



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

MÁSTER INTERUNIVERSITARIO DE NUTRICIÓN Y METABOLISMO

CURSO 2024-2025

TRABAJO FIN DE MÁSTER

***Impacto de la dieta de cafetería en el
metabolismo y el comportamiento de
ratones KO para Bex3***

BOUHEZAM RADHIA

Tutora: Dra. MAR GRASA MARTINEZ

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOMEDICINA MOLECULAR

SECCIÓN DE METABOLISMO Y NUTRICIÓN

UNIVERSITAT DE BARCELONA

SEPTIEMBRE, 2025

Resumen

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por un exceso de grasa corporal que aumenta el riesgo de enfermedades metabólicas. Su alta prevalencia mundial la convierte en un importante problema de salud pública asociado a factores genéticos y ambientales. El gen *Bex3*, ubicado en el cromosoma X y específico de mamíferos placentarios, se expresa mayoritariamente en sistema nervioso central y su pérdida de función está implicada en el desarrollo de patologías como el trastorno de espectro autista.

Este estudio tiene como objetivo analizar la interacción entre la obesidad inducida por la dieta y las alteraciones conductuales en ratones hembra *knockout* (KO) para *Bex3*, un modelo experimental que ha permitido observar anomalías en el funcionamiento del regulador del metabolismo mTOR en cerebro. Durante 10 semanas, ratones KO y heterocigotos para *Bex3* fueron alimentados con dieta control o de cafetería, evaluando el peso, la ingesta, la sensibilidad a la insulina (test de tolerancia a la glucosa), la sociabilidad (test de las tres cámaras) y el nivel de ansiedad (test *elevated plus maze*).

Los resultados muestran que los ratones KO con dieta de cafetería ganaron más peso y grasa visceral, a pesar de que la ingesta energética y los macronutrientes ingeridos fueron similares a los ingeridos por los ratones heterocigotos. La falta completa de *Bex3* causó resistencia a la insulina. La sociabilidad reducida en ratones KO no se vio afectada por la dieta, a diferencia de lo que se observó en la ansiedad, con un posible efecto ansiolítico ligado al genotipo, influenciado por la dieta de cafetería. Los resultados muestran que la eliminación del gen *Bex3* y la dieta obesogénica afectan tanto el metabolismo como el comportamiento, y en algunos casos sus efectos se combinan, resaltando el doble papel de *Bex3* en el neurodesarrollo y en el equilibrio energético.

Palabras clave: Obesidad, dieta de cafetería, *Bex3*, metabolismo, autismo, Resistencia a la insulina, Alteraciones de comportamiento.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	5
1.1	Obesidad.....	5
1.2	El síndrome metabólico, consecuencia clave de la obesidad	6
1.3	mTOR como regulador clave del metabolismo	6
1.4	El gen Bex3.....	7
2	OBJETIVOS	8
3	MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1	Cría y mantenimiento de los animales.....	9
3.2	Genotipado de ratones	10
3.2.1	Obtención de la muestra	10
3.2.2	Digestión de las muestras de ADN.....	10
3.2.3	Identificación de los genotipos	10
3.2.4	Electroforesis en gel agarosa.....	12
3.2.5	Análisis de resultados	12
3.3	Diseño experimental.....	12
3.4	Control de ingesta y del peso corporal	13
3.5	Test de tolerancia a la glucosa	14
3.6	Test de sociabilidad de las tres cámaras	15
3.7	Test <i>Elevated Plus Maze</i>	16
3.8	Procedimiento de eutanasia y obtención de las muestras	16
3.9	Análisis estadístico.....	17
4	RESULTADOS.....	17
4.1	Evolución del peso corporal, ingesta y peso de los tejidos	17
4.2	Resistencia a la insulina.....	21
4.3	Sociabilidad	22
4.4	Ansiedad	22
5	DISCUSIÓN	23
6	CONCLUSIONES.....	27
7	BIBLIOGRAFÍA	28

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Obesidad

La obesidad es una de las principales pandemias del siglo XXI, representando un desafío crítico para la salud pública global debido a su creciente prevalencia y las numerosas comorbilidades asociadas. Se define como una condición caracterizada por un exceso de grasa corporal que puede afectar la salud de diferentes maneras. Puede presentarse en forma de obesidad preclínica, cuando aún no hay daños evidentes, pero existe un mayor riesgo de desarrollar enfermedades, o como obesidad clínica, cuando ya se producen alteraciones en órganos o funciones del cuerpo, con riesgo de complicaciones graves [1]. La obesidad afecta a una proporción significativa de la población mundial. Según la Organización Mundial de la Salud en 2022, 1 de cada 8 personas en el mundo vivía con obesidad, una cifra que se duplicado con creces entre los adultos y se ha cuatriplicado entre los adolescentes desde 1990 [2]. Se estima que para 2030, el 40% de la población del planeta tendrá sobrepeso y más de la quinta parte será obesa, incrementando la carga de enfermedades como el síndrome metabólico, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares [3].

Las causas de la obesidad son complejas y multifactoriales, resultado de la interacción de factores genéticos, epigenéticos, endocrinos, ambientales, sociales y psicológicos. Se estima que la heredabilidad genética del índice de masa corporal oscila entre el 40-70%. Se han identificado centenares de polimorfismos implicados en el desarrollo de la obesidad, entre los que destacan variantes de genes como el FTO, que influyen en la regulación del apetito y el metabolismo energético [4]. Los hábitos dietéticos, caracterizados por un consumo elevado de alimentos ultraprocesados, ricos en azúcares y grasas saturadas, junto con el sedentarismo, contribuyen significativamente al desbalance energético que favorece la ganancia de peso [5]. Además, factores psicológicos, como el estrés, la ansiedad y la depresión, pueden llevar a patrones de alimentación emocional con un incremento neto de la ingesta calórica y preferencia por los llamados *comfort foods* [6]. Alteraciones metabólicas, como la desregulación de la vía mTOR que controla el crecimiento celular y la homeostasis energética también juegan un papel crucial en la fisiopatología de la obesidad [7]. Los entornos socioeconómicos vulnerables, con acceso limitado a

alimentos saludables y la falta de espacios y tiempo de ocio para la actividad física, agravan el problema [8].

1.2 El síndrome metabólico, consecuencia clave de la obesidad

La obesidad representa un importante desafío para la salud porque aumenta sustancialmente el riesgo de enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2, la esteatosis hepática, la hipertensión, el infarto de miocardio, el accidente cerebrovascular, la demencia, la osteoartritis, la apnea obstructiva del sueño y varios tipos de cáncer, lo que contribuye a una disminución tanto de la calidad como de la esperanza de vida [9]. La obesidad también se asocia con el desempleo, las desventajas sociales y la reducción de la productividad socioeconómica, lo que crea cada vez más una carga económica [10].

Dada la estrecha relación entre la obesidad y las alteraciones metabólicas descritas, una de las consecuencias más relevantes de esta condición es el desarrollo del síndrome metabólico, definido por un conjunto de factores de riesgo que aumentan significativamente la probabilidad de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2. El síndrome metabólico se caracteriza por la presencia de al menos tres de los siguientes componentes: obesidad abdominal (circunferencia de cintura ≥ 102 cm en hombres o ≥ 88 cm en mujeres), hipertensión arterial ($\geq 130/85$ mmHg), hiperglucemia (glucosa en ayunas ≥ 110 mg/dL), dislipidemia (triglicéridos ≥ 150 mg/dL y colesterol HDL bajo) y resistencia a la insulina [11]. La obesidad, particularmente la acumulación de grasa visceral desempeña un papel central en la patogénesis del síndrome metabólico, ya que promueve un estado proinflamatorio que altera la regulación metabólica [12].

