

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE SREBP2 EN EL METABOLISMO GLUCÍDICO Y LIPÍDICO DE RATONES DEPENDIENTES DE DIETA

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: **Cristina Bernat Quesada**

TUTOR/A EXTERNO/A: **Dr. D. Felipe Javier Chaves Martínez**

COTUTOR/A EXTERNO/A: **Dra. Dña. Irene Andrés Blasco**

TUTOR/A ACADÉMICO/A: **Prof. María Adelaida García Gimeno**

Curso Académico: 2019/2020
VALENCIA, 01 de junio de 2020

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es una enfermedad multifactorial causada por una interacción compleja entre factores ambientales y genéticos. Mientras que los factores de riesgo ambientales están bien establecidos, entre los cuales se incluyen la dieta o el sedentarismo, el componente genético sigue siendo desconocido en gran medida. Existen estudios realizados con roedores que relacionan la regulación de un conjunto de proteínas conocidas como proteínas de unión al elemento regulador de esterol 2 (SREBP2, del inglés *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2*) con la aparición de algunas enfermedades metabólicas como son la DMT2, obesidad, lipotoxicidad y enfermedades hepáticas. En este contexto, el objetivo del presente proyecto fue llevar a cabo la caracterización metabólica de ratones transgénicos de diferente edad que sobreexpresan SREBP2 a nivel sistémico, para comprobar si existía una posible relación entre este y la DMT2, así como con otras alteraciones del metabolismo lipídico, principalmente la hipercolesterolemia. Una vez realizados los diferentes estudios, se evaluaron las diferencias encontradas entre los diferentes grupos de ratones, en los que se pudo comprobar que, en general, la sobreexpresión de *Srebf2* mejoraba el metabolismo lípido y glucídico, especialmente en ratones de 12 meses, en los que se observó una menor resistencia a la insulina, una disminución del colesterol total y un menor peso corporal.

PALABRAS CLAVE

Diabetes Mellitus tipo 2, enfermedad multifactorial, SREBP2, metabolismo, lípidos, glucosa.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a multifactorial disease caused by a complex interaction between environmental and genetic factors. While environmental risk factors are well established, including diet or sedentary lifestyle, the genetic component remains unknown to a large extent. There are studies realized with rodents that relate the regulation of a set of proteins known as Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 (SREBP2) with the appearance of some metabolic diseases such as T2DM, obesity, lipotoxicity and liver diseases. In this context, the objective of the present project is to carry out the metabolic characterization of transgenic mice of different ages that overexpress SREBP2 at systemic level, to check if there is a possible relationship between this and DM2 as well as other alterations of lipid metabolism, mainly hypercholesterolemia. Once the different studies were carried out, the differences found between the different groups of mice were evaluated, in which it was detected that, in general, the overexpression of Srebf2 improved lipid and glucidic metabolism, especially in 12-month-old mice, in which a lower insulin resistance, a decrease in total cholesterol and a lower body weight were detected.

KEYWORDS

Type 2 diabetes mellitus, multifactorial disease, SREBP2, metabolism, lipids, glucose.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Diabetes	9
1.2 El sistema SREBP2.....	11
1.2.1 Activación de SREBP2	11
1.3 SREBP2 y las enfermedades metabólicas	14
OBJETIVOS.....	17
2. MATERIAL Y MÉTODOS	18
2.1 Ratones y dietas	18
2.2 Genotipado de ratones	18
2.3 Caracterización del metabolismo de la glucosa.....	19
2.3.1 Test de tolerancia a la insulina (TTI)	19
2.3.2 Test de tolerancia a la glucosa (TTG).....	20
2.3.3 ELISA insulina: cuantificación insulina endógena	20
2.4 Caracterización del metabolismo lipídico.....	21
2.5 Obtención y procesamiento de tejidos de ratón	22
2.6 Caracterización fenotípica de diferentes tejidos	22
2.6.1 Determinación del contenido de triglicéridos en el hígado.....	22
2.6.2 Caracterización del tejido adiposo	23
2.7 Análisis estadísticos.....	23
3. RESULTADOS	24
3.1 Resultados de la caracterización del metabolismo glucídico en ratones con sobreexpresión de SREBP	24
3.1.1 Los ratones <i>S-mouse</i> de 12 meses de edad con dieta HFHS mostraron un incremento en los niveles de glucosa basal respecto a los <i>S-mouse</i> con dieta control	24
3.1.2 Los ratones <i>S-mouse</i> de 18 meses de edad con dieta control mostraron una mayor resistencia a la insulina que los ratones <i>WT</i> con esta misma dieta	27
3.2 Caracterización del metabolismo lipídico y peso corporal de ratones <i>WT</i> y <i>S-mouse</i> alimentados con dieta HFHS y dieta control	30
3.2.1 Los ratones <i>S-mouse</i> de 12 meses con dieta HFHS mostraron una disminución del colesterol total con respecto a los ratones <i>WT</i>	30
3.2.2 Los ratones <i>S-mouse</i> de 18 meses con dieta control mostraron una disminución del colesterol ApoB con respecto a los ratones <i>WT</i>	32

3.3 Caracterización del tejido hepático y adiposo en ratones <i>WT</i> y <i>S-mouse</i> alimentados con dieta HFHS y dieta control	34
3.3.1 Los ratones con sobreexpresión de SREBP2 alimentados con dieta HFHS mostraron una tendencia en aumento del contenido de TG hepáticos en comparación con los ratones <i>S-mouse</i> alimentados con dieta de control.....	34
3.3.2 Los ratones <i>S-mouse</i> de 12 meses de edad alimentados con dieta HFHS mostraron una tendencia a presentar adipocitos con menor área con respecto a los ratones <i>WT</i>	36
3.3.3 Los ratones de 18 meses con sobreexpresión de SREBP2 alimentados con dieta HFHS mostraron un aumento del contenido de TG hepáticos en comparación con los ratones <i>S-mouse</i> alimentados con dieta de control	38
4. DISCUSIÓN.....	39
5. CONCLUSIONES.....	44
6. BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número estimado de personas con diabetes en el mundo y por región en 2019 y 2045 (20-79 años)	10
Figura 2. Activación de las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP) regulada por colesterol	13
Figura 3. Las funciones de INSIG en el metabolismo del colesterol	14
Figura 4. Lipotoxicidad mediada por proteínas SREBP	15
Figura 5. Resultados obtenidos durante el TTG en ratones <i>WT</i> y <i>S- mouse</i> alimentados durante 10 meses con dieta HFHS y dieta control	25
Figura 6. Resultados obtenidos durante el TTI en ratones <i>WT</i> y <i>S- mouse</i> alimentados durante 10 meses con dieta HFHS y dieta control	26
Figura 7. Resultados del análisis de la insulina liberada durante el TTG en ratones <i>WT</i> y <i>S- mouse</i> alimentados durante 10 meses con dieta HFHS y dieta control	27
Figura 8. Resultados obtenidos durante el TTG en ratones <i>WT</i> y <i>S- mouse</i> alimentados durante 16 meses con dieta HFHS y dieta control	28
Figura 9. Resultados obtenidos durante el TTI en ratones <i>WT</i> y <i>S- mouse</i> alimentados durante 16 meses con dieta HFHS y dieta control	29
Figura 10. Resultados del análisis de la insulina liberada durante el TTG en ratones <i>WT</i> y <i>S- mouse</i> alimentados durante 16 meses con dieta HFHS y dieta control	30
Figura 11. Caracterización del metabolismo lipídico de ratones <i>WT</i> y <i>S- mouse</i> alimentados durante 10 meses con dieta HFHS y dieta control	32
Figura 12. Caracterización del metabolismo lipídico en ratones <i>WT</i> y <i>S- mouse</i> alimentados durante 16 meses con dieta HFHS y dieta control	33
Figura 13. Caracterización del hígado en ratones <i>WT</i> y <i>S- mouse</i> alimentados durante 10 meses con dieta HFHS y dieta control	35
Figura 14. Caracterización del tejido adiposo en ratones <i>WT</i> y <i>S- mouse</i> alimentados con dieta HFHS y dieta control durante 10 meses	37
Figura 15. Cuantificación del contenido en TG del hígado en ratones <i>WT</i> y <i>S- mouse</i> alimentados con dieta HFHS y dieta control durante 16 meses	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores empleados para el genotipado de los ratones.	19
Tabla 2. Condiciones de la PCR para <i>Srebf2</i>	19

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APOB: Apolipoproteína B

ARN: Ácido Ribonucleico

AUC: Área debajo de la curva

CBPs: Células Beta Pancreáticas

COPII: Complejo II de proteínas de recubrimiento

CTE: Concentración Equivalente de Trioléina

DMT1: Diabetes mellitus tipo 1

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FID: Federación Internacional de la Diabetes

GP78: Glicoproteína 78

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HFHS: Alta en grasa y sacarosa

HMGR: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa

INSIG: Genes inducidos por la insulina

INSIG-1: Gen inducido por la insulina 1

INSIG-2: Gen inducido por la insulina 2

LD: Gota lipídica

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

miR-33a: MicroARN-33a

miR-33b: MicroARN-33b

NAFLD: Hígado graso no alcohólico

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFA: Paraformaldehído

RE: Retículo Endoplasmático

SCAP: Proteína activadora - liberadora de SREBP2

S1P: Proteína S1

S2P: Proteína S2

SREBF1: Factor de unión a elementos reguladores de esteroides 1

SREBF2: Factor de unión a elementos reguladores de esteroides 2

SREBPs: Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides

SREBP1: Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides 1

SREBP1a: Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides 1a

SREBP1c: Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides 1c

SREBP2: Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides 2

TG: Triglicéridos

TMB: Tetrametilbenceno

TTG: Test de tolerancia a la glucosa

TTI: Test de tolerancia a la insulina

VCP: Proteína que contiene valosina

WT: Tipo silvestre

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes

Según las estimaciones realizadas en 2019 por la FID la prevalencia estimada de personas con diabetes en el mundo entre 20 y 79 años es de 463 millones de personas(1–3), de tal manera que 1 de cada 11 adultos tienen diabetes y de los cuales 1 de cada 2 permanecen sin diagnosticar (Figura 1). Esto es muy preocupante porque un aumento en la prevalencia de la diabetes aumentará el número de enfermedades crónicas y agudas en la población general, con profundos efectos sobre la calidad de vida, la demanda de servicios de salud y los costes económicos(4). La alta prevalencia de comorbilidades en la población con diabetes y las complicaciones relacionadas con la enfermedad representan una proporción sustancial de los costes(5), de hecho, 3 de cada 4 personas con diabetes viven en países con ingresos bajos o medios, países que seguramente tendrán dificultades para costear los gastos derivados de esta enfermedad(1). Se estima que el gasto global destinado a la diabetes supone un 10 % de todo lo destinado al cuidado de la salud. Se espera que para el año 2030 se alcance una prevalencia de 578 millones de personas afectadas por la enfermedad y se llegue hasta los 700 millones para el año 2045(1), lo que equivaldría a un aumento del 51% en el número de personas con diabetes del año 2019 al 2045.

La Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) es un trastorno metabólico que se caracteriza por hiperglucemia (niveles altos de azúcar en la sangre) causada por la resistencia a la insulina y/o la falta de esta; en contraste con la Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1), que es una enfermedad autoinmune en la que hay una falta absoluta de insulina debido a la destrucción de los islotes pancreáticos por los propios anticuerpos. Los síntomas clásicos son sed excesiva, micción frecuente y hambre constante. La DMT2 representa alrededor del 90 % de los casos de diabetes, mientras que el otro 10 % se debe principalmente a la DMT1 y a la diabetes gestacional. Se piensa que la obesidad es la principal causa de la DMT2 entre personas con predisposición genética a la enfermedad. En la actualidad, se ha establecido que pueden estar influyendo varios factores en la aparición de DMT2, como factores genéticos, factores ambientales y hábitos de vida poco saludables (sedentarismo, ingesta de alcohol y consumo de tabaco)(6). Sin embargo, factores sociales (factores psicológicos como la depresión o la ansiedad) y el entorno natural (contaminación del aire o niveles de radiación) también pueden afectar en la síntesis y secreción de insulina(7). De esta forma, se está viendo aumentada su prevalencia debido a cambios en los hábitos nutricionales y la falta de ejercicio físico en la población que, al interaccionar con el fondo genético y epigenético, supone un aumento en el desarrollo de la enfermedad. Además, hay que tener en cuenta el envejecimiento de la población, ya que la esperanza de vida aumenta y con ella ciertas enfermedades asociadas(8,9).

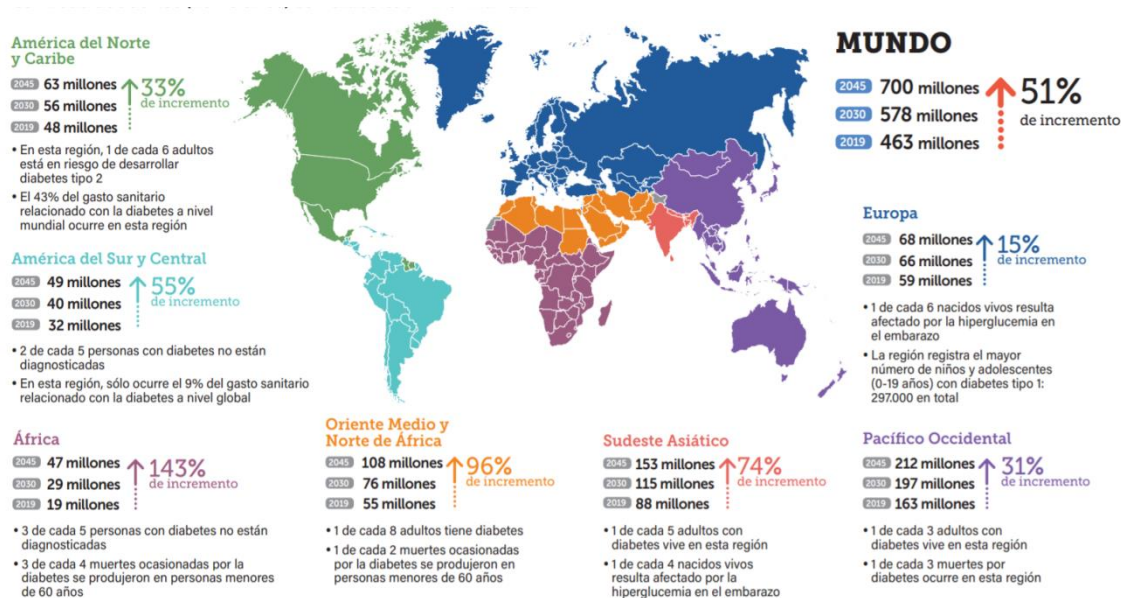


Figura 1. Número estimado de personas con diabetes en el mundo y por región en 2019 y 2045 (20-79 años). Extraída de Atlas de la Diabetes de la FID, 9ª Edición (2019).

La DMT2 se caracteriza por ser una enfermedad crónica asociada a una disminución de la esperanza de vida de diez años. Las complicaciones a largo plazo de la hiperglucemia pueden incluir problemas metabólicos y cardiovasculares como enfermedades del corazón, derrames cerebrales, retinopatía diabética, insuficiencia renal y mala circulación en las extremidades (4,10,11).

Diferentes estudios realizados con roedores relacionan la regulación de un conjunto de proteínas conocidas como proteínas de unión al elemento regulador de esteroles 2 (SREBP2, del inglés *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2*) con la aparición de algunas enfermedades metabólicas como son la DMT2, obesidad, lipotoxicidad, enfermedades hepáticas o incluso Alzheimer(12–16).

