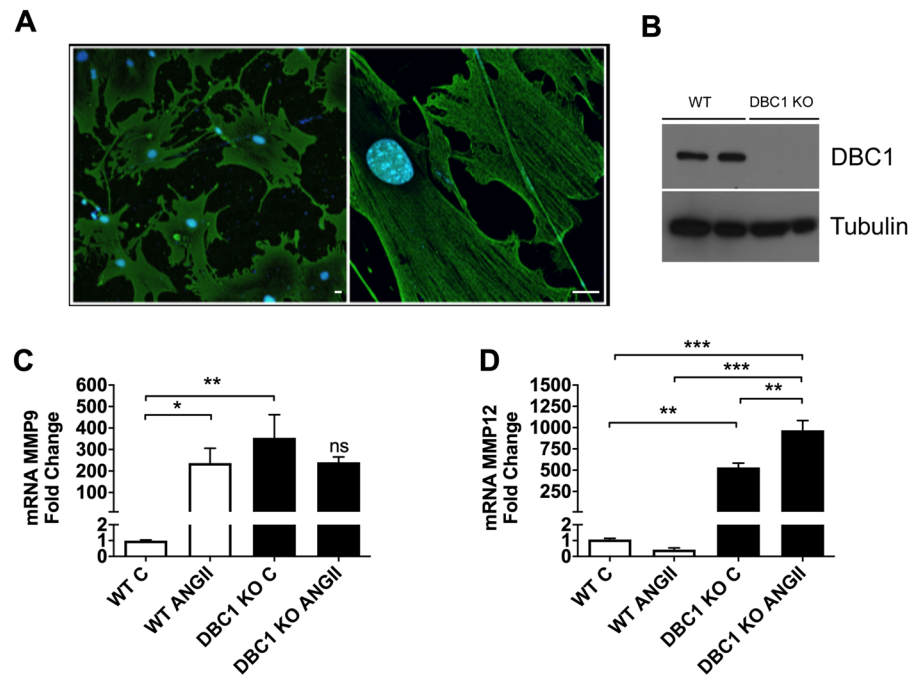


Figure 3. Downregulation of DBC1 in Vascular Smooth Muscle Cells (VSMC), increases the expression of aortic dissection (AD) markers. (A) Immunofluorescence image of VSMC purified and cultured from abdominal aorta using alpha-actin antibody (green), marker of VSMC. Left, panoramic view (100 \times) showing purity of the culture. Right, high magnification (630 \times) showing alpha-actin filaments in VSMC. Scale bar: 15 μ m. (B) Representative western blot for DBC1 expression in proliferating VSMC purified from WT and DBC1 KO mice. (C,D) mRNA expression of MMP9 and MMP12 in WT and DBC1 KO VSMC, treated with vehicle (C) or 100 nM ANGII for 12 h. The results are shown as the mean \pm SEM from at least 3 independent experiments. One-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test for multiple comparisons was done. *, ** and *** means $P < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively.

and *in vivo*⁴⁸. In order to evaluate VSMC proliferation capacity, we measured BrdU incorporation after 1 week of ANGII treatment where it has been shown that VSMC can already be proliferating during hypertension⁴⁹ and also when AD incidence was already higher in DBC1 KO mice (Supplementary Fig. 1). We found that proliferation was not different between WT and DBC1 KO mice at that time, which was coincidental with no changes in wall thickness among genotypes (Supplementary Fig. 1). However, when we measured BrdU incorporation later (at weeks 2–3), we found that DBC1 KO mice showed significantly less BrdU positive cells in the intima-media layer than WT mice (Fig. 4D–E). This suggests that failure to regain cell cycle in quiescent VSMC contributes to artery wall weakness during hypertension, although it may not be directly involved in the development of AD.

Vascular smooth muscle cells from DBC1 KO mice fail to proliferate *in vitro*. As mentioned above, we recently showed that deletion of DBC1 delays cell cycle progression in cells that leave quiescence, both *in vitro* using Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) and *in vivo* in a model of liver regeneration⁴⁸. In order to evaluate if failure to leave quiescence could explain decreased *in vivo* proliferation of VSMC, we cultured VSMC from WT and DBC1 KO mice and measured cell cycle progression. WT and DBC1 KO VSMC were synchronized into quiescence by serum deprivation⁴⁸ and later allowed to re-enter cell cycle by restoring normal serum. Serum restoration in WT cells was accompanied by up-regulation of the proliferation marker Ki67 (Fig. 5A). However, DBC1 KO cells showed no positive cells, even after 72 h of incubation (Fig. 5A). Also, serum deprivation of WT VSMC led to the appearance of DN-DBC1, a novel form of DBC1 present in quiescent cells⁴⁸ (Fig. 5B). DN-DBC1 was rapidly downregulated after serum restoration. This was accompanied by a time-dependent increase of Cyclin D1 and PCNA expression, markers of cell cycle progression (Fig. 5B,C). On the other hand, VSMC cultured from DBC1 KO mice failed to up-regulate any of these cell cycle progression markers (Fig. 5B,C). We measured cell number under the same conditions by flow cytometry and found that while WT VSMC duplicated its population 72 h after serum restoration, DBC1 KO VSMC completely failed to proliferate (Fig. 5D), supporting the results obtained *in vivo*.

Discussion

In this study we show for the first time, that DBC1 is directly involved in the regulation of vascular function. Moreover, we found that deletion of DBC1 increases the incidence of aortic dissections (AD) triggered by ANGII. Mechanistically, our results show that absence of DBC1 increases the expression of vascular remodeling factors, including MMPs, specially MMP9, that are involved in the development of AD both in mice models and humans^{2,3,8,9,18,38,41}. Also, we found that DBC1 KO mice have impaired arterial wall thickening response to ANGII. This

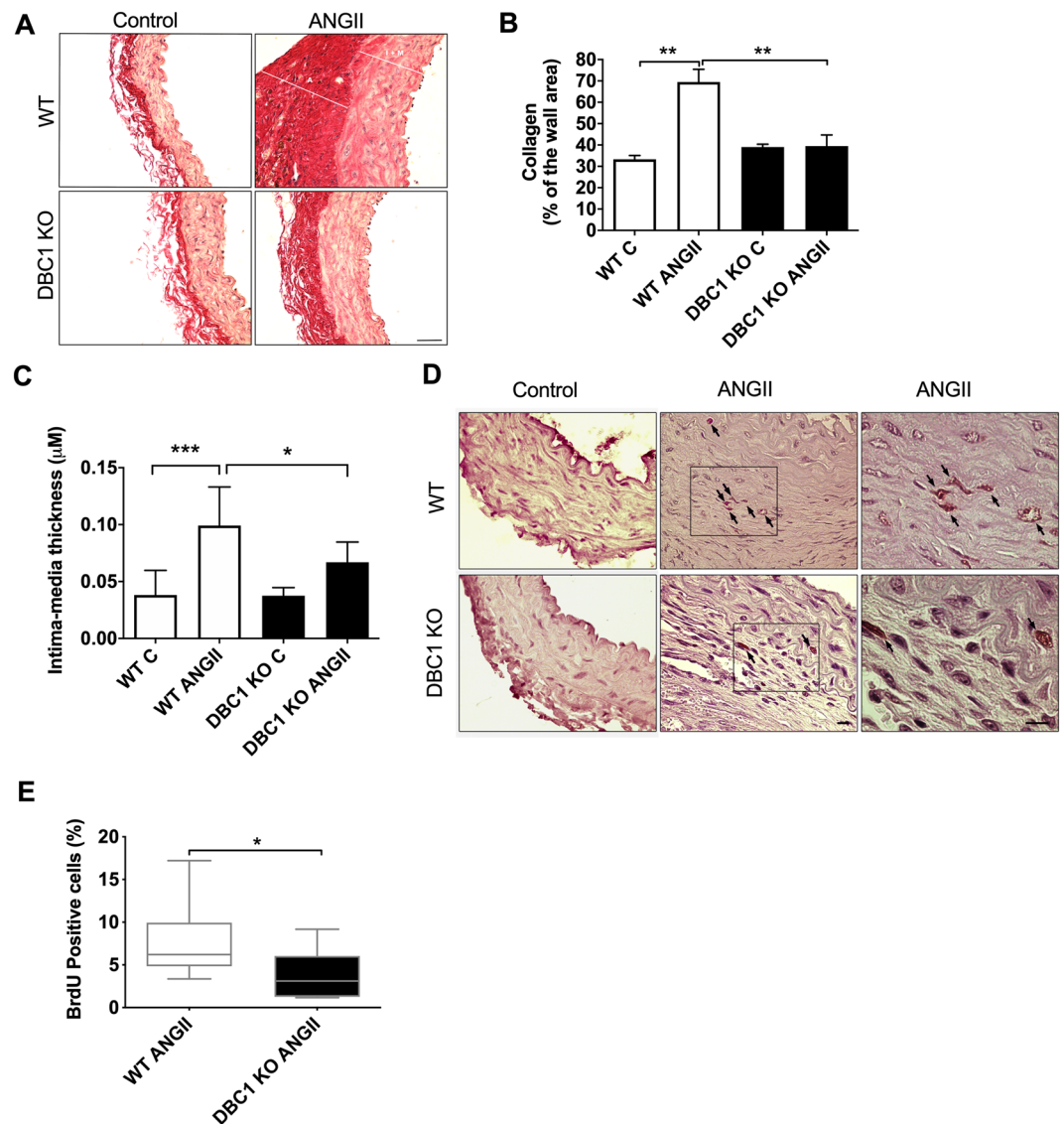


Figure 4. DBC1 KO mice show a failed collagen turnover and impaired vascular proliferation in response to ANGII-induced hypertension. (A) Representative images of aorta stained with Picrosirius red from Control or ANGII-treated WT and DBC1 KO mice. Collagen fibers are stained in red. White lines indicate adventitia (A) and intima-media (I + M). Scale bar: 40 μm. (B) Collagen fibers quantitation from the intima-media tunica (n = 3 for control mice and 4 for ANGII treated mice). One-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test for multiple comparisons was done. ** mean $P < 0.01$. (C) Quantitation of the intima-media tunica thickness in WT and DBC1 KO mice in Control and ANGII-treated conditions. One-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test for multiple comparisons was done. * and *** means $P < 0.05$, and 0.001, respectively. (D) Representative pictures of Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation in WT and DBC1 KO mice aortas in Control and ANGII-treated conditions. Arrows indicate BrdU positive cells (DAB staining). Slides were counterstained with Hematoxylin. Scale bar: 20 μm. (E) Quantitation of BrdU positive cells in the intima-media tunica of WT and DBC1 KO mice treated with ANGII. One-tailed Mann-Whitney U test was done (DBC1 KO median of frequency = 2.8%; WT median of frequency = 6.2%), $U = 7$. No positive signals were detected in control mice (n = 7 per group). * means $P < 0.05$.

is coincident with the fact that DBC1 KO vascular smooth muscle cells failed to leave their quiescent state and re-enter the cell cycle, both *in vitro* and *in vivo*.

We and others have extensively shown that DBC1 plays major roles in metabolism and metabolic diseases^{19,22,31–35}. DBC1 regulates SIRT1 activity in the liver and adipose tissue during different metabolic states^{22,31}. Furthermore, we also showed that DBC1 KO mice are protected against vascular injury and atherosclerosis, due to increased fat adipose tissue buffer capacity during obesity³⁵. In this work we found that ANGII promotes hypertension to a similar extent in WT and DBC1 KO mice, although the latter were partially protected against cardiac hypertrophy. This result is consistent with several reports which have shown that SIRT1 activation protects against cardiac hypertrophy^{50,51}. To our surprise, we found that DBC1 KO mice had a higher incidence of

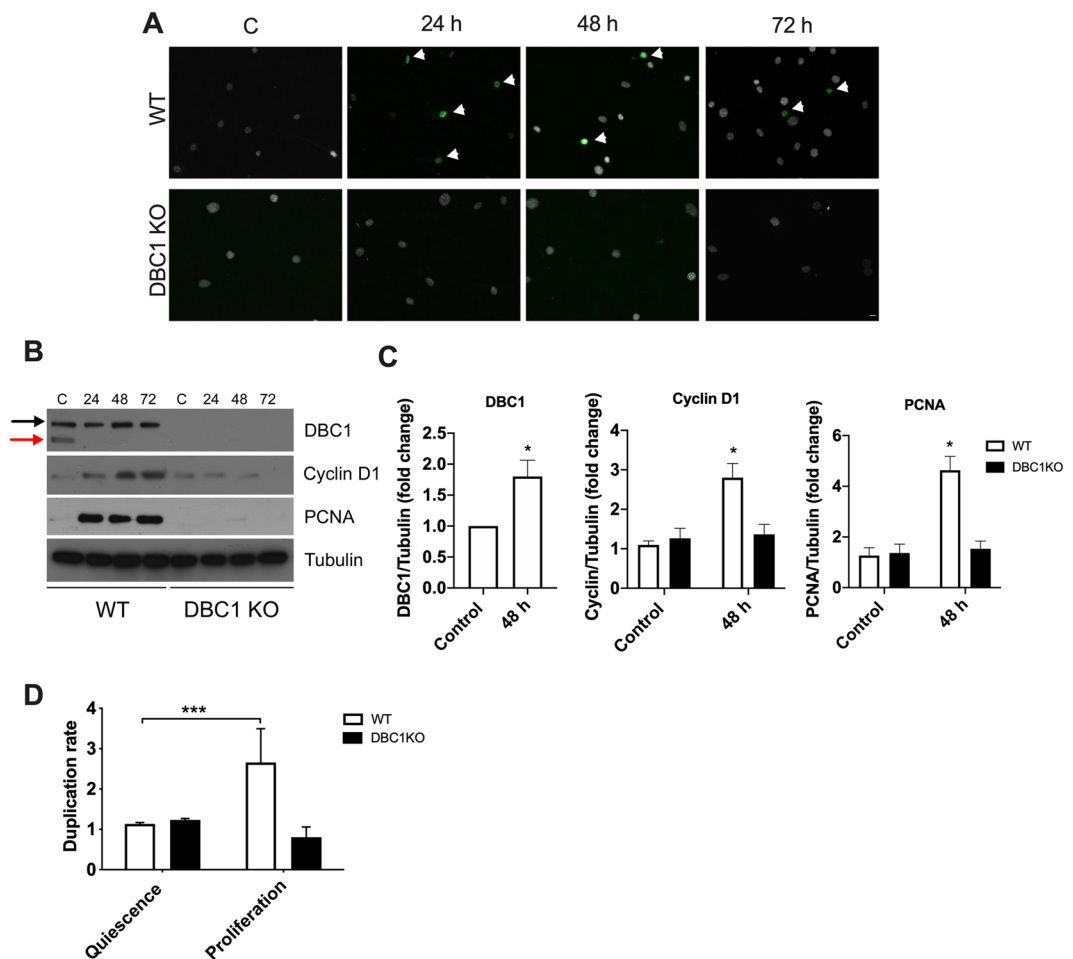


Figure 5. Vascular smooth muscle cells from DBC1 KO mice fail to proliferate *in vitro*. VSMC from WT and DBC1 KO mice aortas were grown and synchronized to a quiescent state by 48 h of serum deprivation. After that, serum was restored and cell cycle progression followed for 24, 48 and 72 h. **(A)** Ki67 staining in WT and DBC1 KO cells. Arrowheads point to Ki67 positive cells (green). DAPI was used as marker of total cell numbers (white). Scale bar: 15 μ m. **(B)** Representative western blot of cell cycle markers expression (Cyclin D1 and PCNA) in WT and DBC1 KO VSMC at quiescent state after 48 h of serum withdrawal (C), and at different time points after serum replenishment (24, 48 and 72 h). Black arrow shows DBC1 and red arrow shows DN-DBC1. **(C)** Quantitation of DBC1 protein expression in quiescent state (Control) and after 48 h of serum replenishment (48 h). Results shown were from 3 independent experiments. **(D)** Quantitation of the replication rate for cell number in quiescent and proliferative, post-quiescent states (72 h) of WT and DBC1 KO VSMC. Cells were grown in complete media (DMEM + 10% FBS for proliferation), later incubated with DMEM with no serum for 48 h (quiescence). After 48 h of serum deprivation, FBS was restored and cells collected 72 h later. Propidium Iodide (PI) negative cells were selected and counted at the different conditions. Three independent experiments were used for quantitation. One-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test for multiple comparisons were done. * means $p < 0.05$.

AD triggered by the treatment. Our results suggest that DBC1 affects different aspects of vascular response during hypertension, which are discussed below.

Deletion of DBC1 increases the expression of matrix remodeling factors that correlate with the incidence of AD in mice and humans. Our results show that DBC1 KO mice exhibit increased incidence of AD in response to ANGII. This effect was as early as 1 week after ANGII infusion (Supplementary Fig. 1), when blood pressure was beginning to rise and hypertension was still to be established. Interestingly, when ANGII dose was decreased from 1 mg/kg/day to 0.6 mg/kg/day ADs disappeared from WT mice. However, DBC1 KO mice still showed incidence of AD, although to a lower extent (Supplementary Fig. 1), supporting the notion that absence of DBC1 predisposes to develop vascular lesions. The role of hypertension in the development of AD in the ANGII-infusion model is not completely clear. Reports have shown that AD promoted by ANGII are sensitive to telmisartan and irbesartan⁵². However, others have suggested that ANGII-induced AD develop even in the absence of hypertension⁵³. The fact that AD can develop before the onset of hypertension (1 week of ANGII infusion) and also that in DBC1 KO mice they still develop at lower doses of ANGII, suggest that AD

and hypertension may be considered as independent events. However, further studies will be needed in order to determine if AD formation in DBC1 KO is independent from blood pressure.

Gene expression analysis of aortas after ANGII infusion showed that DBC1 KO mice had increased expression of MMP9 and VEGF compared to WT mice. Both proteins are up-regulated in mice models of AD, and also in aortic lesions analyzed from patients^{3,54,55}. In fact, MMP9 KO mice are protected against aortic lesions¹⁰. Also, inhibition of VEGF protects against the development of aneurysmatic lesions in mice^{38,39,41,55}. Increased expression of MMP9 and VEGF in DBC1 KO mice aortas was paralleled by decreased collagen deposition in the intima-media of the aorta, suggesting differential collagen turnover in the DBC1 KO mice, a factor that has also been linked to the formation of AD⁴⁰. *In vitro* analysis of cultured VSMC showed that DBC1 is a direct regulator of the expression of MMP9 and VEGF, but also MMP2 and MMP12, suggesting that DBC1 is a general regulator of matrix remodeling factors. These results differ from a previous report using NCI-N87 and MKN-45 gastric cancer cell lines, where authors showed that DBC1 *knock-down* promotes the downregulation of MMP9 and MMP2⁵⁶. Our findings, together with our previously published research, suggests that DBC1 might play different and even opposite roles in transformed and normal cells⁴⁸.

It is important to notice that only DBC1 KO mice showed a clear up-regulation of MMP9 mRNA after one week of ANGII treatment (Supplementary Fig. 1C). In fact, MMP9 was up-regulated in ANGII-treated DBC1 KO aortas even in mice that did not develop AD (Supplementary Fig. 2C). Although it is not possible to establish a clear causative effect between MMP9 expression and the development of AD in the DBC1 KO mice, altogether our results point in that direction. There was an intriguing difference between what we observed in tissues and the findings in VSMC. *In vitro*, there were clear differences in MMPs expression between genotypes under basal (no ANGII stimulation) conditions, while this was not detected *in vivo* in untreated WT and DBC1 KO mice. We cannot provide a definite explanation for this discrepancy. One possibility is that the expression of MMPs by VSMC *in vivo* is too low to detect differences among genotypes. Another possibility is that other cell types rather than VSMC are the main driving force for the observed phenotype. In this regard, it has been shown that macrophages⁵⁷ and neutrophils⁵⁸ that infiltrate vascular tissue during hypertension are an important source of MMPs.

Also, although *in vitro* analysis in VSMC showed that other MMPs besides MMP9 and VEGF are up-regulated in response to DBC1 deletion, we cannot establish for sure if this is also true *in vivo*. It is plausible that those changes, especially in the case of VEGF, are secondary to the vascular lesion rather than a causative phenomenon. All the issues mentioned above need to be clearly established in order to fully understand how DBC1 is regulating vascular response to hypertension.

Many of the biological effects of DBC1 are mediated by regulation of SIRT1 activity, and in fact it was recently shown that SIRT1 activity protects against AD in the context of caloric restriction (CR). The authors showed that specific knock-down of SIRT1 in VSMC *in vivo* abolished the protective effect of CR against AD⁷. We evaluated if either SIRT1 or HDAC3, another target of DBC1²³, could be mediating the DBC1 effect of vascular remodeling factors expression, and we found that neither SIRT1 nor HDAC3 seem to be involved in this phenomenon (See Supplementary Information).

As it was mentioned in the introduction, DBC1 has many molecular targets, which makes it very laborious to single out a molecular effector of its function. In this case, based on the available data, we can propose two possible DBC1-dependent pathways implicated in the development of AD. The first one involves the regulation of the p53 protein. It has been recently shown that loss of p53 sensitizes to ANGII-induced AD during caloric restriction⁵⁹. Indeed, p53 regulates VSMC function⁶⁰. Since DBC1 is a direct regulator of p53²⁴, it is possible that the DBC1-p53 axis is involved in our results. Another possible downstream effector of DBC1 in AD may be the long non-coding RNA (lncRNA) MALAT1. This lncRNA was recently involved in the regulation of aneurysmatic lesions by regulating VSMC function⁶¹. MALAT1 also regulates MMPs expression and cell invasiveness in cancer cells^{62,63}. MALAT1 is directly regulated by DBC1⁶⁴, suggesting that dysregulation of this lncRNA could explain the DBC1-dependent effect on AD in response to ANGII. Which of these pathways, or any other still to be known, are involved in the DBC1-dependent AD incidence needs to be further investigated.

Absence of DBC1 impairs vascular cell proliferation response triggered by hypertension. Besides showing altered expression of vascular remodeling factors, the cells belonging to the intima and media layers from DBC1 KO mice showed impaired proliferation *in vivo* in response to ANGII treatment. This was evidenced by a decreased rate of BrdU incorporation into DNA and paralleled by a failure to increase the thickness of tunica-media in response to hypertension. Several reports have shown that VSMC proliferation capacity is compromised in AD^{14,46,47} and that failure of VSMC could be a cause for aortic wall weakening and aneurysm formation. Recently, we showed that deletion of DBC1 delays cell proliferation in previously quiescent cells, both *in vitro* and *in vivo* during liver regeneration⁴⁸. In fact, when DBC1 KO VSMC were made quiescent by serum deprivation, they failed to re-enter cell cycle upon serum restoration. This was evidenced both by the expression cell cycle progression markers and by cell count. Quiescent VSMC from WT mice showed the appearance of the putative quiescence marker DN-DBC1⁴⁸. Serum restoration triggered the down-regulation of DN-DBC1 and up-regulation of cell cycle progression markers. DBC1 KO VSMC were unable to up-regulate these proteins and failed to progress through cell cycle. These results suggest that, similar to the liver, the ratio between DBC1 and DN-DBC1 plays a role in the control of cell cycle progression of VSMC. Thus, this may affect the response of VSMC to vascular injury *in vivo*. Interestingly, it has been shown that SIRT1 overactivation in VSMC inhibits proliferation after vascular injury⁶⁵. We propose that SIRT1 overactivation might impair the proliferation of VSMC in DBC1 KO mice in response to ANGII. Also, we speculate that under basal conditions the expression of DN-DBC1, which does not bind to SIRT1⁴⁸, contributes to maintaining the quiescent state of VSMC by increasing SIRT1 activity. Upon vascular injury, DN-DBC1 might be fully replaced by DBC1, promoting cell proliferation in intima-media thickening.

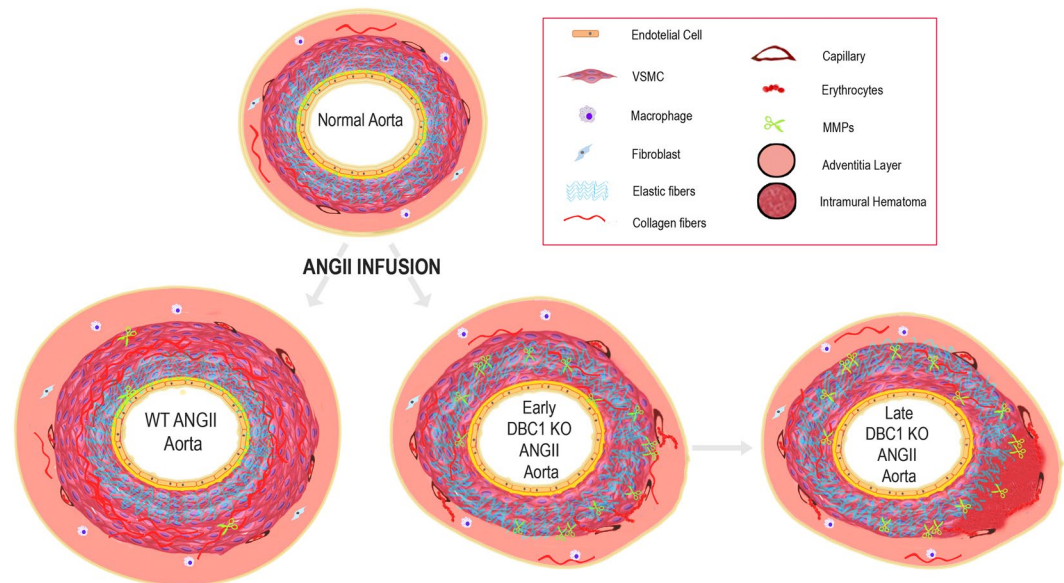


Figure 6. Working model for DBC1 role in the control of vascular response during ANGII-mediated hypertension. In basal conditions, the aorta is composed of a heterogeneous mixture of smooth muscle, nerves, endothelial cells, fibroblast-like cells, and a complex extracellular matrix which maintains balance to guarantee an appropriate blood flow. During hypertension, ANGII promotes VSMCs proliferation, extracellular matrix turnover, and inflammatory environment. However, in aortas from DBC1 KO mice, increased MMPs expression (represented as small scissors) leads to arterial wall weakening. This effect, in combination with micro ruptures of small vessels in the vasa vasorum and tunica media, leads to the formation of IMH and AD. Also, decreased VSMC proliferation in response to hypertension in DBC1 KO mice exacerbates the impaired vascular response to hypertension.