1.3 mTOR como regulador clave del metabolismo

La serina/treonina quinasa *mammalian target of rapamycin* (mTOR) actúa como regulador central del metabolismo, integrando señales de nutrientes, energía y factores de crecimiento en base a los que modula el metabolismo, la autofagia, el crecimiento y la supervivencia celular [13]. mTOR forma dos complejos distintos: mTORC1 y mTORC2, cada uno con funciones específicas. Los complejos mTORC1 y mTORC2 se expresan en casi todos los tejidos de mamíferos, como el músculo esquelético, hígado, cerebro, tejido adiposo, corazón y del sistema inmunitario. Su

actividad varía según las necesidades metabólicas y las señales de nutrientes, energía o factores de crecimiento, regulando procesos como el crecimiento celular, la síntesis de proteínas, la sensibilidad a la insulina y la autofagia en cada tejido [14].

mTORC1 es una proteína clave que actúa como un controlador del crecimiento celular en un contexto de abundancia de nutrientes. Promueve la producción de proteínas, lípidos y nucleótidos para construir nuevas estructuras celulares y ADN, mientras favorece el uso de glucosa para obtener energía. También frena la degradación de proteínas al inhibir procesos como la autofagia. Por otro lado, mTORC2 es menos sensible a nutrientes y regula la supervivencia y proliferación celular, principalmente potenciando la señalización de insulina [15]. Su expresión está regulada por un bucle de retroalimentación negativa con mTORC1 [16].

En la obesidad, la vía mTOR se desregula, principalmente por la hiperactivación de mTORC1 debido a niveles elevados de insulina, aminoácidos y citoquinas inflamatorias, lo que estimula la síntesis de lípidos y la expansión del tejido adiposo. Esta hiperactivación de mTORC1 también interfiere con la señalización de insulina, promoviendo resistencia a la insulina en hígado, músculo y tejido adiposo, lo que contribuye al desarrollo de diabetes tipo 2. Por otro lado, mTORC2, muestra una actividad reducida debido a la retroalimentación negativa de mTORC1, agravando la resistencia a la insulina lo que exacerba las complicaciones metabólicas de la obesidad [16].

1.4 El gen Bex3

La familia de genes BEX (Brain Expressed X-linked) forma parte del clúster Bex/Tceal exclusivo de mamíferos placentarios [17], comprende un grupo de genes localizados principalmente en el cromosoma X, con cinco miembros en humanos (Bex1-5), cuatro en ratas (Bex1-4) y cinco en ratones (Bex1-4 y Bex6). Estos genes se caracterizan por su alta expresión en el cerebro y su implicación en procesos clave como el desarrollo neuronal, enfermedades neurodegenerativas, el ciclo celular y la supresión tumoral [18].

El gen Bex3, también conocido como pHGR74 o NADE [19], es un gen pequeño de 1726 pares de bases localizado en el cromosoma X, compuesto por tres exones, de los cuales únicamente el tercero codifica la proteína funcional [18]. En humanos, Bex3

es ubicuo con una expresión especialmente elevada en cerebro e hígado. En ratones, Bex3 se expresa principalmente en el cerebro y gónadas [19].

Bex3 desempeña un papel crucial en múltiples procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo y neuronal, la regulación del ciclo celular y la supresión tumoral [18]. En el análisis *post mortem* del cerebro de pacientes con trastorno de espectro autista y esquizofrenia se ha detectado una disminución en la expresión de Bex3 [17]. Además, estudios en ratones han revelado que la ausencia de Bex3 provoca la reducción del tamaño cerebral y una menor densidad neuronal en áreas como el córtex cerebral y el hipocampo. Asimismo, se han observado alteraciones conductuales, como una reducción en las interacciones sociales, pérdida de memoria y un aumento de la ansiedad [20] [17].

Por otra parte, al analizar el cerebro de ratones knockout (KO) para Bex3 se encontraron 95 genes que cambiaron su actividad: 42 se activaron y 53 redujeron su expresión. De su análisis se deriva que Bex3 está involucrado en la diferenciación de células del sistema inmunitario y en la regulación de la inflamación a través de la modulación de la señalización de TNF- α y la expresión de citoquinas, entre otros procesos [18].

Bex3 también regula la actividad de los complejos mTORC1 y mTORC2 a través de su interacción física con el complejo TSC1/TSC2, un regulador que inhibe mTORC1 y activa mTORC2. En cerebro de ratones KO para Bex3, se observó una disminución en la fosforilación de S6K1, marcador de la actividad de mTORC1, aunque no hubo cambios en otros marcadores de actividad. Por el contrario, se encontró una hiperfosforilación de los sustratos de mTORC2, AKT y NDRG1, aunque otros marcadores no experimentaron cambios. Estos resultados apuntan a una alteración de la vía de señalización de mTOR con una hipoactivación parcial de mTORC1 y hiperactivación de mTORC2 en el cerebro adulto como posible consecuencia de la deficiencia de Bex3 [17].

2 OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este estudio es caracterizar la respuesta metabólica y el comportamiento frente a la obesidad inducida por la dieta de cafetería en ratones hembra deficientes para el gen *Bex3*.

Objetivos específicos:

- Estudiar las preferencias alimentarias y el balance energético en ratones deficientes en *Bex3* alimentados con una dieta tipo cafetería.
- Investigar el efecto de esta dieta sobre la ansiedad y la sociabilidad en ratones deficientes en *Bex3*.
- Evaluar la sensibilidad a la insulina en ratones KO para *Bex3* sometidos a la dieta de cafetería.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cría y mantenimiento de los animales

Los ratones utilizados en este trabajo se han obtenido a través de una colonia propia mantenida en la Unidad de Experimentación Animal Diagonal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Los ratones KO para *Bex3* se originaron a partir de un cruce entre las cepas de ratones CBA y C57BL/6, utilizando tecnología CRISPR/Cas9 para generar ratones deficientes en *Bex3* por investigadores de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla [17]. Los ratones se alojaron en condiciones estandarizadas (temperatura de 20-22 °C; humedad de 70-80%; ciclo luz/oscuridad: 12/12 h, período de luz de 8h a 20h) con acceso libre a agua y pienso estándar (ref. 2018, Tecklad). Como enriquecimiento ambiental, se proporcionó una hoja de papel de filtro en cada jaula. Todos los procedimientos de manejo y cuidado de los animales fueron aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona, en cumplimiento con la normativa establecida por las administraciones europea, española y catalana.

Para obtener los ratones del experimento, se cruzaron principalmente hembras heterocigotas con machos KO para *bex3* o *wild type* (WT), garantizando la presencia de todos los genotipos posibles en la descendencia, conforme a la segunda ley de Mendel (ley de la segregación independiente). Se recolectaron muestras auriculares a las 4 semanas de edad para genotipado mediante extracción de ADN y PCR. Los resultados revelaron una predominancia de genotipos KO y heterocigotos con una proporción significativamente menor a la esperada de ratones WT de ambos sexos. Dadas las restricciones temporales del estudio, se procedió con los genotipos

disponibles, utilizando los ratones hembra heterocigotos como control y referencia comparándolos con los ratones hembra KO para Bex3.

3.2 Genotipado de ratones

La identificación precisa de los genotipos permitió seleccionar los individuos adecuados para los experimentos. A continuación, se detalla el procedimiento realizado.

3.2.1 Obtención de la muestra

Las muestras de oreja se obtuvieron de ratones de 4 semanas de edad, una semana después del destete, cuando ya son suficientemente maduros para tolerar el procedimiento sin generar estrés excesivo. Este tejido auricular es ideal para la extracción de ADN por su alta densidad celular y bajo contenido graso. Para la toma de muestras, los ratones fueron sedados con isoflurano (IsoFlo, Zoetis). Se realizaron orificios en la oreja con una perforadora estéril de 2 mm (Napox KN 292-B Stainless 2.0), que además sirve como método de identificación. Tras el procedimiento, se verificó la completa recuperación antes de devolverlos a su jaula.