1.2 El sistema SREBP2

Las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs, del inglés *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) son factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en la síntesis de lípidos y tienen un papel clave dentro de redes de señalización involucradas en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos.

Se han establecido funciones fisiológicas distintivas de las SREBP: el factor de unión a elementos reguladores de esteroides 1 (*Srebf1*, del inglés *Sterol Regulatory Element-Binding Factor 1*) codifica para dos proteínas diferentes, las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides 1a (SREBP1a, del inglés *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1a*), implicadas en regular la síntesis de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol; y las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides 1c (SREBP1c, del inglés *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c*), que regulan el metabolismo de la glucosa y los lípidos; mientras que el factor de unión a elementos reguladores de esteroides 2 (*Srebf2*, del inglés *Sterol Regulatory Element-Binding Factor 2*) codifica para las proteínas de unión al elemento regulador de esteroles 2 (SREBP2 del inglés *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2*), implicadas en la regulación del metabolismo del colesterol(17), y para el microARN-33a (miR-33a)(18).

Existen dos isoformas del miR-33 en humanos: el microARN-33b (miR-33b), que está presente en el intrón 17 del gen *Srebf1* en el cromosoma 17, y el microARN-33a, que se encuentra en el intrón 15 del gen *Srebf2* en el cromosoma 22(18). Sin embargo, en ratones, solo hay una isoforma del miR-33 (que equivale al miR-33a humano), ubicada dentro del intrón 15 del gen *Srebf2* de ratón(19).

Cuando se produce la transcripción de *Srebf1* y *Srebf2* aumenta la expresión del miR-33a y del miR-33b, codificados dentro de los intrones de los genes *Srebf2* y *Srebf1*, respectivamente. Los miR-33a y miR-33b regulan negativamente la exportación de lípidos y la oxidación de ácidos grasos(12,20,21).

1.2.1 Activación de SREBP2

En la membrana del retículo endoplasmático (RE), los SREBP forman heterodímeros con otra proteína de membrana, la proteína de activación de escisión de SREBP2 conocida como proteína activadora - liberadora de SREBP2 (SCAP, del inglés *SREBP cleavage-activating protein*)(17,22).

Cuando el colesterol se acumula en las membranas del RE, el complejo SCAP-SREBP2 queda retenido, por lo que se detiene la activación proteolítica de SREBP y disminuye la expresión de sus genes diana. Por lo tanto, la cantidad de colesterol en las células está regulada por un sistema de retroalimentación. Este sistema regulador se extiende más allá de SREBP, ya que la enzima limitante de la velocidad de síntesis del colesterol, la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGR), también está controlada por la proteólisis dependiente de esteroides.

Esta regulación dependiente de esteroides por parte de SCAP y HMGR depende de los dominios de detección de esteroides que se encuentran en estas proteínas(23).

En presencia de esteroides celulares la proteína SCAP se une directamente al colesterol mediante su dominio de detección de esteroides e induce un cambio conformacional en la proteína. Como resultado, SCAP no puede interactuar con el complejo II de proteínas de recubrimiento (COPII, del inglés *Coat complex protein II*) y el complejo SCAP-SREBP2 no se incorpora a las vesículas recubiertas de COPII. Como consecuencia, los SREBP2 no se transportan al aparato de Golgi y no se activan (Figura 2). Además, en presencia de colesterol, esta inhibición se ve reforzada por un grupo de proteínas conocidas como genes inducidos por la insulina (INSIGs, del inglés *Insulin Induced Gene*)(23). Estas son proteínas que residen en el RE e interactúan con SCAP y HMGR de una manera dependiente de esteroides(23). Por lo tanto, la activación de SREBP2 está regulada por el colesterol y los oxisteroides a través de SCAP e INSIG(17).

En mamíferos existen dos proteínas INSIG que son codificadas por genes diferentes: el gen inducido por la insulina 1 (INSIG-1, del inglés *Insulin induced gene 1*), uno de los genes objetivos de SREBP, y el gen inducido por la insulina 2 (INSIG-2, del inglés *Insulin induced gene 2*). Los INSIG (Figura 3) son proteínas de membrana del RE que interactúan directamente con SCAP y evitan que el complejo SCAP-SREBP2 siga la ruta RE-Golgi dependiente de COPII(24). El transporte de SCAP-SREBP2 se bloquea a concentraciones de colesterol mayores del 5% en el RE. Los niveles de INSIG-1 aumentarían de manera similar a otros genes diana de SREBP y en relación con el colesterol celular, proporcionando un mecanismo para restablecer la asociación SCAP-INSIG y limitar la maduración de SREBP2 a medida que los niveles de colesterol continúan por encima del nivel umbral crítico(22,24).

Cuando los niveles de colesterol en el RE se encuentran por debajo del umbral crítico, SCAP cambia su conformación para dejar de unirse a INSIG-1 y permitir por lo tanto la formación del complejo SCAP-SREBP2(24). La ubiquitinación y degradación de INSIG-1 está regulada por la concentración de esteroides, ya que este se estabiliza cuando se une al complejo SCAP en presencia de colesterol. Cuando los niveles de colesterol disminuyen, SCAP-SREBP2 se separa de INSIG-1 y el complejo sale de la membrana del RE. Como resultado, INSIG-1 es rápidamente degradado a través de la acción de la glicoproteína 78 (GP78), una ligasa unida a la membrana(23).

A continuación, el complejo SCAP-SREBP2 se transporta desde el RE al aparato de Golgi y se procesa proteolíticamente para su activación en dos pasos gobernados por dos proteasas unidas a la membrana del aparato de Golgi, la proteína S1 (S1P) y la proteína S2 (S2P) (Figura 2).

S1P actúa en primer lugar escindiendo la proteína SREBP2 inmadura en el lado C-terminal de un residuo de leucina(24). Este primer paso de escisión genera una proteína

SREBP2 con la mitad de su tamaño original. A continuación, la región N-terminal es escindida por S2P(13,17), liberando las formas maduras de la proteína. Estos fragmentos transcripcionalmente activos de SREBP2 se translocan al núcleo, donde se unen a los promotores de sus genes objetivo, incluidos los genes involucrados en la síntesis y el metabolismo de los lípidos. Los primeros genes regulados por SREBP2 identificados fueron los que codifican el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés *Low-density lipoprotein*) y la HMGR(23).

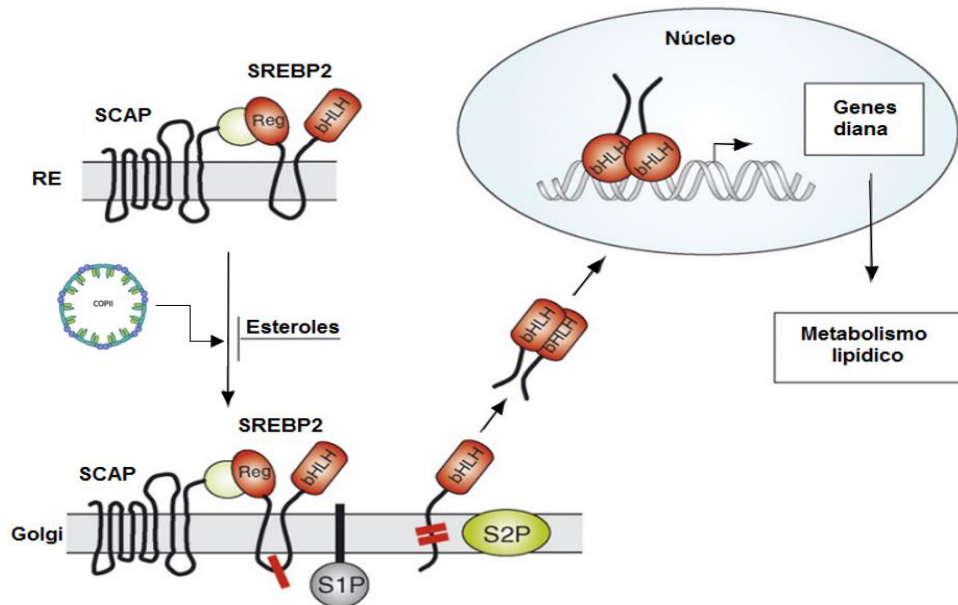


Figura 2. Activación de las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP) regulada por colesterol. Los SREBP asociados a la membrana son transcripcionalmente inactivos. En el RE, los dominios C-terminales de los SREBP interactúan con SCAP, que funciona como un sensor de esteroides. En las células sin esteroides, la proteína SCAP conduce a los SREBP hasta el aparato de Golgi, donde son procesados por dos proteasas asociadas a la membrana, S1P y S2P, que liberan las formas maduras de la proteína para dirigirse al núcleo y unirse a sus promotores donde llevarán a cabo la regulación de genes implicados en el metabolismo lipídico. Cuando el colesterol se acumula en el RE, el complejo SCAP- SREBP2 queda retenido y se detiene la activación proteolítica de SREBP2, con lo que disminuye la expresión de sus genes diana. Adaptada de (Bengoechea-Alonso and Ericsson, 2007).

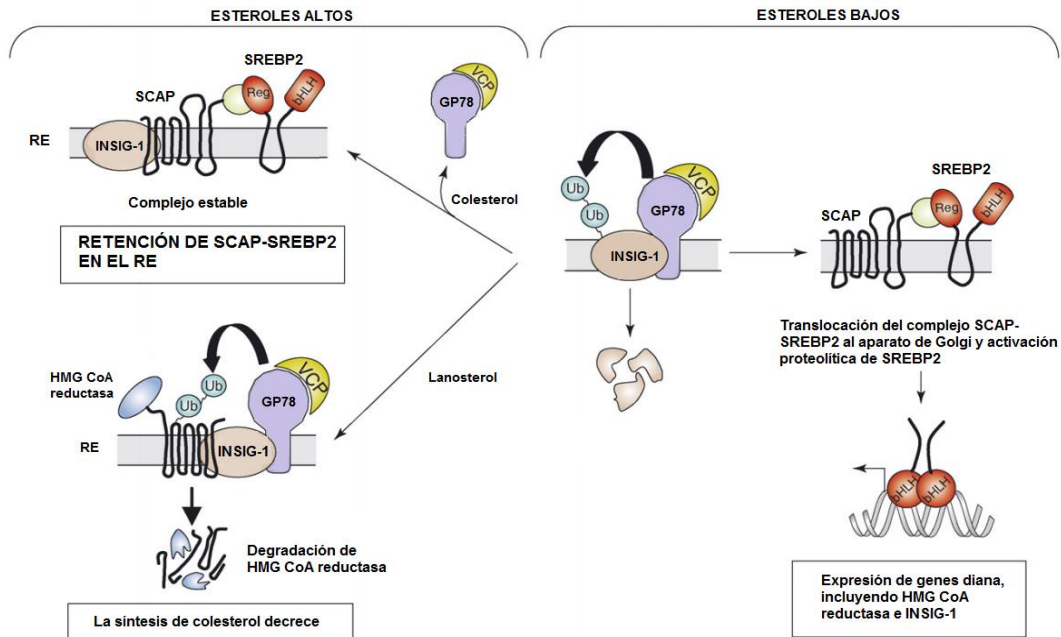


Figura 3. Las funciones de INSIG en el metabolismo del colesterol. En las células deficientes en esteroides, INSIG-1 interactúa con GP78 y una proteína que contiene valosina (VCP, del inglés Valosin-Containing Protein) para ser ubiquitinada y degradada. Como resultado, el complejo SCAP- SREBP2 sale del RE y SREBP2 se activa. Cuando los niveles de colesterol e INSIG-1 aumentan en la membrana del RE, el colesterol se une a SCAP, promoviendo la interacción entre el complejo SCAP- SREBP2 e INSIG-1. Como resultado de esta interacción el complejo se retiene en el RE. Paralelamente, el lanosterol (precursor del colesterol) promueve la unión de HMGR a un grupo de INSIG-1, lo que desencadena la ubiquitinación y degradación de HMGR, inhibiendo así la síntesis de colesterol. Por lo tanto, INSIG-1 participa en la regulación de la transcripción dependiente de SREBP y la síntesis de colesterol. Adaptada de (Bengoechea-Alonso and Ericsson, 2007).

1.3 SREBP2 y las enfermedades metabólicas

El aumento de la actividad de SREBP2 puede deberse a diferentes factores como son la dieta o alteraciones genéticas y epigenéticas y puede producir alteraciones celulares que pueden estar implicadas en el desarrollo de DMT2.

Las proteínas SREBP están involucradas en innumerables procesos y patologías celulares como la generación de especies reactivas de oxígeno, el estrés del retículo endoplásmico, la apoptosis y la autofagia (Figura 4). De hecho, la activación de SREBP causa estrés celular mediado por lípidos (lipotoxicidad) que contribuye a enfermedades metabólicas como la obesidad, la DMT2, la dislipidemia, la hepatosteatosis y la aterosclerosis, extendiendo así la patología relacionada con el SREBP para incluir inflamación y fibrosis en diversos órganos(15,17,25).

En el caso del hígado la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, del inglés *non-alcoholic fatty liver disease*) se caracteriza por una acumulación excesiva de lípidos en los hepatocitos, lo que lleva a diferentes grados de daño hepático. Los principales factores de riesgo de NAFLD son la resistencia a la insulina, la obesidad, la inflamación y la dislipidemia(26,27).

Para comprender las funciones fisiológicas y metabólicas de SREBP2, existen estudios centrados en el hígado que muestran un aumento de la expresión hepática de SREBP2 en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (NASH, del inglés *non-alcoholic steatohepatitis*)(26,28). Además, dado el hecho que los niveles de transcripción de SREBP2 se correlacionan con los niveles de miR-33a en la mayoría de los tejidos y líneas celulares, es probable que miR-33a aumente en enfermedades como NAFLD y NASH, al igual que lo hace SREBP2(29). El miR-33a, por lo tanto, coopera con SREBP2 para mantener los niveles de lípidos celulares.