Based on all the results presented here, we generated a working model for DBC1 role in the control of vascular response during ANGII-mediated hypertension (Fig. 6). We propose that during hypertension, absence of DBC1 leads to increased expression of vascular remodeling factors, including MMPs and VEG. As a consequence, there is an increase in collagen and elastin turnover, thus weakening the arterial wall. The weakening of the arterial wall, in combination with micro-ruptures of small vessels that nurture the vasa vasorum and tunica media leads to the formation of an IMH and later aortic dissection. In addition, the lack of a proper proliferative response by DBC1 KO cells might further contribute to the ongoing aortic wall degeneration process.

Conclusions

This work constitutes the evidence that DBC1 is directly involved in the control of vascular response to injury by regulating the expression of vascular remodeling factors and also the proliferative response of VSMC. Furthermore, it strengthens the emerging role of DBC1 as a key regulator of non-transformed cells and their transition from quiescent to proliferative states. Finally, our findings could contribute to the understanding of the molecular mechanisms that underlie the development of AD.

Received: 3 November 2019; Accepted: 7 April 2020;

Published online: 21 April 2020

References

- O'Rourke, K., VanderZanden, A., Shepard, D. & Leach-Kemon, K. Cardiovascular disease worldwide, 1990–2013. *Jama* **314**, 1905–1905 (2015).
- Spittell, J. A. Hypertension and arterial aneurysm. *Journal of the American College of Cardiology* **1**, 533–540 (1983).
- Gawinecka, J., Schönraht, F. & von Eckardstein, A. Acute aortic dissection: pathogenesis, risk factors and diagnosis. *Swiss medical weekly* **147**, w14489 (2017).
- Forrester, S. J. *et al.* Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* **98**, 1627–1738 (2018).
- Lerman, L. O. *et al.* Animal models of hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension* **73**, e87–e120 (2019).
- Daugherty, A., Manning, M. W. & Cassis, L. A. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1605–1612 (2000).
- Liu, Y. *et al.* Calorie restriction protects against experimental abdominal aortic aneurysms in mice. *Journal of Experimental Medicine* **213**, 2473–2488 (2016).
- Longo, G. M. *et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *The Journal of clinical investigation* **110**, 625–632 (2002).
- Longo, G. M. *et al.* MMP-12 has a role in abdominal aortic aneurysms in mice. *Surgery* **137**, 457–462 (2005).
- Pyo, R. *et al.* Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1641–1649 (2000).

11. Saraff, K., Babamusta, F., Cassis, L. A. & Daugherty, A. Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **23**, 1621–1626 (2003).
12. Trachet, B. *et al.* Angiotensin II infusion into ApoE^{-/-} mice: a model for aortic dissection rather than abdominal aortic aneurysm? *Cardiovascular research* **113**, 1230–1242 (2017).
13. Tajsic, T. & Morrell, N. W. Smooth muscle cell hypertrophy, proliferation, migration and apoptosis in pulmonary hypertension. *Comprehensive Physiology* **1**, 295–317 (2010).
14. Nienaber, C. A. *et al.* Aortic dissection. *Nature Reviews Disease Primers* **2**, 1–18 (2016).
15. Erbel, R. *et al.* 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* **35**, 2873–2926 (2014).
16. Nakashima, Y. Pathogenesis of aortic dissection: elastic fiber abnormalities and aortic medial weakness. *Annals of vascular diseases* **3**, 28–36 (2010).
17. Estrera, A. *et al.* Acute type A intramural hematoma: analysis of current management strategy. *Circulation* **120**, S287–S291 (2009).
18. Wu, D., Shen, Y. H., Russell, L., Coselli, J. S. & LeMaire, S. A. Molecular mechanisms of thoracic aortic dissection. *Journal of Surgical Research* **184**, 907–924 (2013).
19. Chini, E. N., Chini, C. C., Nin, V. & Escande, C. Deleted in breast cancer-1 (DBC-1) in the interface between metabolism, aging and cancer. *Biosci Rep* **33**, (2013).
20. Kim, J. E., Chen, J. & Lou, Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* **451**, 583–586 (2008).
21. Zhao, W. *et al.* Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* **451**, 587–590 (2008).
22. Escande, C. *et al.* Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J Clin Invest* **120**, 545–558 (2010).
23. Chini, C. C., Escande, C., Nin, V. & Chini, E. N. HDAC3 is negatively regulated by the nuclear protein DBC1. *J Biol Chem* **285**, 40830–40837 (2010).
24. Qin, B. *et al.* DBC1 functions as a tumor suppressor by regulating p53 stability. *Cell reports* **10**, 1324–1334 (2015).
25. Hiraike, H. *et al.* Identification of DBC1 as a transcriptional repressor for BRCA1. *Br J Cancer* **102**, 1061–1067 (2010).
26. Fu, J. *et al.* Deleted in breast cancer 1, a novel androgen receptor (AR) coactivator that promotes AR DNA-binding activity. *J Biol Chem* **284**, 6832–6840 (2009).
27. Trauernicht, A. M., Kim, S. J., Kim, N. H. & Boyer, T. G. Modulation of estrogen receptor alpha protein level and survival function by DBC-1. *Mol Endocrinol* **21**, 1526–1536 (2007).
28. Yu, E. J. *et al.* Reciprocal roles of DBC1 and SIRT1 in regulating estrogen receptor alpha activity and co-activator synergy. *Nucleic Acids Res* **39**, 6932–6943 (2011).
29. Chini, C. C., Escande, C., Nin, V. & Chini, E. N. DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1) modulates the stability and function of the nuclear receptor Rev-erbalpha. *Biochem J* **451**, 453–461 (2013).
30. Li, J. *et al.* A conserved NAD⁺ binding pocket that regulates protein-protein interactions during aging. *Science* **355**, 1312–1317 (2017).
31. Escande, C. *et al.* Deleted in Breast Cancer 1 regulates cellular senescence during obesity. *Aging Cell* **13**, 951–953 (2014).
32. Nin, V., Chini, C. C., Escande, C., Capellini, V. & Chini, E. N. Deleted in breast cancer 1 (DBC1) protein regulates hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem* **289**, 5518–5527 (2014).
33. Moreno-Navarrete, J. M. *et al.* DBC1 is involved in adipocyte inflammation and is a possible marker of human adipose tissue senescence. *Obesity (Silver Spring)* **23**, 519–522 (2015).
34. Qiang, L. *et al.* Brown Remodeling of White Adipose Tissue by SirT1-Dependent Deacetylation of Ppargamma. *Cell* **150**, 620–632 (2012).
35. Escande, C. *et al.* Deleted in breast cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype. *Diabetes* **64**, 12–22 (2015).
36. Nilsson, L. M. *et al.* Novel blocker of NFAT activation inhibits IL-6 production in human myometrial arteries and reduces vascular smooth muscle cell proliferation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **292**, C1167–C1178 (2007).
37. Browatzki, M. *et al.* Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor- κ B and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. *Journal of vascular research* **42**, 415–423 (2005).
38. Vijaynagar, B., Bown, M. J., Sayers, R. D. & Choke, E. Potential role for anti-angiogenic therapy in abdominal aortic aneurysms. *European journal of clinical investigation* **43**, 758–765 (2013).
39. Xu, B. *et al.* Inhibition of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)-A or its Receptor Activity Suppresses Experimental Aneurysm Progression in the Aortic Elastase Infusion Model. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **39**, 1652–1666 (2019).
40. Ishii, T. & Asuwa, N. Collagen and elastin degradation by matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in aortic dissection. *Human pathology* **31**, 640–646 (2000).
41. Choke, E. *et al.* Vascular endothelial growth factor enhances angiotensin II-induced aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of vascular surgery* **52**, 159–166. e151 (2010).
42. Vaudo, G. *et al.* Arterial wall thickening at different sites and its association with left ventricular hypertrophy in newly diagnosed essential hypertension. *American journal of hypertension* **13**, 324–331 (2000).
43. Ghiadoni, L. *et al.* Endothelial function and common carotid artery wall thickening in patients with essential hypertension. *Hypertension* **32**, 25–32 (1998).
44. Sung, C.-P., Arleth, A. J., Storer, B. L. & Ohlstein, E. H. Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **271**, 429–437 (1994).
45. Nagata, D. *et al.* AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* **110**, 444–451 (2004).
46. Clément, M. *et al.* Vascular smooth muscle cell plasticity and autophagy in dissecting aortic aneurysms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **39**, 1149–1159 (2019).
47. Lopez-Candales, A. *et al.* Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *The American journal of pathology* **150**, 993 (1997).
48. Santos, L. *et al.* A novel form of Deleted in breast cancer 1 (DBC1) lacking the N-terminal domain does not bind SIRT1 and is dynamically regulated *in vivo*. *Scientific reports* **9**, 1–14 (2019).
49. Sumida, T. *et al.* Complement C1q-induced activation of β -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nature communications* **6**, 6241 (2015).
50. Planavila, A., Iglesias, R., Giral, M. & Villarroya, F. Sirt1 acts in association with PPAR α to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovascular research* **90**, 276–284 (2010).
51. Vinciguerra, M., Santini, M. P., Claycomb, W. C., Ladurner, A. G. & Rosenthal, N. Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity. *Aging (Albany NY)* **2**, 43 (2010).
52. Iida, Y. *et al.* Efficacy and mechanism of angiotensin II receptor blocker treatment in experimental abdominal aortic aneurysms. *PLoS one* **7** (2012).

53. Cassis, L. A. *et al.* ANG II infusion promotes abdominal aortic aneurysms independent of increased blood pressure in hypercholesterolemic mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **296**, H1660–H1665 (2009).
54. Proietta, M. *et al.* MMP-12 as a new marker of Stanford-A acute aortic dissection. *Annals of medicine* **46**, 44–48 (2014).
55. Koullias, G. J., Ravichandran, P., Korkolis, D. P., Rimm, D. L. & Elefteriades, J. A. Increased tissue microarray matrix metalloproteinase expression favors proteolysis in thoracic aortic aneurysms and dissections. *The Annals of thoracic surgery* **78**, 2106–2110 (2004).
56. Bae, J. S. *et al.* CK2 α phosphorylates DBC1 and is involved in the progression of gastric carcinoma and predicts poor survival of gastric carcinoma patients. *International journal of cancer* **136**, 797–809 (2015).
57. Tieu, B. C. *et al.* An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, 3637–3651 (2009).
58. Kurihara, T. *et al.* Neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9 triggers acute aortic dissection. *Circulation* **126**, 3070–3080 (2012).
59. Gao, P. *et al.* Caloric Restriction Exacerbates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm in the Absence of p53. *Hypertension* **73**, 547–560 (2019).
60. Mercer, J., Figg, N., Stoneman, V., Braganza, D. & Bennett, M. R. Endogenous p53 protects vascular smooth muscle cells from apoptosis and reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Circulation research* **96**, 667–674 (2005).
61. Cardenas, C. L. L. *et al.* An HDAC9-MALAT1-BRG1 complex mediates smooth muscle dysfunction in thoracic aortic aneurysm. *Nature communications* **9**, 1009 (2018).
62. Han, Y. *et al.* Tumor-suppressive function of long noncoding RNA MALAT1 in glioma cells by downregulation of MMP2 and inactivation of ERK/MAPK signaling. *Cell death & disease* **7**, e2123 (2016).
63. Liu, P. *et al.* LncRNA-MALAT1 promotes neovascularization in diabetic retinopathy through regulating miR-125b/VE-cadherin axis. *Bioscience reports* **39** (2019).
64. Chen, R. *et al.* Quantitative proteomics reveals that long non-coding RNA MALAT1 interacts with DBC1 to regulate p53 acetylation. *Nucleic acids research* **45**, 9947–9959 (2017).
65. Li, L. *et al.* SIRT1 acts as a modulator of neointima formation following vascular injury in mice. *Circulation research* **108**, 1180–1189 (2011).

Acknowledgements

We thank Tabaré de los Campos, Marcela Díaz from Institut Pasteur Montevideo, Fernando Silva de Lima from Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil, José Manuel Verdes and Victoria Yozzi from Laboratorio de Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, for tissue processing, technical support in microscopy and image analysis. We also thank Jorge Rodríguez-Duarte (Institut Pasteur Montevideo) for discussions and graphical working model generation and Fabiana Blanco (Facultad de Medicina, UdelaR) for her suggestions after reading the draft. The authors would like to thank all the people at the Animal Facility (UATE) and the Cell Biology Units at the Institut Pasteur Montevideo. LC was supported by scholarships from ANII (POS_NAC_2014_1_102909 and CAP (UdelaR). MC was supported by CSIC (Iniciación a la Investigación 2015, ID 137, UdelaR). This work was supported by grants by ANII (FCE_1_2014_1_104002 and INNOVA II to CE) and FOCEM.

Author contributions

L.C., M.C., P.C. and M.B. performed all experiments in mice. L.C. carried out all cellular experiments. L.C., M.C. and A.L. did m.R.N.A. measurements. A.L., L.C., M.C., S.L., D.M. and C.M.M.M. did tissue analysis. C.B. collaborated in ANGII animal model setup, A.D. analysis and discussion of results. M.B. made the artwork for working model presented in Fig. 6. C.E. conceived the idea and supervised the experiments. A.C. analyzed tissue staining. L.C., M.B., P.C., A.C. and C.E. wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63841-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.E.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

OPEN

A novel form of Deleted in breast cancer 1 (DBC1) lacking the N-terminal domain does not bind SIRT1 and is dynamically regulated *in vivo*

Leonardo Santos¹, Laura Colman¹, Paola Contreras^{1,3}, Claudia C. Chini², Adriana Carlomagno¹, Alejandro Leyva⁴, Mariana Bresque¹, Inés Marmisolle⁹, Celia Quijano⁹, Rosario Durán⁴, Florencia Irigoín^{5,6}, Victoria Prieto-Echagüe⁵, Mikkel H. Vendelbo^{10,11}, José R. Sotelo-Silveira⁸, Eduardo N. Chini², Jose L. Badano⁵, Aldo J. Calliari^{1,7} & Carlos Escande¹

The protein Deleted in Breast Cancer-1 is a regulator of several transcription factors and epigenetic regulators, including HDAC3, Rev-erb- α , PARP1 and SIRT1. It is well known that DBC1 regulates its targets, including SIRT1, by protein-protein interaction. However, little is known about how DBC1 biological activity is regulated. In this work, we show that in quiescent cells DBC1 is proteolytically cleaved, producing a protein (DN-DBC1) that misses the S1-like domain and no longer binds to SIRT1. DN-DBC1 is also found *in vivo* in mouse and human tissues. Interestingly, DN-DBC1 is cleared once quiescent cells re-enter to the cell cycle. Using a model of liver regeneration after partial hepatectomy, we found that DN-DBC1 is down-regulated *in vivo* during regeneration. In fact, WT mice show a decrease in SIRT1 activity during liver regeneration, coincidentally with DN-DBC1 downregulation and the appearance of full length DBC1. This effect on SIRT1 activity was not observed in DBC1 KO mice. Finally, we found that DBC1 KO mice have altered cell cycle progression and liver regeneration after partial hepatectomy, suggesting that DBC1/DN-DBC1 transitions play a role in normal cell cycle progression *in vivo* after cells leave quiescence. We propose that quiescent cells express DN-DBC1, which either replaces or coexists with the full-length protein, and that restoring of DBC1 is required for normal cell cycle progression *in vitro* and *in vivo*. Our results describe for the first time *in vivo* a naturally occurring form of DBC1, which does not bind SIRT1 and is dynamically regulated, thus contributing to redefine the knowledge about its function.

¹Laboratory of Metabolic Diseases and Aging, INDICyO Program, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. ²Signal Transduction and Molecular Nutrition Laboratory, Kogod Aging Center, Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, USA. ³Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁴Analytical Biochemistry and Proteomics Unit, Institut Pasteur de Montevideo and Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. ⁵Human Molecular Genetics, INDICyO Program, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. ⁶Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁷Area Biofísica, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁸Department of Genomics, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, and Laboratory of Molecular Interactions, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁹Departamento de Bioquímica and Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ¹⁰Department of Nuclear Medicine and PET Centre, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark. ¹¹Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.E. (email: escande@pasteur.edu.uy)

Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1) is a nuclear protein with multiple roles in the regulation of cellular physiology¹. It does so by binding and modulating the biological activity of several transcription factors and epigenetic regulators, including SIRT1^{2–4}, HDAC3⁵, p53⁶, BRCA1⁷, AR⁸, ER^{9,10}, Rev-erb- α ¹¹ and PARP1¹², among others.

It is well documented that, in most cases, DBC1 binds to its targets through its N-terminal domain. This is the case for ER¹⁰, AR⁸, BRCA1⁷, SIRT1², HDAC3⁵, SUV39H1¹³, and also the lncRNA MALAT1¹⁴. In the case of SIRT1 and other proteins, the N-terminal region on DBC1 responsible for binding was originally narrowed down to the LZ domain, which begins in the residue 243 in the human protein¹. However, recent findings challenge this view¹⁵, suggesting that this regulation is more complex than previously believed. Moreover, to date information about how the interaction between DBC1 and its targets is regulated is scarce. We showed previously that in liver and fat tissue DBC1/SIRT1 interaction is regulated by metabolic load^{4,16}. Later, we and other investigators showed that AMPK and PKA-dependent phosphorylation of SIRT1 regulated its binding to DBC1^{17,18}. Also, it was shown that GAPDH phosphorylation by AMPK leads to SIRT1/DBC1 dissociation¹⁹. On the contrary, phosphorylation of DBC1 by ATM during genotoxic stress increases its binding and inhibition of SIRT1²⁰. Besides the regulation of SIRT1/DBC1 association by phosphorylation, reports have shown that DBC1 binding to a given partner can be displaced by another DBC1 target^{6,14,21}, suggesting that a stoichiometric balance among different proteins may play a role in target selectivity. However, since many of these results rely on overexpression experiments, more work should be done to strengthen their biological relevance.

As its name indicates, DBC1 has been involved in cell cycle control and cancer. However, its role in cancer is not clearly defined, since some evidence suggests that DBC1 is tumorigenic, while others underscore a tumor suppressor function¹. Nevertheless, it is well accepted that DBC1 plays a role in cell cycle control in many different cell lines, mainly through regulation of the proteins mentioned above. Of note however, most of the accumulated evidence has been obtained using transformed cells, where normal cell cycle control is typically altered. Indeed, up to date the role of DBC1 on cell cycle control *in vivo* or in non-transformed cells has not been studied in depth.

We and others have shown previously that DBC1 also plays a key role in the regulation of metabolism^{4,11,16,18,22–24}. DBC1 binds to SIRT1 and inhibits its enzymatic activity during obesity^{4,16}. Consistently, genetic deletion of DBC1 in mice protects against high-fat diet induced insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease⁴ and atherosclerosis¹⁶. In fat tissue, DBC1 regulates cellular senescence during obesity through modulation of HDAC3 activity²³, whereas in the liver, DBC1 participates in the control of gluconeogenesis, regulating PEPCK activity²².

Unlike most tissues in mammals, the liver has a unique regeneration capacity. In a normal liver, hepatocytes are mostly in a quiescent state (G0) of the cell cycle. When the liver is injured or partially removed, hepatocytes massively exit G0 and undergo a series of synchronic rounds of division until the original organ size is recovered²⁵. Once total regeneration has been achieved, hepatic cells go back into quiescence²⁵, making liver regeneration a remarkable model to study cell cycle control *in vivo*, especially G0/G1 transitions. Importantly, understanding how the liver regeneration potential is regulated is key for the treatment of acute liver injury and liver transplant²⁶. The mechanisms that regulate liver regeneration are not completely known and are of critical importance for understanding liver function in normal and pathological conditions. In this context, it is worth pointing out that SIRT1 has been involved in liver regeneration. A recent report using transgenic mice overexpressing SIRT1 showed impaired liver regeneration, compared to WT mice. Also, SIRT1 transgenic mice showed a delay in G0-G1/S transitions²⁷.

The aim of this work was to gain insight into the mechanisms of regulation of DBC1 biological activity during the cell cycle *in vitro* and *in vivo*. We found that in quiescent cells, DBC1 is processed by proteolytic cleavage in the N-terminus, producing a novel form of the protein (DN-DBC1). We mapped the cleavage sequence of DN-DBC1 to the residues 124–138, meaning that DN-DBC1 loses the S1-like binding domain. In agreement with this, we found that DN-DBC1 does not bind to SIRT1, suggesting that DN-DBC1 is inactive in terms of SIRT1 regulation. Tissue analysis in mouse and human samples showed that DN-DBC1 can be found *in vivo*. Also, we show that DN-DBC1 is rapidly down-regulated when quiescent cells re-entered the cell cycle, findings that were also observed *in vivo* in a model of liver regeneration. Finally, we show that DBC1 KO mice show impaired liver regeneration after partial hepatectomy, suggesting that DBC1, and probably the dynamic regulation of the DN-DBC1/DBC1 ratio is necessary for correct cell cycle progression during liver regeneration.

In summary, our results provide evidence that the function of DBC1 is regulated during cell cycle *in vitro* and *in vivo*. We propose that during quiescence DBC1 is processed resulting in a N-deleted protein (DN-DBC1) that is unable to bind SIRT1. When cells re-enter the cell cycle, DN-DBC1 is rapidly replaced by DBC1. Our results suggest that downregulation of DN-DBC1 and replacement by DBC1 is necessary to inhibit SIRT1 during normal liver regeneration, an observation that is consistent with the data already reported. Altogether, our findings provide compelling new evidence regarding the regulation of DBC1 *in vivo*, and bring new insights to understand its role in liver regeneration and cell cycle control, findings that are potentially relevant to dissect the function of DBC1 in cancer.

Materials and Methods

Animal handling and experiments. All mice used in this study were maintained at the Institut Pasteur de Montevideo Animal facility (UATE). The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Institut Pasteur de Montevideo (CEUA, Protocol number 009-16) and studies were performed according to the methods approved in the protocol. WT and whole-body DBC1 KO mice were in a C57BL/6J pure background. DBC1 KO mice were backcrossed into C57BL/6J for more than 10 generations in order to ensure genetic purity. Only male mice (8–14 weeks old) were used in this study. In all experiments, groups consisted of at least 3–4 mice per group.

Partial hepatectomy and liver regeneration. To study liver regeneration, we performed 2/3 hepatectomy in mice as described previously²⁸. Briefly, mice were weighed before surgery. Anesthesia was induced by isoflurane. Skin was disinfected with 70% ethanol and a midline incision in abdominal skin and muscle was made. The xiphoid apex was lifted upward and backward according to the instructions shown by the above-mentioned authors in the supplementary video on-line. The peritoneal cavity was held open by retractors. Once the liver was exposed it was manipulated by saline-moistened cotton tips. First, the left lateral lobe was completely ligated with a 4–0 silk thread and then cut. Afterwards, the median lobe was ligated not too close to the supra-hepatic vena cava in order to avoid venous obstruction and then cut as well. The remaining liver consisted of the right and caudate lobes. The peritoneum was closed with a 5–0 silk suture and the skin with wound clips. Buprenorphine hydrochloride was administered at the site of the incision for analgesia. The entire procedure lasted 15 minutes. Mice were placed on a warming pad for recovery. The dissected tissue was weighed. If acute bleeding occurred or if animals did not recover properly and showed signs of suffering, they were euthanized. Mice were controlled every 12 hours after hepatectomy.

Human liver tissue. Liver tissue specimen was obtained from the lateral portion of a partial hepatectomy performed upon clinical indication. Informed consent to the procedure was given. Anonymized tissue was addressed in accordance with the Danish National Committee on Health Research Ethics guidelines on the use of biological material in health research projects, where approval from local Danish ethical committee is not required unless the research is related to artificial fertilization.

Histology. Liver sections were obtained from paraffin-embedded tissue and stained with H&E following standard procedures. Liver cyto-architecture and quantitation of mitotic index were analyzed double blinded by independent personnel. For each mouse, at least 3 sections were analyzed.

In vivo BrdU incorporation. Two hours before euthanasia, 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma) was injected to mice i.p. (100 mg/kg). After that time, mice were deeply anesthetized with ketamine and xylazine. Blood was obtained with heparinized syringes and hepatic tissue from the right lobe was either frozen in liquid nitrogen for qPCR and western blot or fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 24 hours for immunohistochemistry.

RNA isolation and qPCR. Total RNA from livers was isolated with TRIzol by standard procedures. qPCR was carried out using Taqman probes as follows: Cyclin A2 (Mm00438063_m1), Cyclin E1 (Mm01266311_m1), Cyclin B1 (Mm03053893_gH), Cyclin D1 (Mm00432359_m1), Sirt1 (Mm01168521_m1). Expression analysis was calculated as fold increase with respect to control.

Cell growth and maintenance. Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were obtained from E13–E14 embryos following standard procedures. IMR90 and HepG2 cells were obtained from ATCC. Cell growth and maintenance was performed in standard conditions in a humidified CO₂ incubator at 37 °C and 5% CO₂. Unless otherwise specified, cell culture medium was Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM – Thermo Fisher Scientific, #61965026), supplemented with fetal bovine serum 10% (FBS), glutamine 2 mM, Hepes 10 mM, penicillin 10,000 U/mL and streptomycin 10,000 µg/mL (Thermo Fisher Scientific, #16000044, #25030081, #15630080, #15140122, respectively). Washes were performed with phosphate-buffered saline (PBS – Thermo Fisher Scientific, #14190094). Experiments in MEFs were performed between passages 2–5; experiments in IMR90 were performed between passages 5–15.