3.2.2 Digestión de las muestras de ADN

Para la extracción de ADN genómico se utilizó la muestra de tejido auricular, al cual se le añadieron 40 µL del reactivo de extracción QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Biosearch Technologies) en tubos Eppendorf de pared fina para PCR de 0,2 mL. A continuación, se incubaron los tubos en un termociclador Applied Biosystems GeneAmp® 2700, 6 minutos a 65 °C para facilitar la lisis celular. Luego, las muestras fueron agitadas 15 segundos en vórtex y centrifugadas a 16.000g durante 1 minuto. Después, se incubaron a 98 °C durante 2 minutos, seguido nuevamente de agitación y centrifugación bajo las mismas condiciones. Finalmente, las muestras se conservaron a –20 °C.

3.2.3 Identificación de los genotipos

Para determinar el genotipo de los ratones se realizaron tres reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) a cada muestra. Los cebadores se muestran en la Tabla 1. La primera PCR1, empleaba cebadores que amplificaban una región amplia del ADN, dentro de la cual se encuentra la secuencia del gen Bex3. La segunda PCR, PCR

nested, utiliza cebadores internos diseñados para diferenciar el alelo con el gen Bex3 intacto y el alelo carente de parte del gen Bex3, distinguibles por las diferencias en el tamaño de los fragmentos amplificados. La tercera PCR es específica para el alelo WT. En esta PCR, el cebador *forward* estaba localizado dentro del fragmento eliminado en los ratones KO, por lo que solo se amplifica banda en presencia del alelo intacto. El cebador *reverse* era el mismo utilizado en la PCR *nested*.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados para genotipar.

Tipo de PCR	Primer	Secuencia
PCR 1	<i>Forward</i>	CCTGTCTAGGACCCCTGTGA
	<i>Reverse</i>	GCGGGAGTCACAGTATGGAT
Nested PCR	<i>Forward</i>	TGCCCTGTCTTGCTTGTGT
	<i>Reverse</i>	TGGTGATCGTGGTGGTTAGA
PCR WT	<i>Forward</i>	CTAACTTCCGGGCCATT
	<i>Reverse</i>	TGGTGATCGTGGTGGTTAGA

Esta tercera reacción es clave para distinguir entre heterocigotos y KO, ya que la nested PCR a veces muestra solo la banda del alelo KO, más corta, debido a su mayor eficiencia de amplificación, lo que puede inducir a interpretaciones confusas.

Las reacciones de PCR se realizaron con el reactivo comercial PCR REDTaq ReadyMix (Sigma-Aldrich) y los cebadores, se diluyeron previamente a una concentración intermedia de 3 μ M con agua Milli-Q. Para cada muestra se preparó una mezcla que contenía 5 μ L de Master Mix, 2 μ L de primer *forward*, 2 μ L de primer *reverse* (concentración final 0,6 μ M cada uno) y 1 μ L de solución con ADN extraído de oreja o producto de PCR anterior, según el caso. Las reacciones de las PCR siguieron las siguientes condiciones:

- PCR 1: 95 °C 5 minutos, 30 ciclos a 95 °C 30 segundos, 55 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 30 segundos, con una extensión final de 10 minutos a 72 °C
- PCR *nested* y PCR WT: se usaron las mismas condiciones, pero con una temperatura de hibridación de 59 °C.

Finalmente, las muestras se conservaron a -20 °C o se realizó la electroforesis.

3.2.4 Electroforesis en gel agarosa

Se preparó un gel al 2% de agarosa en tampón TAE 1x. La mezcla se calentó en un microondas durante 1-2 minutos, asegurando la disolución completa de la agarosa, y se enfrió. Se añadió SYBRSafe (6 µl/100 mL), un fluorocromo que se une al ADN para su visualización bajo luz ultravioleta. La solución se vertió en un molde sellado y se dejó solidificar durante 20-30 minutos. Una vez listo, el gel se cubrió con tampón TAE 1x y se cargaron las muestras de ADN junto con un DNA ladder (GeneRuler 1 Kb) como marcador de peso molecular. La electroforesis se realizó a 120 V durante 20-40 minutos. Los resultados se visualizaron en el GelDoc Go Gel Imaging System.

3.2.5 Análisis de resultados

Los genotipos se determinaron según el patrón de bandas observado en los geles de las PCR nested y WT (figura 1):

- KO: Banda de ~207 pb en la PCR nested, sin banda en la PCR WT.
- WT: Banda de ~403 pb en la PCR nested y banda en la PCR WT.
- Heterocigoto: Bandas de ~403 pb y ~207 pb en la PCR nested, y banda en la PCR WT.

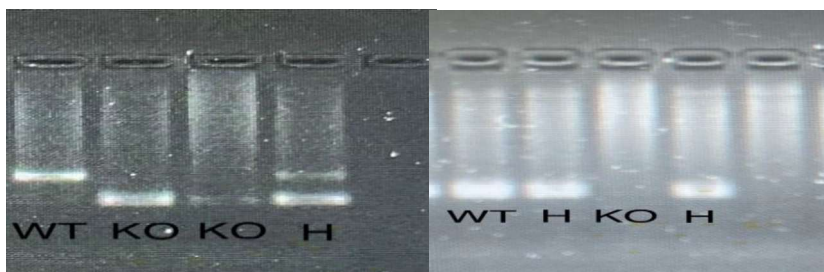


Figura 1. Ejemplo representativo de los resultados obtenidos mediante PCR. A la izquierda, se muestra el resultado de la PCR *nested*, donde se observa una banda específica en las muestras KO, una banda distinta en WT y ambas bandas en los heterocigotos. A la derecha, se presenta la PCR WT, en la cual se observa una única banda en la muestra WT y heterocigotas, así como ausencia de banda en las KO. WT: wild type; KO: knockout; H: heterocigoto.

3.3 Diseño experimental

El diseño experimental, incluyendo la asignación de los animales a los distintos grupos según su genotipo y dieta, se ilustra en la Figura 2. Se utilizaron entre 10 y 11 ratones hembra de 7 semanas de edad por grupo experimental, y repartidos a razón de 3-4 ratones por jaula, con 3 o 4 jaulas por grupo experimental. Durante 10 semanas, se administró y controló el consumo de dieta estándar y dieta de cafetería, procediendo a realizar diversos tests a partir de la semana 8 de tratamiento. El diseño experimental

está encaminado a causar obesidad inducida a través de dieta de cafetería y testar su impacto en los aspectos establecidos en los objetivos. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- **Ratones heterocigotos con dieta control:** 11 ratones en 3 jaulas, alimentados con pienso dieta control.
- **Ratones heterocigotos con dieta de cafetería:** 10 ratones en 3 jaulas, alimentados con dieta de cafetería.
- **Ratones KO con dieta control:** 10 ratones en 3 jaulas, alimentados con pienso dieta control.
- **Ratones KO con dieta cafetería:** 11 ratones en 3 jaulas, alimentados con dieta de cafetería.

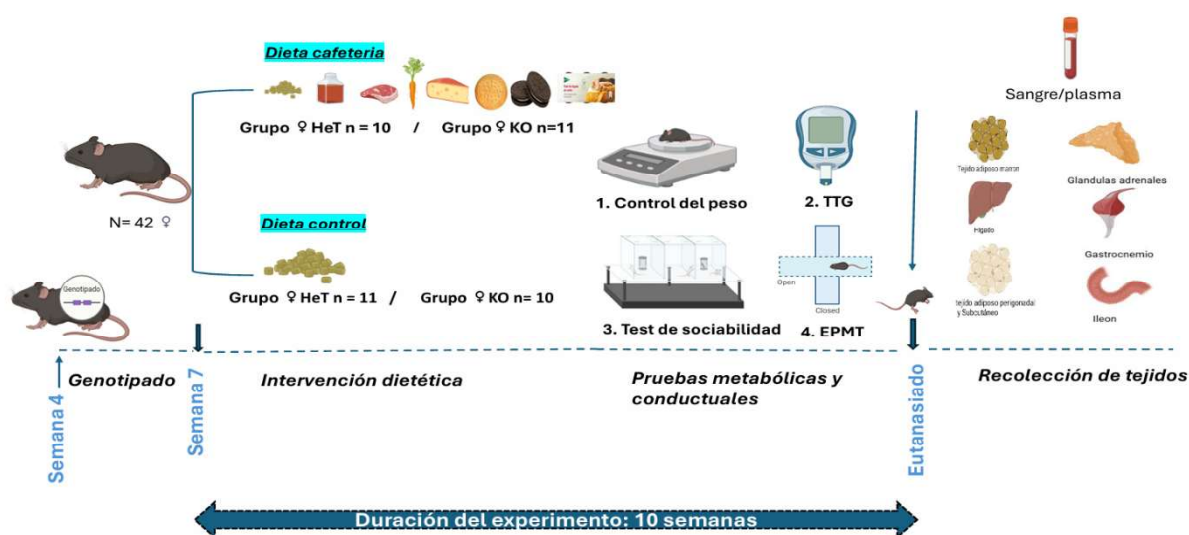


Figura 2. Esquema ilustrativo del diseño experimental.