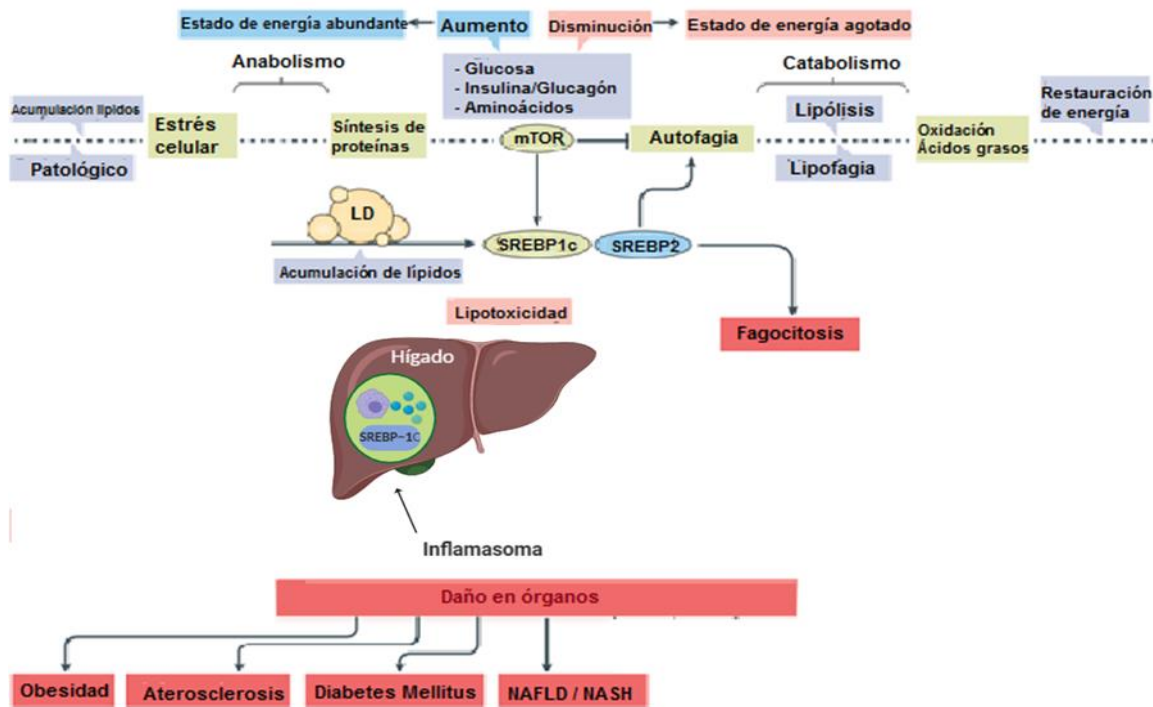


Figura 4. Lipotoxicidad mediada por proteínas SREBP. El estado de abundancia de energía activa las proteínas SREBP (SREBP1 y SREBP2), mientras que los estados de agotamiento de energía las inhiben, regulando así la síntesis de ácidos grasos y colesterol, respectivamente. La proteína SREBP2 forma parte de un sistema de retroalimentación autónomo para la regulación del esteroles. Durante estados de agotamiento energético, las gotitas lipídicas (LD, del inglés Lipid drop) se degradan a través de la lipofagia para restaurar los niveles de energía. SREBP2 podría participar en la regulación de la fagocitosis y la autofagia. Las flechas negras y las barras en T denotan acciones estimulantes e inhibitorias, respectivamente. Adaptado de (Shimano-Sato, 2017)

La activación del factor de transcripción nuclear SREBP2 promueve la acumulación de colesterol en hepatocitos(27). Existen estudios en humanos en los que se ha encontrado un aumento en la expresión hepática de SREBP2 y de sus genes diana, sin embargo, no está claro si este aumento puede ser una causa del NAFLD o una consecuencia de la hiperinsulinemia y obesidad de los pacientes. En otros trabajos se ha visto como la sobreexpresión de SREBP2 en hígado puede predisponer a sujetos inicialmente delgados y sensibles a la insulina al desarrollo de NAFLD y puede modular la lesión hepática y el metabolismo de glucosa y lípidos(27).

Estos estudios en ratones transgénicos han mostrado que la actividad de SREBP2 regula a *Srebf1* en el hígado y otros tejidos y, por lo tanto, SREBP2 modularía el metabolismo de la glucosa y el metabolismo lipídico. Estudios en otros animales transgénicos han demostrado que el aumento de SREBP2 puede alterar la secreción de la insulina y reducir el número de células beta pancreática (CBPs).

OBJETIVOS

Este trabajo consta de un objetivo principal: **estudio de los efectos en el metabolismo lipídico y glucídico de la sobreexpresión de SREBP2 en ratones a nivel sistémico**. Para ello, este objetivo principal está subdividido en 3 objetivos:

- 1. Caracterización del metabolismo glucídico en ratones con sobreexpresión de SREBP2.**
- 2. Caracterización del metabolismo lipídico en ratones con sobreexpresión de SREBP2.**
- 3. Estudio del papel de SREBP2 en diferentes tejidos y su relación con enfermedades metabólicas.**

Por ello, en el proyecto que he colaborado se seleccionó el gen *Srebp2* y se creó un ratón transgénico específico a partir del que se llevarían a cabo una serie de experimentos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Ratones y dietas

Los ratones utilizados en este estudio fueron estabulados en el animalario de la Universidad de Valencia, ubicado en la Facultad de Medicina. El manejo de los ratones y los procedimientos experimentales siguieron la normativa vigente 2010/63/EU para el cuidado de animales de experimentación.

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ratones transgénicos que llevaban copias adicionales del gen *Srebf2* (nombrado por nosotros *S-mouse*), que se obtuvieron mediante retrocruces en el fondo genético C57BL6/J. Se utilizaron ratones de tipo silvestre (*WT*, del inglés *Wild Type*) como grupo de control. Ambos grupos fueron identificados por genotipado para detectar o no la presencia de la copia adicional de *Srebf2*. Los ratones tuvieron acceso a alimentos y agua a voluntad y fueron expuestos a un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los ratones fueron alimentados con una dieta control (2,8% de grasa, Panlab, España) o con una dieta alta en grasa y sacarosa (HFHS, del inglés *High Fat-High Sucrose*) (60% de grasa y 24% de sacarosa. Ssniff, Alemania). Estos estudios se llevaron a cabo en ratones macho y hembra de 12 y 18 meses de edad.

2.2 Genotipado de ratones

Para determinar si los ratones eran transgénicos o silvestres, se llevó a cabo el genotipado de los mismos mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*). La identificación de los ratones consistió en una perforación de la oreja, de la cual se obtuvo tejido para el genotipado de los mismos. Se extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) de tejido de oreja de ratón mediante un kit comercial para purificar ADN (Maxwell® CSC DNA FFPE Kit, Promega, EEUU) que se utiliza junto con el instrumento clínico Maxwell® CSC (Promega, EEUU) cuyo papel consiste en realizar la extracción del ADN. El primer día de la extracción se mezcló el tejido con 20 µl de proteinasa K, enzima encargada de digerir las células y desnaturalizar proteínas, se añadieron 180 µl del tampón de incubación y se dejaron toda la noche en una estufa a 70°C.

El segundo día, se preparó el Maxwell® colocando tantos cartuchos como muestras había. En cada cartucho se encontraban diferentes reactivos que se emplearon para la purificación del ADN. Se añadieron 400µl de tampón de lisis a las muestras dejadas durante toda la noche y se pasaron por vórtex durante 10 segundos hasta que hicieron espuma. Posteriormente, se puso a punto el instrumento para insertar los cartuchos con la muestra.

Una vez obtenida nuestra de ADN purificado, se realizó una PCR para *Srebf2*. Para ello, se preparó la mezcla (H₂O, cebadores, enzima KAPA2G) de la cual se añadieron 25µl, junto con 3µl de la muestra. Los grupos experimentales se identificaron mediante genotipado utilizando las condiciones y los cebadores que se indican en las tablas 1 y 2.

Gen	Cebadores
<i>Srebf2</i>	FW: 5'- ATT GCT AGG CTC CCA TTC CAA- 3' RV: 3'- TGA AGT CAG CCC CAT ACG AT- 5'

Tabla 1. Cebadores empleados para el genotipado de los ratones.

Lid 105°C	
94°C	1 minuto
94°C	15 segundos
57°C	15 segundos
72°C	5 segundos
38 ciclos	
72°C	10 minutos
Mantener a 4°C	

Tabla 2. Condiciones de la PCR para *Srebf2*

Posteriormente, para visualizar los resultados de la amplificación, se llevó a cabo una electroforesis capilar con un DNA QIAxcell (QIAGEN, Países Bajos).

Para la electroforesis capilar se añadieron 8µl de un tampón de dilución y 2µl del producto de la PCR en unos pocillos. Se puso el alineamiento para delimitar el fragmento del transgén (15-1000 pb) y el marcador de pares de bases de 50-800 pb, ya que el transgen es de 519 pb. Finalmente se visualizó la presencia de las bandas.

2.3 Caracterización del metabolismo de la glucosa

2.3.1 Test de tolerancia a la insulina (TTI)

Los estudios de tolerancia a la insulina se llevaron a cabo para determinar la sensibilidad a esta mediante la prueba de tolerancia a la insulina en ratones ayunados durante 4 horas. Para ello se pesó a los ratones y se les inyectó intraperitonealmente insulina recombinante (ACTRAPID 100UI/ml, NovoNordisk, Alemania) a una dosis de 0.5U/Kg de peso corporal (ratones separados por ser *WT* y *S-mouse*, machos y hembras y el tipo de dieta control o HFHS). Tras la inyección se midieron los niveles de glucosa en sangre mediante la realización de un pinchazo en la cola a diferentes tiempos (basal, 15, 30, 45, 60 y 90 minutos). Los resultados se analizaron calculando el parámetro del área debajo de la curva (AUC, del inglés, *Area Under the Curve*) (Software GraphPad Prism, La Jolla, CA, EEUU), que es el área resultante de la curva generada una vez se representan las medidas de glucosa a diferentes tiempos (AUC_{glucosa})

Esta prueba se realizó con la finalidad de administrar insulina exógena a los ratones con diferente genotipo y dieta para observar cómo responden a la insulina y por lo tanto evaluar la resistencia /sensibilidad a la misma.

2.3.2 Test de tolerancia a la glucosa (TTG)

La tolerancia a la glucosa se determinó mediante el test de tolerancia a la glucosa. Ratones ayunados durante 15-17 horas fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis de glucosa de 2g/Kg de peso corporal a partir de una solución estéril al 20% de glucosa (SIGMA, EEUU). Antes de inyectar la glucosa, se realizó la extracción de sangre de la cola a tiempo 0 mediante una pipeta Pasteur con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*) como anticoagulante y se guardó en un tubo eppendorf. Esta sangre se utilizó posteriormente para obtener plasma y realizar un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) de insulina para cuantificar la insulina endógena secretada por los ratones en los diferentes tiempos. Tras la inyección, los niveles de glucosa se analizaron a diferentes tiempos (tiempo 0, 15, 30, 60 y 120 minutos), también se extrajo sangre a estos tiempos para poder cuantificar la insulina. Los niveles de glucosa se midieron en sangre utilizando un glucómetro (Ascensia Elite, BAYER, Leverkusen, Alemania).

Los resultados se analizaron mediante el $AUC_{glucosa}$ (Software GraphPad Prism, La Jolla, CA, EEUU) resultante de la curva generada al representar la glucosa a los diferentes tiempos.

2.3.3 ELISA insulina: cuantificación insulina endógena

Los niveles de insulina se determinaron en plasma de ratón mediante técnicas de ELISA según las instrucciones del fabricante (CRYSTAL CHEM, EEUU). El método utilizado está basado en la técnica directa de sándwich ELISA, donde dos anticuerpos monoclonales están dirigidos contra determinantes antigénicos independientes de la molécula de insulina.

En primer lugar, se centrifugó la sangre extraída de la cola de los ratones durante el TTG a 12000 rpm durante 30 minutos a 4 °C para obtener el plasma y poder llevar a cabo el experimento de acuerdo con las instrucciones del protocolo del kit (CRYSTAL CHEM, EEUU). Posteriormente, se añadió el estándar a los pocillos de la placa que contiene el anticuerpo adherido y las muestras de plasma de los ratones a tiempo 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. El estándar fue previamente diluido a diferentes concentraciones como marca el protocolo del kit. Se añadieron 95 μ l del diluyente a cada pocillo y se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se llevó a cabo la segunda reacción, se realizaron tres lavados con tampón de lavado (200 μ l/pocillo) y se añadió la mezcla con el anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa, esto se dejó incubando durante aproximadamente media hora a temperatura ambiente.

Tras varios lavados con el tampón para la eliminación del exceso de enzima no unido, se llegó a la detección por reacción con el sustrato tetrametilbenceno (TMB, del inglés *Tetramethylbenzidine*), se añadieron 100 μ l del sustrato TMB, dejándolo incubar 40 minutos a temperatura ambiente hasta que se produjo la reacción y las muestras adquirieron un color azul de diferente intensidad dependiendo de la concentración de insulina. La reacción se detuvo al añadir H_2SO_4 0.5M, obteniendo un producto final de color amarillo que se leyó a una longitud de onda de 450nm y 630nm (esta segunda se le restó a la primera para realizar una corrección que figuraba en el protocolo). Las concentraciones se determinaron a partir de la recta patrón obtenida por las lecturas del estándar con concentraciones conocidas de insulina, en la que se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras a cuantificar.

Los resultados se analizaron mediante el $\text{AUC}_{\text{insulina}}$ (Software GraphPad Prism, La Jolla, CA, EEUU) resultante de la curva generada al representar la glucosa a los diferentes tiempos.

2.4 Caracterización del metabolismo lipídico

Para determinar los niveles plasmáticos de lípidos los ratones fueron ayunados durante 15 horas y se utilizaron kits colorimétricos enzimáticos comerciales. El plasma se obtuvo tras la centrifugación de la sangre extraída en el momento de sacrificar a los ratones durante 30 minutos a 12000 rpm, a 4°C usando como anticoagulante EDTA.

Para la determinación de triglicéridos (TG), se empleó el kit “LabAssay Triglyceride” (WAKO, EEUU) y para la determinación del colesterol total se empleó el kit “LabAssay Cholesterol” (WAKO, EEUU) ambos basados en procedimientos enzimáticos que dan lugar a un producto azulado que se lee espectrofotométricamente a 600nm de longitud de onda. Los niveles de lípidos se determinaron a partir de una curva patrón con cantidades conocidas de cada uno de los lípidos. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés *High-density lipoprotein*) se determinaron de la misma forma que el colesterol total, pero incorporando un paso previo que permite la precipitación de lipoproteínas ricas en apolipoproteína B (ApoB). Para ello, se añadió una mezcla a partes iguales de MgCl_2 1M y 20g/L de sulfato de dextrano, y se centrifugó durante 30 min a 4 °C y 13000 rpm. De esta forma se obtuvo el sobrenadante (aproximadamente 7-10 μ l de sobrenadante) y con este se midió el colesterol HDL, de la misma forma que el colesterol total, utilizando una placa de 96 pocillos y el kit “LabAssay Cholesterol” de tal manera que mediante las mediciones de la absorbancia a 600nm se obtuvo la recta patrón en la que se interpolaron los resultados de las muestras, obteniendo así los datos de colesterol total, colesterol HDL y TG en mg/ μ l. Finalmente, para obtener el colesterol ApoB se restó el colesterol total y el HDL.

2.5 Obtención y procesamiento de tejidos de ratón

Para la obtención del corazón, hígado, riñón, páncreas, músculo esquelético, grasa y cerebro, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical y posteriormente se procedió a la disección longitudinal desde la base del abdomen hasta la parte superior del tórax para poder dejar visibles las vísceras.

Antes de sacrificarlos, se extrajo sangre que se utilizó posteriormente para realizar medidas metabólicas. Una vez extraído el cerebro, se procedió a la extracción del resto de órganos. Para el lavado de la sangre de los tejidos se seccionó la aorta a nivel de la bifurcación ilíaca y se perfundieron entre 1 y 2 ml de tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*) mediante una aguja 23G introducida en el ápice del corazón. Una vez extraídos los órganos, se colocó un trozo de hígado, páncreas y grasa en *cassettes* que se fijaron con la solución de PFA al 4% (30).

Estos órganos se deshidrataron de manera que se utilizaron posteriormente para incluirlos en parafina y realizar cortes con un microtomo para realizar las tinciones correspondientes. Este último proceso fue llevado a cabo por el departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Valencia.

El resto de los órganos (hígado, riñones, grasa, cerebro, músculo esquelético y corazón) se congelaron a -80°C . Estos se emplearán para futuros estudios basados en extracción de proteínas y ácido ribonucleico (ARN).