Induction of cell cycle arrest. Cell cycle arrest was induced by serum deprivation in primary MEFs and HepG2, or contact inhibition (IMR90). Cell cycle arrest induced by serum deprivation was performed in cells initially cultured in standard conditions. Once cells reached 50–60% confluence they were washed twice with PBS and fresh serum-deprived medium was added. The serum concentrations and the period of time in which cells remained under conditions of serum-deprivation are specified in each experiment.

Induction of cell senescence. Early passage IMR90 human fibroblasts (population doubling level 25) were transduced with lentivirus carrying a plasmid for expression of the oncogene Ras (pLenti CMV/TO RasV12 Puro, w119-1 was a gift from Eric Campeau, Addgene plasmid # 22262); or a lentivirus containing a control plasmid (Open Biosystems). Cells were selected with puromycin (2 µg/ml). Ras expression was verified by western blot. Senescence associated β-galactosidase (SA-β-Gal) activity was determined as described previously²⁹. Percentage positive staining was calculated by counting at least 100 random cells in 5 different microscopic fields. Experiments were performed two weeks after infection.

BrdU Incorporation in cells. To analyze BrdU-positive cells, 3 × 10⁵ MEFs, were plated in 5 plates/10 cm each (including coverslips), in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine and 10 mM Hepes. Cells were synchronized by serum deprivation (0.1% FBS) for 48 hours and later incubated with 10% FBS for 6, 12, 24, 30 and 48 hours, and 2 hours before harvesting, they were incubated with 10 µM BrdU. Cells were counted in a Neubauer chamber. Coverslips were washed 3 times with PBS, fixed using 4% PFA × 15 minutes, incubated with 2 M HCl for 15 minutes at 37 °C, blocked with 2% BSA-0.03% Triton x-100 during 1 hour and then incubated with a rat anti-BrdU antibody (Abcam). Finally, a goat anti-rat Alexa Fluor 488 labeled antibody (Invitrogen) was used and samples were analyzed using an epifluorescence microscope (Olympus IX81).

Protein extraction and immunoprecipitations. Protein extraction was performed using NETN lysis buffer (Tris-HCl pH 7.4 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, IGEPAL 0.5% –Merck, #T1503, #S3014, #E6758, #I8896, respectively) supplemented with NaF 5 mM, Nicotinamide 5 mM, β -glycerophosphate 50 mM and protease inhibitor cocktail 1.4 mg/mL (Merck, #S6776, #N0632, #G9422 and #S8830, respectively). Cultured cells were first washed with PBS to remove cell debris and then collected with PBS using a cell scraper. Cells were pelleted, resuspended in lysis buffer (in a volume ratio of 1:10), and then incubated during 20–30 minutes at 4 °C under constant agitation. Lysates were then centrifuged at 10,000 g during 10 minutes at 4 °C and supernatants conserved; these represent the soluble protein extracts. Hepatic tissue was fast-frozen by incubation into liquid nitrogen immediately after its dissection. One-hundred mg of hepatic tissue were first cut into small pieces and further processed with lysis buffer (in a volume ratio of 1:10) and 0.5 mm zirconium-oxide beads (in a volume ratio of 1:2) using a Bullet Blender (Next Advance, #BBY24M). Velocity and time conditions were set as recommended by manufacturers. Homogenates were then incubated during 20–30 minutes at 4 °C under constant agitation. Lysates were then centrifuged at 10,000 g during 10 minutes at 4 °C and supernatants conserved; these represent the soluble protein extracts. Protein extracts used for immunoprecipitation assays were first pre-cleared by incubating 1 mg of total protein with 20 μ L of Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology Inc. #SC-2003) during 30 minutes at 4 °C under constant agitation. The pre-cleared protein extracts were then incubated with 20 μ L of Protein A/G PLUS-Agarose and 4 μ g of anti-DBC1 (Bethyl, #A303-942) or a non-specific IgG (Merck, #I5006) during 1 hour at 4 °C under constant agitation.

Western blots. Protein extracts and immunoprecipitation were resuspended in Laemmli 2X. SDS-PAGE and subsequent protein transfer to PVDF membrane, blocking and washes were performed at standard conditions. Primary antibodies utilized were anti-DBC1 (Bethyl, #A300-434 and #A300-432), anti-SIRT1 (Cell Signalling, #9475), anti-Cyclin D1 (Abcam, #ab137875), anti- β actin (Merck, #A5441), anti- α tubulin (Merck, #T6074), anti-GAPDH (Abcam, #ab9485 and Cell Signalling, #2118), anti-cyclin A2 (Abcam, #ab181591), anti-Ras (Cell Signalling, #3339) and anti-FLAG (Sigma, #F3165). Secondary antibodies utilized were HRP-conjugated IgG from rabbit, mouse and goat (Merck, #A0545, #A9044 and #A8919, respectively). Blot developing was performed with SuperSignal West Pico Chemiluminescent Kit (Pierce, #34080) and results were processed by densitometry analysis with ImageJ (Rasband, W.S., Bethesda, Maryland, USA).

SIRT1 activity. SIRT1 activity was determined with a SIRT1 Fluorometric Kit (Enzo Life Sciences) according to the manufacturer's instructions and as described previously by us^{4,16,18,30}. Briefly, this assay uses a small lysine-acetylated peptide, corresponding to K382 of human p53, as a substrate. The lysine residue is deacetylated by SIRT1, and this process is dependent on the addition of exogenous NAD⁺. The fluorescence values obtained in the absence of NAD⁺ did not differ from the blank. Addition of exogenous NAD⁺ was necessary, most likely because endogenous NAD⁺ was lost during sample preparation. SIRT1 inhibitors nicotinamide (2 mM), suramin (100 μ M), and sirtinol (100 μ M) were used to confirm the specificity of the reaction. Samples were homogenized in NETN buffer as described above. Homogenates were then incubated for 10 minutes at 37 °C to allow degradation of any contaminant NAD⁺. Next, 10 mM DTT was added to the medium, and homogenates were incubated again for 10 minutes at 37 °C. The homogenates (20–30 μ g protein/well) were then incubated in SIRT1 assay buffer in the presence of either 100 μ M Fluor de Lys-SIRT1 substrate (Enzo Life Sciences) and 5 μ M TSA to determine the SIRT1-independent activity, or with 100 μ M Fluor de Lys-SIRT1 substrate, 5 μ M TSA and 200 μ M NAD⁺ to determine the SIRT1-dependent activity. After 1 hour of incubation at 37 °C, the reaction was terminated by adding a solution containing Fluor de Lys Developer (Enzo Life Sciences) and 2 mM nicotinamide. Plates were incubated at 37 °C for 1 hour. Values were determined on a fluorometric plate reader (Spectramax Gemini XPS; Molecular Devices) with an excitation wavelength of 360 nm and an emission wavelength of 460 nm. Calculation of net fluorescence included the subtraction of a blank consisting of buffer containing no NAD⁺ and expressed as a percentage of control. The SIRT1-dependent activity was calculated after subtracting fluorescence values obtained in the absence of NAD⁺. In all cases, we confirmed the linearity of the reaction over time.

Mass spectrometry. Both DBC1 and DN-DBC1 proteins were purified by immunoprecipitation as described above. Immunoprecipitants were resuspended in Laemmli buffer 2X and run in an 8.5% SDS-PAGE under standard conditions. Gels were then stained by colloidal Coomassie Blue and selected bands were manually excised and processed for mass spectrometry analysis as previously described³¹. Briefly, in-gel digestion was performed overnight at 37 °C by incubation with trypsin (sequencing grade, Promega); the resulting peptides were extracted with aqueous 60% acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), and vacuum-dried. Tryptic peptides were desalted using C18 micro-columns (OMIX pipette tips, Agilent) and eluted with matrix solution (saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 60% acetonitrile 0.1% TFA) directly onto the MALDI sample plate. Mass spectra were acquired in a 4800 MALDI TOF/TOF instrument (Abi Sciex) in positive reflector mode and were externally calibrated using a mixture of standard peptides (Applied Biosystems). Selected peptides were further analyzed by MS/MS. Protein identification was performed by searching SwissProt database (2017_09; 555594 sequences) using the MASCOT program (Matrix Science <http://www.matrixscience.com/search> form select.html). The following search parameters were used: monoisotopic mass tolerance, 0.05 Da; fragment mass tolerance, 0.6 Da; methionine oxidation and cysteine carbamidomethylation as variable modifications; and one missed tryptic cleavage allowed. Protein mass and taxonomy were unrestricted. Significant protein scores ($p < 0.05$), and at least one peptide ion significant score ($p < 0.05$) per protein were used as criteria for positive identification. The differential signals in the spectra of the analyzed protein bands were fragmented and their sequence assignments were further corroborated by manual inspection of the MS/MS spectra.

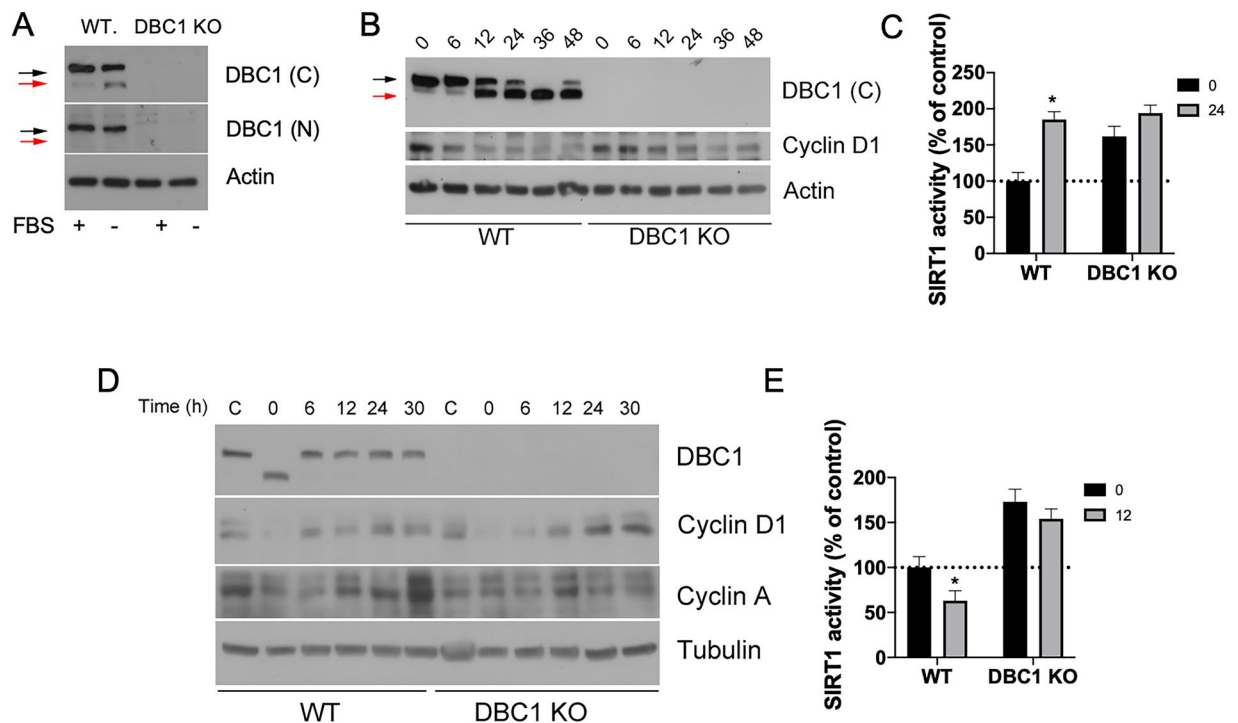


Figure 1. Quiescent cells dynamically express a low molecular weight form of DBC1 that lacks the N-terminal region. (A) WT and DBC1 KO MEFs were maintained either in 10% FBS (+) or in Serum free media (–) for 48 hours. Western blot for DBC1 was performed using an antibody for the C-terminal domain (sequence surrounding aa 875) or an antibody for the N-terminal domain (aa 1–50). Black arrows point to DBC1. Red arrows show the lower molecular weight band. (B) WT MEFs were incubated in serum-free media for different times. (C) SIRT1 activity was measured in WT and DBC1 KO MEFs at time 0 or after 24 hours of serum deprivation. *means $p < 0.05$ compared to Control (t0) for each genotype, unpaired t-test. (D) WT and DBC1 KO MEFs were incubated either in the presence of 10% FBS (C) or in serum-free media (–) for 48 hours. At time 0, media was replaced for 10% FBS (+) in quiescent cells and cells were collected at different time points. (E) SIRT1 activity was measured in WT and DBC1 KO MEFs at time 0 (48 hours of serum deprivation) or after 12 hours of serum (10% FBS) replenishment. *means $p < 0.05$ compared to Control (t0) for each genotype, unpaired t-test.

Plasma transaminases quantification. The extent of liver injury at different time points after hepatectomy was evaluated by quantification of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in plasma. Blood was obtained from anesthetized mice with heparinized syringes and then spun at 10,000 g for 5 minutes at 4 °C to separate plasma from blood cells. Plasma AST and ALT levels were measured by GOT (AST) or GPT (ALT) IFCC modified liquid UV test (Human).

Statistics. Values are presented as mean \pm SEM of 3–5 experiments, unless otherwise indicated. For liver regeneration experiments, the results were analyzed by Two-way ANOVA. In all cases at least 3–4 animals per experimental condition were used. The exact number of mice in each experiment is specified in the corresponding figure legends. When comparing two different experimental conditions, 2-tailed Student's *t* test was used. A *P* value less than 0.05 was considered significant.

Results

Quiescent cells express a low molecular weight form of DBC1 that lacks the N-terminal region.

We have shown previously that DBC1 activity is regulated by energy status, both *in vitro* and *in vivo*⁴. In fact, we showed that energy deprivation abolished DBC1 binding to SIRT1 in hepatic cells⁴. However, the mechanisms that regulate this interaction remain to be elucidated. In order to gain knowledge into this regulation, we exposed MEFs to serum deprivation, which induces cellular quiescence (G0 synchronization). We found that in primary MEFs, induction of cell cycle arrest by serum deprivation led to the appearance of a lower molecular weight band of DBC1. This band became apparent only when using an antibody against the C-terminus of DBC1, but not against the N-terminus (aa 1–50) and it was not present in DBC1 KO MEFs (Fig. 1A). This short form of DBC1 (DN-DBC1) became apparent between 6–12 hours after serum removal, and it remained present for as long as cells were in quiescence (Fig. 1B). The replacement of DBC1 by DN-DBC1 in response to serum deprivation was accompanied by an increase in SIRT1 activity in WT MEFs (Fig. 1C). DBC1 KO MEFs showed increased SIRT1 activity in control conditions, but there was no further activation after serum deprivation (Fig. 1C). Interestingly, DN-DBC1 was rapidly down-regulated when serum was restored and replaced by full length DBC1 at the same time that cells re-entered into cell cycle, as can be seen by up-regulation of cyclins

(Fig. 1D). Both cyclin D1 and A2 were downregulated during serum deprivation, coincidentally with the appearance of DN-DBC1. Upon serum restoring, DN-DBC1 was rapidly (6 hours) replaced by DBC1 coincidentally with up-regulation of cyclin D1 and before up-regulation of cyclin A2 (Fig. 1D), which typically peaks at the S/G2 transition. Taken together, these data suggest that DN-DBC1 is replaced by DBC1 early after cells re-enter into cell cycle, probably on G1 phase. Interestingly, replacement of DN-DBC1 by DBC1 after serum restoration was paralleled by an inhibition of SIRT1 activity in WT MEFs but not in DBC1 KO MEFs (Fig. 1E).

We also studied if DN-DBC1 is produced in response to another type of cell cycle arrest different from quiescence. For that, we induced cellular senescence by overexpression of the RAS oncogene in human cells (Supplementary Fig. 1). Interestingly, we found that DN-DBC1 was also produced in human quiescent cells, but not in RAS-induced senescent cells (Supplementary Fig. 1). Since it was proposed previously that DBC1 could be proteolytically processed during apoptosis^{32,33}, we incubated resting cells with etoposide. In contrast, we did not observe DN-DBC1 after induction of apoptosis in quiescent cells (Supplementary Fig. 1).

DN-DBC1 is a product of proteolytic cleavage of DBC1 and is also present *in vivo* in the liver.

Next, we investigated the mechanism of generation of DN-DBC1 in quiescent cells. Incubation of quiescent WT MEFs with the proteasome inhibitor MG132 partially restored DBC1 levels with a concomitant decrease in DN-DBC1 (Fig. 2A), suggesting that loss of the N-terminus domain is dependent on proteasomal activity and occurs at the expense of pre-existing DBC1. Similar results were obtained in human cells (Fig. 2B). In order to rule out *de novo* synthesis of DN-DBC1 during quiescence, we incubated quiescent cells in the presence of the protein synthesis inhibitor Cycloheximide (CHX) during the same time used with MG132, and found that DN-DBC1 was still produced both in human and mouse cells, even though protein synthesis was blocked, as evidenced by downregulation of cyclin D1 expression (Fig. 2B). To further confirm that DN-DBC1 was neither a novel alternative splicing product nor a variant not previously detected and reported in current genome annotations, we first transfected DBC1 KO MEFs with the cDNA coding for DBC1. Serum deprivation under these conditions led to an increase in the appearance of DN-DBC1 (Fig. 2C). Secondly, we analyzed sequencing data from normal mice liver transcriptome³⁴. All splicing isoforms detected from mice did not produce, when translated *in silico*, products of the molecular weight of DN-DBC1. In fact, all splicing forms of DBC1 that contain an open reading frame included the N-terminus of the protein (Fig. 2D). This assessment was extended using annotations derived from the *de novo* assembly of transcripts performed previously from 10,000 human RNA-seq experiments gathered at the Chess database (See Supplementary methods for detailed information). Human DBC1 splicing variants were more abundant than the ones found in mice but none of them, when translated *in silico*³⁵, yielded products comparable to DN-DBC1 (Fig. 2E). Altogether, these results show that DN-DBC1 is produced as a product of a proteasome-dependent proteolytic cleavage of pre-existing DBC1. Finally, we evaluated if DN-DBC1 is produced *in vivo* in mice and also in humans. To do this, we chose the liver, where most cells are in a quiescent state. We found that DN-DBC1 is expressed *in vivo* under normal conditions (Fig. 2F–G).

DN-DBC1 lacks the S1-like binding domain and does not bind SIRT1.

Next, we mapped the region that is lost in DN-DBC1 compared to the full-length protein. We purified both DBC1 and DN-DBC1 from mouse liver by immunoprecipitation and analyzed them by mass spectrometry. We found that DN-DBC1 lacks the first 124–138 residues (Fig. 3A). Therefore, these data indicate that DN-DBC1 loses the S1-like binding domain while maintains the NLS and LZ domains (Fig. 3B). Sequence alignment between mouse and human DBC1 showed that the sequence mapped is 100% conserved among species (Fig. 3C). Next, we investigated if loss of the S1-like domain of DN-DBC1 affects its binding to one of DBC1 main targets: SIRT1. For that, we expressed a recombinant DN-DBC1 protein lacking the first 138 residues in 293 T cells and evaluated its binding to endogenous SIRT1 by co-immunoprecipitation. We found that the recombinant DN-DBC1 does not bind SIRT1, suggesting that this is an inactive form of the protein in terms of SIRT1 regulation (Fig. 3D). These results were further confirmed by measuring SIRT1 activity *in vitro*. Overexpression of FL DBC1 inhibit SIRT1 activity, while there was no inhibition when DN-DBC1 was overexpressed (Fig. 3E). We also measured *in situ* SIRT1 activity in 293 T cells by H3 acetylation in Lysine 9 (AcH3K9), a well-known target of SIRT1³⁶. SIRT1 overexpression in 293 T cells decreased H3K9 acetylation (Fig. 3F). This effect was inhibited by overexpression of DBC1. However, overexpression of DN-DBC1 had no effect on SIRT1-dependent H3K9 acetylation (Fig. 3F). We also measured SIRT1 binding to endogenous DBC1 (full length) and DN-DBC1 by pull-down assays in livers. We incubated liver lysates with predominance of either DBC1 or DN-DBC1 (Fig. 3G, Input) with recombinant purified SIRT1 (Flag-SIRT1) and performed pull-down assays. When performing immunoprecipitation using Flag-SIRT1 and liver lysates, only DBC1 could be detected (Fig. 3G, left) in Flag immunoprecipitates, but not DN-DBC1. Similar results were obtained when DBC1 was immunoprecipitated with a C-terminus antibody. When DN-DBC1 was predominant in the livers, we found a decrease in Flag-SIRT1 binding (Fig. 3G, right). Altogether, these results suggest that endogenous DN-DBC1 does not bind to SIRT1, losing its SIRT1-inhibitory capacity

The ratio between DN-DBC1 and DBC1 is dynamically regulated *in vivo* during liver regeneration, affecting SIRT1 function.

In order to study the dynamics of DBC1/DN-DBC1 during cell cycle *in vivo*, we used a well-characterized model of 2/3 partial hepatectomy²⁸, where hepatocytes re-enter massively form G0 into G1 after surgery. First, we confirmed that DBC1 and DN-DBC1 are dynamically regulated in hepatic cells. HepG2 cells showed a similar pattern of dynamic DBC1 regulation to fibroblasts. DN-DBC1 accumulated during quiescence (Fig. 4A). Also, the appearance of DN-DBC1 was regulated by MG132 but not by Cycloheximide (Fig. 4B), showing that DBC1/DN-DBC1 is regulated also in hepatic cells. Next, we performed 2/3 partial hepatectomy in WT mice and followed DBC1/DN-DBC1 dynamics by western blot. We found that 24 hours after surgery, DN-DBC1 was still present in hepatectomized mice, similar to sham mice (Fig. 4C). However, 36 hours after surgery there was a clear decrease in DN-DBC1 (Fig. 4D). In order to determine if changes in DN-DBC1/

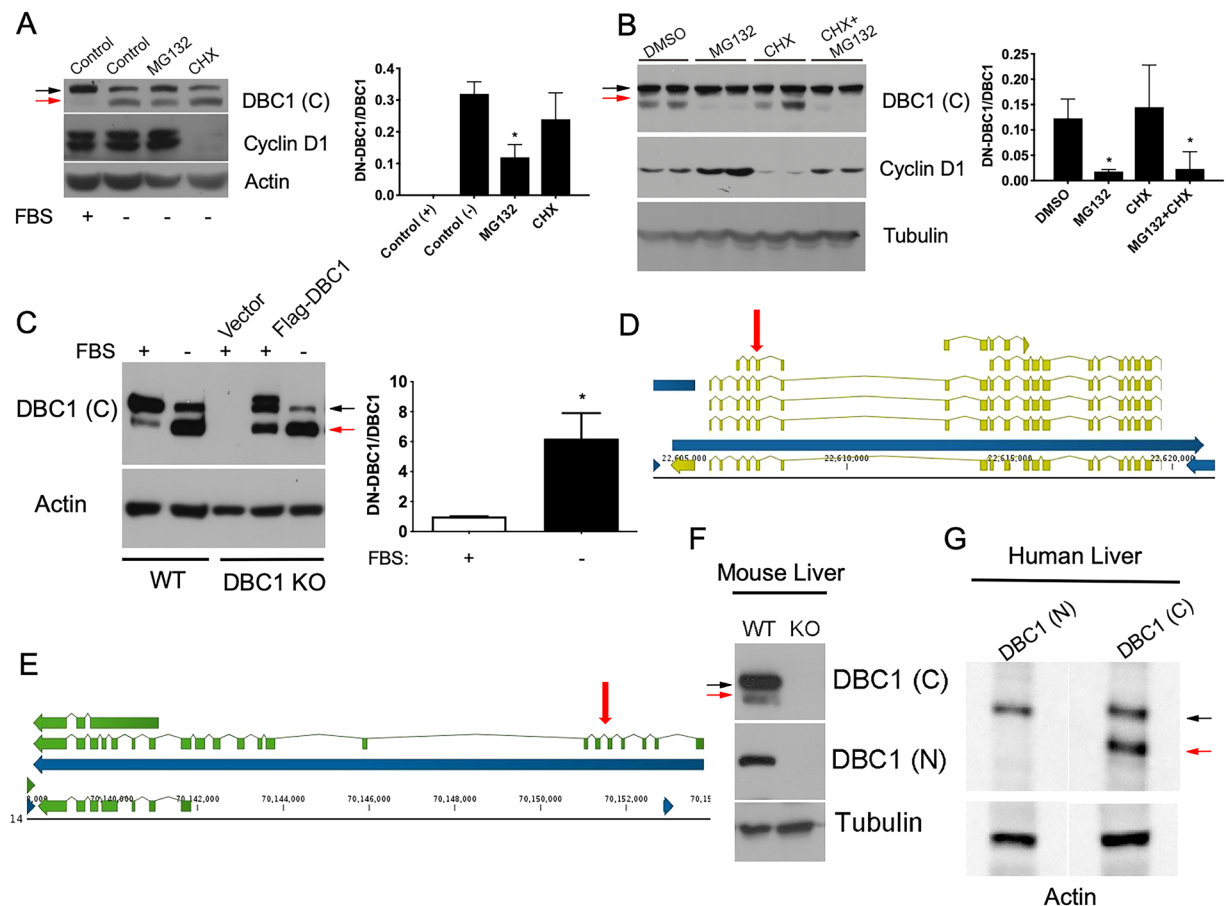


Figure 2. DN-DBC1 is a product of proteolytic cleavage of DBC1 and is also present *in vivo* in the liver. (A,B) WT primary MEFs (A) and IMR90 cells (B) were incubated in the presence (+) and absence (-) of FBS for 48 hours, and later with or without 10 μ M MG132 or 100 μ g/ml Cycloheximide (CHX) for 6 hours. Left, representative western blot. Right panel, quantitation of DN-DBC1/DBC1 ratio in three independent experiments. *means $p < 0.05$ compared to Control (-), One-way ANOVA. (C) DBC1 KO primary MEFs were transfected with empty vector (+) or Flag-DBC1 vector and later incubated with (+) or without (-) FBS for 48 hours. WT MEFs were used as control. Left, representative western blot. Right, quantitation of Flag-DN-DBC1 in KO MEFs in three independent experiments. (D,E) To corroborate annotation and the number of possible splicing variants *de novo* transcript assembly and *in silico* translation was performed using transcriptomic data from human (D) and mouse (E) livers. For human transcript, *de novo* assembly the CHESSE database was used. Green annotations summarize three possible transcripts from mice liver RNA-seq data. From top to bottom, the first and third were not previously annotated, the second matches with previous annotations. None of them when translated yielded the molecular weights observed in the present manuscript. (E) depicts annotations in the case of human transcripts. Here, we can observe more splicing variants (several of them matched previous annotations) but *in silico* translation did not yield the observed molecular weights for DBC1 detected by the approaches used in this manuscript. Vertical red arrows show the exon where DN-DBC1 sequence begins. (F) Representative western blot of liver samples isolated from WT and DBC1 KO mice using antibodies against the C-terminal (C) or N-terminal (N) regions. (G) Representative western blot of healthy human liver tissue using antibodies against the C-terminal (C) or N-terminal (N) regions.