3.4 Control de ingesta y del peso corporal

Durante las 10 semanas del experimento, se controló semanalmente el peso corporal de cada ratón. En los grupos con dieta de cafetería, los alimentos se ofrecían a diario y se renovaban al día siguiente, salvo los fines de semana, cuando se duplicaba la cantidad (excepto la leche con Nesquik, que se cambiaba el sábado). En los grupos control, el pienso se reemplazaba una vez por semana.

La dieta de cafetería contenía pienso estándar (ref. 2018, Teklad), galleta María, galleta Oreo, queso Emmental, zanahoria, paté, *bacon* ahumado y leche entera con

20% de Nesquik preparada diariamente. La composición en energía y macronutrientes de cada alimento se muestran en la Tabla 2.

La ingesta se calculaba por diferencia entre el peso del alimento ofrecido y el de los restos recuperados al día siguiente. Esta diferencia se ajustaba teniendo en cuenta la pérdida o ganancia de humedad derivada de la exposición al aire durante 24 horas. La energía y los macronutrientes ingeridos se estimaron a partir del peso consumido y de la composición nutricional de cada alimento, calculando los kilojulios aportados por cada macronutriente (Tabla 2).

Tabla 2. Composición en energía total y energía aportada por cada macronutriente expresada por gramo de alimento incluido en la dieta de cafetería y del pienso estándar de mantenimiento.

ALIMENTOS	KJ/g	KJ/g Proteína	KJ/g Azúcares	KJ/g Glúcidos totales	KJ/g Lípidos	KJ/g Ácidos grasos saturados
Pienso (ref 2018, Teklad)	13,0	3,12	-	7,54	2,34	-
Bacon ahumado (El Corte Inglés)	14,6	2,51	0,170	0,170	12,0	4,89
Paté Piara	11,4	2,01	0,083	0,368	9,03	1,45
Leche con Nesquik 20%	5,2	0,573	3,00	3,12	1,33	0,801
Galleta María	18,2	1,25	3,34	13,0	3,50	0,376
Galleta Oreo	19,8	0,936	5,85	11,20	7,15	0,903
Queso Emmental (El Corte Inglés)	15,5	4,51	-	-	10,9	3,34
Zanahoria	1,4	0,134	1,14	1,17	0,113	0,019

3.5 Test de tolerancia a la glucosa

A las 8 semanas de tratamiento, se realizó un test de tolerancia a la glucosa para evaluar la sensibilidad a la insulina en los distintos grupos. Los ratones fueron sometidos a un ayuno diurno controlado de 6 horas (de 8h a 14h). Luego, se tomó una muestra de ~20 µL de sangre mediante corte del extremo distal de la cola, que permitió medir la glucemia basal con un glucómetro comercial y fue recogida en microtubos con EDTA (Microvette® CB 300, Sarstedt) para la obtención posterior de plasma.

Acto seguido, se administró una carga intraperitoneal de D-glucosa al 20% en solución salina estéril, calculando el volumen necesario a inyectar para administrar una dosis de 2 g/kg de peso corporal. Las determinaciones de glucosa en sangre se realizaron

a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos tras la administración, utilizando el mismo procedimiento que en el tiempo 0. Las muestras de sangre fueron centrifugadas durante 10 minutos a 14.000 g, y el plasma resultante se almacenó a -20°C .

3.6 Test de sociabilidad de las tres cámaras

El test de las tres cámaras fue desarrollado en 2004 y se ha utilizado ampliamente como una prueba estándar para evaluar la sociabilidad en ratones. La sociabilidad se define en este test como el tiempo que el ratón pasa en la cámara que contiene un ratón desconocido en comparación con la cámara vacía [21].

Los animales fueron trasladados a la sala de experimentación 30 minutos antes del test para habituarse al entorno. La prueba se realizó entre las 10h y 14h, durante varios días consecutivos, en condiciones de silencio e iluminación controlada. El dispositivo experimental era una estructura de metacrilato transparente

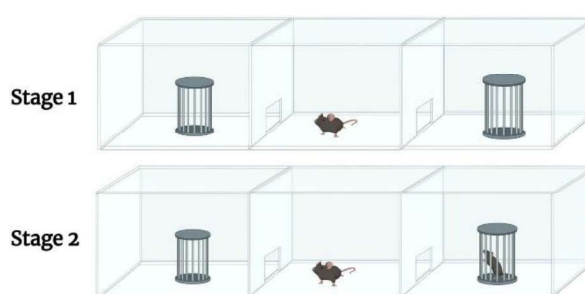


Figura 3. Esquema del test de interacción social en tres compartimentos para evaluar la sociabilidad en ratones.

dividida en tres compartimentos conectados ($15 \times 15 \times 20$ cm): una cámara central y dos laterales. En los extremos de las cámaras laterales se colocaron cilindros metálicos enrejados que permitían el contacto visual y olfativo (Figura 3). La prueba se desarrolló en dos fases consecutivas:

- **Fase de habituación (5–10 minutos):** Cada ratón fue colocado en la cámara central y se le permitió explorar libremente las tres cámaras. Se registró el tiempo que el animal pasó en cada compartimento y el número de accesos. La fase se extendió a 10 minutos para asegurar que el animal pasara al menos 1 minuto en cada cámara. Si no exploró todas las cámaras en ese tiempo, el experimento se repitió al día siguiente.
- **Fase de sociabilidad (10 minutos):** Tras la habituación, se introdujo un ratón desconocido (de la misma edad y sexo) en un cilindro enrejado (derecha o izquierda) y el cilindro opuesto quedó vacío. El ratón fue colocado en la cámara central y se le permitió explorar durante 10 minutos. Se registró el tiempo en cada cámara y la interacción con el ratón intruso.

Tras cada sesión, el dispositivo se limpió con etanol al 70 % para evitar interferencias olfativas.

3.7 Test *Elevated Plus Maze*

El test *Elevated Plus Maze* (EMPT) se empleó para evaluar la ansiedad en ratones. La prueba se basa en el conflicto entre la aversión innata a los espacios abiertos, percibidos como amenazantes, y la tendencia exploratoria natural del roedor.

El dispositivo consistió en una plataforma con cuatro brazos perpendiculares (30×5 cm): dos abiertos y dos cerrados con paredes opacas de 15 cm, conectados por una plataforma central de 5×5 cm (Figura 4). El suelo blanco facilitó la detección del movimiento, al contrastar con el pelaje. Un menor tiempo o número de entradas en los brazos abiertos se interpretó como mayor ansiedad [22]. La prueba se realizó

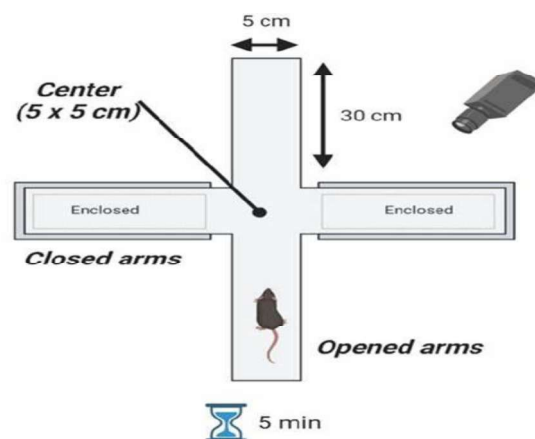


Figura 4. Diseño del test *Elevated Plus Maze* [22]

en la semana 9, tras 30 minutos de habituación a la sala. Las sesiones se llevaron a cabo entre las 10h y 14h, bajo luz controlada (200 lux) y en silencio, con el laberinto rodeado de cortinas negras para minimizar estímulos visuales no deseados.