2.6 Caracterización fenotípica de diferentes tejidos

2.6.1 Determinación del contenido de triglicéridos en el hígado

Para determinar el contenido en grasa de los hígados extraídos, se recuperaron los hígados congelados y se pesaron aproximadamente entre 90-120 mg de hígado de cada ratón. Al tubo con el trozo seleccionado de hígado se le añadió 350 μl de la mezcla 2:1 (etanol:KOH), de tal manera que se llevó a cabo una saponificación. Se incubó la mezcla a 55°C durante toda la noche para que se digiriera el hígado.

Al día siguiente, la mezcla se pasó por vórtex y se añadieron 650 μl de H_2O para conseguir un volumen final de 1000 μl . Se centrifugó la mezcla y se recuperó el sobrenadante para ponerlo en un tubo nuevo, al cual se añadieron 250 μl de MgCl_2 1M y se centrifugó para obtener un nuevo sobrenadante.

Posteriormente, se realizó el ensayo para determinar el contenido en glicerol. De la misma forma que se realizaron las medidas metabólicas del colesterol y TG, se empleó una técnica enzimática para el análisis del contenido en glicerol de las muestras (Free Glycerol Reagent, Sigma, EEUU). En primer lugar, se añadió el estándar para obtener la recta patrón con las diferentes concentraciones, posteriormente, se añadieron los 3 μl del último sobrenadante obtenido y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540nm.

Finalmente, se realizaron los cálculos correspondientes para obtener el contenido de TG en el hígado. Estos cálculos consistían en que una vez interpolados los datos de la absorbancia en la recta se obtenían unos resultados medidos en mg/ml de concentración de trioleína, esto se multiplicó por 100 para obtener mg/dl. Una vez obtenido el contenido en mg/dl de trioleína, este se multiplicó por 415/200 y por 0'012 (correcciones de volúmenes determinadas en el protocolo) y se dividió entre el peso en gramos (este peso corresponde a la cantidad de hígado pesado inicialmente), obteniendo así la concentración equivalente de trioleína (CTE). Finalmente, la CTE se multiplicó por 9'81 para obtener la concentración de TG en el hígado (mg de TG/g de hígado).

La caracterización del tejido hepático se llevó a cabo con la ayuda del departamento de Anatomía patológica de la Universidad de Valencia, donde se realizó la deshidratación, los cortes histológicos y la posterior tinción del tejido incluido en PFA. Estos cortes histológicos fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina- eosina. No se realizó la cuantificación de las gotas lipídicas contenidas en los hepatocitos, pero sí la observación y el estudio de las imágenes tomadas con un microscopio óptico LEICA DMD108 (Leica biosystems, Alemania).

2.6.2 Caracterización del tejido adiposo

La caracterización del tejido adiposo se llevó a cabo con la ayuda del departamento de Anatomía patológica de la Universidad de Valencia, donde se realizó la deshidratación de los órganos, cortes histológicos y tinción de estos con hematoxilina-eosina. La toma de imágenes de los cortes histológicos se realizó utilizando el microscopio óptico LEICA DMD108 (Leica biosystems, Alemania) de la misma forma que con el tejido hepático. La cuantificación de los adipocitos se realizó mediante morfometría computarizada utilizando la aplicación informática ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, versión 1.47v; Java 1.6.0_20)(31). Para ello, se empleó la herramienta “*Adipocytes Tools*” de ImageJ(32). Finalmente, los resultados se representaron como el número de adipocitos y el área de estos con respecto al área total del corte.

2.7 Análisis estadísticos

Todos los datos cuantitativos se mostraron como la media±error estándar de la media. En los experimentos con dos grupos, la existencia de diferencias estadísticamente significativas se evaluó mediante la prueba t-Student no pareado de dos colas. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas para valores de $p \leq 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1 Resultados de la caracterización del metabolismo glucídico en ratones con sobreexpresión de SREBP2

3.1.1 Los ratones *S-mouse* de 12 meses de edad con dieta HFHS mostraron un incremento en los niveles de glucosa basal con respecto a los *S-mouse* con dieta control

Los ratones *S-mouse* y *WT* de 12 meses de edad fueron alimentados con una dieta HFHS o una dieta control y posteriormente fueron caracterizados. La caracterización del metabolismo glucídico de los ratones mostró unos niveles similares de glucosa basal en ayunas entre los ratones con la misma dieta, no obstante, se observaron diferencias significativas entre ratones del mismo genotipo alimentados con las diferentes dietas (Figura 5A, $p \leq 0.05$).

El estudio de la tolerancia a la glucosa, determinada por el parámetro $AUC_{glucosa}$ obtenido durante el TTG (curva glucosa vs tiempo) (Figura 5B), mostró un aumento de los niveles de glucosa de forma significativa en los ratones *S-mouse* de 12 meses de edad alimentados con dieta HFHS con respecto a los *S-mouse* alimentados con dieta control. De la misma forma, se observó un aumento significativo de la glucosa en ratones *WT* alimentados con la dieta HFHS en comparación con ratones *WT* alimentados con dieta control (Figura 5C, $p \leq 0.05$), pero no se encontraron diferencias significativas entre grupos de ratones con distinto genotipo y alimentados con el mismo tipo de dieta.

Los resultados del análisis de la tolerancia a la insulina se representaron en una curva glucosa vs tiempo (Figura 6A). El cálculo del parámetro $AUC_{glucosa}$ (Figura 6B) obtenido durante el TTI, no mostró diferencias significativas entre ninguno de los cuatro grupos de ratones de 12 meses, aunque el grupo que mejor pareció responder a la insulina fueron los *S-mouse* alimentados con dieta control.

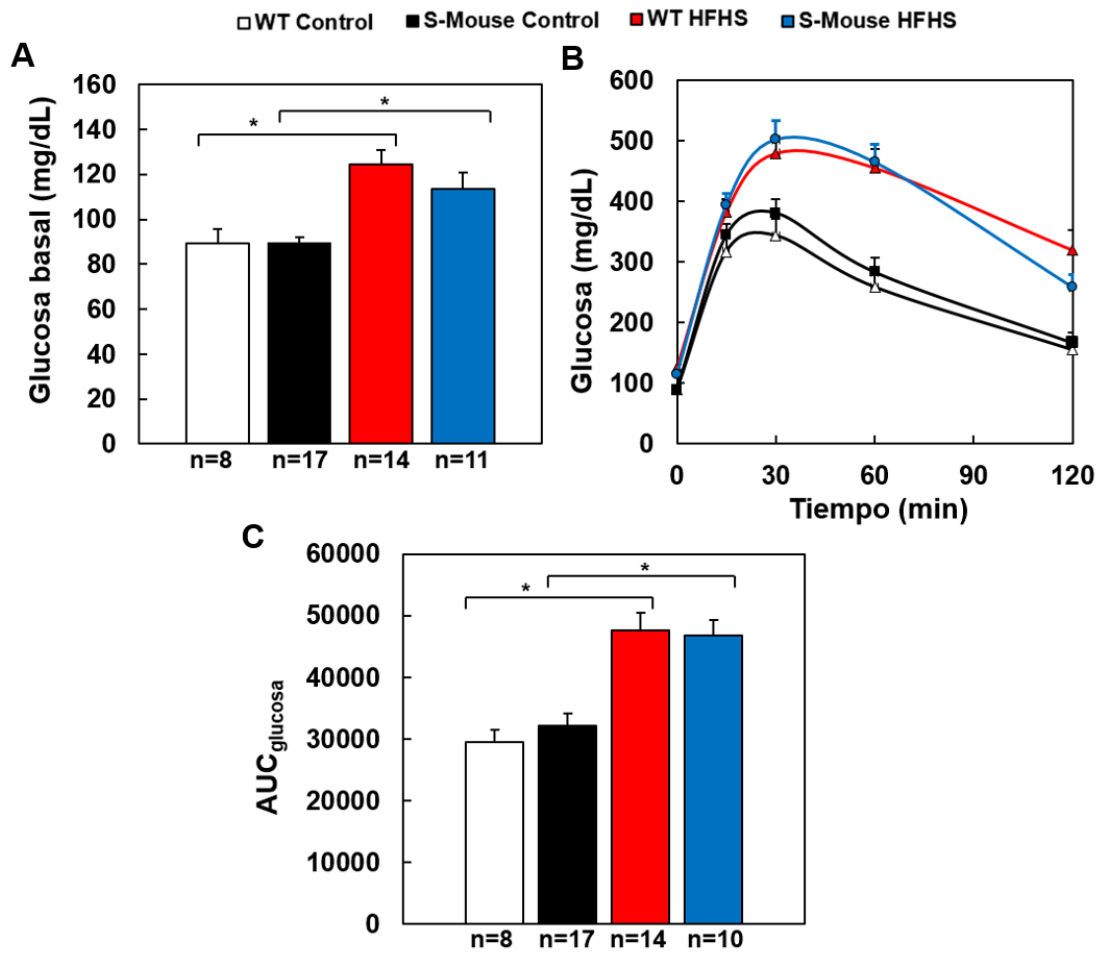


Figura 5. Resultados obtenidos durante el TTTG en ratones WT y S- mouse alimentados durante 10 meses con dieta HFHS y dieta control. A) Niveles de glucosa basal(mg/dl) obtenidos al inicio de la prueba en ratones ayunados entre 15-17h. B) Niveles plasmáticos de glucosa (mg/dl) obtenidos durante el TTTG en los diferentes tiempos (min) de la prueba. C) Resultados del parámetro AUC_{glucosa} generado a partir de las medidas de glucosa en todos los grupos de ratones. Los datos se presentan como media \pm SEM. Estudio estadístico realizado mediante la prueba T. * $p \leq 0.05$.

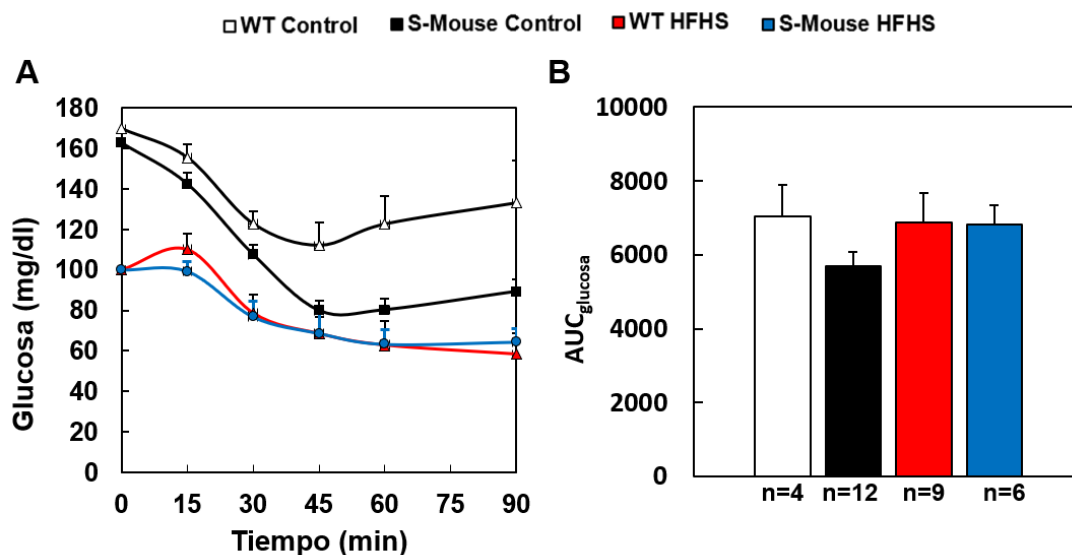


Figura 6. Resultados obtenidos durante el TTI en ratones WT y S- mouse alimentados durante 10 meses con dieta HFHS y dieta control. A) Niveles plasmáticos de glucosa (mg/dl) (porcentaje relativo a los niveles iniciales de glucosa) obtenidos durante el TTI en los diferentes tiempos (min) de la prueba en ratones ayunados durante 4h. B) Resultados del parámetro $AUC_{glucosa}$ generado a partir de las medidas de glucosa en todos los grupos de ratones. Los datos se presentan como media \pm SEM. Estudio estadístico realizado mediante la prueba T.

Los resultados del análisis de la insulina liberada durante el TTG, mediante el ELISA, muestran como la insulina basal tras las 15-17 horas de ayuno de los ratones con 12 meses de edad fue menor en ratones S-mouse para ambas dietas que en ratones WT (Figura 7A), aunque no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos. Los cálculos de la $AUC_{insulina}$ obtenidos a partir de los datos de la gráfica (Figura 7B) donde se representan los valores de insulina plasmática (ng/ml) respecto al tiempo (min), no mostraron diferencias significativas entre los cuatro grupos (Figura 7C), aunque la secreción de insulina fue ligeramente menor en los ratones S-mouse con dieta HFHS durante la prueba en comparación con los ratones WT alimentados con la misma dieta. De la misma forma, no se observaron diferencias significativas entre ratones S-mouse y WT con dieta control.

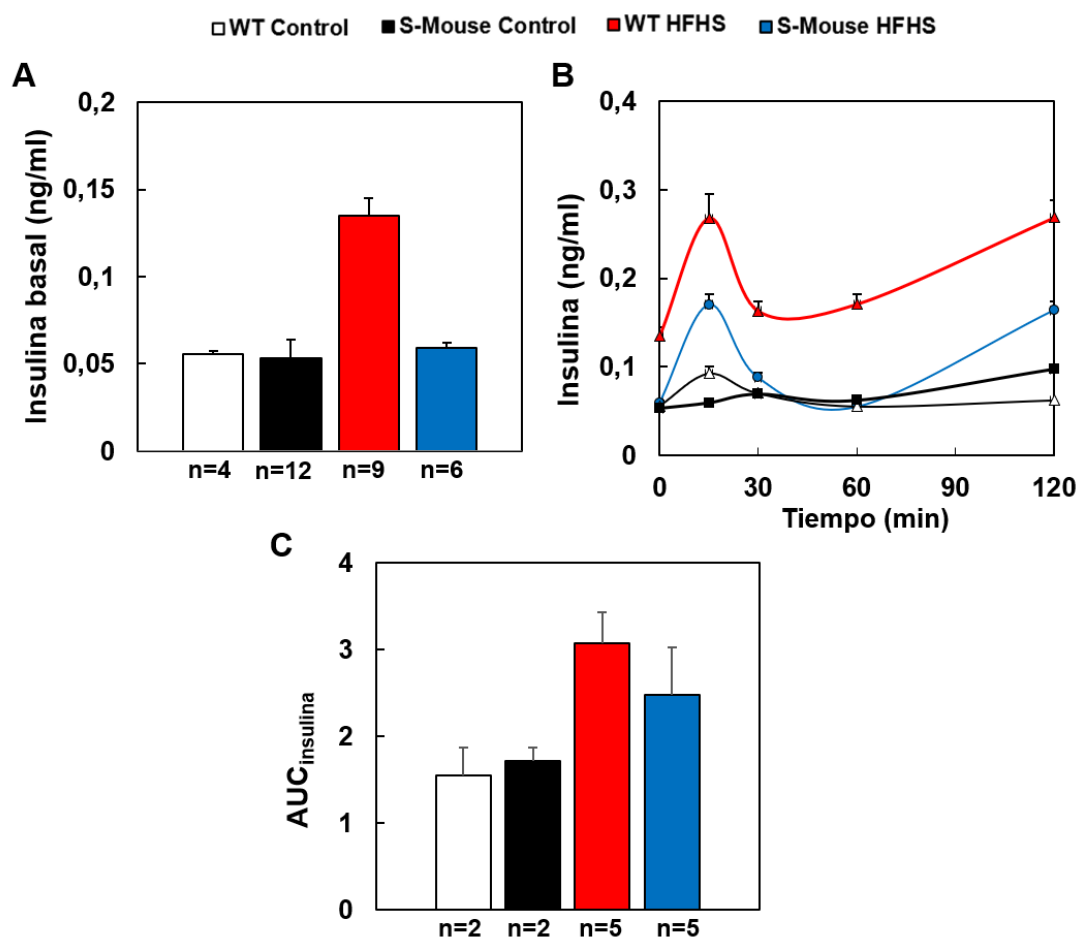


Figura 7. Resultados del análisis de la insulina liberada durante el TTG en ratones WT y *S-mouse* alimentados durante 10 meses con dieta HFHS y dieta control. A) Niveles plasmáticos de insulina basal (ng/ml) al inicio del TTG en ratones ayunados durante 15-17h. B) Representación de la evolución de los niveles de insulina a lo largo de la prueba en una curva insulina vs tiempo. C) Resultados del parámetro $AUC_{insulina}$ generado a partir de las medidas de insulina en todos los grupos de ratones. Los datos se presentan como media \pm SEM. Estudio estadístico realizado mediante la prueba T.