DBC1 dynamics during liver regeneration affect SIRT1 function, we measured its enzymatic activity in WT and DBC1 KO mice during liver regeneration. In sham mice, SIRT1 activity was higher in DBC1 KO compared to WT mice (Supplementary Fig. S2). When we performed liver surgeries in these mice, we found an inhibition of SIRT1 activity 36 hours after partial hepatectomy (Fig. 4E), although total SIRT1 levels remained unchanged (Fig. 4F and Supplementary Fig. S2). Interestingly, the inhibition of SIRT1 activity was coincidental with the decrease in DN-DBC1 levels (Fig. 4G) and was not observed in DBC1 KO mice (Fig. 4E). This suggests that replacement of DN-DBC1 by DBC1 plays a role in the inhibition of SIRT1 activity observed during regeneration. Finally, we measured DN-DBC1/DBC1 ratio 7 days (168 hours) after partial hepatectomy and found that by the time liver regeneration had achieved its end, DN-DBC1 was expressed to similar levels as sham mice (Fig. 4G).

Absence of DBC1 delays liver regeneration by affecting normal cell cycle progression after partial hepatectomy. A previous report showed that transgenic liver-specific SIRT1-overexpressing mice have

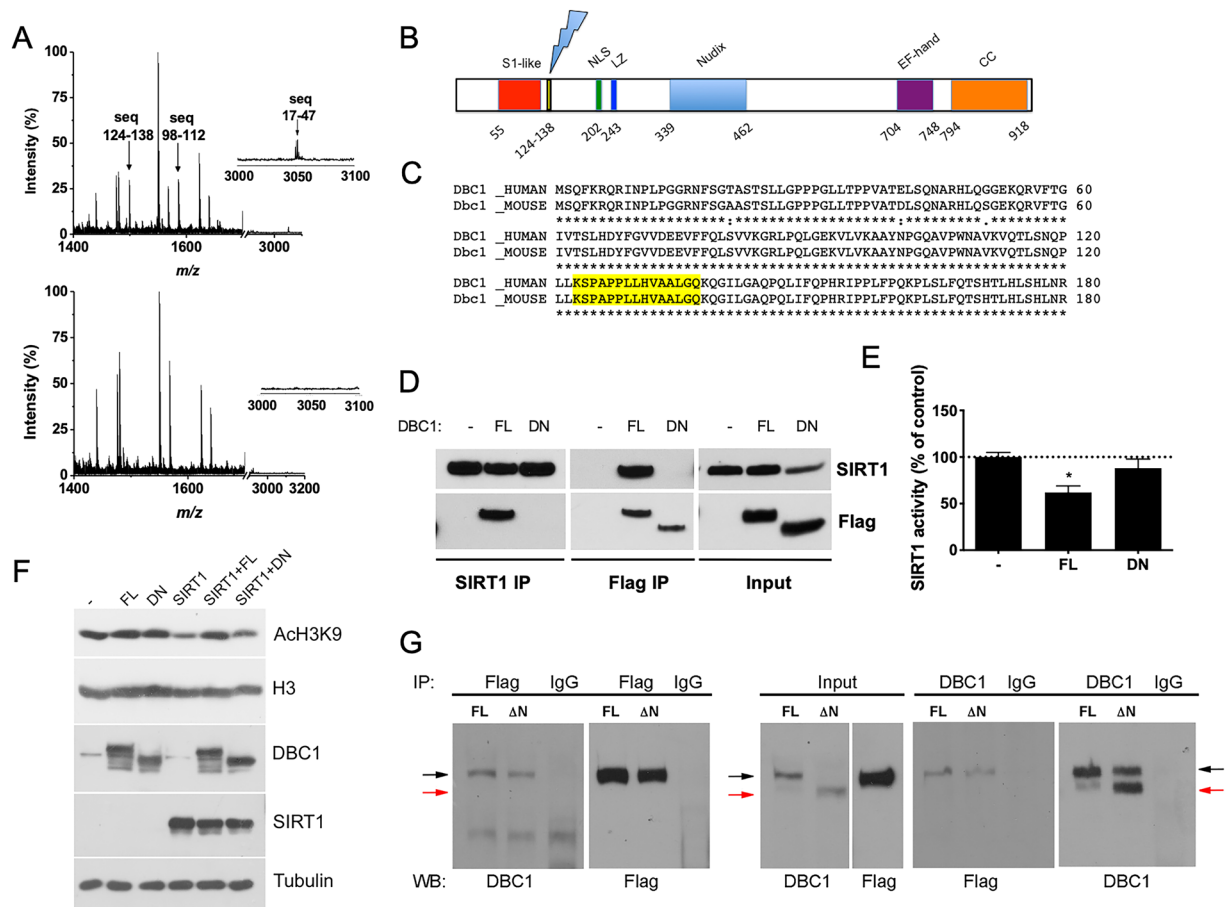


Figure 3. DN-DBC1 lacks the first 124–138 residues and maintains the LZ domain while not binding to SIRT1. (A) DBC1 (upper panel) and DN-DBC1 (lower panel) were purified by immunoprecipitation from mice livers and digested with trypsin previous to the analysis by mass spectrometry (MS). Upper panel, partial Mass Spectrometry (MS) spectrum of Full-length (FL) protein. Lower panel, partial MS spectrum of DN protein. Arrow in inset show the peak corresponding to peptides that were not detected in DN-DBC1 (B) Scheme of DBC1 sequence showing the different domains and the proposed site of cleavage. (C) Alignment of the first 188 amino acids of mouse and human DBC1. The region found to be lost in DN-DBC1 is highlighted in yellow, showing 100% aminoacidic residues conservation among species. (D) Flag-tagged FL and DN-DBC1 were overexpressed in 293 T cells and their binding to endogenous SIRT1 was evaluated by co-immunoprecipitation. Non-transfected cells were used as controls. A representative experiment out of three independent experiments is shown. (E) SIRT1 activity in 293 T cells transfected with empty vector (–) Flag-tagged FL, or Flag-tagged DN-DBC1. Activity was expressed as a percent of control (–) cells. *means $p < 0.05$ compared to control (–). One-way ANOVA. (F) Flag-tagged FL, DN-DBC1 and SIRT1 were overexpressed in 293 T. SIRT1 activity regulation was evaluated by H3 acetylation in Lysine 9 (AcH3K9). A representative western blot is shown. (G) SIRT1 and DBC1 interaction assayed by pull-down experiments. Flag-tagged recombinant SIRT1 was purified from overexpression in 293 T cells. 293 T cell lysates were incubated with liver lysates mainly expressing DBC1 (FL) or DN-DBC1 (DN). Pull-down assays were performed by incubating with Flag antibody (left panels) or DBC1 (C-terminus) antibody (right panels). Input is shown in the center. A representative experiment out of three independent ones is shown. Black and red arrows point to DBC1 and DN-DBC1 respectively.

impaired liver regeneration²⁷. Based on this study, and our data suggesting that SIRT1 activity is regulated by DBC1/DN-DBC1 during liver regeneration, we compared the liver regeneration capacity in WT and DBC1 KO mice during the first 72 hours after partial hepatectomy. First, we studied liver architecture during regeneration in WT and DBC1 KO mice. The evaluation of H&E stained slices of livers undergoing regeneration revealed histological differences between genotypes. After 72 hours of hepatectomy, the livers of WT mice showed a histological organization of liver lobules reminiscent of those present in the mature intact organ: a clearly identifiable central vein (Fig. 5A,B, left panels; thick arrows) surrounded by differentiated hepatocytes arranged close to sinusoids (Fig. 5A,B, left panels; thin arrows). In contrast, after 72 hours of hepatectomy the DBC1 KO mice livers showed a less structured pattern of organization of the hepatic lobule, almost lacking sinusoids (Fig. 5A,B, right panels). We also found that AST and ALT levels 24 hours after the hepatectomy were significantly higher in DBC1 KO mice compared to WT animals (Fig. 5C), although this difference was lost later during regeneration. We also followed mass liver recovery over time after the surgery, and found that DBC1 KO mice have a delay in liver mass

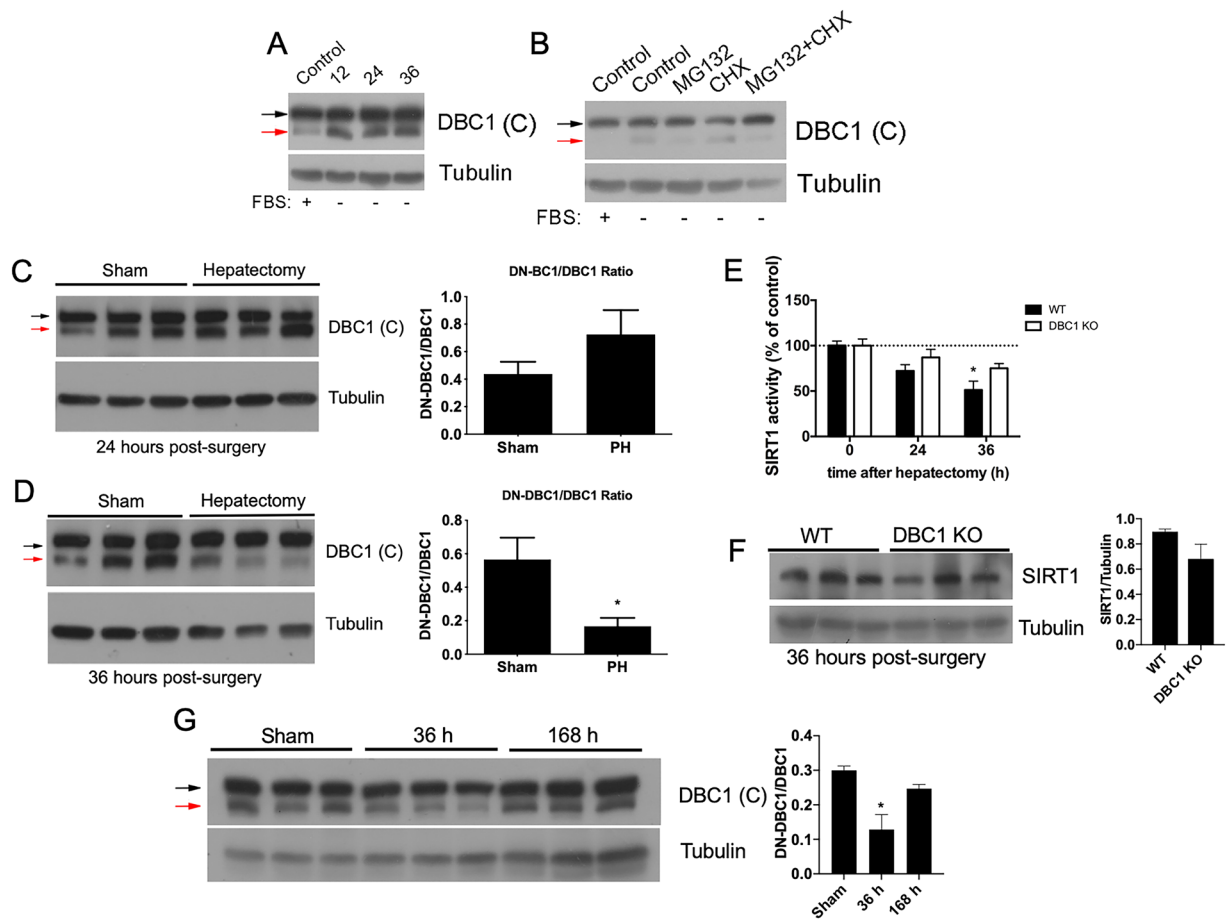


Figure 4. The ratio between DN-DBC1 and DBC1 is dynamically regulated *in vivo* during liver regeneration, affecting SIRT1 function. (A) Human hepatocytes (HepG2) were incubated in serum free media for 12, 24 and 36 hours. (B) HepG2 cells were incubated in the presence (+) and absence of FBS (–) for 24 hours, and later with or without 10 μ M MG132 or 100 μ g/ml Cycloheximide (CHX) for 6 hours. (C,D) Expression of DBC1 and DN-DBC1 in sham mice and 24 (C) or 36 (D) hours after partial hepatectomy (PH). Left, representative western blots. Right, quantitation of DN-DBC1/DBC1 ratio by densitometric analysis. *means $p < 0.05$, t-test. (E) SIRT1 activity was measured in isolated liver nuclei from WT and DBC1 KO mice in sham mice and 24 or 36 hours after partial hepatectomy. Activity was normalized to sham control condition in each genotype. DBC1 KO mice showed increased basal SIRT1 activity (See supplementary information). SIRT1 activity showed significant inhibition in WT mice 36 hours after hepatectomy compared to sham WT mice. *means $p < 0.05$. Two-way ANOVA. (F) SIRT1 levels were measured by western blot in WT and DBC1 KO mice 36 hours after partial hepatectomy. Left, representative western blot. Right, quantitation by western blot densitometry, (G) Representative western blot of DN-DBC1 and DBC1 after 7 days (168 hours) of partial hepatectomy. Left, representative western blot. Right, quantitation by densitometric analysis. *means $p < 0.05$, Two-way ANOVA.

recovery after the surgery (Fig. 5D). Moreover, when we measured liver mass recovery one week after surgery, we found that WT mice fully recovered the original mass, but total liver mass was still lower in the DBC1 KO (Supplementary Fig. S2). Despite this, there was no difference in survival between WT and DBC1 KO mice after surgery (Supplementary Fig. S2). Next, we assessed cell division in WT and DBC1 KO regenerating livers. First, we analyzed liver tissue for mitotic cells 36 hours post-surgery, and we found that livers from DBC1 KO mice showed significantly less mitotic cells (Fig. 6A, arrows and Fig. 6B), suggesting DBC1 KO cells have altered cell proliferation after surgery. However, we measured BrdU incorporation in the regenerating livers from WT and DBC1 KO mice and found no difference between genotypes (Fig. 6C), suggesting that DBC1 KO mice have no compromise in the early response to the liver surgery and cell cycle entry.

Analysis of the expression of different mRNAs coding for cyclins confirmed that DBC1 KO mice had alterations in normal cell cycle progression compared to WT mice. Cyclins showed no significant difference in expression in the early phases of liver regeneration. Moreover, both WT and DBC1 KO mice cyclins A2, D1, and E1 were all up-regulated in the first 24 hours of liver regeneration. However, later on during regeneration, the expression pattern of cyclins started to differ. Cyclin A2 expression became statistically different at 36 hours post-surgery, being higher in the DBC1 KO mice, and remaining higher for as long as 72 hours post-surgery (Fig. 6D). On the other hand, Cyclin D1 levels in WT livers decreased after 72 hours, time where livers were already showing liver mass recovery, while in the DBC1 KO mice failed to go down (Fig. 6D). Cyclin B1, which is normally

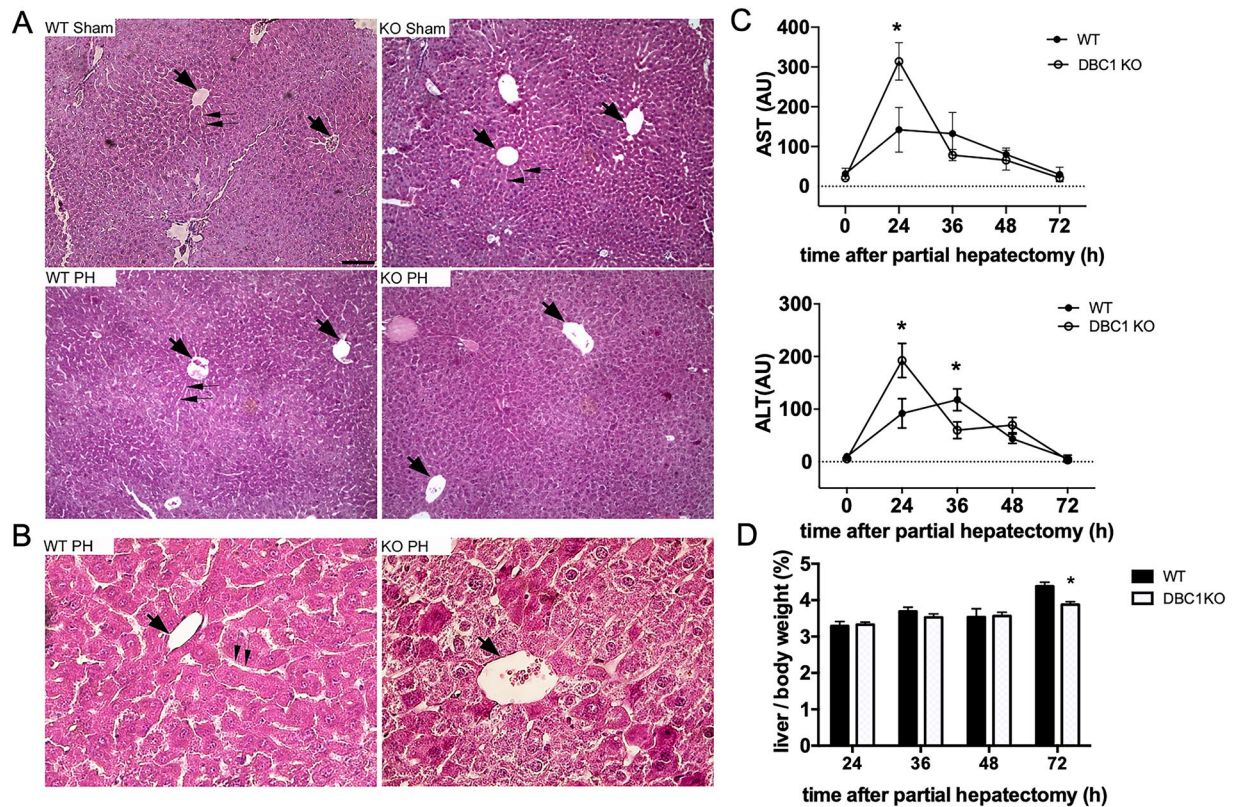


Figure 5. DBC1 KO mice have impaired liver regeneration after partial hepatectomy. (A,B) The cyto-architecture of control (sham) and regenerating livers (PH) differ between WT and DBC1 KO mice. (A) Lobule organization seems to be similar in intact (Sham) livers of WT and KO mice. However, after 72 hours of partial hepatectomy (PH) the lobule organization around the central vein (thick arrows) is almost complete in WT livers. Note that sinusoids (thin arrows) that are being formed in WT livers, are difficult to trace in lobules of DBC1 KO animals. Bar is 200 micrometers. (B) Higher magnification of livers after 72 hours of partial hepatectomy, showing a lobular central vein (thick arrow) and hepatocytes surrounding it to better appreciate the presence of newly formed sinusoids (thin arrows) in WT livers and their absence in KO ones. Bar is 50 micrometers. (C) Aspartate aminotransferase (AST, upper panel) and Alanine aminotransferase (ALT, lower panel) activity measured in plasma of WT and DBC1 KO mice during liver regeneration. * $p < 0.05$, two-way ANOVA (D) Time course of liver mass recovery after partial hepatectomy in WT and DBC1 KO mice. Liver mass was normalized to total body weight. * $p < 0.05$ Unpaired t-test at each time point. Total liver mass was not different between WT and DBC1 KO in sham control mice.

up-regulated prior to mitosis, peaked at 36 hours post hepatectomy in WT mice, with its expression decreasing afterwards. DBC1 KO mice however failed to show a peak at that time. There were no significant differences in Cyclin E1 expression along the time course of the experiment (Fig. 6D). This data suggested that early phases of liver regeneration start normally in DBC1 KO mice, but there might be a later impairment in the normal process of reconstitution of liver mass. Finally, we studied cell cycle progression and duplication in WT and DBC1 KO MEFs after G0 release. We found that similar to what we observed *in vivo*, DBC1 KO MEFs showed a delay in cell division rate upon G0 release (Supplementary Fig. S3), suggesting that restoring of full length DBC1 is necessary for normal cell cycle progression when cells move from a quiescent into an actively dividing state both *in vitro* and *in vivo*.

Discussion

In this study, we show that DBC1 can exist in two different forms, the full length DBC1 and DN-DBC1, which lacks the N-terminal region. We show that DN-DBC1 appears in quiescent cells and is produced by proteolytic cleavage of pre-existing DBC1. Moreover, the balance between these two forms is dynamically regulated *in vitro* and *in vivo*. We mapped the missing sequence in DN-DBC1, showing that this protein lacks the first 124–138 amino acid residues, which includes the S1-like domain. Importantly, we show that DN-DBC1 does not bind to SIRT1. Finally, we show that DBC1 and DN-DBC1 are differentially regulated *in vivo* during liver regeneration and that DBC1 KO mice have delayed liver regeneration after partial hepatectomy by a mechanism probably involving dysregulation of normal cell cycle progression.

Until now, most of the evidence regarding the role of DBC1 in the control of cell cycle were obtained *in vitro* using transformed cells. Understanding how DBC1 is regulated in normal cells and tissues is vital not only to assess its function in normal physiological conditions but also in cancer. Our results show for the first time that

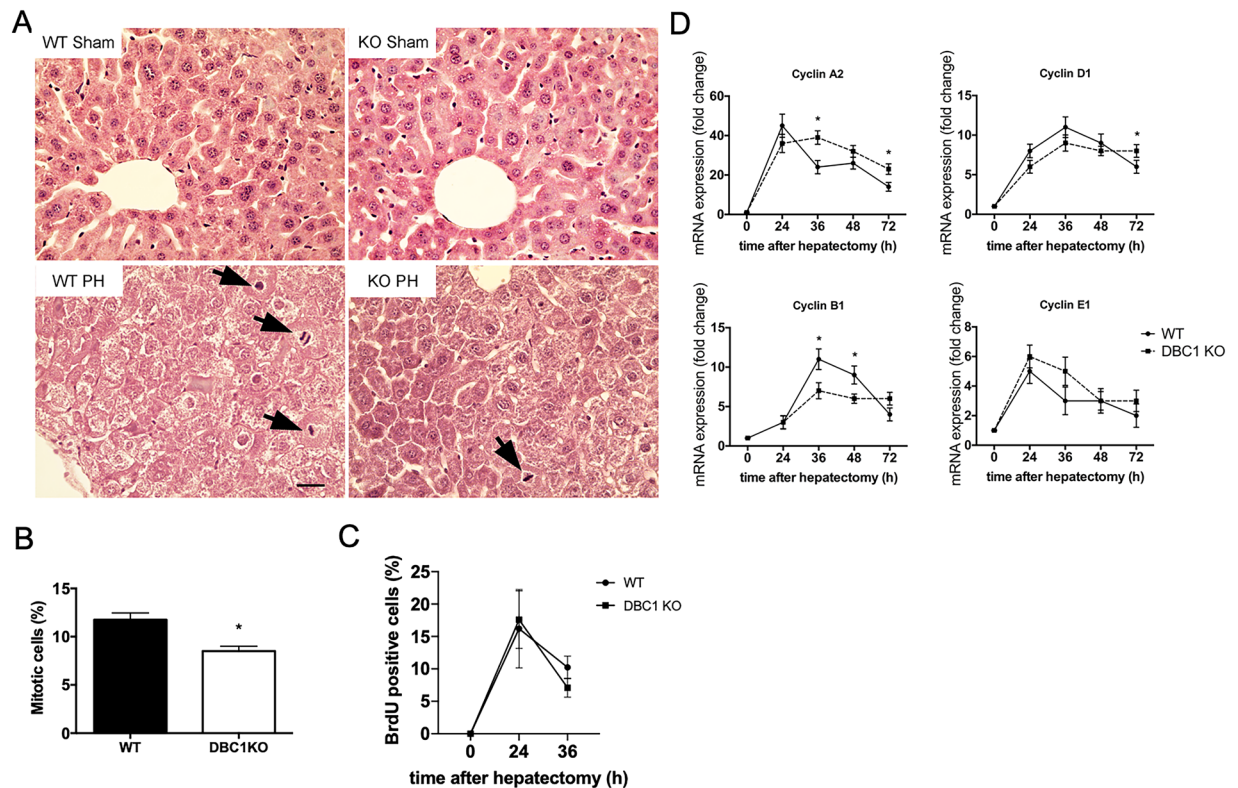


Figure 6. Absence of DBC1 impairs cell cycle progression after cells leave quiescence *in vivo*. **(A)** Representative H&E pictures of sham (upper panels) and regenerating (PH, lower panels) livers obtained from WT (left panels) and DBC1 KO mice (right panels) 36 hours after partial hepatectomy. Arrowheads show cells undergoing mitosis. **(B)** Quantitation of percent of mitotic cells. Mitotic cells were quantified in double-blinded experiments from H&E-stained sections. * $p < 0.05$, two tailed unpaired t-test. **(C)** Quantitation of BrdU incorporation into livers of WT and DBC1 KO mice at 0, 24, and 36 hours after partial hepatectomy. BrdU (100 mg/kg) was injected i.p. 2 hours before euthanasia. BrdU positive cells were quantified as percent of total cells. **(D)** Time course of cell cycle progression markers from WT and DBC1 KO livers during regeneration. * $p < 0.05$, Two-way ANOVA between groups.