Cada ratón fue colocado en el centro del aparato y se le permitió explorar durante 5 minutos. El comportamiento fue grabado con una cámara cenital y analizado con el software Smart 3.0 (Panlab, España), registrando el número de entradas a brazos abiertos y cerrados, la distancia total recorrida, y conductas repetitivas como *grooming* o *rearing*. Al finalizar cada ensayo, el aparato se limpió con etanol al 70 % para eliminar restos físicos y olores.

3.8 Procedimiento de eutanasia y obtención de las muestras

En la semana 10 del experimento, se llevó a cabo la eutanasia. Los ratones fueron sometidos previamente a un ayuno diurno de 6 horas con acceso libre al agua. A continuación, fueron anestesiados con isoflurano y se extrajo sangre de la vena cava inferior. Tras dislocación cervical, se diseccionaron los tejidos (hígado, tejido adiposo

perigonadal, subcutáneo, mesentérico y retroperitoneal, tejido adiposo marrón, músculo gastrocnemio, glándulas adrenales e íleon), se pesaron e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido, almacenándolos luego a -80 °C. Las muestras de sangre se centrifugaron 10 minutos a 14000g a 4 °C y se almacenaron a -20 °C.

3.9 Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como media $\pm$ error estándar. Los datos experimentales fueron analizados y representados utilizando GraphPad Prism v10 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). Se emplearon ANOVAs de dos o tres factores según el estudio, considerando como factores principales el genotipo, la dieta y, en algunos casos, el tiempo. Posteriormente, se aplicó el test de comparaciones múltiples de Tukey. Para la comparación entre dos grupos, se utilizó la prueba t de Student, en su versión para muestras independientes cuando los grupos no estaban relacionados, y para muestras pareadas cuando las comparaciones se realizaban dentro del mismo sujeto o entre medidas emparejadas. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,050$.

4 RESULTADOS

4.1 Evolución del peso corporal, ingesta y peso de los tejidos

La Figura 5 muestra la evolución del peso corporal en los grupos experimentales durante las 10 semanas, expresada en gramos y como porcentaje respecto al peso inicial. Todos los grupos mostraron un aumento progresivo de peso, siendo más acusado en los alimentados con dieta tipo cafetería.

Además, los ratones KO para Bex3 tendieron a presentar un peso superior al de los ratones heterocigotos en ambos tipos de dieta, observándose la diferencia más notable en el grupo alimentado con dieta cafetería.

El análisis estadístico mediante ANOVA de tres factores (tiempo, genotipo y dieta) indicó efectos significativos del tiempo ($p < 0.0001$), dieta ($p = 0.0002$) y genotipo ($p = 0.0002$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre comparaciones individuales en el post-test de Tukey.

Se analizó la ingesta energética media diaria de los distintos grupos experimentales (Figura 6, derecha). Los ratones alimentados con dieta tipo cafetería presentaron una ingesta energética significativamente mayor en comparación con los que recibieron dieta control (ANOVA de dos factores, $p < 0.0001$), sin observarse diferencias atribuibles al genotipo.

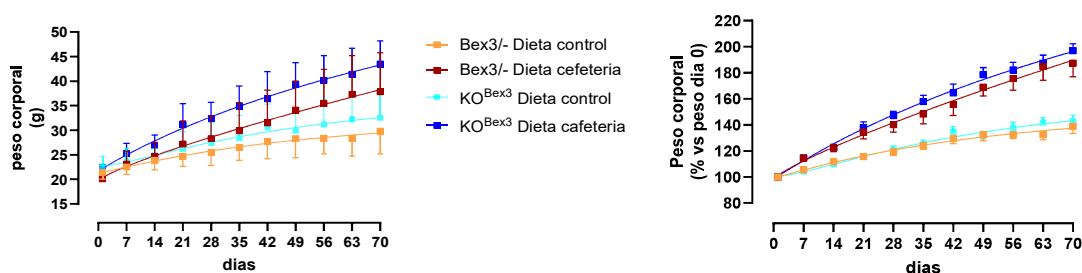


Figura 5. Evolución del peso corporal (izquierda, en gramos) y relativo al peso inicial (derecha, en %) durante 10 semanas de intervención dietética en ratones hembra KO para Bex3 y heterozigotos. Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de tres factores (tiempo, genotipo y dieta), seguido de un post-test de Tukey para comparaciones múltiples que no dio ninguna diferencia entre parejas.

La eficiencia energética, definida como los gramos de peso ganados en relación con la ingesta se muestra en la Figura 6, izquierda. Los ratones con dieta tipo cafetería mostraron una eficiencia significativamente mayor que los del grupo control ($p = 0.0029$). También se observó una tendencia a mayor eficiencia en los ratones KO para Bex3 en comparación con los heterozigotos, aunque sin alcanzar significación estadística ($p = 0.0601$).

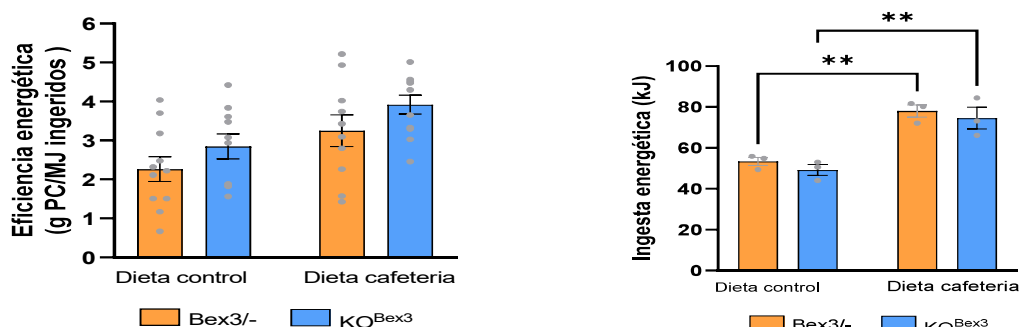


Figura 6. Eficiencia e ingesta energética en función del genotipo y del tipo de dieta en ratones hembra KO para Bex3 y heterozigotos. Valores expresados como media $\pm$ error estándar (SEM). Se realizó una ANOVA de dos factores (dieta y genotipo), seguido de comparación múltiple mediante el test de Tukey. ** $p < 0.010$.

La composición en macronutrientes de dicha ingesta se muestra en la Figura 7. La ingesta proteica se redujo significativamente con la dieta de cafetería en ambos

genotipos (ANOVA de dos factores, efecto de la dieta: $p = 0.0039$). Por el contrario, la ingesta de glúcidos ($p = 0.0024$), azúcares, lípidos y ácidos grasos saturados ($p < 0.0001$ en todos los casos) aumentó significativamente en respuesta a esta dieta.