3.1.2 Los ratones *S-mouse* de 18 meses de edad con dieta control mostraron una mayor resistencia a la insulina que los ratones WT con esta misma dieta

Los ratones *S-mouse* y WT de 18 meses de edad fueron alimentados con una dieta HFHS o una dieta control y posteriormente fueron caracterizados de la misma forma que los ratones de 12 meses. La caracterización del metabolismo glucídico de los ratones mostró unos niveles similares de glucosa basal en ayunas entre los ratones con ambas dietas, no obstante, los ratones *S-mouse* de ambas dietas mostraron unos niveles de glucosa basal reducidos con respecto a los ratones WT de ambas dietas, aunque estas diferencias no fueron significativas (Figura 8A).

El estudio de la tolerancia a la glucosa, determinada por el parámetro $AUC_{glucosa}$ obtenido durante el TTG (curva glucosa vs tiempo) (Figura 8B), mostró un aumento de los

niveles de glucosa en los ratones *S-mouse* de 18 meses de edad alimentados con dieta HFHS con respecto a los *S-mouse* alimentados con dieta control. Este incremento no fue tan significativo en ratones *WT* alimentados con diferentes dietas (Figura 8C), aunque no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

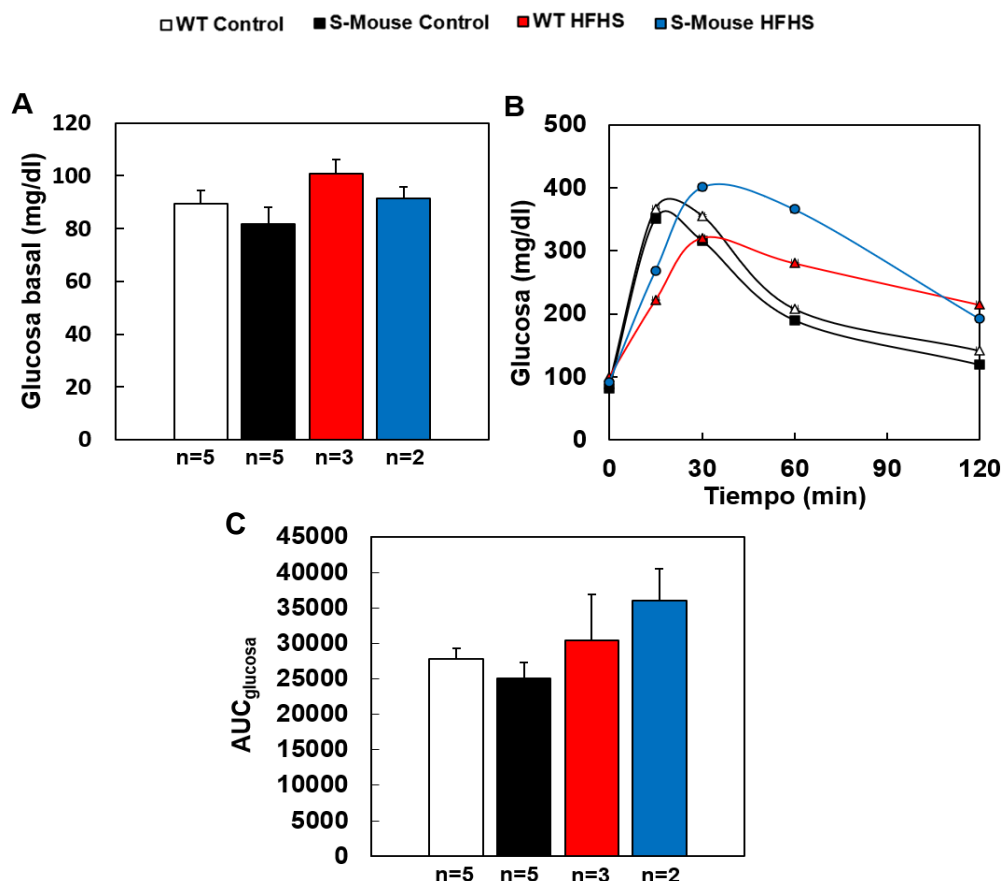


Figura 8. Resultados obtenidos durante el TTG en ratones *WT* y *S-mouse* alimentados durante 16 meses con dieta HFHS y dieta control. A) Niveles de glucosa basal (mg/dl) obtenidos al inicio de la prueba. B) Niveles plasmáticos de glucosa (mg/dl) obtenidos durante el TTG en los diferentes tiempos (min) de la prueba. C) Resultados del parámetro AUC_{glucosa} generado a partir de las medidas de glucosa en todos los grupos de ratones. Los datos se presentan como media \pm SEM. Estudio estadístico realizado mediante la prueba T.

Los resultados del análisis de la tolerancia a la insulina se representaron en una curva glucosa vs tiempo (Figura 9A). El cálculo del parámetro AUC_{glucosa} (Figura 9B) obtenido durante el TTI mostró diferencias significativas entre ratones *S-mouse* y ratones *WT* alimentados con dieta control ($p \leq 0,05$).

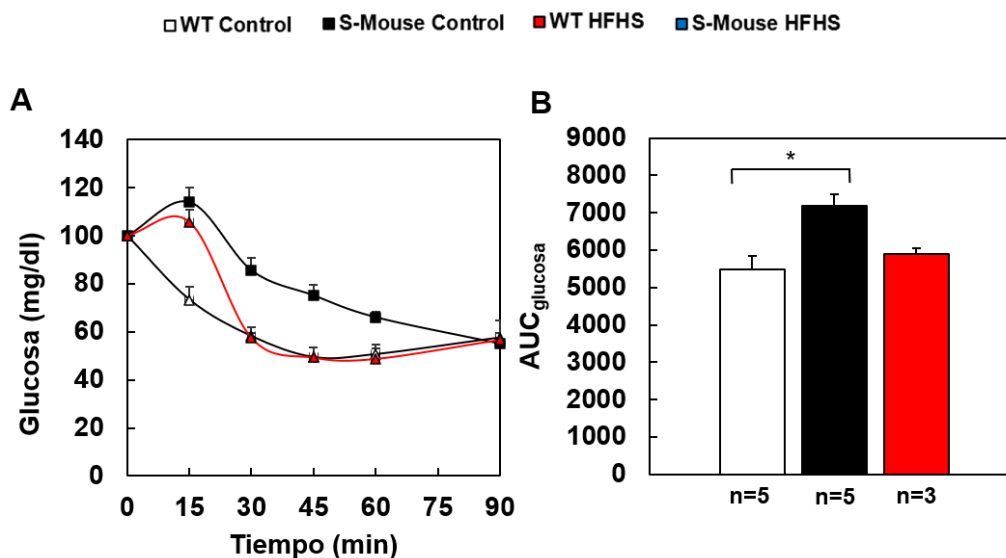


Figura 9. Resultados obtenidos durante el TTI en ratones *WT* y *S-mouse* alimentados durante 16 meses con dieta HFHS y dieta control. A) Niveles plasmáticos de glucosa (mg/dl) (porcentaje relativo a los niveles iniciales de glucosa) obtenidos durante el TTI en los diferentes tiempos (min) de la prueba en ratones ayunados durante 4h. B) Resultados del parámetro $AUC_{glucosa}$ generado a partir de las medidas de glucosa. Los datos se presentan como media \pm SEM. Estudio estadístico realizado mediante la prueba T. * $p \leq 0.05$

Los resultados del análisis de la insulina liberada durante el TTG (Figura 10A), mediante el ELISA, muestran como la insulina basal tras las 15-17 horas de ayuno de los ratones con 18 meses de edad tendió a ser menor en ratones *S-mouse* para ambas dietas, aunque no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos. Los cálculos del $AUC_{insulina}$ obtenidos a partir de los datos de la gráfica (Figura 10B) donde se representan los valores de insulina plasmática (ng/ml) respecto al tiempo (min), no mostraron diferencias significativas en ninguno de los cuatro grupos (Figura 10C), aunque la secreción de insulina fue menor en los ratones *S-mouse* con dieta HFHS durante la prueba en comparación con los ratones *WT* alimentados con la misma dieta. De la misma forma, no se observaron diferencias significativas entre ratones *S-mouse* y *WT* con dieta control, aunque en este caso los ratones *S-mouse* mostraron una mayor secreción de insulina con respecto a los *WT*.

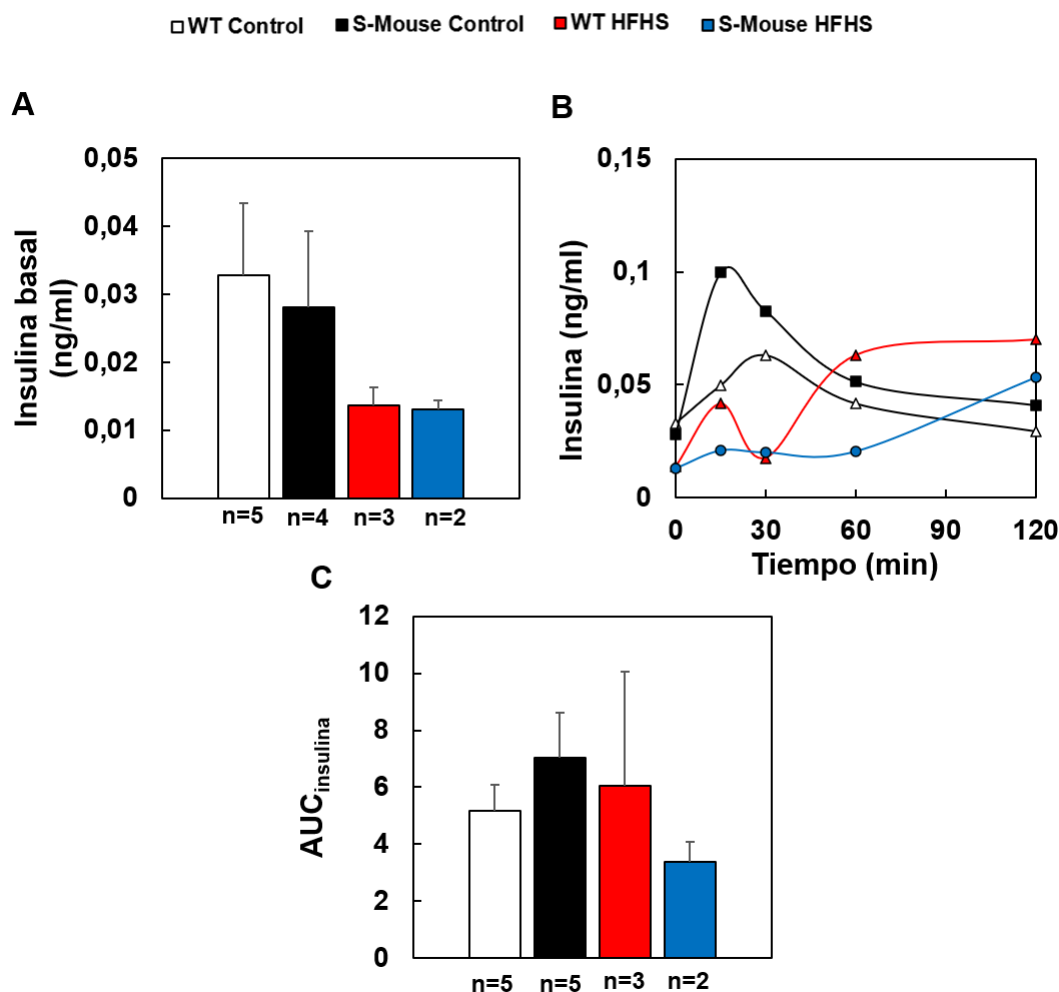


Figura 10. Resultados del análisis de la insulina liberada durante el TTG en ratones *WT* y *S-mouse* alimentados durante 16 meses con dieta HFHS y dieta control. A) Niveles plasmáticos de insulina basal (ng/ml) al inicio del TTG en ratones ayunados durante 15-17h. B) Representación de la evolución de los niveles de insulina a lo largo del TTG en una curva insulina vs tiempo, mediante un ELISA de insulina. C) Resultados del parámetro AUC_{insulina} generado a partir de las medidas de insulina. Los datos se presentan como media \pm SEM. Estudio estadístico realizado mediante la prueba T.

3.2 Caracterización del metabolismo lipídico y peso corporal de ratones *WT* y *S-mouse* alimentados con dieta HFHS y dieta control

3.2.1 Los ratones *S-mouse* de 12 meses con dieta HFHS mostraron una disminución del colesterol total con respecto a los ratones *WT*

No se observaron diferencias significativas en el peso de los ratones *S-mouse* y *WT* de 12 meses de edad alimentados con la dieta control, no obstante, los ratones *S-mouse* mostraron un menor peso corporal que los ratones *WT* alimentados con dieta HFHS (Figura 11A, $p \leq 0.05$). La dieta HFHS aumentó el peso corporal en ambos genotipos y aumentó las diferencias entre estos y los ratones alimentados con dieta control ($p \leq 0.05$).

De acuerdo con el papel de SREBP2 en el metabolismo de los lípidos, se obtuvieron muestras plasmáticas de los ratones mediante la centrifugación de la sangre extraída en el momento de sacrificar a los ratones durante 30 minutos a 12000 rpm, a 4°C usando como anticoagulante EDTA. El análisis plasmático de los lípidos mostró niveles más bajos de colesterol total y colesterol HDL en ratones *S-mouse* de 12 meses de edad alimentados con la dieta HFHS, aunque esta dieta aumentó tanto el colesterol total como el colesterol HDL en ratones de ambos genotipos con respecto a los ratones alimentados con dieta control. No se encontraron diferencias significativas en ratones de distinto genotipo alimentados con las mismas dietas, pero sí que se encontraron diferencias significativas en el colesterol total de ratones con el mismo genotipo alimentados con dietas diferentes (Figura 11B, $p \leq 0.05$). Respecto al colesterol HDL, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos excepto en los ratones con dieta control, donde las diferencias entre distintos genotipos sí que fueron significativas (Figura 11C, $p \leq 0.05$). No se observaron cambios en el colesterol ApoB para ninguno de los grupos excepto entre ratones con la sobreexpresión de SREBP2, donde el efecto de la dieta HFHS mostró un efecto significativo (Figura 11D, $p \leq 0.05$).