DBC1 is involved in normal cell cycle control *in vitro* and *in vivo*. We found that, in quiescent cells *in vitro* as well as in resting liver cells, there is a short form of DBC1 (DN-DBC1), which is rapidly down-regulated when quiescent cells re-enter into the cell cycle. Proteolytic processing of DBC1 under different conditions has been previously proposed. Two previous reports suggested the appearance of a short form of DBC1 which, under their experimental conditions was linked to apoptosis^{32,33}. Different to their findings, we found that at least in quiescent cells, induction of apoptosis by etoposide leads to the loss of DN-DBC1 rather than its appearance. We cannot exclude that DN-DBC1 or other different proteolytic processing of the protein could be produced in other contexts of cellular apoptosis. However, we believe that this novel form of DBC1 is mainly expressed in quiescent cells and that this regulation may be lost in transformed malignant cells. Importantly, DN-DBC1 is also lost in a cellular model of cellular senescence. Although further work should be conducted using other models of cellular senescence, our findings suggest that the DBC1/DN-DBC1 ratio could be a marker of different types of cell cycle arrest. In fact, it has been recently shown that SIRT1 regulates SASP³⁷ suggesting that down-regulation of DN-DBC1 may be required for the establishment of the SASP in senescent cells. The fact that DN-DBC1 is lost both in quiescent cells that undergo apoptosis and in senescent cells suggest that DN-DBC1 is not only a marker of quiescent cells. We speculate that down-regulation of DN-DBC1 is a key regulatory event in the decision of the cellular fate upon leaving quiescence, either to re-enter cell cycle, to undergo apoptosis, or to go into cellular senescence.

DN-DBC1 appears to be an inactive form of the protein, at least in terms of SIRT1 inhibition. It is puzzling the fact that in some cases, the presence of DN-DBC1 correlates with clear decay in DBC1, while in other instances this correlation is not evident. Although we cannot provide an answer for this apparent inconsistency, we believe that it could be due to different equilibrium dynamics among cell types or perhaps a reflection of cell culture heterogeneity. This issue needs further investigation and is important in order to understand the dynamics of DN-DBC1 and its biological functions. Mapping of the cleavage sequence of DBC1 showed that DN-DBC1 is missing the first 124–138 residues, thus losing only the S1-like domain. Still, DN-DBC1 was not able to bind SIRT1, which is in line with a recent report showing that DBC1 uses the S1-like binding domain in order to bind and regulate SIRT1¹⁵. The fact that DN-DBC1 does not bind SIRT1 has important implications in terms of understanding how the SIRT1-DBC1 interaction is regulated. It was originally reported that DBC1 binds SIRT1 via its LZ domain^{2,3}. It was later suggested that the N-terminal sequence of DBC1 is also important for SIRT1 binding,

but no definitive evidence was provided¹³. Our findings show that a naturally existing form of DBC1 that does not bind SIRT1 is regulated during the cell cycle and it is mainly present during G0, implicating that SIRT1 might not be targeted by DBC1 in quiescent cells.

It is worth noticing that most of the binding partners and molecular targets of DBC1, like ER, p53, BRCA1 have been mapped to bind DBC1 through its LZ and N-terminal domains¹. Based on this data, it is plausible that DN-DBC1 might not only lose its ability to bind SIRT1 but also other targets. In fact, BRCA1 and p53 are key regulators of cell cycle control with major roles in cancer^{38,39}. Our experimental evidence cannot rule out a putative role of either BRCA1 or p53 in the DBC1-dependent effects observed when cells leave quiescence. Interestingly, besides being targets of DBC1, both p53 and BRCA1 activity are directly regulated by SIRT1 activity^{40,41}. The interplay among all these proteins is complex and understanding its regulation goes beyond the aim of this work. However, the possibility that DN-DBC1 is also inactive in regulating p53 and BRCA1 may have major implications in cell cycle control and cancer, so it will be further investigated. In addition, the S1-like binding domain of DBC1 seems to go beyond the regulation of protein-protein interaction. It was shown recently that DBC1 binds to the lncRNA MALAT1 regulating its biological activity¹⁴. The binding of DBC1 to MALAT1 was mapped to the N-terminal domain of DBC1. It is possible that the specific loss of the S1-like RNA binding domain in DBC1 has important implications in the regulation of MALAT1 and possibly other RNAs.

We show here that DBC1 KO mice have impaired liver regeneration. In fact, we show that SIRT1 activity inhibition observed in WT mice during early steps of liver regeneration is not present in livers from DBC1 KO mice. Interesting, a recent report using transgenic SIRT1 overexpressing mice showed impaired liver regeneration compared to WT mice²⁷. Our results are in accordance with those findings and although we do not provide a direct link between SIRT1 over-activation and altered liver regeneration in DBC1 KO mice, it is plausible that this could be the case. In addition, since DBC1 has many other protein targets besides SIRT1, we cannot rule out that other mechanisms exceeding SIRT1 regulation are taking place in the DBC1 KO mice. It is interesting the fact that livers from DBC1 KO mice show a delay in cell cycle progression after S phase, with a decreased percent of mitotic cells compared to WT mice, suggesting that liver cells get delayed in the G2/M transition. Similar results were obtained in MEFs. Importantly, previous reports using U2OS cells have shown Dbc1 to be necessary for a correct G2/M transition through a yet unknown mechanism⁴². It is possible then, that during liver regeneration, DBC1 KO cells are delayed in the G2/M transition of the cell cycle, slowing down cell cycle and affecting mass liver recovery. Further investigation will be needed in order to clearly determine if this is the mechanism operating.

Finally, our results also bring new insights into the role of DBC1 in the regulation of cell cycle, which are likely to be relevant to understand the reported function of DBC1 in cancer. Traditionally it has been proposed that absence of DBC1 promotes tumorigenesis^{6,7,42–45}, although this view may not be accurate for all cancers⁴⁶. In fact, many studies in cancer have been conducted using antibodies against the N-terminal sequences of DBC1^{45–53}, raising the possibility that DBC1 expression could have been underestimated because of failure to detect DN-DBC1. Thus, we believe that the role of DBC1 in cancer and its value as a predictor marker may need to be re-evaluated.

Conclusions

This work contributes substantial novel findings about the role of DBC1 in the regulation of liver regeneration, providing novel insights about the role of DBC1 in the regulation of liver function. Our findings also bring knowledge about the role of DBC1 in cell cycle regulation, which we believe is important to understand its function not only in liver regeneration but also in cancer. Additionally, the fact that DN-DBC1 no longer binds to SIRT1 brings new questions about the regulation of the SIRT1/DBC1 interaction and possibly about other molecular targets of DBC1. Finally, whether DN-DBC1 is just an inactive form of DBC1 or it has acquired novel roles different from those of DBC1 will need to be further investigated.

References

- Chini, E. N., Chini, C. C., Nin, V. & Escande, C. Deleted in breast cancer-1 (DBC-1) in the interface between metabolism, aging and cancer. *Biosci Rep* **33**, <https://doi.org/10.1042/BSR20130062> (2013).
- Kim, J. E., Chen, J. & Lou, Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* **451**, 583–586 (2008).
- Zhao, W. *et al.* Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* **451**, 587–590, <https://doi.org/10.1038/nature06515> (2008).
- Escande, C. *et al.* Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J Clin Invest* **120**, 545–558, <https://doi.org/10.1172/JCI39319> (2010).
- Chini, C. C., Escande, C., Nin, V. & Chini, E. N. HDAC3 is negatively regulated by the nuclear protein DBC1. *J Biol Chem* **285**, 40830–40837, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.153270> (2010).
- Qin, B. *et al.* DBC1 functions as a tumor suppressor by regulating p53 stability. *Cell reports* **10**, 1324–1334 (2015).
- Hiraikie, H. *et al.* Identification of DBC1 as a transcriptional repressor for BRCA1. *Br J Cancer* **102**, 1061–1067, <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605577> (2010).
- Fu, J. *et al.* Deleted in breast cancer 1, a novel androgen receptor (AR) coactivator that promotes AR DNA-binding activity. *J Biol Chem* **284**, 6832–6840, <https://doi.org/10.1074/jbc.M808988200> (2009).
- Yu, E. J. *et al.* Reciprocal roles of DBC1 and SIRT1 in regulating estrogen receptor alpha activity and co-activator synergy. *Nucleic Acids Res* **39**, 6932–6943, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr347> (2011).
- Trauernicht, A. M., Kim, S. J., Kim, N. H. & Boyer, T. G. Modulation of estrogen receptor alpha protein level and survival function by DBC-1. *Mol Endocrinol* **21**, 1526–1536 (2007).
- Chini, C. C., Escande, C., Nin, V. & Chini, E. N. DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1) modulates the stability and function of the nuclear receptor Rev-erbalpha. *Biochem J* **451**, 453–461, <https://doi.org/10.1042/BJ20121085> (2013).
- Li, J. *et al.* A conserved NAD⁺ binding pocket that regulates protein-protein interactions during aging. *Science* **355**, 1312–1317 (2017).
- Li, Z. *et al.* Inhibition of SUV39H1 methyltransferase activity by DBC1. *J Biol Chem* **284**, 10361–10366, <https://doi.org/10.1074/jbc.M900956200> (2009).
- Chen, R. *et al.* Quantitative proteomics reveals that long non-coding RNA MALAT1 interacts with DBC1 to regulate p53 acetylation. *Nucleic acids research* **45**, 9947–9959 (2017).

15. Krzysiak, T. C. *et al.* An insulin-responsive sensor in the SIRT1 disordered region binds DBC1 and PACS-2 to control enzyme activity. *Molecular cell* **72**, 985–998. e987 (2018).
16. Escande, C. *et al.* Deleted in breast cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype. *Diabetes* **64**, 12–22. <https://doi.org/10.2337/db14-0192> (2015).
17. Lau, A. W., Liu, P., Inuzuka, H. & Gao, D. SIRT1 phosphorylation by AMP-activated protein kinase regulates p53 acetylation. *Am J Cancer Res* **4**, 245–255 (2014).
18. Nin, V. *et al.* Role of deleted in breast cancer 1 (DBC1) protein in SIRT1 deacetylase activation induced by protein kinase A and AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* **287**, 23489–23501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.365874> (2012).
19. Chang, C. *et al.* AMPK-dependent phosphorylation of GAPDH triggers Sirt1 activation and is necessary for autophagy upon glucose starvation. *Molecular cell* **60**, 930–940 (2015).
20. Yuan, J., Luo, K., Liu, T. & Lou, Z. Regulation of SIRT1 activity by genotoxic stress. *Genes Dev* **26**, 791–796. <https://doi.org/10.1101/gad.188482.112> (2012).
21. Pangon, L. *et al.* MCC inhibits beta-catenin transcriptional activity by sequestering DBC1 in the cytoplasm. *International journal of cancer* **136**, 55–64 (2015).
22. Nin, V., Chini, C. C., Escande, C., Capellini, V. & Chini, E. N. Deleted in breast cancer 1 (DBC1) protein regulates hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem* **289**, 5518–5527. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.512913> (2014).
23. Escande, C. *et al.* Deleted in Breast Cancer 1 regulates cellular senescence during obesity. *Aging Cell* **13**, 951–953. <https://doi.org/10.1111/acer.12235> (2014).
24. Qiang, L. *et al.* Brown Remodeling of White Adipose Tissue by SirT1-Dependent Deacetylation of Pparggamma. *Cell* **150**, 620–632. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.027> (2012).
25. Forbes, S. J. & Newsome, P. N. Liver regeneration—mechanisms and models to clinical application. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* **13**, 473 (2016).
26. Kawasaki, S. *et al.* Liver regeneration in recipients and donors after transplantation. *The Lancet* **339**, 580–581 (1992).
27. García-Rodríguez, J. L. *et al.* SIRT1 controls liver regeneration by regulating bile acid metabolism through farnesoid X receptor and mammalian target of rapamycin signaling. *Hepatology* **59**, 1972–1983 (2014).
28. Mitchell, C. & Willenbring, H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nature protocols* **3**, 1167 (2008).
29. Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9363–9367 (1995).
30. Aksoy, P. *et al.* Regulation of SIRT 1 mediated NAD dependent deacetylation: a novel role for the multifunctional enzyme CD38. *Biochem Biophys Res Commun* **349**, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.066> (2006).
31. Lima, A. *et al.* Serine/threonine protein kinase PrkA of the human pathogen *Listeria monocytogenes*: biochemical characterization and identification of interacting partners through proteomic approaches. *J Proteomics* **74**, 1720–1734. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.005> (2011).
32. Sundararajan, R., Chen, G., Mukherjee, C. & White, E. Caspase-dependent processing activates the proapoptotic activity of deleted in breast cancer-1 during tumor necrosis factor-alpha-mediated death signaling. *Oncogene* **24**, 4908–4920. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208681> (2005).
33. Giguère, S. S. *et al.* The proteomic profile of deleted in breast cancer 1 (DBC1) interactions points to a multi-faceted regulation of gene expression. *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp. M115. 054619 (2015).
34. White, R. R. *et al.* Comprehensive transcriptional landscape of aging mouse liver. *BMC Genomics* **16**, 899. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2061-8> (2015).
35. Robinson, J. T. *et al.* Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**, 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754> (2011).
36. Vaquero, A. *et al.* Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Molecular cell* **16**, 93–105 (2004).
37. Hayakawa, T. *et al.* SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. *PLoS one* **10**, e0116480 (2015).
38. Bykov, V. J. N., Eriksson, S. E., Bianchi, J. & Wiman, K. G. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **18**, 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.109> (2018).
39. Roy, R., Chun, J. & Powell, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* **12**, 68–78. <https://doi.org/10.1038/nrc3181> (2011).
40. Li, D. *et al.* A novel crosstalk between BRCA1 and sirtuin 1 in ovarian cancer. *Scientific reports* **4**, 6666 (2014).
41. Vaziri, H. *et al.* hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**, 149–159 (2001).
42. Tanikawa, M. *et al.* Role of multifunctional transcription factor TFII-I and putative tumour suppressor DBC1 in cell cycle and DNA double strand damage repair. *British journal of cancer* **109**, 3042 (2013).
43. Ji, Y. E. *et al.* Reciprocal roles of DBC1 and SIRT1 in regulating estrogen receptor {alpha} activity and co-activator synergy. *Nucleic Acids Res* **39**, 6932–6943. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr347> (2011).
44. Koyama, S. *et al.* Repression of estrogen receptor beta function by putative tumor suppressor DBC1. *Biochem Biophys Res Commun* **392**, 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.025> (2010).
45. Izumi, H. *et al.* Frequent silencing of DBC1 is by genetic or epigenetic mechanisms in non-small cell lung cancers. *Hum Mol Genet* **14**, 997–1007. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi092> (2005).
46. Zhang, Y. *et al.* DBC1 is over-expressed and associated with poor prognosis in colorectal cancer. *International journal of clinical oncology* **19**, 106–112 (2014).
47. Ha, S. Y. *et al.* Expression of DBC1 is associated with poor prognosis in hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma. *Pathology-Research and Practice* **212**, 616–621 (2016).
48. Won, K. Y. *et al.* High DBC1 (CCAR2) expression in gallbladder carcinoma is associated with favorable clinicopathological factors. *International journal of clinical and experimental pathology* **8**, 11440 (2015).
49. Noguchi, A. *et al.* SIRT1 expression is associated with a poor prognosis, whereas DBC1 is associated with favorable outcomes in gastric cancer. *Cancer medicine* **3**, 1553–1561 (2014).
50. Kim, J. R. *et al.* Expression of SIRT1 and DBC1 is associated with poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PLoS one* **8**, e74738 (2013).
51. Park, H. S. *et al.* Expression of DBC1 and androgen receptor predict poor prognosis in diffuse large B cell lymphoma. *Translational oncology* **6**, 370–381 (2013).
52. Sung, J. Y., Kim, R., Kim, J. E. & Lee, J. Balance between SIRT1 and DBC1 expression is lost in breast cancer. *Cancer science* **101**, 1738–1744 (2010).
53. Cha, E. J. *et al.* Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis of gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* **15**, 4453–4459. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3329> (2009).

Acknowledgements

The authors would like to thank all the people at the Animal Facility Unit at Institut Pasteur Montevideo (UATE). The authors would like to thank Helle Zimbrandsten (Department of Clinical Medicine, The Research Laboratory for Biochemical Pathology, Aarhus University, Aarhus, Denmark) for technical assistance with human liver tissue, Dr. Rafael Radi (Facultad de Medicina, UdelaR, Uruguay) for helpful discussions. This work was supported by grants by ANII (FCE_1_2014_1_104002 and INNOVA II to CE) and FOCEM.

Author Contributions

L.S. and L.C. performed most experiments. P.C. and A.C. developed and performed surgeries. A.L., A.J.C. and R.D. did mass spectrometry analysis. M.B. contributed with BrdU incorporation experiments and MEFs purification. C.C. generated mutants and did interaction experiments. A.J.C. performed pull-down assays in liver. F.I. and V.P. performed experiments in human cells. I.M. and C.Q. contributed with RAS-induced cellular senescence model and results. JRS-S performed *in-silico* analysis for splicing variants. MHV was responsible for tissue manipulation and processing of human liver samples. CE conceived the idea and designed the experiments. E.N.C., C.C., A.J.C., J.L.B. and C.E. discussed results and wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50789-7>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.


Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

BBS4 regulates the expression and secretion of FSTL1, a protein that participates in ciliogenesis and the differentiation of 3T3-L1

Victoria Prieto-Echagüe^{1,2}, Sukanya Lodh³, Laura Colman^{2,4}, Natalia Bobba^{2,4}, Leonardo Santos^{2,4}, Nicholas Katsanis⁵, Carlos Escande^{2,4}, Norann A. Zaghoul³ & Jose L. Badano^{1,2}

Bardet-Biedl syndrome is a model ciliopathy. Although the characterization of BBS proteins has evidenced their involvement in cilia, extraciliary functions for some of these proteins are also being recognized. Importantly, understanding both cilia and cilia-independent functions of the BBS proteins is key to fully dissect the cellular basis of the syndrome. Here we characterize a functional interaction between BBS4 and the secreted protein FSTL1, a protein linked to adipogenesis and inflammation among other functions. We show that BBS4 and cilia regulate FSTL1 mRNA levels, but BBS4 also modulates FSTL1 secretion. Moreover, we show that FSTL1 is a novel regulator of ciliogenesis thus underscoring a regulatory loop between FSTL1 and cilia. Finally, our data indicate that BBS4, cilia and FSTL1 are coordinated during the differentiation of 3T3-L1 cells and that FSTL1 plays a role in this process, at least in part, by modulating ciliogenesis. Therefore, our findings are relevant to fully understand the development of BBS-associated phenotypes such as obesity.

The ciliopathies are a group of human genetic diseases characterized by an overlapping set of phenotypes including cystic kidney disease, retinal degeneration, central nervous defects, polydactyly, diabetes and obesity. This group of disorders presents a common cellular defect: problems in the formation, maintenance and/or function of primary cilia^{1–3}. These cellular organelles have been shown to concentrate receptors for a number of paracrine signaling pathways and to participate in sensing and transducing mechanical and chemical cues^{4,5}.

One pleiotropic ciliopathy is Bardet-Biedl syndrome (BBS), where patients present, with variable penetrance, the majority of phenotypes that have been associated with cilia dysfunction⁶. To date, 21 BBS genes have been identified and for the subset of which there has been a functional characterization, the corresponding proteins were associated with the formation and function of cilia^{7–13}. Most BBS proteins localize to the base of cilia, the basal body, and can also enter the cilium. A complex of BBS proteins, termed the BBSome, composed of BBS1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, and 18/BBIP1/BBIP10 plays a role in vesicle trafficking, transporting ciliary components to the base of the cilium and its interior^{14–17}. Other BBS proteins participate in the assembly (BBS6, 10, 12)^{15, 18, 19} and the recruitment (BBS3) of the BBSome to the ciliary membrane¹⁶, or regulate entrance into the cilium (BBS17)¹³. The BBS proteins have been shown to participate in the regulation of cilia/basal body-associated signaling pathways such as Wnt and Shh^{20–22}. In addition, multiple reports support a broader role for the BBS proteins in intracellular trafficking. For example, knockdown of different Bbs genes in zebrafish results in defective melanosome transport and BBS proteins transport the insulin and leptin receptors to the plasma membrane^{23–25}. We have shown recently that BBS1 and BBS4 regulate endosomal trafficking of the Notch receptor and its recycling to the plasma membrane²⁶. Therefore, understanding the role of BBS proteins and the BBSome, both in the cilium and outside of it, is critical to dissect the cellular basis of BBS.

¹Human Molecular Genetics Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo, CP11400, Uruguay. ²INDICyO Institutional Program, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo, CP11400, Uruguay. ³Division of Endocrinology, Diabetes, and Nutrition, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, 21201, USA. ⁴Metabolic Diseases and Aging Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo, CP11400, Uruguay. ⁵Department of Cell Biology and Center for Human Disease Modeling, Duke University Medical Center, Durham, NC, 27710, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.L.B. (email: jbadano@pasteur.edu.uy)

One hallmark of BBS is obesity, which is thought to have two major components. A hypothalamic/ neuro-endocrine dysfunction is thought to be critical in the development of obesity in the ciliopathies as feeding/ satiety signaling is altered, likely due to the mislocalization of signaling receptors on neuronal cilia. Recent data is also highlighting an important role of the BBS proteins and cilia in maintaining peripheral tissue homeostasis, particularly in adipose tissue^{10,27–29}. Several BBS proteins have been shown to change their abundance during adipogenesis while cilia are lost in mature adipocytes^{30,31}. Depletion of BBS10 and BBS12 results in impaired ciliogenesis in differentiating adipocytes and increased adipogenesis³¹ while BBS4 was also shown to directly affect adipocyte proliferation and differentiation³². However, the mechanisms by which BBS proteins influence adipocyte differentiation remain to be elucidated.

Here we investigated a functional interaction between BBS4 and follistatin-like 1 (FSTL1). *FSTL1* was identified originally as a TGF- β 1 regulated gene in a mouse osteoblastic cell line and encodes for a secreted glycoprotein³³, downregulation of which correlates with myocyte and adipocyte differentiation^{34,35}. In addition, FSTL1 has also been proposed to be a regulator of inflammation and may play a role in inflammation related to obesity and insulin resistance^{36–38}. Therefore, FSTL1 has been linked to processes potentially relevant to the pathogenesis of the BBS phenotype, particularly obesity. Here we show that both BBS4 and, more broadly, cilia, regulate the levels of secreted FSTL1 but through discrete mechanisms. While cilia dysfunction results in a reduction in *FSTL1* mRNA levels, knockdown of BBS4 affects both *FSTL1* mRNA and the secretion of the protein. We show that disrupting BBS4 function results in accumulation of FSTL1 in lysosomes, where it is degraded. Importantly, we also report that FSTL1 is not only regulated by the cilium but in turn can modulate ciliogenesis in a cell non-autonomous manner. Finally, our data indicate that BBS4, FSTL1 and the cilium are co-regulated during the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes, and this process can be affected by modulating the levels of FSTL1. Taken together, our data further support a role for the BBS proteins in intracellular trafficking. Moreover, we report a novel function for FSTL1 in the regulation of ciliogenesis and demonstrate a role for FSTL1 in modulating the differentiation of 3T3-L1 cells.

Results

BBS4 knockdown results in a reduction of FSTL1 intracellular and secreted levels. BBS4 contains a series of tetratricopeptide repeats (TPRs) arranged in tandem, a motif typically involved in mediating protein-protein interactions^{39,40}, and is incorporated into the BBSome at the end of the assembly process¹⁸. Thus, it could play a role acting as an adaptor between the BBSome and its targets¹⁰. Through a yeast two-hybrid screen using full length BBS4 as bait we previously identified PCM1 and RPN10, thus providing insight into the function of BBS4 and the BBSome complex^{20,40}. In that original screen we also isolated a prey construct containing 762 bp of the *FSTL1* coding region cloned in frame with the myristoylation domain of the pMyr vector and encoding 253 out of the 308 residues of FSTL1 (from residue E56 to the stop codon; reference sequence NM_007085, NP_009016; Fig. S1).

As mentioned above, FSTL1 has been shown to participate in processes likely relevant to the pathogenesis of BBS. Thus, here we focused on determining whether there is a functional link between BBS4 and FSTL1. We first assessed FSTL1 mRNA and protein levels in cells with depleted BBS4. We used a double stranded RNA oligonucleotide (dsRNA) to specifically target *BBS4* by siRNA in hTERT-RPE1 cells (Fig. S2A,B). We chose this ciliated cell line because i) a secretome analysis showed that hTERT-RPE1 cells express and secrete FSTL1⁴¹ and ii) these cells have been used to study ciliogenesis¹⁷. We evaluated the levels of FSTL1 48 hours after BBS4 knockdown (KD) observing a significant decrease in FSTL1 abundance, both intracellular and secreted (Fig. 1A and C). To test whether this effect was linked to the role of the BBS proteins in primary cilia, we targeted the intraflagellar protein IFT88 using our previously validated dsRNA⁴² (Fig. S2A). *IFT88* KD resulted in an approximately 50% reduction in both intracellular and secreted FSTL1 (Fig. 1B,C). To study whether this function of BBS4 occurs in the context of the BBSome, we targeted the complex core protein BBS2^{17,18}. Similarly, FSTL1 secretion was reduced by 60% in BBS2 KD cells (Fig. 1D,E). In contrast, the secretion of laminin, an unrelated extracellular matrix constituent, was not altered by BBS4 KD (Fig. 1F). Thus, our results suggest a specific effect of BBS4, BBS2 and cilia on FSTL1 levels.