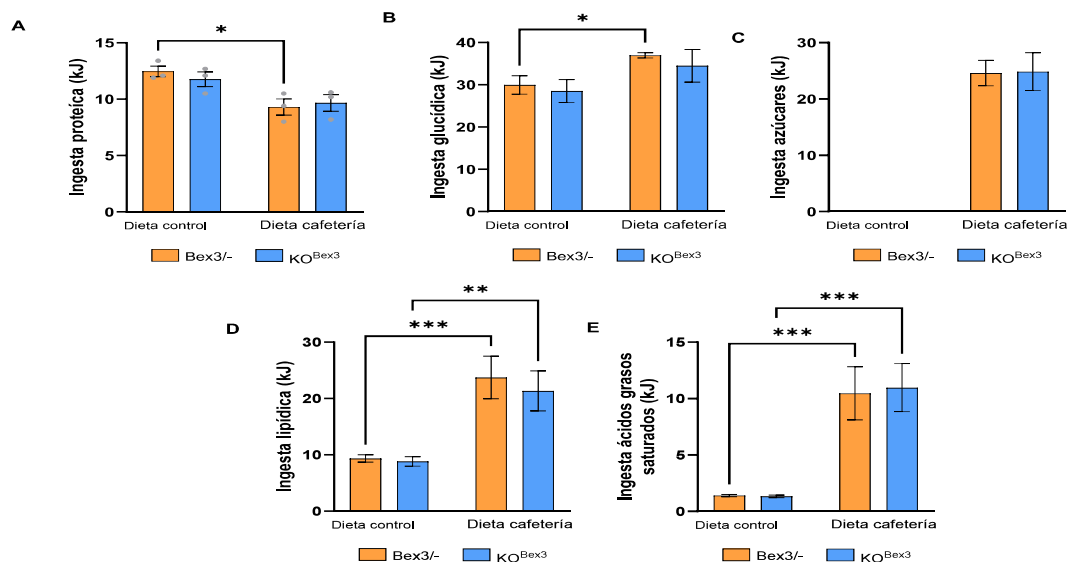


Figura 7. Comparación de la ingesta energética media de diferentes macronutrientes entre dieta control y de cafetería dependiendo del genotipo en hembras KO para Bex3 y heterozigotos. A: Proteica, B: Glucídica C: Azúcares D: Lípidos y E: Ácidos grasos saturados. Valores expresados como media $\pm$ error estándar (SEM). Se realizó un ANOVA de 2 factores (genotipo, dieta) + test de Tukey. * $p < 0.050$, ** $p < 0.010$, *** $p < 0.001$.

El análisis estadístico no reveló efectos significativos del genotipo ni interacciones entre dieta y genotipo para ninguno de los macronutrientes. Sin embargo, el post test de Tukey indicó que el aumento en la ingesta de glúcidos y lípidos inducido por la dieta de cafetería fue más pronunciado en los ratones heterozigotos que en los KO para Bex3. De manera complementaria, se analizó la ingesta individual de los alimentos que componían la dieta tipo cafetería (Figura 8). Los ratones KO para Bex3 consumieron más pienso ($p < 0.01$), leche con Nesquik ($p < 0.001$) y queso Emmental ($p < 0.05$), mientras que los heterozigotos ingirieron más galleta María ($p < 0.001$) y Oreo ($p < 0.0001$). No se observaron diferencias significativas en el consumo de bacon, paté ni zanahoria, aunque esta última mostró una leve tendencia a mayor consumo en el grupo KO.

Los pesos de los distintos tejidos tras 10 semanas de tratamiento se presentan en la Figura 9. El análisis ANOVA de 2 factores reveló que la dieta de cafetería incrementó significativamente el peso del hígado ($p = 0.0109$, Figura 9A). Aunque el genotipo no mostró un efecto significativo global, el test de Tukey sugiere que este incremento fue más pronunciado en los animales con el genotipo KO para Bex3.

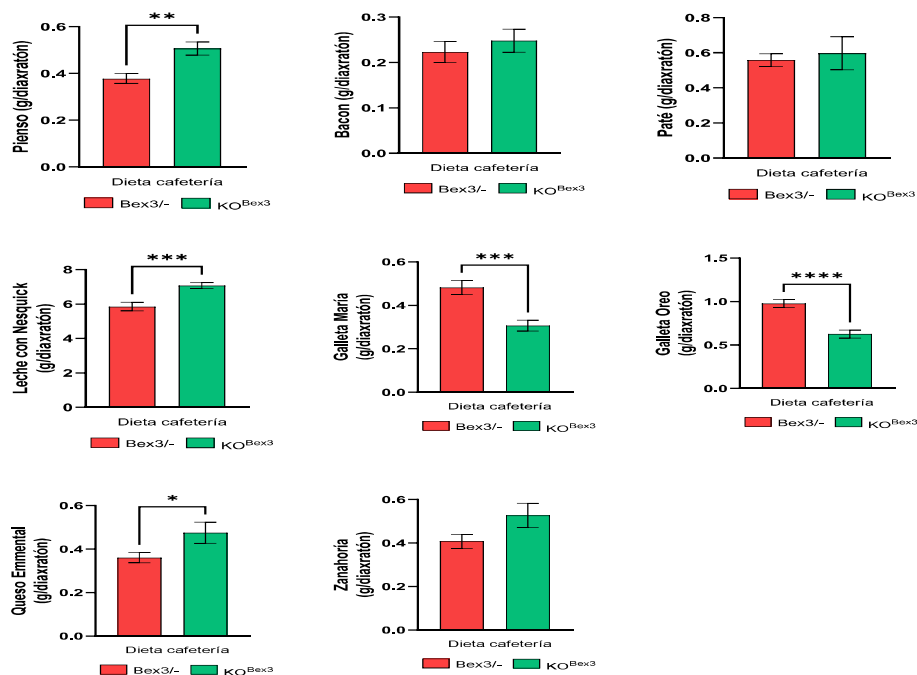


Figura 8. Comparación del consumo diario de distintos alimentos ofrecidos en la dieta tipo cafetería entre ratones KO para Bex3 y heterocigotos. Los alimentos incluidos fueron: pienso estándar, bacon, paté, leche con Nesquik, galleta María, galleta Oreo, queso Emmental y zanahoria. Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar (SEM) en g/día/ratón. El análisis estadístico se realizó mediante t-test no pareado, * $p < 0.050$, ** $p < 0.010$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

En el tejido adiposo blanco (TAB), tanto el depósito perigonadal como el mesentérico mostraron resultados similares (Figuras 9B y 9D, respectivamente). Se observó un aumento significativo del peso en ambos tejidos asociado tanto a la dieta ($p = 0.0001$ para TAB perigonadal, $p = 0.0002$ para TAB mesentérico) como al genotipo ($p = 0.0303$ y $p = 0.032$, respectivamente). El test de Tukey reveló diferencias significativas entre los grupos KO para Bex3 y heterocigotos bajo la dieta de cafetería. En el TAB subcutáneo inguinal (Figura 9C), ambos factores también influyeron ($p = 0.0001$ y $p = 0.0332$), aunque no se hallaron diferencias significativas entre grupos en el test de Tukey. En el TAB retroperitoneal y tejido adiposo marrón (TAM) (Figura 9E y 9F), hubo un aumento significativo por efecto de la dieta ($p = 0.0003$, $p < 0.0001$), pero el genotipo no causó cambios significativos, sin embargo, Tukey detectó diferencias entre genotipos dentro de cada dieta. Finalmente, el índice de adiposidad (relación entre el peso total de tejido adiposo y el peso corporal, expresado en porcentaje), mostrado en la Figura 9G, indica que tanto la dieta como el genotipo tienen un efecto global significativo sobre la adiposidad corporal. Además, bajo la dieta de cafetería se encontraron diferencias entre genotipos, según el test de Tukey.