Los niveles plasmáticos de TG en ratones de 12 meses de edad fueron más altos en ratones *S-mouse* alimentados con dieta control en comparación con ratones *WT*, pero sin mostrar diferencias significativas. La dieta HFHS aumentó los niveles de TG en ratones *S-mouse*, donde sí que se observaron diferencias significativas con respecto a los ratones *WT* alimentados con la misma dieta, que mostraron unos niveles de TG menores ($p \leq 0.05$). Las diferencias también fueron significativas entre ratones *S-mouse* alimentados con distintas dietas (Figura 11E, $p \leq 0.05$), pero no para ratones *WT*.

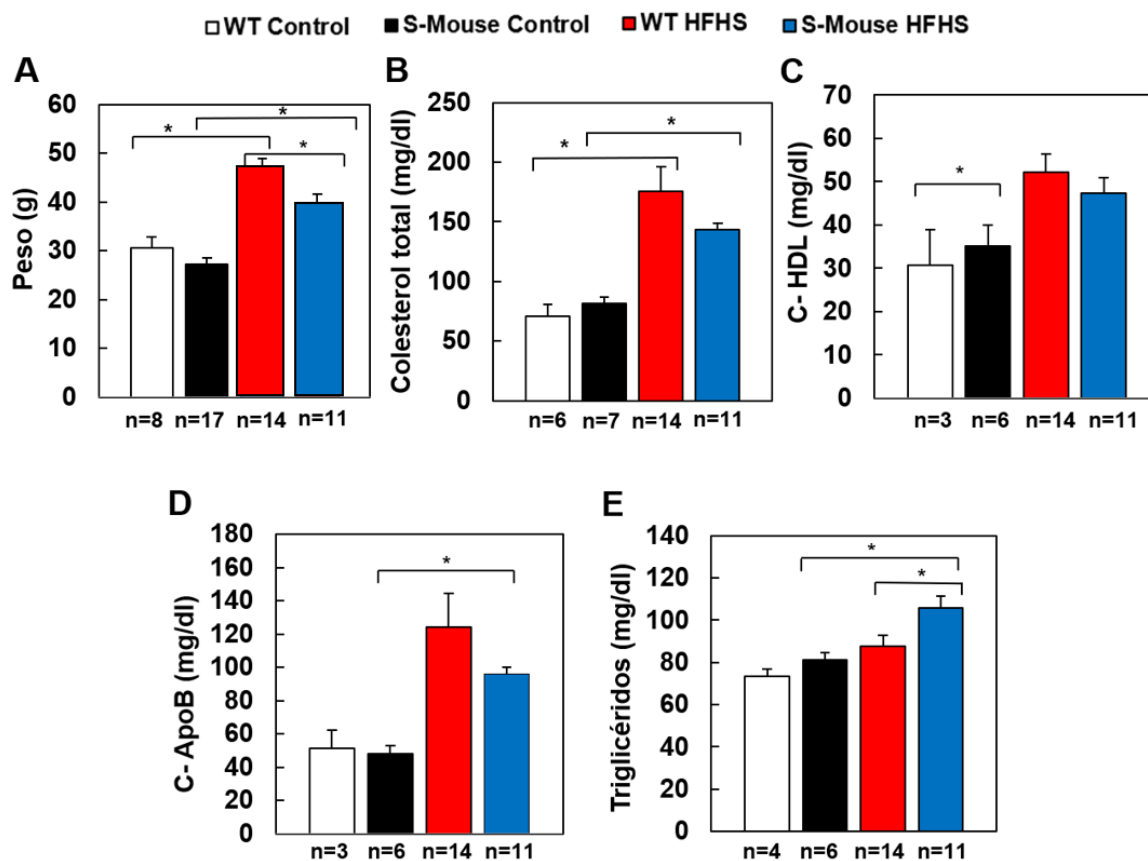


Figura 11. Caracterización del metabolismo lipídico de ratones *WT* y *S-mouse* alimentados durante 10 meses con dieta HFHS y dieta control. A) Peso corporal de ratones *WT* y *S-mouse* de 12 meses alimentados con los dos tipos de dieta. B) Resultados de las medidas de colesterol total (mg/dl) obtenidas mediante ELISA. C) Medidas obtenidas de colesterol HDL (C-HDL) (mg/dl) mediante ELISA. D) Resultados de las medidas de colesterol ApoB (C-ApoB) mediante los cálculos de las diferencias entre colesterol total y HDL. E) Niveles plasmáticos de TG (mg/dl) obtenidos mediante ELISA. Los datos se presentan como media \pm SEM. Estudio estadístico realizado mediante la prueba T. * $p \leq 0.05$.

3.2.2 Los ratones *S-mouse* de 18 meses con dieta control mostraron una disminución del colesterol ApoB con respecto a los ratones *WT*

Únicamente se observaron diferencias significativas en el peso entre los ratones *WT* con diferentes dietas (Figura 12A, $p \leq 0.05$). Los ratones *S-mouse* mostraron una tendencia a un menor peso corporal que los ratones *WT* alimentados con dieta HFHS, aunque las diferencias no fueron significativas.

El análisis plasmático de los lípidos mostró niveles más bajos de colesterol total y colesterol HDL en ratones *S-mouse* de 18 meses de edad alimentados con dieta control con respecto a los ratones *WT* alimentados con ambas dietas. En el caso del colesterol total, se observaron diferencias significativas (Figura 12B, $p \leq 0.05$) entre ratones de distinto genotipo alimentados con la dieta control, sin embargo, para el colesterol HDL (Figura 12C) no se

observaron diferencias significativas entre ninguno de los tres grupos. Al igual que con los datos obtenidos del colesterol total, se encontraron diferencias significativas en los niveles de colesterol ApoB entre ratones *S-mouse* y ratones *WT* alimentados con dieta control (Figura 12D, $p \leq 0.05$) siendo menor el colesterol en ratones con la sobreexpresión de SREBP2.

Los niveles plasmáticos de TG en ratones de 18 meses de edad tendieron a ser mayores en ratones *S-mouse* alimentados con dieta control en comparación con ratones *WT*, pero sin mostrar diferencias significativas. No se encontraron diferencias significativas entre ratones *WT* con dieta HFHS y los grupos con dieta control (Figura 12E).

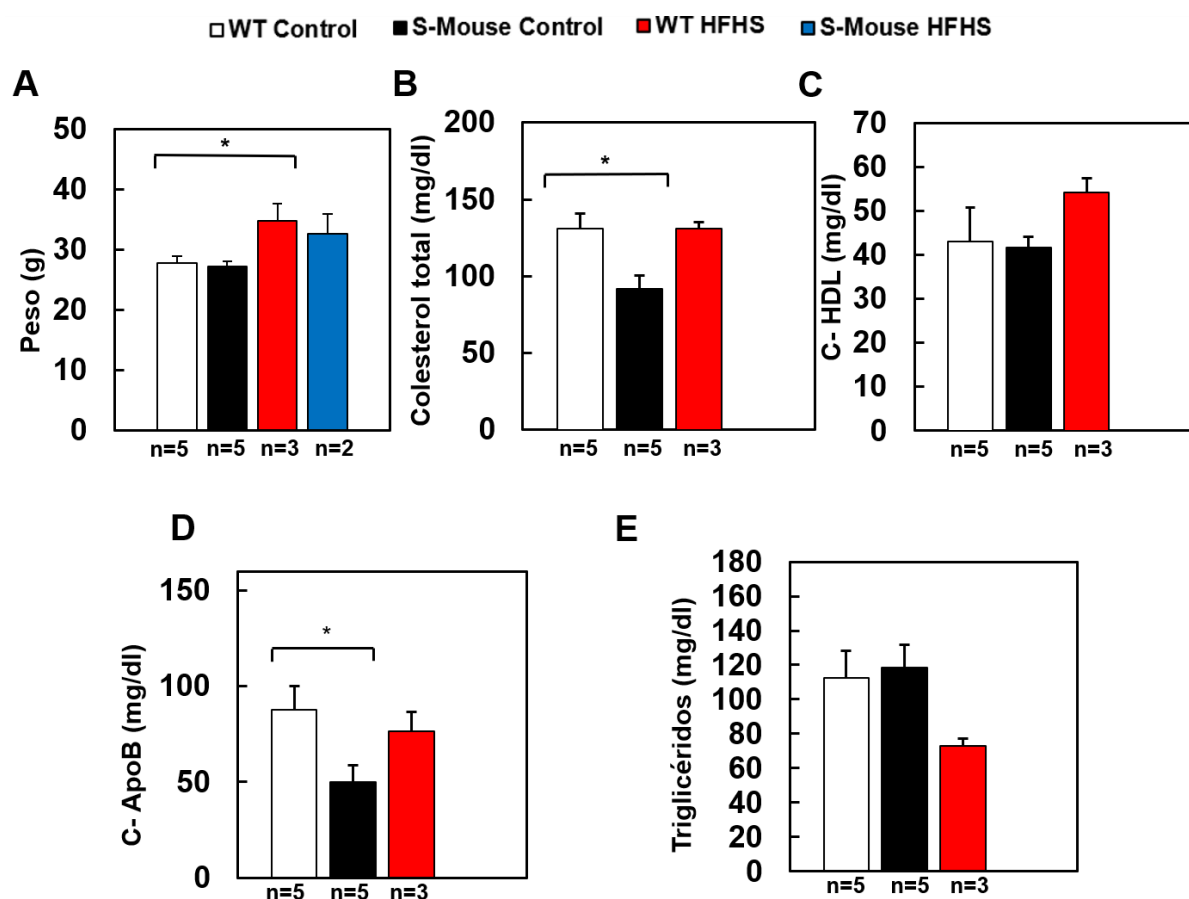


Figura 12. Caracterización del metabolismo lipídico en ratones *WT* y *S-mouse* alimentados durante 16 meses con dieta HFHS y dieta control. A) Peso corporal de ratones *WT* y *S-mouse* de 18 meses alimentados con los dos tipos de dieta. B) Resultados de las medidas de colesterol total (mg/dl). C) Medidas obtenidas de colesterol HDL (C-HDL) (mg/dl). D) Resultados de las medidas de colesterol ApoB (C-ApoB) mediante los cálculos de las diferencias entre colesterol total y HDL. E) Niveles plasmáticos de TG (mg/dl) obtenidos mediante colorimetría enzimática. Los datos se presentan como media \pm SEM. Estudio estadístico realizado mediante la prueba T. * $p \leq 0.05$

3.3 Caracterización del tejido hepático y adiposo en ratones *S-mouse* y *WT* alimentados con dieta HFHS y dieta control

3.3.1 Los ratones con sobreexpresión de SREBP2 alimentados con dieta HFHS mostraron una tendencia en aumento del contenido de TG hepáticos en comparación con los ratones *S-mouse* alimentados con dieta de control

Teniendo en cuenta la relación entre la NAFLD, la dislipidemia, la NASH y los niveles de TG en la sangre, se llevó acabo el análisis hepático para cuantificar el contenido de TG del mismo. En la figura 13A pueden observarse fotografías de cortes histológicos para cada uno de los genotipos y dietas teñidos con hematoxilina-eosina en los que se aprecian las diferencias en cuanto la cantidad y el tamaño de las gotas lipídicas en los hepatocitos. En los resultados del estudio en ratones de 12 meses no se encontraron diferencias entre los genotipos en cuanto al contenido de TG hepáticos. Sin embargo, el efecto de la dieta mostró un mayor contenido de TG hepáticos en ratones alimentados con una dieta HFHS en comparación con los ratones alimentados con una dieta control (Figura 13B, $p \leq 0.05$), siendo los de mayor contenido en TG los ratones *S-mouse* con dieta HFHS.

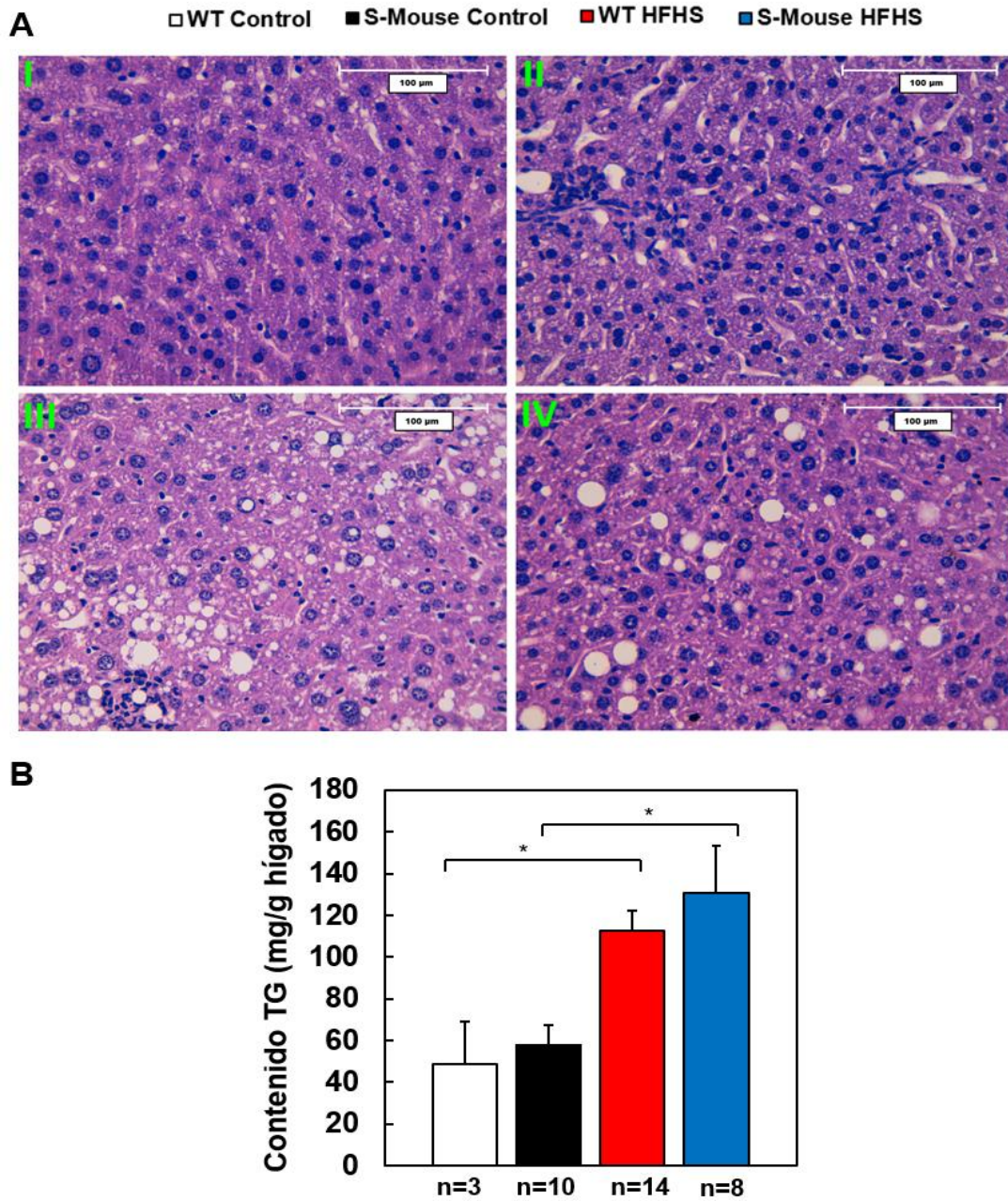


Figura 13. Caracterización del hígado en ratones *WT* y *S-mouse* alimentados durante 10 meses con dieta HFHS y dieta control. A) Imágenes de secciones teñidas con hematoxilina-eosina en las que se muestran las gotas lipídicas (aumento de 40x). I. *S-mouse* dieta control, II. *WT* dieta control, III. *S-mouse* dieta HFHS, IV. *WT* dieta HFHS. Los datos se presentan como media \pm SEM. B) Resultados del contenido de TG en el hígado. Estudio estadístico realizado mediante la prueba T. * $p \leq 0.05$.