The decrease in FSTL1 intracellular protein levels could be explained by changes in the levels of transcript. Using real time quantitative PCR (RTqPCR) we found a 60% reduction of *FSTL1* mRNA in *BBS4* KD cells and a 70% and 90% reduction upon *BBS2* and *IFT88* KD respectively (Fig. 1G). Taken together, our results indicate that BBS2, BBS4 and IFT88/cilia regulate the levels of *FSTL1* mRNA and thus affect the amount of protein in the extracellular space.

BBS4 and cilia regulate FSTL1 levels by different mechanisms. Since we observed that cilia are important for *FSTL1* gene expression, depleting the BBS proteins could impact *FSTL1* expression by affecting ciliary function. However, while knockdown of BBS4 and IFT88 produced a comparable reduction in FSTL1 protein abundance (50 to 60%; Fig. 1C), the IFT88 knockdown produced a 90% reduction on *FSTL1* mRNA levels compared to the 50% reduction caused by knocking down BBS4 (Fig. 1G). Thus, BBS4 could regulate FSTL1 levels through additional mechanisms.

BBS4 has been shown to participate in protein turnover^{20,43} and trafficking^{26,44}. Thus, we tested whether FSTL1 protein stability was altered in BBS4 KD cells. We therefore treated BBS4 and IFT88 KD cells with the proteasome inhibitor MG132. Inhibiting proteasome-mediated degradation (Fig. 2A lower panel) did not produce a significant increase in FSTL1 levels (Fig. 2A upper panel). Next, we established a working dose of chloroquine to inhibit lysosomal degradation of proteins as evidenced by the accumulation of LC3BII (Fig. S3). Chloroquine treatment restored intracellular FSTL1 levels in BBS4 KD cells to that of controls but did not affect the levels of secreted FSTL1 (Fig. 2B upper panel, 2C and 2D). In contrast, chloroquine did not rescue the IFT88 KD-mediated drop in FSTL1 intracellular levels (Fig. 2B lower panel, 2E and 2F). Taken together our data suggest that the decrease

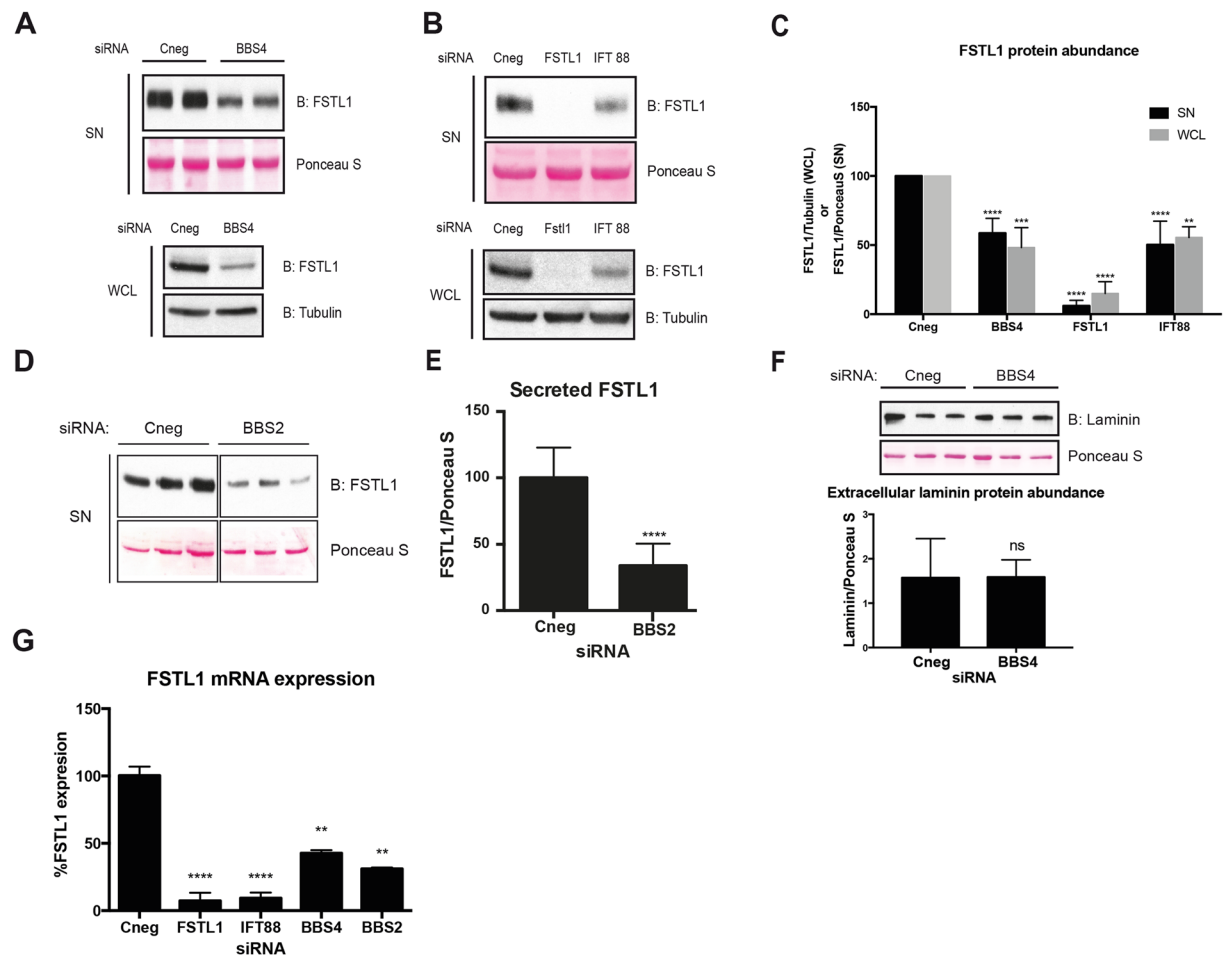


Figure 1. Cilia, BBS4 and BBS2 knockdown result in a reduction of intracellular and secreted FSTL1. (A) hTERT-RPE1 cells were transfected with control siRNA (Cneg) or siRNA *BBS4* to produce BBS4 knock-down (BBS4). Secreted FSTL1 and intracellular FSTL1 levels were analyzed in cell culture media (SN) and whole cell lysates (WCL) respectively by Western blot using anti-FSTL1. Full-length blots are shown in Figure S7A. (B) hTERT-RPE1 cells were transfected with siRNA to target *FSTL1* and *IFT88* or siRNA Cneg. Secreted FSTL1 and intracellular FSTL1 were analyzed in SN and WCL respectively by Western blot using anti-FSTL1. In both A and B Ponceau S staining of an unspecific blotted protein and anti- α tubulin were used as loading controls to normalize FSTL1 abundance. Full-length gels are shown in Figure S7D. (C) Quantitative representation of densitometry readings of 3 combined experiments shown in (A) and (B). BBS4-KD cells show reduced levels of both intra- and extracellular FSTL1. (D) hTERT-RPE1 cells were transfected with siRNA BBS2 or siRNA Cneg and secreted FSTL1 was analyzed by Western blot anti-FSTL1 and Ponceau S staining was used to normalize. The Cneg and BBS2 KD set of lanes were cropped from the same blot. Full-length blots are shown in Figure S7E. (E) Densitometry readings of Western blot shown in (D). The results shown are representative of two independent experiments. (F) SN of hTERT-RPE1 cells transfected with siRNA *BBS4* were analyzed by Western blot with anti-Laminin and Ponceau S staining to normalize (upper panel). Densitometry readings of the western blot showed that BBS4-KD does not affect Laminin secretion (lower panel). The full-length blot is shown in Figure S7F. (G) qRT-PCR was performed to analyze *FSTL1* gene expression in hTERT-RPE1 cells transfected with the following siRNAs: Cneg, *BBS4*, *FSTL1*, *IFT88* and *BBS2*. *FSTL1* mRNA levels are represented as % expression relative to control siRNA (Cneg)-transfected cells. *FSTL1* expression is reduced by BBS2 and BBS4 KD cells as well as by IFT88/cilia knockdown. Data from at least two independent experiments, designed with biological duplicates, and three technical replicates were normalized relative to Cneg siRNA transfected cells and combined for the analysis. In all cases, error bars represent standard deviation. **: $P = 0,001-0,01$; ***: $P = 0,0001-0,001$ and ****: $P < 0,0001$, ANOVA or t-test.

in FSTL1 secretion caused by BBS4 depletion has two main components: i) a likely cilia-mediated effect of BBS4 regulating *FSTL1* mRNA levels and ii) a role whereby BBS4 depletion promotes the degradation of FSTL1 in the lysosome.

FSTL1 is a secreted protein that presumably uses the constitutive secretory pathway through the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. In agreement with previous reports³⁷, our confocal microscopy analysis showed a wide cytoplasmic distribution of FSTL1 in punctate structures consistent with intracellular vesicles (Fig. 3). Given the diffuse nature of the FSTL1 localization pattern, we calculated Manders co-localization coefficients^{45,46}.

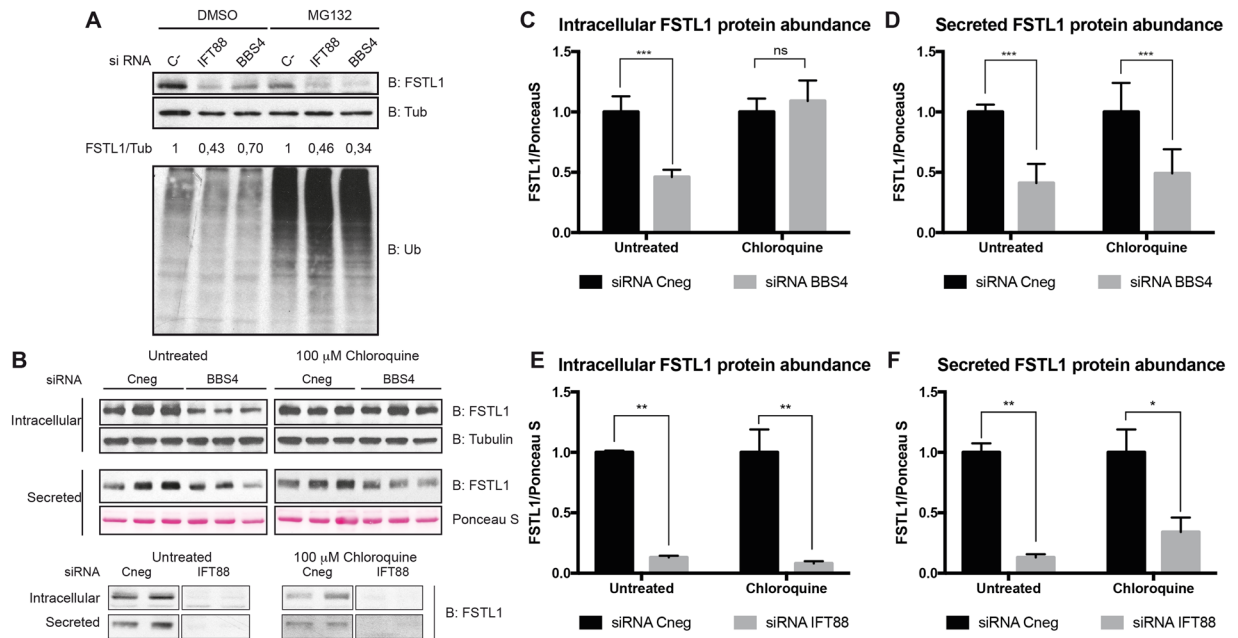


Figure 2. Lysosome inhibition rescues the FSTL1 degradation induced by BBS4 knockdown. **(A)** hTERT-RPE1 cells were transfected with siRNA Cneg, siRNA *IFT88* or siRNA *BBS4* for 48 hours and incubated for 6 hours with MG132. Cell lysates were analyzed by Western blot anti-FSTL1, anti α tubulin and anti-Ubiquitin. Full-length blots are shown in Figure S8A. **(B)** hTERT-RPE1 cells were transfected with siRNA Cneg, siRNA *BBS4* (top panel) or siRNA *IFT88* (bottom panel; for each condition, lanes cropped from the same gel are shown) during 24 hours and incubated with chloroquine for an additional 24 hours. Full-length blots are shown in Figure S8B. **(C–F)** Quantification of experiment shown in **(B)**. Densitometry readings were used to calculate ratios of FSTL1/Tubulin to quantitate intracellular FSTL1 and FSTL1/Poncaeu S to measure secreted FSTL1. Chloroquine treatment rescued intracellular levels of FSTL1 without affecting its extracellular abundance. Results shown are representative of three independent experiments performed with biological triplicates or duplicates as shown. Error bars represent standard deviation and ns: $P > 0.05$; *: $P = 0.01–0.05$; **: $P = 0.001–0.01$; ***: $P = 0.0001–0.001$, ANOVA test.

FSTL1 colocalized with Calnexin (ER), Golgin 97 (Golgi) and LAMP2 (lysosomes; Fig. 3A–D). Upon BBS4 KD, we did not observe consistent changes of FSTL1 colocalization with ER or Golgi markers (not shown). In contrast, the depletion of BBS4 resulted in a significant increase of the co-localization coefficients of FSTL1 with LAMP2 from $M = 0.36$ to $M = 0.53$ (Fig. 3C,D; $P < 0.0001$). Therefore, these data reinforce our previous biochemical results indicating that in BBS4 KD cells FSTL1 accumulates in lysosomes.

Secreted FSTL1 plays a role in ciliogenesis. Given the known link between the BBS proteins and cilia, we next tested whether FSTL1 plays a role in ciliogenesis. We measured cilia length in FSTL1 KD hTERT-RPE1 cells using immunofluorescence and confocal microscopy. Cilia in FSTL1 KD cells were significantly shorter than in control cells, presenting means of $2.9 \mu\text{m}$ and $3.9 \mu\text{m}$ respectively ($P \leq 0.0001$; Fig. 4A). Cilia were affected similarly when *IFT88* was knocked down (Fig. 4A). Since FSTL1 is a secreted protein we next investigated whether the intracellular protein is important for ciliogenesis or if this activity is achieved by secreted FSTL1. We collected conditioned media containing FSTL1 from 24 hours hTERT-RPE1 cell cultures. FSTL1 KD cells incubated with conditioned media showed a recovery in cilia length ($3.5 \mu\text{m}$) suggesting that the FSTL1 secreted to the media rescues the effect of FSTL1 knockdown (Fig. 4B).

FSTL1 levels correlate with BBS4 and cilia during differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes. The BBS proteins, the primary cilium, and FSTL1 have been linked to the process of adipogenesis due to their role in pre-adipocyte differentiation. The expression of BBS genes and the presence of cilia are dynamic throughout differentiation^{30,31}. BBS4 knock-down has been reported to increase cell proliferation and fat accumulation in 3T3-F422A cells³², and FSTL1 has been proposed to be a marker of preadipocytes given that its levels drop along differentiation into adipocytes³⁵. Importantly, the role of FSTL1 in the process has not been established. Therefore, to continue characterizing the functional interaction between Bbs4, cilia and Fstl1, we turned to 3T3-L1 pre-adipocytes.

First, we confirmed that depletion of Bbs4 in 3T3-L1 cells also resulted in Fstl1 secretion defects, showing a 40% reduction (Fig. 5A). Next, we examined the expression patterns of *Bbs4* and *Fstl1* during the differentiation of 3T3-L1 cells. Cells were collected at different time points: at approximately 70% confluency; 2 days after reaching 100% confluency; and daily after differentiation day 0 (when differentiation media was added) up to day 11. In agreement with reported data³⁰, using qRT-PCR we observed that *Bbs4* was upregulated transiently upon addition of differentiation medium. Bbs4 expression came down around day 2 post-differentiation and presented a second

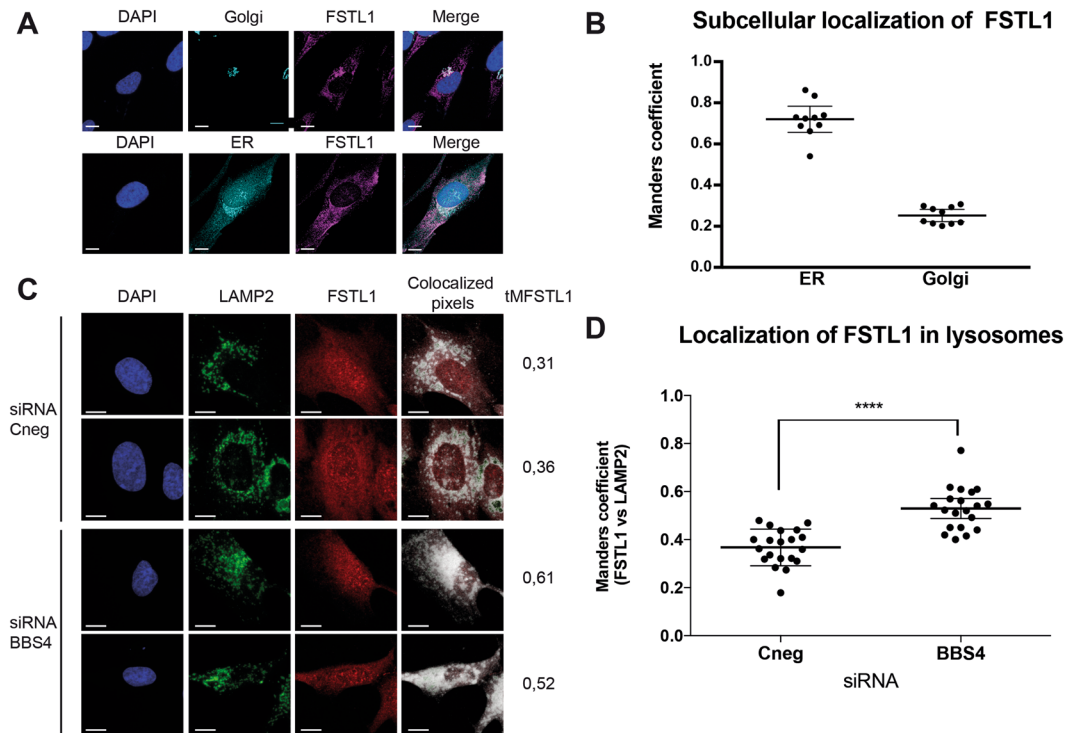


Figure 3. FSTL1 accumulates in lysosomes in the absence of BBS4. (A) Control hTERT-RPE1 were co-immunostained for Golgi (top row, Golgin 97 in cyan) or ER (bottom row, Calnexin, cyan) together with FSTL1 (magenta). (B) Analysis of colocalization of FSTL1 with each organelle marker represented as Manders coefficients showing that FSTL1 colocalizes with both organelles. (C) hTERT-RPE1 control and BBS4-KD cells were co-immunostained to study colocalization of FSTL1 (red) and lysosomes (LAMP2 in green). Colocalization is evidenced by colocalized pixels in white. (D) Manders coefficients were determined showing that in BBS4 KD cells, FSTL1 is accumulated in lysosomes. In all cases, scale bars represent 10 μ m and ****: $P < 0,0001$, t-test.

peak of expression at day 5 (Fig. 5B). *Fstl1* gene expression also followed a biphasic curve peaking shortly after the onset of differentiation (5.3-fold relative to day 0), dropping by day 4, and remaining low thereafter (Fig. 5B). We next examined the presence and length of primary cilia at days 0, 4 and 10 after induction of differentiation (D0, D4 and D10) (Fig. 5C,D). Consistent with previous reports^{31,47}, we found that 69% of cells at day D0 had primary cilia, which remained present until D4 at which point 64% of cells were still ciliated. In contrast, only 11% of cells had cilia at D10 (Fig. 5C). Cilia length decreased from D0 (2.2 μ m) to D4 (1.8 μ m) to D10 (1.6 μ m) (Fig. 5D), compared to uninduced control cells in which cilia length ranged from 2.7 μ m to 3.4 μ m on average at D4 and 2.4 μ m to 3.0 μ m at D10 (Fig. 6D and H, 7C). We followed *Ppar γ* expression, a marker of adipocyte differentiation⁴⁸, which increased 2-fold at D4 and 4-fold at D10, while *Fstl1* and *Bbs4* expression dropped significantly (Fig. 5E). The differentiation markers *Cebp α* and *Fabp4*⁴⁸ were also upregulated during differentiation (Fig. S4). Moreover, *Fstl1* levels were reduced significantly upon induction of obesity in C57/BL6 mice fed *ad libitum* with a Western diet during 10 weeks (Fig. S5).

Knocking-down *Fstl1* in 3T3-L1 preadipocytes impairs differentiation. Overall our data show that BBS4 regulates FSTL1 and we hypothesized that this finding could be relevant to understand the previously reported role of BBS4 in adipocyte differentiation. As mentioned, FSTL1 can be considered a preadipocyte marker given that it is downregulated as adipocyte differentiation progresses³⁵, but whether the protein plays an active role in the process was not determined. We therefore tested whether modulating FSTL1 levels could affect 3T3-L1 differentiation. Since *Fstl1* presents an initial phase with high expression and a second phase where its level drops (Fig. 5), we hypothesized that *Fstl1* could have a dual effect: it might be required at the onset of differentiation while it needs to be downregulated once cells engage in the differentiation process.

To test the requirement for *Fstl1* at the beginning of differentiation, we knocked it down in 3T3-L1 preadipocytes before adding differentiation media thus reducing both *Fstl1* basal levels and its peak in expression associated with the induction to differentiate (Fig. 6A). After induction 3T3-L1 cells present a clonal expansion phase⁴⁹ that was not impaired by *Fstl1* KD as evidenced by BrdU incorporation (Fig. 6B). We then sampled control and *Fstl1* KD cells at D4 and D10 and examined i) the percentage of ciliated cells, ii) cilia length and iii) the expression of the adipogenic transcription factors *Ppar γ* , *Cebp α* , *Fabp4*, *Scd1* and *Atgl*. By D4, uninduced *Fstl1* KD cells had fewer and shorter cilia than control cells (50% vs 82% and 2.2 μ m vs 3.1 μ m; Fig. 6C–E). Furthermore, the induction to differentiate in *Fstl1* KD cells did not result in a further drop in the number (Fig. 6C) or length of cilia (Fig. 6D): cilia length in induced control cells was 1.8 μ m compared to 3.1 μ m in uninduced cells, whereas in *Fstl1*

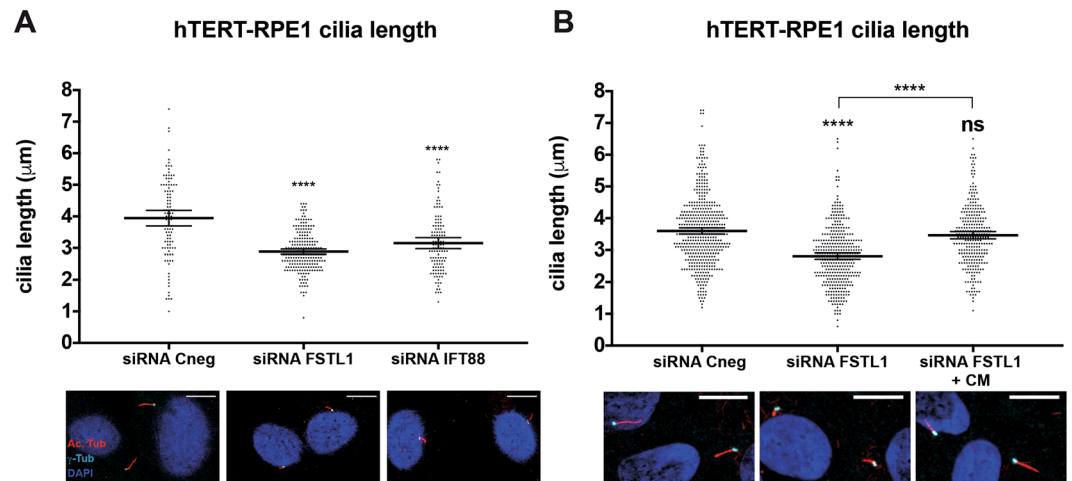


Figure 4. FSTL1 regulates ciliogenesis. (A) Upper panels: primary cilia length was measured in hTERT-RPE1 cells. FSTL1 KD cells present shorter cilia than control cells and comparable to IFT88 KD cells. Scatter plots with a line at the mean are shown and error bars represent 95% confidence intervals. Lower panels: micrographs showing basal bodies (γ -tubulin) in cyan, cilia (acetylated tubulin) in red and nuclei in blue (DAPI). The results shown are representative of four independent experiments. (B) Upper panel: hTERT-RPE1 FSTL1 KD cells were incubated with conditioned media starting at 24 hours after silencing of FSTL1 and primary cilia length was measured after 24 additional hours. In cells incubated with conditioned media, cilia length was comparable to that of control cells. Scatter plots with a line at the mean are shown and error bars represent 95% confidence intervals. The results shown are representative of two independent experiments. Lower panels: micrographs showing basal bodies (γ -tubulin) in cyan, cilia (acetylated tubulin) are in red and nuclei are in blue (DAPI). Statistical significance is shown as compared to siRNA Cneg except when noted. In all cases, scale bars represent 10 μ m. ns: $P > 0.05$; and ****: $P < 0.0001$, ANOVA test.

KD cells cilia length was not significantly different (2.2 μ m in uninduced and 1.9 μ m in induced cells; Fig. 6D–E; Suppl. Table 1). Therefore, Fstl1 plays a role at the beginning of differentiation favoring ciliation and ciliary length. In addition, Fstl1 KD impaired the upregulation of adipogenic markers upon induction to differentiate (Fig. 6F).