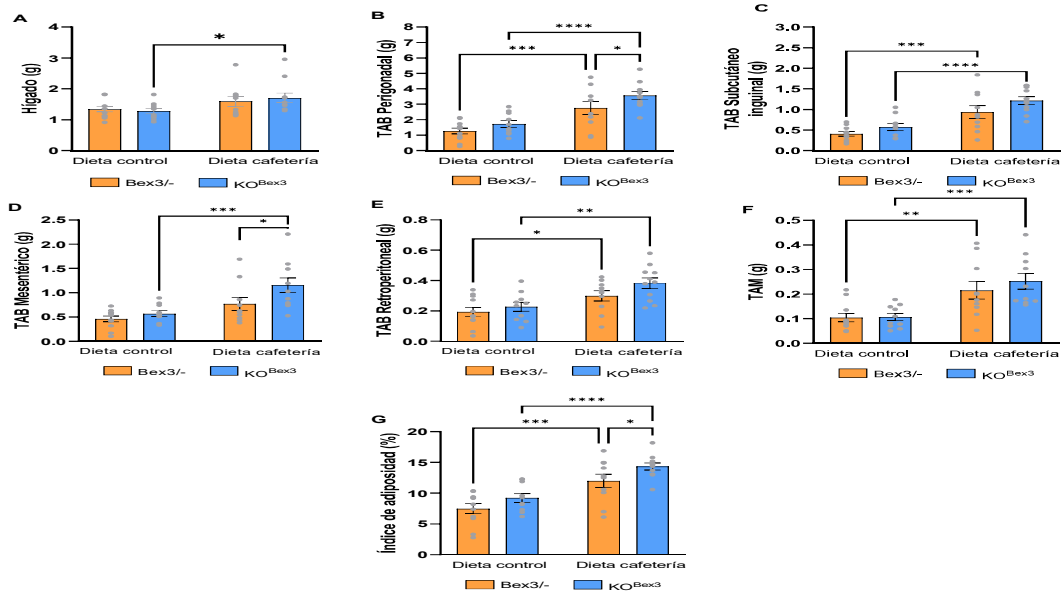


Figura 9. Peso de los distintos tejidos recolectados tras el sacrificio de los modelos experimentales (A–F) e índice de adiposidad (G). Los resultados se presentan como media $\pm$ error estándar (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos factores (dieta y genotipo) y comparaciones múltiples con test de Tukey, * $p < 0,050$, ** $p < 0,010$, y *** $p < 0,001$.

4.2 Resistencia a la insulina

Se observó un aumento significativo en la glucemia durante el test de tolerancia a la glucosa en los ratones KO con dieta de cafetería, mientras que no hubo cambios en los heterocigotos (Figura 10, izquierda). La ANOVA de 3 factores mostró un efecto significativo del tiempo ($p < 0.0001$) y una interacción entre dieta y genotipo ($p = 0.0002$). Estas diferencias también se reflejan en el área bajo la curva (Figura 10, derecha), donde los ratones KO para Bex3 con dieta de cafetería mostraron un valor mayor que el de los KO control.

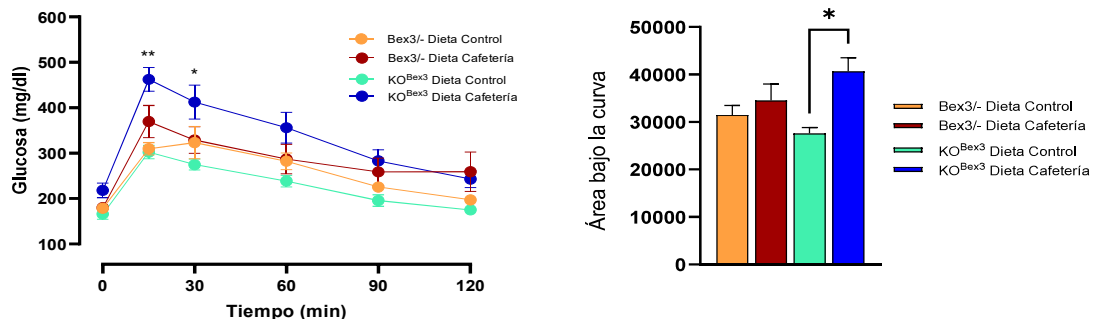


Figura 10. Niveles de glucosa durante el test de tolerancia (izquierda) y área bajo la curva (AUC) correspondiente (derecha). Los grupos fueron: HBex3^{-/-} con dieta control (n=7) o de cafetería (n=7), y KO Bex3 con dieta control (n=6) o de cafetería (n=6). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM. Se aplicó ANOVA de tres factores para los niveles de glucosa y de dos factores para el AUC, seguido del test de Tukey, ** $p < 0.010$ y * $p < 0.050$.

4.3 Sociabilidad

La prueba de las tres cámaras realizada para evaluar la sociabilidad incluye dos fases. En la fase de habituación (Figura 11, izquierda), el ratón pudo explorar libremente las cámaras vacías e idénticas, y no se observaron diferencias significativas en el tiempo de visita entre cámaras en ningún grupo. En la fase de sociabilidad (Figura 11, derecha), se introdujo un ratón intruso en una de las cámaras, mientras que la otra permaneció vacía. En esta fase, se observó un efecto del genotipo: los heterozigotos pasaron más tiempo con el intruso, mientras que los KO no mostraron preferencia. La dieta de cafetería no afectó el comportamiento.

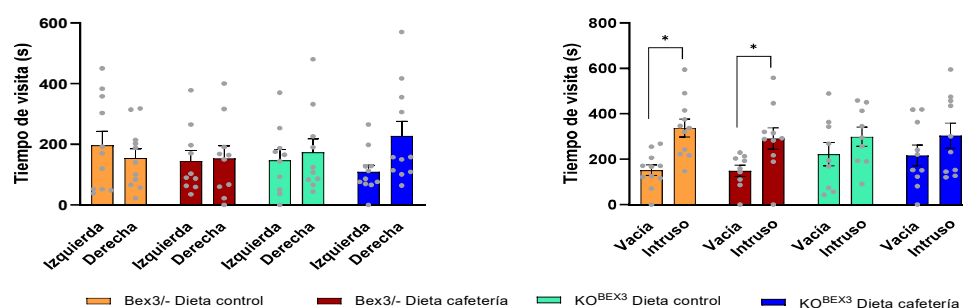


Figura 11. Evaluación del comportamiento social en el test de las tres cámaras, expresado como tiempo medio $\pm$ error estándar invertido en cada cámara: a la izquierda, fase de habituación; a la derecha, fase de sociabilidad. El análisis estadístico se realizó mediante prueba T de Student para cada grupo experimental; * $p < 0,050$.

4.4 Ansiedad

En el test de ansiedad se observó una alta variabilidad en los resultados, lo cual dificulta extraer conclusiones sólidas. En cuanto al número de entradas a los brazos abiertos (Figura 12A), el análisis ANOVA de dos factores (dieta y genotipo) mostró una interacción significativa entre ambos factores ($p=0.0396$). En este caso, los ratones heterozigotos presentaron más entradas a los brazos abiertos bajo la dieta de cafetería en comparación con la dieta control. En cambio, en los ratones KO para Bex3, se observó el efecto contrario: la dieta de cafetería disminuyó el número de entradas. Mientras con dieta control los ratones KO registraron más entradas a los brazos abiertos.

Respecto al tiempo pasado en los brazos abiertos (Figura 12B), no se encontraron diferencias significativas ni por la dieta ni por el genotipo, y la interacción entre ambos

factores tampoco fue significativa, aunque se acercó al umbral de significación ($p=0.0737$).

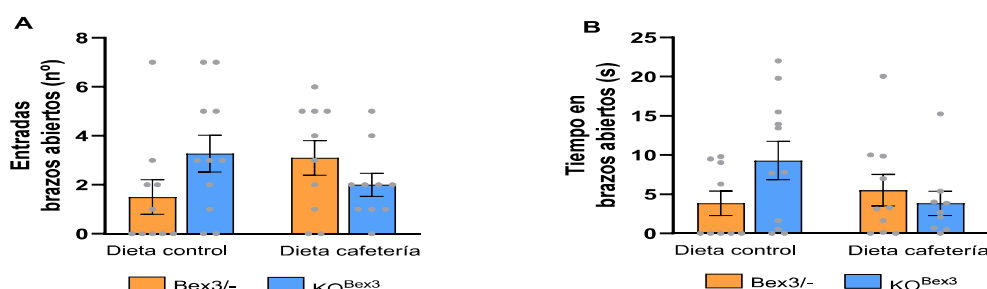


Figura 12. Número de entradas (A) y tiempo (B) en los brazos abiertos durante el test de ansiedad (EMPT). Los valores se presentan como media $\pm$ error estándar. Se realizó ANOVA de dos factores (genotipo y dieta), seguido del test de Tukey, que no reveló diferencias significativas entre grupos.