3.3.2 Los ratones *S-mouse* de 12 meses de edad alimentados con dieta HFHS mostraron una tendencia a presentar adipocitos con menor área con respecto a los ratones *WT*

Dadas las diferencias observadas en el peso corporal entre diferentes genotipos y el posible efecto de la dieta, se procedió a analizar el tejido adiposo. Los adipocitos se caracterizaron mediante cortes histológicos de grasa abdominal teñidos con hematoxilina-eosina (Figura 14A) en los que se pudo observar que entre diferentes dietas había diferencias en cuanto al tamaño, número y distribución de los adipocitos. Estos estudios no mostraron grandes diferencias en los ratones de 12 meses de edad, no obstante, los adipocitos de ratones *S-mouse* resultaron seguir una tendencia hacia un área menor para ambas dietas con respecto a los ratones *WT* (Figura 14B). Para la representación del área, las medias obtenidas en las diferentes imágenes se dividieron por el área total del tejido visible en la imagen para poder así relativizar los valores. En el análisis del número de adipocitos se observó una tendencia creciente en el número de adipocitos en ratones *S-mouse* con respecto a los ratones *WT* para ambas dietas (Figura 14C).

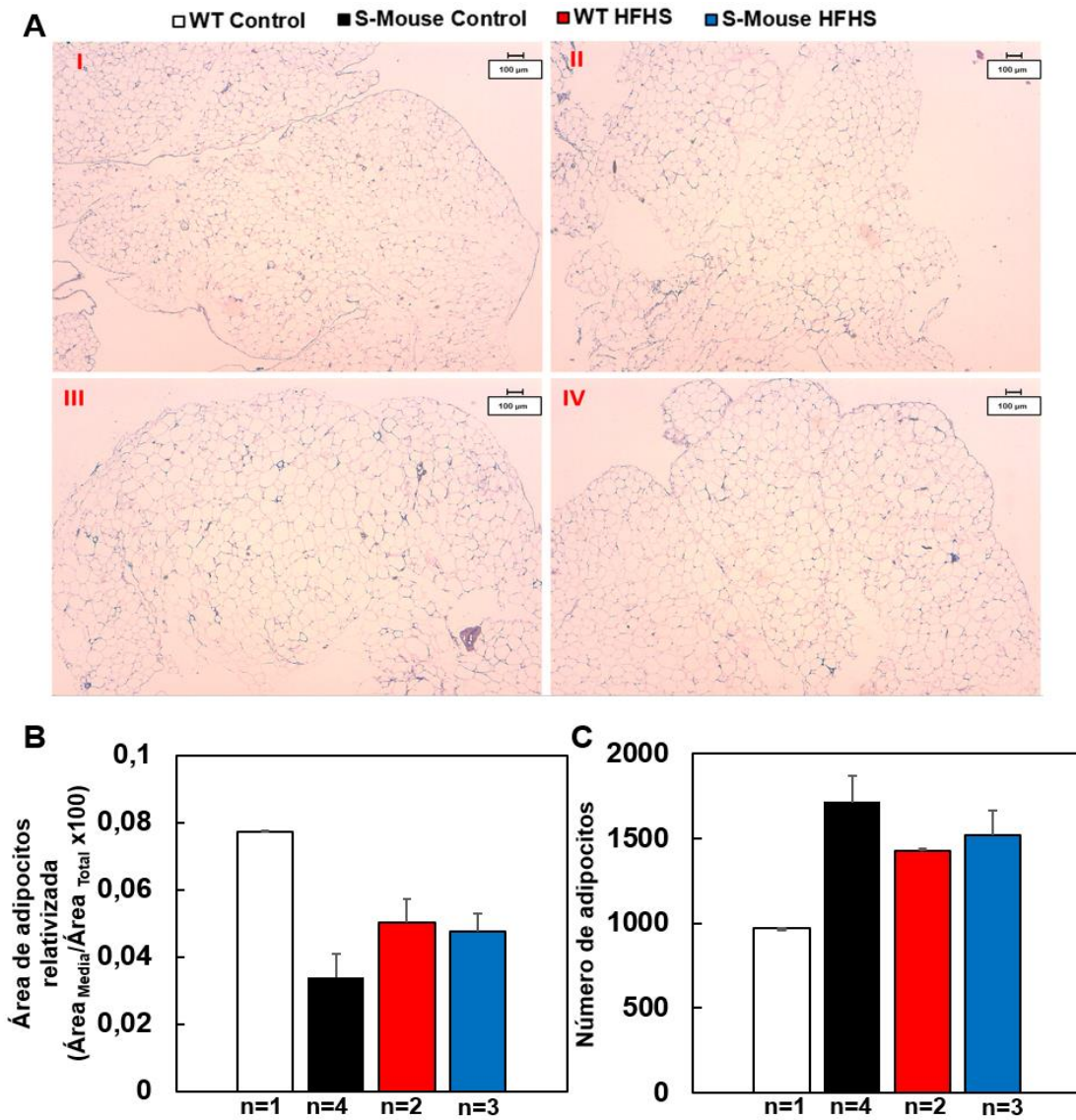


Figura 14. Caracterización del tejido adiposo en ratones *WT* y *S-mouse* alimentados con dieta HFHS y dieta control durante 10 meses. A) Imágenes de cortes histológicos del tejido adiposo teñidos con hematoxilina-eosina (aumento 4x), I. *S-mouse* dieta control, II. *WT* dieta control, III. *S-mouse* dieta HFHS, IV. *WT* dieta HFHS. Los datos se presentan como media \pm SEM. B) Resultados del cálculo del área de los adipocitos en los que se representa el área relativizada. C) Resultados de las medias del número de adipocitos cuantificados en las imágenes.

3.3.3 Los ratones de 18 meses con sobreexpresión de SREBP2 alimentados con dieta HFHS mostraron un aumento del contenido de TG hepáticos en comparación con los ratones *S-mouse* alimentados con dieta de control

Los resultados del estudio en ratones de 18 meses mostraron diferencias significativas en cuanto al contenido de TG en el hígado en ratones *S-mouse* y *WT* alimentados con dieta HFHS, siendo mayores en los ratones con sobreexpresión del gen (Figura 15, $p \leq 0.05$). Al contrario, entre ratones de distintos genotipos alimentados con dieta control se observó una tendencia en disminución de los TG hepáticos bastante notable en los ratones *S-mouse*, aunque sin mostrar diferencias significativas.

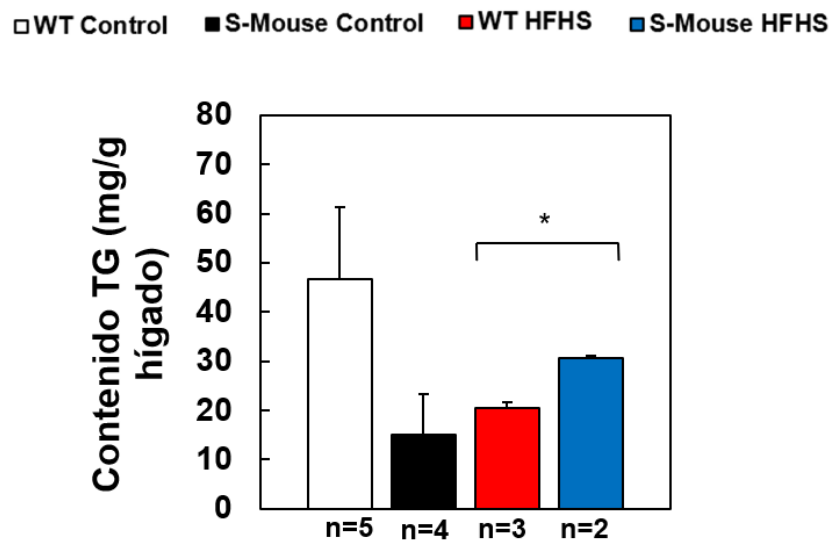


Figura 15. Cuantificación del contenido en TG del hígado en ratones *WT* y *S-mouse* alimentados con dieta HFHS y dieta control durante 16 meses. Resultados del contenido de TG en el hígado (mg/g) obtenidos mediante colorimetría enzimática. Estudio estadístico realizado mediante la prueba T. * $p \leq 0.05$.

Los resultados de las imágenes de los cortes histológicos de los ratones de 18 meses no fue posible obtenerlos debido a la falta de tiempo y a las circunstancias de la pandemia.

4. DISCUSIÓN

Para el trabajo actual se utilizaron ratones transgénicos que llevaban copias adicionales del gen *Srebf2* en regiones *upstream* y *downstream* (aproximadamente 10.000 pb y 5.000 pb, respectivamente). A diferencia de otros ratones transgénicos para *Srebf2*, los ratones utilizados en este estudio mostraron una sobreexpresión moderada del gen *Srebf2* regulado por su propio promotor, expresión en tejidos y bajo regulación génica propia, producción de proteína SREBP2 completa (regulada por el sistema SREBP) y la presencia de miR-33a en la secuencia genética utilizada. Así pues, estos ratones pueden proporcionar información interesante sobre diferentes alteraciones metabólicas relacionadas con el índice de masa corporal (IMC), el metabolismo glucídico y lipídico y cómo estos están regulados.

Aunque las construcciones transgénicas de estudios anteriores tenían una expresión muy alta en uno o dos tejidos de la forma activa de SREBP2 (incluido el dominio de transactivación ácida NH₂ y el dominio de unión al ADN de bHLH-Zip), carecían del dominio regulador terminal COOH que produce SREBP2 activo de forma constitutiva(14,16,28,33). Estas modificaciones dan como resultado la ausencia de regulación de SREBP2 a niveles transcripcionales y postranscripcionales. Además, la mayoría de las construcciones de los ratones de otros estudios se basan en ADN complementario únicamente, por lo tanto, carecen de miR-33a. Este miRNA está codificado por el intrón 16 del gen *Srebf2* en ratones y humanos, y tiene un papel importante en la regulación de la actividad SREBP2(29,34). Estudios anteriores han demostrado que la activación de *Srebf2* aumentaba los niveles de colesterol en sangre, tejidos y células(14,28,33), así como también la lipotoxicidad en diferentes tipos de células, incluidas las CBPs y hepatocitos, induciendo DMT2 y NASH(10,14,26,35). En ratas se ha visto como la hiperactividad de SREBP2 en el hígado produce efectos similares a los de los ratones: niveles reducidos de insulina sérica y niveles elevados de glucosa(16).

En el actual estudio se demostró como la copia adicional del gen *Srebf2* puede producir sobreexpresión de la proteína provocando un efecto significativo en aspectos como el peso corporal, la DMT2 y enfermedades del metabolismo lipídico, especialmente cuando los ratones están alimentados con la dieta HFHS. Bajo la dieta control, los ratones *S-mouse* de 12 meses de edad mostraron una reducción en el peso corporal y una mejor tolerancia a la insulina durante el TTI en comparación con los ratones *WT* con dieta control, no obstante, los niveles de colesterol total, colesterol HDL y TG fueron ligeramente mayores con respecto a los ratones *WT* alimentados con esta dieta. Por otra parte, la dieta HFHS aumentó las diferencias entre los grupos con diferentes dietas en peso corporal, colesterol total y HDL e insulina basal. La dieta HFHS provocó la disminución de algunos de los parámetros en ratones *S-mouse* con respecto a los ratones *WT* con esta misma dieta, como son el peso corporal, la insulina liberada durante el TTG, el colesterol total, el c-HDL y ApoB. A pesar de mostrar una menor liberación de insulina

durante el TTG, los ratones *S-mouse* con dieta HFHS no mostraron diferencias significativas en el $AUC_{glucosa}$ tanto durante el TTG como el TTI, por lo que parece que la sobreexpresión de SREBP2 no estaría afectando tanto en el metabolismo glucídico de los ratones cuando se expresa a nivel sistémico ya que a pesar de ser alimentados con la dieta HFHS no se observan diferencias significativas entre ratones con diferente genotipo. Sin embargo, sí que se observan más diferencias en metabolismo lipídico ya que el efecto de la dieta HFHS provocó el aumento de los niveles plasmáticos de TG en ratones *S-mouse* en comparación con los ratones *WT*. Estos resultados coinciden con los resultados hallados en un estudio realizado en la Academia de Ciencias de la República Checa, donde generaron un modelo de ratas transgénicas que sobreexpresaban SREBP2 en el hígado. Las ratas con el aumento de expresión hepática, en comparación con los modelos *WT*, exhibieron niveles hepáticos significativamente mayores de TG pero no de colesterol(14). Parece que en ratones alimentados con una dieta como la HFHS, los niveles de colesterol total, HDL y ApoB son menores en ratones *S-mouse* con respecto a ratones *WT*, no obstante, los niveles de TG son mayores en los ratones portadores de la copia extra del gen. Además, resulta interesante que ambos grupos de ratones *S-mouse*, independientemente del tipo de dieta con la que hayan sido alimentados, muestren un menor peso corporal que los ratones *WT* a pesar de mostrar un aumento en las concentraciones de TG plasmáticos.

El tamaño de los adipocitos de ratones con 12 meses de edad aumentó en ambos grupos de ratones con la dieta HFHS, aunque el aumento en ratones *S-mouse* fue menor. El área de los adipocitos también disminuyó en ratones que sobreexpresaban SREBP2 con dieta control con respecto a los ratones *WT*. Estos resultados coinciden con la reducción de la actividad adipogénica mostrada en las ratas transgénicas SHR SREBP2, aunque estas ratas habían aumentado el peso corporal(16). Uno de los mecanismos implicados en el tamaño del adipocito puede ser el aumento de los niveles de colesterol en estas células debido a la ingesta de la dieta HFHS. En un estudio anterior se observó un mayor contenido de proteína SREBP2 activa en extractos nucleares de adipocitos de ratas obesas, junto con la acumulación continua de colesterol en las gotas lipídicas de los adipocitos agrandados. Por lo tanto, la activación de la vía SREBP2 aparecía como una característica común de las células grasas de ratas obesas(36). En nuestro estudio, no se han observado diferencias significativas entre ratones *S-mouse* y ratones *WT*, no obstante, los resultados varían cuando se comparan entre las diferentes dietas, por lo que es posible que el aumento del colesterol debido a la ingesta de una dieta HFHS esté demostrando el posible papel de esta molécula en la señalización para la hipertrofia de adipocitos en ratones. Es importante mencionar también, que en el estudio anterior realizado con ratas obesas(36) utilizaron adipocitos procedentes de un cultivo celular, a diferencia del estudio actual, en el que se utilizó un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa SREBP2 a nivel sistémico.

Por otra parte, el número de adipocitos fue mayor en ratones *S-mouse* con dieta control respecto al número observado en ratones *WT*. De la misma forma que sucedió con los ratones alimentados con la dieta HFHS, donde los *S-mouse* mostraron un mayor número de adipocitos con respecto a los *WT* alimentados con esta misma dieta, aunque las diferencias no fueron tan notables, probablemente debido al efecto de la dieta que causa un aumento del tamaño de las células del tejido adiposo, haciendo que el número de estas sea menor.