At D10, control cells induced to differentiate exhibited significantly fewer cilia than uninduced cells (15% compared to 74%). Similar to D4, Fstl1 KD cells presented fewer cilia and this percentage was not reduced further by the stimulus to differentiate (37% ciliation vs 30% respectively; Fig. 6G). In control cells and after 10 days of differentiation, the rare primary cilia that we were able to measure were shorter in induced cells compared to uninduced cells (1.7 μ m long compared to 2.4 μ m). In contrast, cilia in differentiating Fstl1 KD cells were not significantly different in length between induced (1.5 μ m) and uninduced (1.8 μ m) cells (Fig. 6H–I, Suppl. Table 1). The expression of *Ppar γ* , *Cebp α* , *Scd1* and *Atgl* was significantly reduced in Fstl1 KD cells at D10 whereas *Fabp4* was comparable to controls (Fig. 6J). Finally, staining cells at D10 with the oil-soluble dye Oil Red O showed that knockdown of Fstl1 impaired lipid accumulation (Fig. 6K). Thus, our results show that Fstl1 depletion at the onset of differentiation significantly affects cilia and alters adipogenesis in 3T3-L1 cells.

Maintaining high Fstl1 levels interferes with the differentiation of 3T3-L1. Finally, we tested whether down-regulation of *Fstl1* is also a required event during differentiation. We first attempted to maintain Fstl1 levels up by using conditioned media from D0 onwards: conditioned media was obtained from 3T3-L1 cultures and media collected from Fstl1 KD cells was used as control (Fig. S6A). Along the entire differentiation protocol the addition of conditioned media resulted in a mild effect on cilia: by D4 it did not affect the percentage of ciliated cells nor its reduction upon induction to differentiate. The expected cilia shortening triggered during differentiation was observed with both media, albeit it was milder in cells cultured in conditioned media (Suppl. Table 2, Fig. S6B,C). At D10 we observed a subtle effect on both the reduction in the percentage of ciliated cells and cilia shortening (Suppl. Table 2). Similarly, the expression of adipogenic markers was variably affected. While *Ppar γ* expression was upregulated at D4 in the presence of conditioned media, *Cebp α* and *Fabp4* were not affected (Fig. S6D). By day 10, the conditioned media with Fstl1 inhibited the upregulation of *Ppar γ* , did not affect the expression of *Cebp α* and *Fabp4* (Fig. S6E) and resulted in a modest effect on lipid accumulation (Fig. S6F). Thus, our results suggested a mild perturbation of differentiation if Fstl1 levels are maintained high.

To further evaluate this possibility we used purified recombinant Fstl1. We first tested whether the recombinant protein was functional by assessing its capacity to rescue the cilia phenotype of Fstl1 KD 3T3-L1 cells. We knocked down Fstl1 and added Fstl1 protein 24 hours after transfecting with the siRNA oligo: 200 ng/ml of protein to reach levels comparable to secreted protein (Fig. 7A), or 100 ng/ml as a suboptimal dose. Cilia length was rescued in a dose-response manner increasing from 2.5 μ m in Fstl1 KD cells to 2.8 and 3.1 μ m with 100 and 200 ng/ml of recombinant Fstl1 respectively (Fig. 7B). Thus, our results showed that the recombinant protein was functional, at least regarding its role in cilia, and further supported our previous observation that secreted Fstl1 plays a role in ciliogenesis.

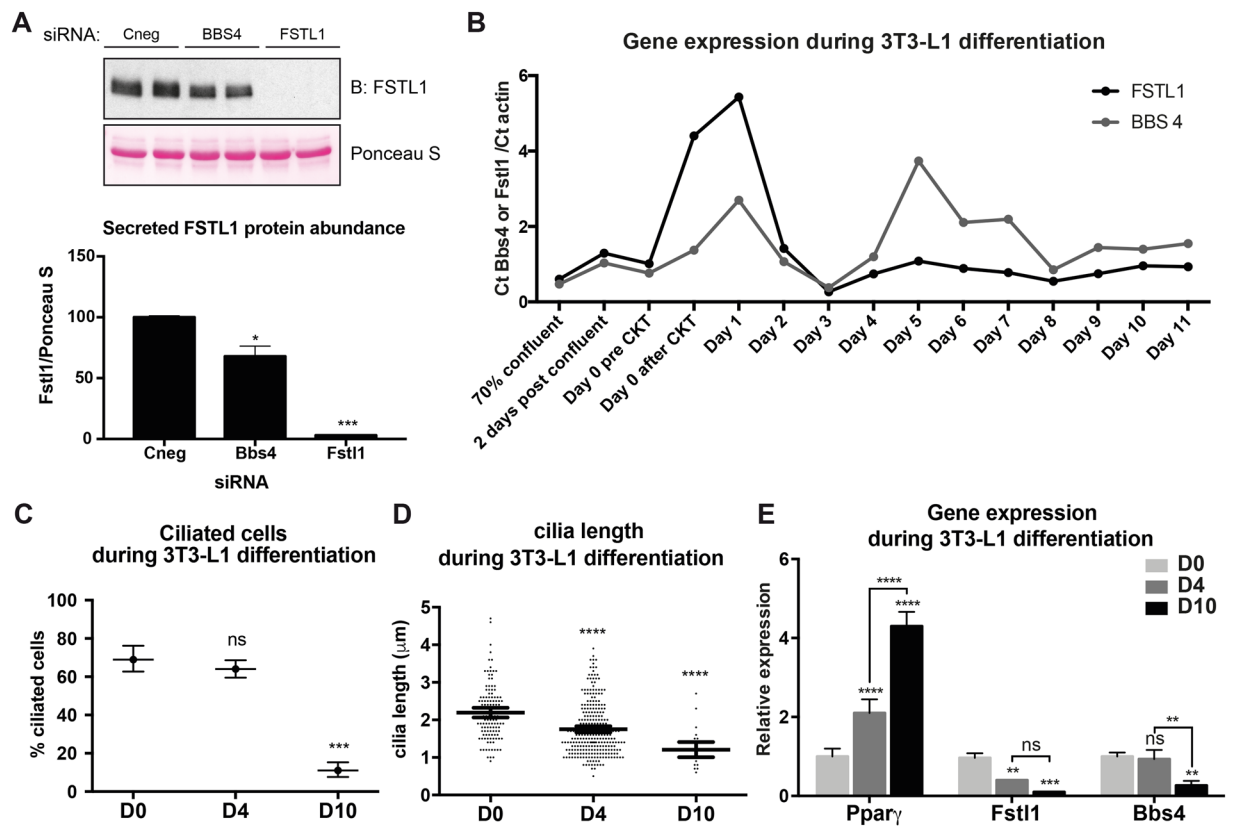


Figure 5. Cilia, BBS4 and FSTL1 are coordinated during 3T3-L1 differentiation. **(A)** 3T3-L1 cells were transfected with control siRNA or siRNA Bbs4 and secreted Fstl1 was detected in the supernatant by Western blot anti-Fstl1 (upper panel). Densitometry analysis of western blot normalized with Ponceau-S staining of an unspecific blotted protein as a loading control (lower panel). Knocking-down Bbs4 also reduces Fstl1 secretion in 3T3-L1 cells. Full-length blot and gel are shown in Figure S9A. **(B)** qRT-PCR analysis of *Fstl1* and *Bbs4* genes expression in 3T3-L1 cells during differentiation from proliferative cells to day 11 after induction to differentiate. Error bars represent standard deviation. Three biological replicates were analyzed. **(C)** The percentage of ciliated cells was analyzed in 3T3-L1 cells at different time points during differentiation: day 0, day 4 and day 10. Mean values are shown and error bars represent 95% confidence intervals for the mean. **(D)** Cilia length was analyzed in 3T3-L1 cells at the same time points. Data is shown as scatter plots with a line at the mean and error bars representing 95% confidence intervals. **(E)** mRNA levels of the adipocyte differentiation marker *Ppar γ* , *Fstl1* and *Bbs4* were analyzed in 3T3-L1 cells at the same time points during differentiation. The results shown are representative of multiple independent experiments (see also controls in Figs 6 and 7). Statistical significance is shown as compared to D0 except when noted and ns: $P > 0.05$; *: $P = 0.01-0.05$; **: $P = 0.001-0.01$; ***: $P = 0.0001-0.001$ and ****: $P < 0.0001$, hypothesis test for proportions, ANOVA or Kruskal Wallis test.

We then evaluated the effect of supplementing the media with 200 ng/ml of Fstl1 recombinant protein during 3T3-L1 cell differentiation by assessing cilia at D4, adipogenic markers at D6 and D10, and lipid accumulation at D10. At D4, the addition of Fstl1 protein completely blocked the cilia shortening that is triggered with the addition of differentiation media: in control cells cilia changed from 2.7 μm to 1.9 μm upon induction while cilia in cells cultured with 200 ng/ml of Fstl1 were 2.7 μm long both in the uninduced and induced conditions (Fig. 7C, Suppl. Table 3). This in turn correlated with a reduction in the levels of *Ppar γ* , *Cebpa*, *Fabp4*, *Scd1*, and *Atgl* (Fig. 7D). Interestingly however, by day 10, despite a marked reduction in lipid accumulation in cells treated with 200 ng/ml Fstl1 (Fig. 7F), the expression of the different adipogenic markers was comparable to controls (Fig. 7E). Therefore, maintaining Fstl1 levels affected differentiation likely delaying it. Collectively, our data suggest that both the initial high levels of Fstl1 as well as its reduction during differentiation are important steps during the differentiation of 3T3-L1 cells.

Discussion

Despite having a common cellular defect, the ciliopathies present overlapping but not identical phenotypes. In addition, the same clinical manifestation can vary in its presentation among different ciliopathies. This variability can be explained by the specific gene affected, the type of mutation, the specific role of the encoded protein in the context of the cilium, and importantly, extra-ciliary functions that the protein might have. Here we show that

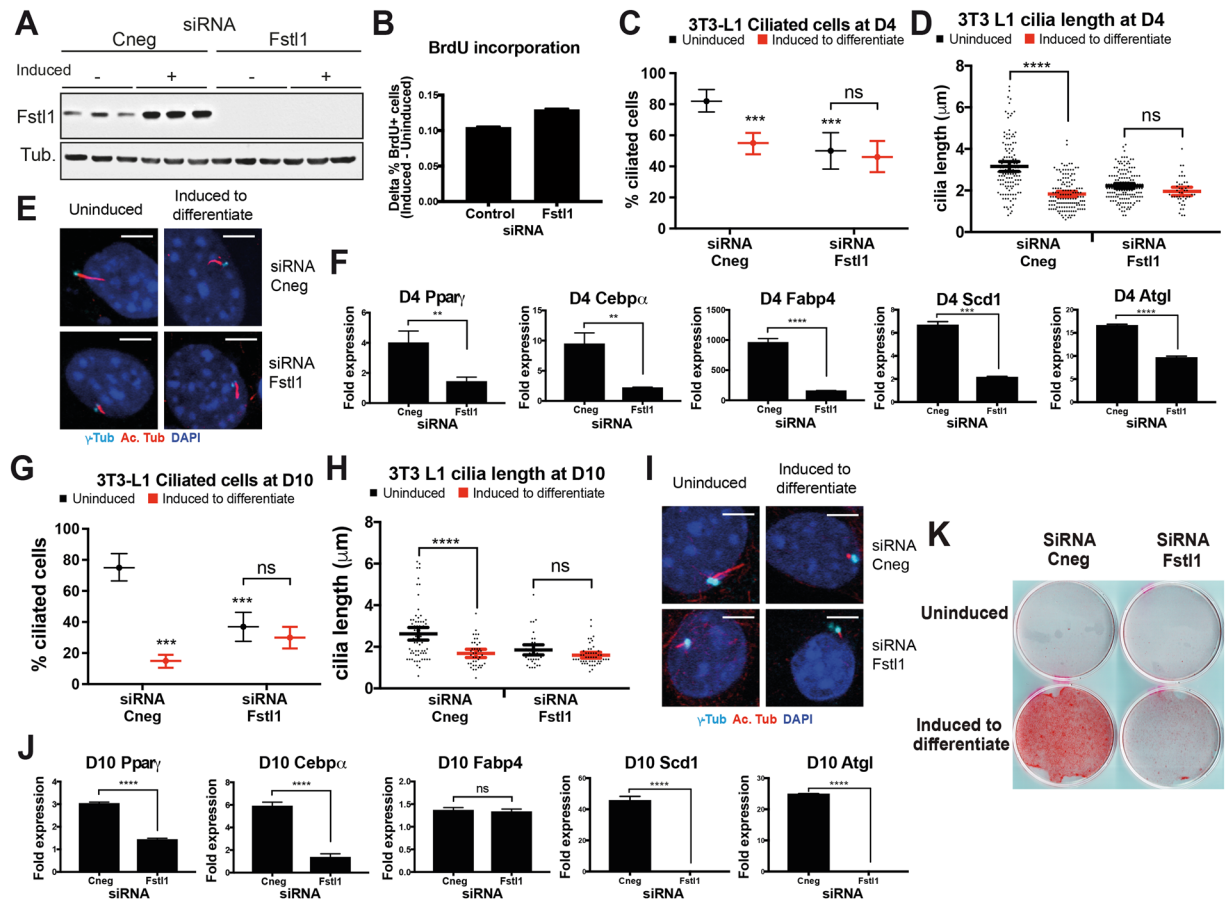


Figure 6. Blocking *Fstl1*-mediated ciliogenesis inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation. (A) Western blot of *Fstl1* showing upregulation of the protein upon induction to differentiate and the levels of the protein in *Fstl1* KD 3T3-L1 cells. The data is representative of two independent experiments. Full-length blots are shown in Figure S9B. (B) Clonal expansion in 3T3-L1 cells upon induction to differentiate was measured by a pulse of BrdU and immunofluorescence. The difference in the percentage of BrdU positive cells between induced an uninduced cultures is shown. *Fstl1* KD does not inhibit clonal expansion. Result of two independent experiments with three biological replicates each. Approximately 500 cells were counted per condition, per experiment. (C and G) The percentage of ciliated cells was analyzed in 3T3-L1 cells at day 4 (C) and day 10 (G) of differentiation. Data are shown as a line at the mean and error bars represent 95% confidence intervals. (D and H) Cilia length was measured in 3T3-L1 cells at day 4 (D) and day 10 (H). Approximately 100 cilia were measured per condition, per experiment. Scatter plots with a line at the mean are shown and error bars represent 95% confidence intervals. (E and I) Micrographs showing examples of cilia used in the analysis at D4 and D10 respectively. Basal bodies (γ -tubulin) are in cyan, cilia (acetylated tubulin) are in red and nuclei (DAPI) are in blue. Scale bars represent 5 μ m. (F and J) qRT-PCR analysis of the adipocyte differentiation markers *Ppar γ* , *Cebp α* , *Fabp4*, *Scd1* and *Atgl* in 3T3-L1 cells at day 4 (F) and day 10 (J) of differentiation. Bars represent the fold change upon induction of each gene relative to *Gapdh* comparing induced with uninduced cells. Error bars represent standard deviation. (K) Oil red staining comparing lipid accumulation between control and *Fstl1* KD cells. The data shown are representative of two independent experiments. ns: $P > 0.05$; ** $P = 0.001-0.01$; *** $P = 0.0001-0.001$ and **** $P < 0.0001$, hypothesis test for proportions, Kruskal Wallis or t-test.

BBS4 regulates the function of *FSTL1* through a dual mechanism, cilia dependent and independent, at the mRNA level and the secretion of the protein respectively.

Our data indicate that reducing BBS4 results in decreased *FSTL1* mRNA levels. Given that BBS4 plays a role in cilia, through its role in the BBSome¹⁷, this is likely a cilia-dependent effect. Supporting this possibility, targeting *IFT88* also downregulated *FSTL1* mRNA. Furthermore, *FSTL1* was originally identified as a TGF β 1 target and this signaling pathway is regulated by the cilium with TGF β receptors localizing in the ciliary compartment and ciliary pocket at the base of the organelle^{33, 50}.

In addition, we show that BBS4 regulates the cellular trafficking of *FSTL1* in a cilia-independent manner. Depletion of BBS4 resulted in the accumulation and degradation of *FSTL1* in lysosomes. Consistently, intracellular levels of *FSTL1* were rescued by lysosome inhibition, which did not rescue the secretion of *FSTL1* suggesting that inhibiting protein degradation did not fix the underlying intracellular trafficking defect caused by BBS4 KD. Importantly, chloroquine treatment did not rescue the *FSTL1* reduction in *IFT88* KD cells supporting the interpretation that, in this latter case, *FSTL1* abundance is regulated exclusively at the transcriptional level. Based on

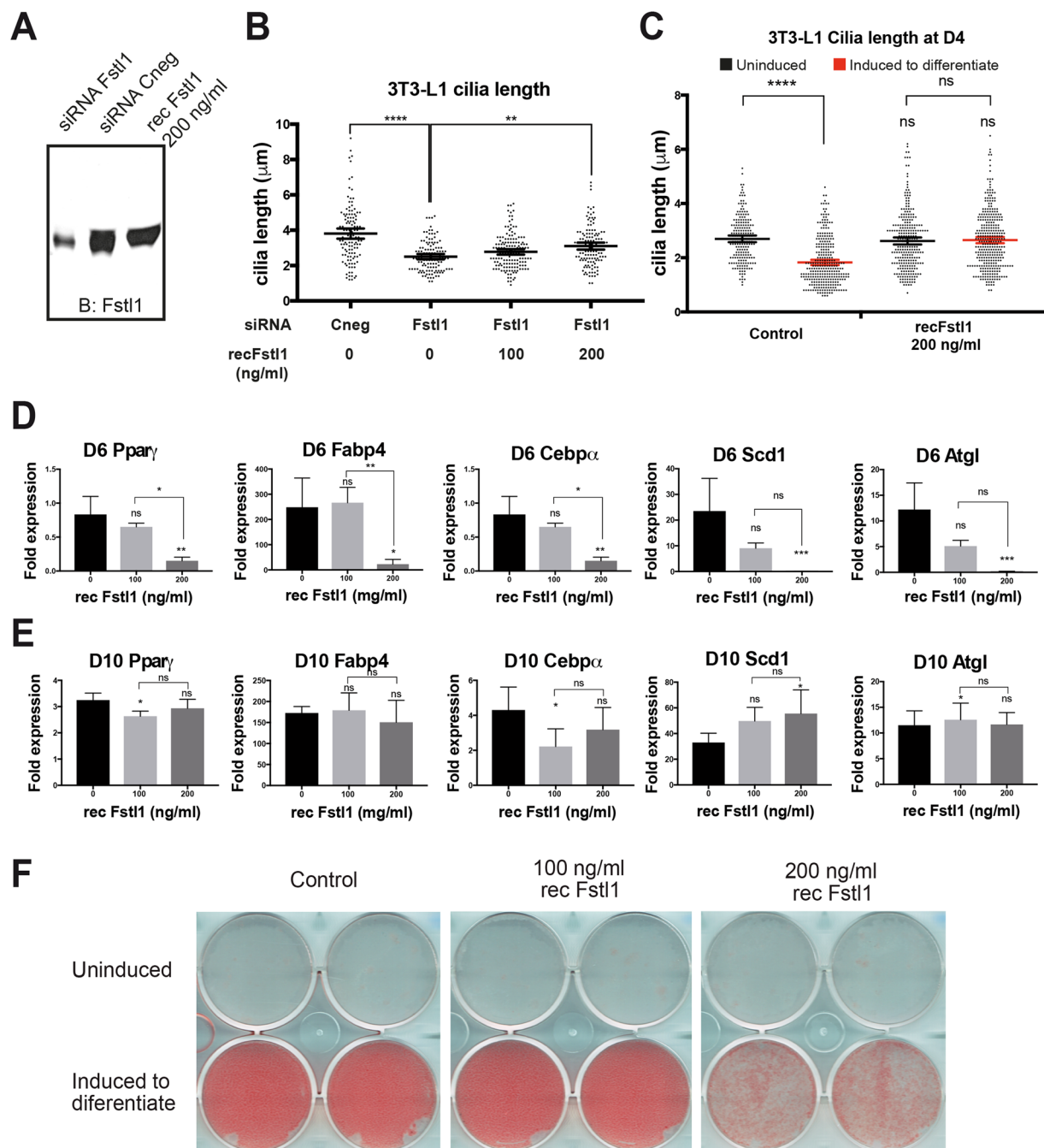


Figure 7. Addition of recombinant Fstl1 interferes with 3T3-L1 preadipocyte differentiation. **(A)** Western blot showing comparable levels of Fstl1 in supernatant from control cells and recombinant Fstl1 diluted in fresh culture media at 200 ng/ml. **(B)** Cilia length was measured in control and Fstl1 KD 3T3-L1 cells supplemented with 0, 100 ng/ml or 200 ng/ml of recombinant Fstl1. Cilia length was rescued in a dose dependent manner by the addition of Fstl1. Data are shown as a line at the mean and error bars represent 95% confidence intervals. At least 120 cilia were measured per condition and results shown are representative of three independent experiments. **(C)** Cilia length at D4 was measured in uninduced and induced to differentiate control cells and cells cultured with 200 ng/ml of recombinant Fstl1. Scatter plots with a line at the mean are shown and error bars represent 95% confidence intervals. **(D,E)** qRT-PCR analysis of gene expression of differentiation markers *Ppar γ* , *Cebp α* , *Fabp4*, *Scd1* and *Atgl* in 3T3-L1 cells at day 6 **(D)** and day 10 **(E)** of differentiation. Bars represent the fold change upon induction of each gene relative to *Gapdh* comparing induced cells with uninduced cells. Error bars represent standard deviation. Two biological and three technical replicates were analyzed. **(F)** Oil red staining showing lipid accumulation in induced control cells in comparison with cells supplemented with recombinant Fstl1 protein. ns: $P > 0.05$; *: $P = 0.01-0.05$; **: $P = 0.001-0.01$; ***: $P = 0.0001-0.001$ and ****: $P < 0.0001$, ANOVA, or t-test.

the reported involvement of BBS4 in vesicle sorting and trafficking, together with our lysosomal degradation data, we propose that the depletion of BBS4 results in a shift of FSTL1 from the secretory to the endo-lysosomal degradation pathway. Furthermore, BBS2 knockdown also led to a FSTL1 secretion defect suggesting that this function of BBS proteins could occur in the context of the BBSome, a possibility that will have to be studied further.

These results raise two main questions: i) what is the mechanism by which BBS4 regulates FSTL1 secretion? and ii) could a FSTL1 secretion defect contribute to the etiology of BBS-associated phenotypes? Regarding the mechanism, it is known that the BBS proteins, through the activity of the BBSome, direct Golgi-derived vesicles to the base of the primary cilium by recognizing ciliary membrane proteins^{15, 17, 51} and we have shown that BBS4 participates in recycling the Notch receptor to the plasma membrane²⁶. Interestingly, recycling endosomes act as sorting checkpoints, coordinating trafficking pathways in close proximity to the basal body⁵². Therefore, BBS4, in the context of the BBSome, might direct FSTL1-containing vesicles towards the plasma membrane. However, FSTL1 is a secreted protein expected to be present in the lumen of the Golgi compartment and post-Golgi vesicles whereas the BBS proteins are cytosolic. Although this work began by finding a putative physical interaction between BBS4 and FSTL1, further studies will be needed to first confirm this interaction in a physiological setting and then dissect when and where does it occur inside the cell. One possibility is that a pool of FSTL1 might be secreted by a non-classical route depending on the BBS proteins, analogous to FGF2 which is secreted by direct translocation across the plasma membrane⁵³. However, FSTL1 presents a typical ER signal peptide and is N-glycosylated, a post-translational modification that occurs in the ER and Golgi⁵⁴. Therefore, the mechanism by which BBS proteins affect FSTL1 secretion is unknown and understanding it will be critical to completely elucidate the role of BBS proteins in intracellular traffic. Regarding the second question, our results strongly document a FSTL1 defect upon depletion of BBS4 thus raising the intriguing possibility that this could contribute to the pathogenesis of BBS phenotypes. Here we studied the role of FSTL1 in the differentiation of 3T3-L1 cells as a first approximation to test this hypothesis.

Previous reports have linked the BBS proteins, cilia and FSTL1 with adipocyte differentiation. Studies of gene expression dynamics of *Bbs1-4*, 6-9 and 11 in the murine cell line 3T3-F422A³⁰, and *BBS10* and *BBS12* in human mesenchymal stem cells (hMSC)^{31, 55} showed maximum values for BBS transcripts between D2 and D4 of differentiation. Transient ciliogenesis is observed during adipogenesis of human adipose stem cells, followed by a decrease in cilia number and length in mature adipocytes⁴⁷. In 3T3-L1 cells, blocking ciliogenesis by suppressing *Ift88* inhibits differentiation⁵⁶. During pre-adipocyte to adipocyte differentiation FSTL1 expression shows a transient increase during the first two days followed by a dramatic decrease³⁵. However, whether FSTL1 plays an active role during adipogenesis was not known. Here we assessed the role of Fstl1 during 3T3-L1 differentiation hypothesizing that the initial phase of increase and the phase of decrease are both important, affecting the initiation and progression of differentiation respectively. Thus, we used two different approaches to modulate Fstl1 abundance: i) we knocked down *Fstl1* expression prior to differentiation and ii) we impaired Fstl1 down-regulation using a differentiation cocktail prepared with conditioned media containing Fstl1 or by adding purified recombinant Fstl1 directly. Our results indicate that both phases are relevant for 3T3L1 differentiation.