Por lo que respecta a los ratones de 18 meses de edad alimentados con la dieta control, no se observaron diferencias en cuanto al peso corporal entre los diferentes genotipos. El peso de los ratones *WT* alimentados con dieta HFHS fue mayor que el de los ratones del mismo genotipo alimentados con dieta control, esto posiblemente se deba al efecto de la dieta. Los niveles de colesterol total y colesterol ApoB fueron menores en ratones de *S-mouse* alimentados con dieta control que en ratones *WT* alimentados con esta misma dieta. Los resultados en el caso de colesterol HDL siguieron la misma tendencia, aunque las diferencias en este parámetro no fueron tan notables. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en los ratones de 12 meses de edad, aunque en los ratones de 18 meses se observa una disminución en los niveles plasmáticos de colesterol ApoB. Este hecho llama la atención ya que normalmente los niveles de colesterol ApoB suelen aumentar con la edad. Los resultados de los niveles de TG plasmáticos en ratones de 18 meses alimentados con dieta control coinciden con los resultados observados en ratones de 12 meses, ya que se observa una tendencia al aumento de TG en ratones *S-mouse* en ambas edades. En cuanto a los resultados del metabolismo lipídico en ratones *WT* de 18 meses alimentados con dieta HFHS, los resultados muestran una tendencia al aumento del colesterol total y HDL, aunque es muy probable que esto se deba al efecto de la dieta, de la misma forma que se observaba en ratones de 12 meses. No obstante, a diferencia de los resultados obtenidos en ratones de 12 meses, los niveles de colesterol ApoB y TG mostraron una tendencia a disminuir en ratones *WT* con dieta HFHS con respecto a ratones *WT* con dieta control. Es posible que existan otros genes del ratón que interactúen con la ruta de SREBP2 que se expresen de manera diferente en distintas edades. Para poder indagar más en este aspecto, sería necesario realizar ensayos de expresión génica o de miRNA y poder observar si existen diferencias y qué elementos génicos son los que están implicados. En cuanto a la caracterización del tejido hepático en ratones de 18 meses, el contenido de TG hepáticos coincide con el resultado obtenido para ratones de 12 meses, donde ratones *S-mouse* alimentados con dieta HFHS mostraron un mayor contenido de TG hepáticos que ratones *WT* con esta misma dieta. El aumento de TG hepáticos observado en ratones *WT* de dieta control demuestra que es necesario realizar más experimentos e incrementar el número de ratones (“n”) para poder desarrollar conclusiones definitivas.

En relación con los resultados obtenidos para el metabolismo glucídico en ratones de 18 meses, durante el TTI los ratones *S-mouse* con dieta control mostraron una mayor resistencia

a la insulina exógena que los ratones *WT* alimentados con ambas dietas. Estos resultados podrían demostrar que quizás la edad podría estar vinculada con un estado de prediabetes o DMT2 en los ratones *S-mouse*, ya que los resultados observados anteriormente en ratones de 12 meses de edad no coinciden con los de 18 meses. Es interesante hacer hincapié en que los ratones que muestran mayor resistencia a la insulina no están alimentados con dieta HFHS, (ya que uno de los principales factores de aparición de esta resistencia es la obesidad), por lo que estas observaciones podrían estar más relacionadas con otros factores como es el factor genético. En cuanto a los resultados obtenidos durante el TTG, al igual que sucedía en ratones de 12 meses, los ratones alimentados con dieta HFHS muestran niveles más elevados de glucosa en sangre (mayor resistencia a la insulina endógena), es probable que esto se deba al efecto de la dieta. No obstante, en este caso, los resultados del TTG obtenidos para ratones con dieta control no coinciden con los resultados del TTI, ya que los ratones *S-mouse* muestran una cierta resistencia a la insulina, pero, sin embargo, muestran una mejor tolerancia a la glucosa, es decir, muestran una mayor respuesta a la insulina endógena en comparación con los otros grupos. A su vez, los resultados obtenidos durante el TTG coinciden con resultados obtenidos para el ELISA de insulina en ratones de 18 meses, ya que se observa una menor concentración de insulina endógena en aquellos ratones que mostraban una mayor intolerancia a la glucosa externa (ratones *S-mouse* con dieta HFHS), al igual que sucedía en ratones de 12 meses. Estos datos demuestran cómo ratones de mayor edad podrían presentar una mayor prevalencia a desarrollar DMT2. No obstante, es necesario realizar más experimentos con más ratones para poder afirmar este hecho y comprobar si realmente está afectando la dieta, el genotipo o ambos.

En ratones de 12 meses, la dieta HFHS aumentó los niveles de glucosa basal y produjo una leve intolerancia a la glucosa en comparación con la dieta control. Después de 10 meses con la dieta HFHS, los niveles de glucosa durante las dos pruebas (TTG y TTI) no mostraron diferencias entre ratones *S-mouse* y ratones *WT*, por lo que parece que la sobreexpresión de SREBP2 no afecta tanto en el metabolismo glucídico como en el metabolismo lipídico. Esto puede deberse a que el modelo de ratón utilizado en este estudio sobreexpresa SREBP2 de manera constitutiva, sistemática y bajo su propio promotor, a diferencia de otros modelos de ratones transgénicos que sobreexpresan SREBP2 de manera específica de tejido, y quizás haya elementos génicos propios del ratón que estén afectando en esta regulación génica. No obstante, respecto al metabolismo glucídico es importante destacar que la insulina liberada durante el TTG fue menor en ratones *S-mouse*, sin embargo, se obtenían niveles de glucosa muy similares a los *WT* durante la prueba. Estos datos pueden indicar que la sobreexpresión moderada de SREBP2 permite mejorar el metabolismo de la glucosa (aunque no lo haga en gran medida) en los ratones de 12 meses, ya que indicarían que los ratones *S-mouse* requieren niveles de insulina más bajos que los *WT*.

Sin embargo, en ratones de 18 meses parece que tanto el genotipo como la dieta podrían estar influyendo en mayor medida en el metabolismo glucídico de los ratones. En cuanto al metabolismo lipídico, se observan resultados muy parecidos para ambas edades. Por lo tanto, parece que, a priori, a medida que aumenta la edad de los ratones aumentan las alteraciones en el metabolismo glucídico y se mantiene la tendencia a la disminución del colesterol total, así como al incremento de los niveles de TG en ratones *S-mouse*.

Se encontraron marcadas diferencias entre los ratones *S-mouse* y otros animales transgénicos en muchos parámetros relacionados con alteraciones metabólicas y el papel de SREBP2. La mayoría de estos cambios aumentan con la dieta HFHS. Los efectos pueden deberse en parte a la regulación transcripcional y postranscripcional, pero también podrían deberse a la regulación metabólica por miR-33a, no analizado en el trabajo actual(29,34). En general, la sobreexpresión de *Srebf2* parece tener efectos beneficiosos en todos los parámetros metabólicos medidos, excepto los niveles TG, así como la observación de algunos parámetros que recuerdan a un estado de prediabetes en los ratones de mayor edad. Por todo esto, SREBP2 podría ser un objetivo farmacológico interesante para el tratamiento de diferentes enfermedades que incluyen DMT2, síndrome metabólico, dislipidemia y cáncer(26,37).

5. CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de *Srebf2* produce una alteración del metabolismo lipídico y glucídico en comparación con los ratones *WT*. Además, una dieta HFHS aumenta las diferencias entre ratones *S-mouse* y *WT*, lo que sugiere un papel de *Srebf2* y de la dieta relacionado con diversas enfermedades metabólicas.
2. Los ratones de 12 meses de edad con sobreexpresión de SREBP2 mostraron una mejora en cuanto al metabolismo glucídico y lipídico en general, además de presentar un menor peso corporal. No obstante, los niveles de TG plasmáticos y el contenido de TG en el tejido hepático mostraron una tendencia en aumento en los ratones *S-mouse*.
3. Sin embargo, en los ratones *S-mouse* de 18 meses de edad se observó un incremento de alteraciones en el metabolismo glucídico, observándose unos resultados típicos de un estado de prediabetes o DMT2. Los resultados en cuando al metabolismo lipídico fueron muy similares a los ratones de 12 meses.
4. En general, la sobreexpresión completa del gen *Srebf2* en ratón mejora los parámetros metabólicos relacionados con el riesgo cardiovascular, no obstante, se precisa de estudios adicionales para evaluar la viabilidad de las estrategias terapéuticas basadas en la modulación de SREBP2 y miR-33a.
5. Finalmente, este estudio presenta el gen *Srebf2* como una posible diana terapéutica interesante para el tratamiento de diferentes enfermedades que incluyen DMT2, síndrome metabólico, dislipidemia y cáncer.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Federación Internacional de Diabetes. Atlas de la Diabetes de la FID. Actualización. [Internet]. Atlas de la Diabetes de la FID. 2019. 1–169 p. Available from: http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf
2. Guariguata L, Whiting D, Weil C, Unwin N. The International Diabetes Federation diabetes atlas methodology for estimating global and national prevalence of diabetes in adults. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2011;94(3):322–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2011.10.040>
3. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2019;157:107843. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>
4. Harding JL, Pavkov ME, Magliano DJ, Shaw JE, Gregg EW. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia*. 2019;62(1):3–16.
5. Chapman D, Foxcroft R, Dale-Harris L, Ronte H, Bidgoli F, Bellary S. Insights for Care: The Healthcare Utilisation and Cost Impact of Managing Type 2 Diabetes-Associated Microvascular Complications. *Diabetes Ther* [Internet]. 2019;10(2):575–85. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13300-018-0548-4>
6. Nunn AVW, Bell JD, Guy GW. Lifestyle-induced metabolic inflexibility and accelerated ageing syndrome: Insulin resistance, friend or foe? *Nutr Metab*. 2009;6:1–26.
7. Dong G, Qu L, Gong X, Pang B, Yan W, Wei J. Effect of Social Factors and the Natural Environment on the Etiology and Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Int J Endocrinol*. 2019;2019:1–7.
8. Sigal RJ, Kenny GP, Wasserman DH, Castaneda-Sceppa C, White RD. Physical activity/exercise and type 2 diabetes: A consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2006;29(6):1433–8.
9. Zhuo X, Zhang P, Hoerger TJ. Lifetime direct medical costs of treating type 2 diabetes and diabetic complications. *Am J Prev Med* [Internet]. 2013;45(3):253–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amepre.2013.04.017>
10. Brunham LR, Kruit JK, Verchere CB, Hayden MR. Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2008;118(2):403–8.
11. Huang Y, Cai X, Mai W, Li M, Hu Y. Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: Systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2016;355.
12. John R.Giudicessi, BA.Michael J.Ackerman. 2013. 基因的改变NIH Public Access. *Bone* [Internet]. 2008;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
13. Xiao X, Song B. SREBP : a novel therapeutic target The Activation Process of SREBPs The Effects of Insulin on SREBPs. *Acta Biochim Biophys Sin* [Internet]. 2013;45(1):2–10. Available from: <http://abbs.oxfordjournals.org/content/45/1/2.short>
14. Landa V, Zídek V, Mlejnek P, Šimáková M, Šilhavý J, Trnovská J, et al. Sterol

- regulatory element binding protein 2 overexpression is associated with reduced adipogenesis and ectopic fat accumulation in transgenic spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res*. 2014;63(5):587–90.
15. Ide T, Shimano H, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yamamoto T, et al. SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat Cell Biol*. 2004;6(4):351–7.
 16. Ishikawa M, Iwasaki Y, Yatah S, Kato T, Kumadaki S, Inoue N, et al. Cholesterol accumulation and diabetes in pancreatic β -cell-specific SREBP-2 transgenic mice: A new model for lipotoxicity. *J Lipid Res*. 2008;49(12):2524–34.
 17. Shimano H, Sato R. SREBP-regulated lipid metabolism: Convergent physiology-divergent pathophysiology. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2017;13(12):710–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.91>
 18. Degennaro M, Hurd TR, Siekhaus DE, Biteau B, Jasper H, Lehmann R. MicroRNA-33 and the SREBP Host Genes Cooperate to Control Cholesterol Homeostasis. *Science* (80-). 2013;20(2):233–43.
 19. Ramirez CM, Goedeke L, Rotllan N, Yoon J-H, Cirera-Salinas D, Mattison JA, et al. MicroRNA 33 Regulates Glucose Metabolism. *Mol Cell Biol*. 2013;33(15):2891–902.
 20. Dávalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramírez CM, Warriar NP, Andreo U, et al. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(22):9232–7.
 21. Wijesekara N, Zhang LH, Kang MH, Abraham T, Bhattacharjee A, Warnock GL, et al. miR-33a modulates ABCA1 expression, cholesterol accumulation, and insulin secretion in pancreatic islets. *Diabetes*. 2012;61(3):653–8.
 22. Yabe D, Xia ZP, Adams CM, Rawson RB. Three mutations in sterol-sensing domain of SCAP block interaction with insig and render SREBP cleavage insensitive to sterols. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(26):16672–7.
 23. Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(2):215–22.
 24. Berger AN, Kashyap AK, Scalise JM, Gertler M, Benjamin M, Berger AN, et al. Board of Governors of the Federal Reserve System of the U . S . The Transformation Banking Industry : What a Long , Strange Trip It ’ s Been. *Genes Dev*. 1995;2:55–218.
 25. Muller PY, Miserez AR. Identification of mutations in the gene encoding sterol regulatory element binding protein (SREBP)-2 in hypercholesterolaemic subjects. *J Med Genet*. 2002;39(4):271–5.
 26. Malhotra P, Aloman C, Ankireddy A, Khadra H, Ooka K, Gill RK, et al. Overactivation of intestinal sterol response element-binding protein 2 promotes diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2017;313(5):G376–85.
 27. Musso G, Cassader M, Bo S, De Michieli F, Gambino R. Sterol regulatory element-binding factor 2 (SREBF-2) predicts 7-year NAFLD incidence and severity of liver disease and lipoprotein and glucose dysmetabolism. *Diabetes*. 2013;62(4):1109–20.
 28. Ma K, Malhotra P, Soni V, Hedroug O, Annaba F, Dudeja A, et al. Overactivation of intestinal SREBP2 in mice increases serum cholesterol. *PLoS One*. 2014;9(1).
 29. Gerin I, Clerbaux LA, Haumont O, Lanthier N, Das AK, Burant CF, et al. Expression of

- miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *J Biol Chem.* 2010;285(44):33652–61.
30. Gonzalez-Navarro H, Vila-Caballer M, Pastor MF, Vinue A, White MF, Burks D, et al. Plasma insulin levels predict the development of atherosclerosis when IRS2 deficiency is combined with severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-null mice. *Front Biosci.* 2007;12(6):2291–8.
 31. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques.* 2007;43(1S):S25–30.
 32. Osman OS, Selway JL, Kępczyńska MA, Stocker CJ, Dowd JFO, Cawthorne MA, et al. Osman 2013 Automated image analysis adipocyte quant. 2013;2(3):160–4.
 33. Norton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest.* 1998;101(11):2331–9.
 34. Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K, et al. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(40):17321–6.
 35. Hao M, Head WS, Gunawardana SC, Hasty AH, Piston DW. A Novel Mechanism for Pancreatic β -Cell Dysfunction. 2007;56(September).
 36. Lay S Le, Krief S, Farnier C, Lefrère I, Liepvre X Le, Bazin R, et al. Cholesterol, a Cell Size-dependent Signal That Regulates Glucose Metabolism and Gene Expression in Adipocytes. *J Biol Chem.* 2001;276(20):16904–10.
 37. Shah SA, Yoon GH, Chung SS, Abid MN, Kim TH, Lee HY, et al. Novel osmotin inhibits SREBP2 via the AdipoR1/AMPK/SIRT1 pathway to improve Alzheimer's disease neuropathological deficits. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2017;22(3):407–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2016.23>