Our understanding of how FSTL1 modulates 3T3-L1 differentiation is still incomplete. While we cannot discard a role for Fstl1 in cell proliferation, Fstl1 KD did not affect clonal expansion of 3T3-L1 upon induction to differentiate. In contrast, our data do highlight a complex interplay between the BBS proteins, FSTL1 and cilia. First, *Bbs* and *Fstl1* gene expression and the presence of cilia correlate during differentiation. In agreement with previous reports, our data show that *Bbs4* and *Fstl1* are synchronized and transiently upregulated shortly after the onset of differentiation, while cilia are also transiently observed and later reabsorbed as differentiation progresses. Second, our results unveil a link between the BBS proteins and cilia with FSTL1, which in turn we report here as a novel regulator of ciliogenesis, both in hTERT-RPE and 3T3-L1 cells. Accordingly, reducing Fstl1 levels from the start of differentiation resulted in shorter and fewer cilia by day 4 and impaired differentiation. Importantly, maintaining Fstl1 levels high also perturbed cilia dynamics by inhibiting their reabsorption and affected differentiation, likely delaying it. Collectively, these results suggest that *Fstl1* expression in pre-adipocytes is required for transient ciliogenesis and commitment to the differentiation program. In addition, our results point to a cilia-Fstl1 feedback loop, whereby cilia modulates Fstl1 expression and Fstl1 participates in ciliogenesis. Defining the exact order of events will require further work but our results indicate that Fstl1 downregulation contributes to cilia reabsorption and differentiation in 3T3-L1 cells.

Therefore, Fstl1 could modulate, at least indirectly, cilia-mediated signaling pathways important for adipogenesis such as Shh and Wnt. Shh signaling has been shown to influence the balance between the osteoblastic and adipogenic pathways⁵⁷⁻⁶⁰. Also, in 3T3L1 cells, Hedgehog signaling was shown to be active in preadipocytes and then decrease during differentiation⁶¹. Canonical Wnt signaling activation leads to *PPAR* γ and *CEBP* α downregulation and inhibition of differentiation⁶². Therefore, the reduction in Fstl1 levels could promote or ensure cilia reabsorption and thus facilitate the downregulation of cilia-dependent anti-adipogenic pathways during differentiation. In addition, FSTL1 has been shown to act as an inhibitor of bone morphogenetic protein 4 (BMP4)^{63, 64}, a member of the transforming growth factor β (TGF- β), which in turn is an important player during adipogenesis, driving the commitment of mesenchymal stem cells to the adipogenic lineage and differentiation of preadipocytes⁶⁵⁻⁶⁹.

Our data uncover a novel role for FSTL1 regulating ciliogenesis in a non-cell autonomous manner. Complete depletion of Fstl1 in mice results in perinatal death due to severe malformations, particularly affecting lung and skeletal development and dependent on misregulated BMP signaling^{63, 64}. It will be interesting to evaluate the status of cilia in this model and to determine whether the role of FSTL1 in ciliogenesis relies on its activity as a BMP4 inhibitor. Also, a receptor for FSTL1, DIP2A, was identified in endothelial cells⁷⁰ and future work will be aimed at determining whether DIP2A mediates the role of FSTL1 in ciliogenesis and adipogenesis.

Understanding the functional relationship between BBS proteins, cilia and FSTL1 will provide critical insight to dissect the cellular basis of BBS. Depletion of *Bbs4* promotes proliferation and triglyceride accumulation in

murine 3T3-F422A cells³² and *Bbs4*-null mice develop obesity as well as other BBS features such as retinal degeneration^{71,72}. Similarly, cells from BBS10 and BBS12 patients differentiate and accumulate more adipocytes and more triglycerides and secrete more leptin^{31,55}. Some of these results might be difficult to reconcile with the requirement for cilia at the onset of adipocyte differentiation. However, targeting individual BBS proteins does not necessarily inhibit ciliogenesis. For example, *Bbs2*, *Bbs4* and *Bbs6* knockout mice do form cilia^{72–74}. Thus, one possibility is that in the absence of proteins such as BBS4, albeit compromised, cilia are functional enough to allow adipocyte differentiation to begin. Then, a lower level of secreted FSTL1 might generate a sensitized background where adipogenesis could be favored. *In vivo* work will be needed to fully evaluate this intriguing possibility. Our results highlight the need to fully understand the role of ciliary proteins both in and outside the cilium, as these more likely specific functions might underlie important differences in the presentation of a given phenotype across ciliopathies.

Methods

Reagents, antibodies. Bovine serum albumin, Ponceau S, Sigmafast protease inhibitor cocktail tablets, Rosiglitazone and Insulin from Sigma. Primary antibodies: mouse anti- α tubulin clone B-5-1-2, mouse anti-acetylated tubulin clone 6-11-B-1, rabbit anti- γ tubulin and rabbit anti-laminin from Sigma; goat anti-human FSTL1, goat anti-mouse *Fstl1*, and mouse *Fstl1* recombinant protein from R&D Systems, rabbit anti-BBS4 from ProteinTech, rabbit anti-LC3B from Cell Signaling Technology, mouse anti-human golgin-97 clone CDF4 from Invitrogen, and rabbit anti-calnexin, mouse anti-LAMP2 clone H4B4 and rat anti-BrdU from Abcam. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies anti-mouse and anti-goat from Santa Cruz and anti-rabbit from Sigma. Alexa Fluor (AF)–594 donkey anti-goat, AF-488 donkey anti-mouse, AF-633 goat anti-rabbit, Alexa Fluor 488-conjugated anti-rat and tetramethylrhodamine goat-anti mouse were from Invitrogen. TRIzol reagent, Lipofectamine RNAiMAX and stealth RNAs were obtained from Invitrogen. Dexamethasone and 3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX) were obtained from AppliChem.

Yeast-two hybrid assay. The Cytotrap cytoplasmic yeast-two hybrid assay (Stratagene) was performed using a human fetal brain library as previously described⁷⁵.

Cell culture and transfection. hTERT-RPE1 cells were maintained in DMEM-F12 with Hepes with 10% FBS, PS and 0,01 mg/ml Hygromycin (Sigma). 3T3-L1 cells were maintained in DMEM with glutamax, high glucose and high pyruvate with 10% FBS and PS. For siRNA experiments, stealth siRNA duplex ARN oligos were transfected using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen). To collect conditioned media, cells were transfected with the appropriate siRNA (control or *Fstl1*), media was replaced 24 hours post-transfection, and media was collected after additional 24 hours. The media was centrifuged at 800xg for 5 min to eliminate cell debris.

Cell lysates, supernatants and Western blot. Cells were lysed at 4°C for 45 minutes using lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma). Whole cell lysates were obtained as the soluble fraction after centrifugation at 12,000xg for 15 minutes. Secreted proteins were collected with the media from serum-starved (24 hours) cultures and centrifuged for 5 minutes at 800xg. Proteins in lysates (30–50 μ g) or supernatant (40 μ l) were blotted into PVDF membranes and probed with anti-FSTL1 (1/2000) and anti-tubulin (1/2000), or the appropriate antibodies overnight at 4°C. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were used for western blot. The densitometry of bands was performed using FIJI and Graph Pad Student test calculator.

siRNA sequences. The siRNA oligonucleotide sequences used in this study are available upon request.

RNA extraction and qRT-PCR. Total RNA was extracted from cells using TRIzol and cDNA was generated using either the Superscript First strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen) or the Fermentas First Strand cDNA transcription kit (Thermo scientific). Target-specific primers for *FSTL1*, *BBS4*, *BBS2*, *IFT88*, *Ppar γ* , *Fabp4*, *Cebpa*, *Scd1*, *Atgl*, *Gapdh* and *Cyclophilin* are available upon request. Platinum SYBR Green qPCR superMix-UDG (Invitrogen), SYBR FAST Universal 2X qPCR Master Mix (Kapa) and LightCycler 480 SybrGreen (Roche) were used in different experiments and reactions were performed either on a Real Time Rotor Gene 6000 PCR (Corbett Research), an Eco Real time PCR System (Illumina) or a LightCycler 480 machine (Roche). All samples were run in triplicate and the CT value was normalized to calculate relative expression of each gene. The rate of gene expression (R) was calculated using the $\Delta\Delta$ Ct method with *Cyclophilin*, *Gapdh*, or β -actin as reference genes and relative to a control situation (control siRNA or uninduced cells).

Immunofluorescence and co-localization studies. Cells grown in coverslips were fixed with ice-cold methanol or freshly made PBS containing 4% paraformaldehyde for 10 minutes, permeabilized with PBS containing 0,1% Triton X-100, and blocked with PBS containing 0,02% Tween-20, 10% FBS and 1% BSA. Coverslips were incubated overnight at 4°C with goat anti-human FSTL1 1/100, rabbit anti-LAMP2 1/1000, mouse anti-Golgin 97 1/100 or anti-calnexin 1/2000 followed by Alexa Fluor 594-conjugated anti-Goat, Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies. Images were acquired using a Leica SP5 confocal microscope under 63X oil immersion 1.4 NA objective, Zoom of 5X and Z sections of 0,123 μ m of thickness and acquired with same gain, offsets an laser powers settings. Co-localization was quantified as Manders coefficients using the colocalization threshold and the Jacop plugin, both available with FIJI software. For cilia staining, cells were probed with rabbit anti- γ tubulin 1/1000, mouse anti-acetylated tubulin 1/1000, and Alexa Fluor 633-conjugated anti-rabbit, Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse antibodies and DAPI. For anti-BrdU staining, cells were permeabilized with PBS containing 2 M HCl and 0.1% tween-20 for 15 minutes at 37°C, blocked with PBS containing 2% BSA, 0.3%

Triton X-100, 150 mM glycine for 1 hour, incubated with rat anti-BrdU 1/100 overnight at 4°C followed by Alexa Fluor 488-conjugated anti-rat 1/1000 and DAPI.

3T3-L1 preadipocyte differentiation. 3T3-L1 preadipocytes were maintained as a subconfluent monolayer culture and differentiation was induced by placing cells in differentiation cocktail (DMEM with 10% FBS, PS, 1 µg/ml bovine insulin, 0,25 mM dexamethasone, 0,5 mM IBMX and 2,5 mM Rosiglitazone), for 48 hours and then changing the medium every two days with DMEM with 10% FBS, PS, 1 µg/ml insulin. For the BrdU incorporation assay, cells were grown in coverslips and 10 µM BrdU was added to the differentiation cocktail at the time of induction for 24 hours. Cells were fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde for 10 minutes and probed with anti-BrdU and DAPI.

Statistical data analysis. For cilia length measurements, cilia were measured using the freehand ROI selection tool in FIJI. For all data processing, values were analyzed using GraphPad Prism 7 One-way ANOVA with Tukey's post hoc test or Student t-test and for data with no normal distribution we used the non-parametric test Kruskal Wallis. For percentage of ciliated cells and BrdU incorporation assays, the fractions of cells with cilia or BrdU positive cells vs the total number of cells were calculated. Comparison between different experimental conditions was done using a test of Hypothesis specific for comparison of two proportions (hypothesis test for proportions).

In all cases, differences were considered significant when *P* values were smaller than 0,05.

References

- Badano, J. L., Mitsuma, N., Beales, P. L. & Katsanis, N. The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **22**, 125–148 (2006).
- Fliegauf, M., Benzing, T. & Omran, H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 880–893 (2007).
- Sharma, N., Berbari, N. F. & Yoder, B. K. Ciliary dysfunction in developmental abnormalities and diseases. *Curr Top Dev Biol* **85**, 371–427 (2008).
- Cardenas-Rodriguez, M. & Badano, J. L. Ciliary Biology: Understanding the Cellular and Genetic Basis of Human Ciliopathies. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* **151C**, 263–280 (2009).
- Christensen, S. T., Pedersen, L. B., Schneider, L. & Satir, P. Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease. *Traffic* **8**, 97–109 (2007).
- Zaghloul, N. A. & Katsanis, N. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *The Journal of clinical investigation* **119**, 428–437, doi:10.1172/JCI37041 (2009).
- Aldahmesh, M. A. *et al.* IFT27, encoding a small GTPase component of IFT particles, is mutated in a consanguineous family with Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* **23**, 3307–3315, doi:10.1093/hmg/ddu044 (2014).
- Forsythe, E. & Beales, P. L. Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet* **21**, 8–13, doi:10.1038/ejhg.2012.115 (2013).
- Heon, E. *et al.* Mutations in C8ORF37 cause Bardet Biedl syndrome (BBS21). *Hum Mol Genet.* **25**, 2283–2294, doi:10.1093/hmg/ddw096 (2016).
- Novas, R., Cardenas-Rodriguez, M., Irigoien, F. & Badano, J. L. Bardet-Biedl syndrome: Is it only cilia dysfunction? *FEBS Lett* **589**, 3479–3491, doi:10.1016/j.febslet.2015.07.031 (2015).
- Schaefer, E. *et al.* Identification of a novel mutation confirms the implication of IFT172 (BBS20) in Bardet-Biedl syndrome. *J Hum Genet* **61**, 447–450, doi:10.1038/jhg.2015.162 (2016).
- Scheidecker, S. *et al.* Exome sequencing of Bardet-Biedl syndrome patient identifies a null mutation in the BBSome subunit BBP1 (BBS18). *J Med Genet* **51**, 132–136, doi:10.1136/jmedgenet-2013-101785 (2014).
- Seo, S. *et al.* A novel protein LZTFL1 regulates ciliary trafficking of the BBSome and Smoothed. *PLoS genetics* **7**, e1002358, doi:10.1371/journal.pgen.1002358 (2011).
- Jin, H. & Nachury, M. V. The BBSome. *Curr Biol* **19**, R472–473, doi:10.1016/j.cub.2009.04.015 (2009).
- Jin, H. *et al.* The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. *Cell* **141**, 1208–1219 (2010).
- Loktev, A. V. *et al.* A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation. *Dev Cell* **15**, 854–865 (2008).
- Nachury, M. V. *et al.* A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* **129**, 1201–1213, doi:10.1016/j.cell.2007.03.053 (2007).
- Zhang, Q., Yu, D., Seo, S., Stone, E. M. & Sheffield, V. C. Intrinsic protein-protein interaction-mediated and chaperonin-assisted sequential assembly of stable bardet-biedl syndrome protein complex, the BBSome. *J Biol Chem* **287**, 20625–20635, doi:10.1074/jbc.M112.341487 (2012).
- Seo, S. *et al.* BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 1488–1493 (2010).
- Gerdes, J. M. *et al.* Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat Genet* **39**, 1350–1360 (2007).
- Ross, A. J. *et al.* Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* **37**, 1135–1140 (2005).
- Zhang, Q., Seo, S., Bugge, K., Stone, E. M. & Sheffield, V. C. BBS proteins interact genetically with the IFT pathway to influence SHH-related phenotypes. *Hum Mol Genet* **21**, 1945–1953 (2012).
- Yen, H. J. *et al.* Bardet-Biedl syndrome genes are important in retrograde intracellular trafficking and Kupffer's vesicle cilia function. *Hum Mol Genet* **15**, 667–677 (2006).
- Guo, D. F. *et al.* The BBSome Controls Energy Homeostasis by Mediating the Transport of the Leptin Receptor to the Plasma Membrane. *PLoS genetics* **12**, e1005890, doi:10.1371/journal.pgen.1005890 (2016).
- Starks, R. D. *et al.* Regulation of Insulin Receptor Trafficking by Bardet Biedl Syndrome Proteins. *PLoS genetics* **11**, e1005311, doi:10.1371/journal.pgen.1005311 (2015).
- Leitch, C. C., Lodh, S., Prieto-Echague, V., Badano, J. L. & Zaghloul, N. A. Basal body proteins regulate Notch signaling through endosomal trafficking. *J Cell Sci* **127**, 2407–2419, doi:10.1242/jcs.130344 (2014).
- Chennen, K., Scerbo, M. J., Dollfus, H., Poch, O. & Marion, V. [Bardet-Biedl syndrome: cilia and obesity - from genes to integrative approaches]. *Med Sci (Paris)* **30**, 1034–1039, doi:10.1051/medsci/20143011018 (2014).
- Guo, D. F. & Rahmouni, K. Molecular basis of the obesity associated with Bardet-Biedl syndrome. *Trends Endocrinol Metab* **22**, 286–293, doi:10.1016/j.tem.2011.02.009 (2011).
- Oh, E. C., Vasanth, S. & Katsanis, N. Metabolic regulation and energy homeostasis through the primary Cilium. *Cell metabolism* **21**, 21–31, doi:10.1016/j.cmet.2014.11.019 (2015).
- Forti, E., Aksanov, O. & Birk, R. Z. Temporal expression pattern of Bardet-Biedl syndrome genes in adipogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1055–1062, doi:10.1016/j.biocel.2007.02.014 (2007).

31. Marion, V. *et al.* Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **10**, 1820–1825 (2009).
32. Aksanov, O., Green, P. & Birk, R. Z. BBS4 directly affects proliferation and differentiation of adipocytes. *Cell Mol Life Sci* **71**, 3381–3392, doi:10.1007/s00018-014-1571-x (2014).
33. Shibamura, 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. *European journal of biochemistry / FEBS* **217**, 13–19 (1993).
34. Rosenberg, M. I., Georges, S. A., Asawachaicharn, A., Analau, E. & Tapscott, S. J. MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol* **175**, 77–85, doi:10.1083/jcb.200603039 (2006).
35. Wu, Y., Zhou, S. & Smas, C. M. Downregulated expression of the secreted glycoprotein follistatin-like 1 (Fstl1) is a robust hallmark of preadipocyte to adipocyte conversion. *Mechanisms of development* **127**, 183–202, doi:10.1016/j.mod.2009.12.003 (2010).
36. Chaly, Y., Hostager, B., Smith, S. & Hirsch, R. Follistatin-like protein 1 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Immunologic research* **59**, 266–272, doi:10.1007/s12026-014-8526-z (2014).
37. Chaly, Y. *et al.* Follistatin-like protein 1 enhances NLRP3 inflammasome-mediated IL-1beta secretion from monocytes and macrophages. *Eur J Immunol* **44**, 1467–1479, doi:10.1002/eji.201344063 (2014).
38. Fan, N. *et al.* Follistatin-like 1: a potential mediator of inflammation in obesity. *Mediators of inflammation* **2013**, 752519, doi:10.1155/2013/752519 (2013).
39. Blatch, G. L. & Lassle, M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**, 932–939 (1999).
40. Kim, J. C. *et al.* The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* **36**, 462–470 (2004).
41. An, E. *et al.* Secreted proteome profiling in human RPE cell cultures derived from donors with age related macular degeneration and age matched healthy donors. *J Proteome Res* **5**, 2599–2610, doi:10.1021/pr060121j (2006).
42. Cardenas-Rodriguez, M. *et al.* Characterization of CCDC28B reveals its role in ciliogenesis and provides insight to understand its modifier effect on Bardet-Biedl syndrome. *Hum Genet* **132**, 91–105, doi:10.1007/s00439-012-1228-5 (2013).
43. Liu, Y. P. *et al.* Ciliopathy proteins regulate paracrine signaling by modulating proteasomal degradation of mediators. *The Journal of clinical investigation* **124**, 2059–2070, doi:10.1172/JCI71898 (2014).
44. Xu, Q. *et al.* BBS4 and BBS5 show functional redundancy in the BBSome to regulate the degradative sorting of ciliary sensory receptors. *Sci Rep* **5**, 11855, doi:10.1038/srep11855 (2015).
45. Bolte, S. & Cordelières, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* **224**, 213–232, doi:10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x (2006).
46. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676–682, doi:10.1038/nmeth.2019 (2012).
47. Forcioli-Conti, N., Lacas-Gervais, S., Dani, C. & Peraldi, P. The primary cilium undergoes dynamic size modifications during adipocyte differentiation of human adipose stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* **458**, 117–122, doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.078 (2015).
48. Lowe, C. E., O’Rahilly, S. & Rochford, J. J. Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci* **124**, 2681–2686, doi:10.1242/jcs.079699 (2011).
49. Tang, Q. Q., Otto, T. C. & Lane, M. D. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 44–49, doi:10.1073/pnas.0137044100 (2003).
50. Clement, C. A. *et al.* TGF-beta signaling is associated with endocytosis at the pocket region of the primary cilium. *Cell reports* **3**, 1806–1814, doi:10.1016/j.celrep.2013.05.020 (2013).
51. Berbari, N. F., Lewis, J. S., Bishop, G. A., Askwith, C. C. & Mykityn, K. Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 4242–4246 (2008).
52. Sung, C. H. & Leroux, M. R. The roles of evolutionarily conserved functional modules in cilia-related trafficking. *Nat Cell Biol* **15**, 1387–1397, doi:10.1038/ncb2888 (2013).
53. Steringer, J. P., Muller, H. M. & Nickel, W. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2—a novel type of protein translocation across membranes? *J Mol Biol* **427**, 1202–1210, doi:10.1016/j.jmb.2014.07.012 (2015).
54. Liu, T. *et al.* Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry. *J Proteome Res* **4**, 2070–2080, doi:10.1021/pr0502065 (2005).
55. Marion, V. *et al.* BBS-induced ciliary defect enhances adipogenesis, causing paradoxical higher-insulin sensitivity, glucose usage, and decreased inflammatory response. *Cell metabolism* **16**, 363–377, doi:10.1016/j.cmet.2012.08.005 (2012).
56. 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. *Journal of cell science* **122**, 2760–2768, doi:10.1242/jcs.046276 (2009).
57. Mariman, E. C. *et al.* The cilium: a cellular antenna with an influence on obesity risk. *Br J Nutr* **116**, 576–592, doi:10.1017/S0007114516002282 (2016).
58. Spinella-Jaegle, S. *et al.* Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *J Cell Sci* **114**, 2085–2094 (2001).
59. van der Horst, G., Farah-Sips, H., Lowik, C. W. & Karperien, M. Hedgehog stimulates only osteoblastic differentiation of undifferentiated KS483 cells. *Bone* **33**, 899–910 (2003).
60. James, A. W. *et al.* Sonic Hedgehog influences the balance of osteogenesis and adipogenesis in mouse adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng Part A* **16**, 2605–2616, doi:10.1089/ten.TEA.2010.0048 (2010).
61. Cousin, W., Dani, C. & Peraldi, P. Inhibition of the anti-adipogenic Hedgehog signaling pathway by cyclopamine does not trigger adipocyte differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* **349**, 799–803, doi:10.1016/j.bbrc.2006.08.112 (2006).
62. Ross, S. E. *et al.* Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* **289**, 950–953 (2000).
63. Geng, Y. *et al.* Follistatin-like 1 (Fstl1) is a bone morphogenetic protein (BMP) 4 signaling antagonist in controlling mouse lung development. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 7058–7063, doi:10.1073/pnas.1007293108 (2011).
64. Sylva, M. *et al.* The BMP antagonist follistatin-like 1 is required for skeletal and lung organogenesis. *PLoS One* **6**, e22616, doi:10.1371/journal.pone.0022616 (2011).
65. Bowers, R. R., Kim, J. W., Otto, T. C. & Lane, M. D. Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 13022–13027, doi:10.1073/pnas.0605789103 (2006).
66. Huang, H. *et al.* BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 12670–12675, doi:10.1073/pnas.0906266106 (2009).
67. Modica, S. & Wolfrum, C. The dual role of BMP4 in adipogenesis and metabolism. *Adipocyte* **6**, 141–146, doi:10.1080/21623945.2017.1287637 (2017).
68. Suenaga, M. *et al.* Bmp4 expressed in preadipocytes is required for the onset of adipocyte differentiation. *Cytokine* **64**, 138–145, doi:10.1016/j.cyto.2013.07.011 (2013).
69. Tang, Q. Q., Otto, T. C. & Lane, M. D. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 9607–9611, doi:10.1073/pnas.0403100101 (2004).
70. Ouchi, N. *et al.* DIP2A functions as a FSTL1 receptor. *J Biol Chem* **285**, 7127–7134, doi:10.1074/jbc.M109.069468 (2010).

71. Eichers, E. R. *et al.* Phenotypic characterization of Bbs4 null mice reveals age-dependent penetrance and variable expressivity. *Hum Genet* **120**, 211–226, doi:[10.1007/s00439-006-0197-y](https://doi.org/10.1007/s00439-006-0197-y) (2006).
72. Mykytyn, K. *et al.* Bardet-Biedl syndrome type 4 (BBS4)-null mice implicate Bbs4 in flagella formation but not global cilia assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 8664–8669 (2004).
73. Fath, M. A. *et al.* Mkks-null mice have a phenotype resembling Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* **14**, 1109–1118 (2005).
74. Nishimura, D. Y. *et al.* Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 16588–16593 (2004).
75. Cardenas-Rodriguez, M. *et al.* The Bardet-Biedl syndrome-related protein CCDC28B modulates mTORC2 function and interacts with SIN1 to control cilia length independently of the mTOR complex. *Hum Mol Genet* **22**, 4031–4042, doi:[10.1093/hmg/ddt253](https://doi.org/10.1093/hmg/ddt253) (2013).

Acknowledgements

We thank Magdalena Cárdenas-Rodríguez, Florencia Irigoín, Paola Lepanto, Rossina Novas, Belén Torrado and Matías Fabregat for discussions and help along different stages of this work and Maine Fariello for her help with statistical analysis. We also thank other members of the INDICyO Program and in particular Dr. Carlos Batthyány and Dr. Marcelo Hill for sharing reagents and helpful discussions. This study was supported by MERCOSUR Structural Convergence Fund (FOCEM, COF 03/11). VP, NB, LS, CE, and JLB are supported by the “Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas”, PEDECIBA, and by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay. NZ is supported by NIH grant RO1DK102001 and the Mid-Atlantic Nutrition and Obesity Research Center (P30DK072488), and NK by NIH grant HD042601.

Author Contributions

V.P.E., S.L., L.C., N.B., and L.S. performed the experiments. V.P.E., S.L., C.E., N.A.Z., and J.L.B. analyzed data. V.P.E., N.K., C.E., N.A.Z. and J.L.B. designed experiments. V.P.E. and J.L.B. wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:[10.1038/s41598-017-10330-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-10330-0)

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017