La distancia total recorrida durante el test (Figura 13A) fue significativamente mayor en los ratones KO para Bex3, lo que indica que el genotipo potencia la actividad motora ($p = 0.025$). En cuanto al comportamiento de *grooming*, los ratones con dieta control mostraron más episodios que los de dieta de cafetería (ANOVA, factor dieta $p = 0.004$), indicando un efecto de la dieta sobre esta conducta repetitiva, especialmente en los KO para Bex3, aunque no hubo diferencias globales debido al genotipo (ANOVA genotipo $p=0,114$). En el comportamiento de *rearing* no se encontraron diferencias significativas, aunque los efectos de genotipo ($p = 0.0633$) y dieta ($p = 0.0509$) estuvieron cerca del umbral.

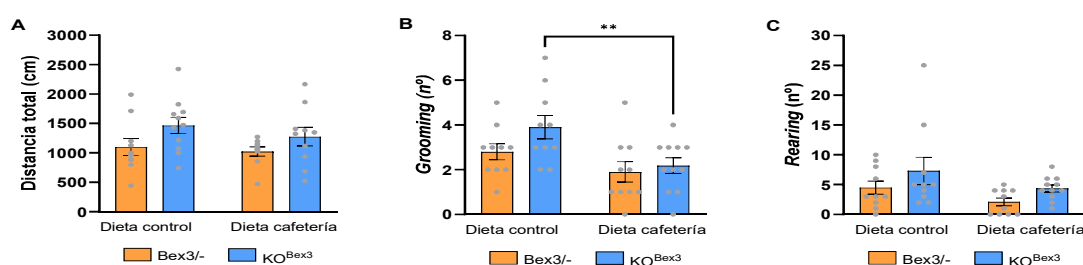


Figura 13. Distancia total recorrida (A), y número de episodios de grooming (B) y rearing (C), comportamientos repetitivos asociados a la ansiedad, en los distintos grupos experimentales. Los resultados se presentan como media $\pm$ error estándar. Se utilizó una ANOVA de dos factores (dieta y genotipo), seguido del test de Tukey para comparaciones entre grupos. ** $p < 0.001$.

5 DISCUSIÓN

En este trabajo se buscó caracterizar la respuesta metabólica y el comportamiento frente a la obesidad inducida por una dieta de cafetería en ratones hembra deficientes

en el gen *Bex3*, un gen previamente asociado a trastornos neurológicos que se halla en el cromosoma X. Es un proceso bien conocido la inactivación aleatoria de uno de los cromosomas X en las hembras causando un efecto mosaico [23]. Según esto, los ratones hembra heterocigotos para el gen *Bex3* utilizados como controles en este TFM, presentarán tejidos donde algunas células expresarán el alelo *Bex3* y otras no lo expresarán. Esto genera una expresión global de *Bex3* menor en ratones heterocigotos que en los *wild type* (WT). Por ello, para interpretar los fenotipos en estos ratones, es crucial considerar este mosaicismo, y las conclusiones definitivas requerirán estudios adicionales con ratones WT para comparar los efectos de la expresión reducida de *Bex3*.

Las dietas altas en grasas y/o azúcares han sido la estrategia más utilizada para inducir obesidad y sus patologías asociadas. La dieta de cafetería se considera un modelo obesogénico especialmente relevante, ya que no solo induce obesidad, sino que también provoca alteraciones metabólicas como hiperglucemia, dislipidemia, resistencia a la insulina, estrés oxidativo e inflamación hepática [24], [25]. Los resultados obtenidos muestran el efecto obesogénico de la dieta de cafetería. Aunque todos los grupos mostraron un incremento de peso con el tiempo, los ratones KO para *Bex3* con dieta de cafetería presentaron el aumento más pronunciado, seguidos por los heterocigotos con la misma dieta. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la ingesta energética entre los grupos, lo que sugiere que el aumento de grasa corporal no está mediado por un mayor consumo calórico. Un posible mecanismo que puede estar actuando es la desregulación de mTOR, identificada previamente en cerebro de los ratones deficientes para *Bex3* [17], donde se ha observado una hipoactivación de mTORC1 y una hiperactivación de mTORC2. Su alteración se ha relacionado con un aumento de la lipogénesis y la acumulación de tejido adiposo, entre otros, observación confirmada para los depósitos de grasa subcutánea, mesentérico y perigonadal, así como por el incremento del índice de adiposidad general en los ratones KO [17], [26].

A pesar de que no se observaron diferencias significativas en la ingesta energética ni de macronutrientes total entre los ratones KO para el gen *Bex3* y los heterocigotos bajo la dieta tipo cafetería, el análisis detallado del consumo individual de los distintos componentes de dicha dieta reveló diferencias notables en las preferencias alimentarias entre ambos grupos genotípicos. En concreto, los animales KO para *Bex3*

mostraron una mayor ingesta de alimentos como pienso, queso emmental y leche con Nesquik, mientras que los ratones heterocigotos consumieron preferentemente galletas tipo Oreo y María. Este patrón sugiere que la ausencia del gen *Bex3* podría estar modulando la elección de alimentos en función de su palatabilidad y textura, mostrando una inclinación hacia alimentos líquidos y dulces (como la leche) o menos crujientes (como el queso o el pienso). Este tipo de preferencia alimentaria es particularmente relevante, dado que la alteración en la expresión del gen *Bex3* se ha relacionado con el trastorno del espectro autista (TEA) [17]. Una de las características comunes en los TEA es la alimentación selectiva, donde tanto la textura como el sabor de los alimentos juegan un papel fundamental. Además, se ha descrito una tendencia al consumo excesivo de alimentos altamente palatables en individuos con TEA [27]. Estudios previos en modelos animales y en humanos respaldan la hipótesis de que ciertas alteraciones genéticas pueden influir en la sensibilidad sensorial y, en consecuencia, en las preferencias alimentarias[28].

El test de tolerancia a la glucosa evidenció una marcada resistencia a la insulina de los ratones KO para *Bex3* alimentados con dieta de cafetería. Por contra, los ratones heterocigotos no mostraron diferencias significativas en el test, lo que sugiere un posible efecto protector de la presencia de *Bex3*. Estos resultados son coherentes con estudios previos que relacionan la dieta de cafetería con resistencia a la insulina, hiperglucemia postprandial y alteraciones en las vías de señalización de mTOR[25], [29]. Además, la adiposidad visceral aumentada en estos ratones puede favorecer un ambiente inflamatorio crónico, caracterizado por secreción de citocinas proinflamatorias, que inhiben la señalización de la insulina promoviendo así la progresión de la resistencia a la insulina [30]. En línea con estos hallazgos, un estudio de los genes más afectados por la ausencia de *Bex3* mostró que muchos de ellos están relacionados con enfermedades metabólicas, como la diabetes mellitus neonatal transitoria, lo que sugiere que *Bex3* podría estar involucrado en el equilibrio de la glucosa y en la prevención de alteraciones metabólicas inducidas por la dieta [18]. Estudios adicionales serán necesarios para confirmar si esta resistencia a la insulina es consecuencia directa de la ausencia de *Bex3* o si es mediada por efectos indirectos, como el aumento de tejido adiposo y la inflamación sistémica asociada.

Los ratones KO para *Bex3* mostraron menor sociabilidad frente a los heterocigotos lo que es coherente con estudios anteriores [17]. La expresión predominante de *Bex3*

en tejidos neurales y su implicación en procesos críticos como la plasticidad sináptica, la neurogénesis y la apoptosis neuronal la plasticidad sináptica, en particular, es fundamental para el aprendizaje, la memoria y la regulación del comportamiento social [31]. Estos rasgos son similares a los que se ven en modelos animales de TEA [20], lo que sugiere una posible relación entre la pérdida de *Bex3* y este tipo de trastornos. Además, la deficiencia de *Bex3* provoca una alteración en la señalización de la vía mTOR en el cerebro [17], donde participa en procesos clave como la sinaptogénesis y la corticogénesis, y su disregulación también se ha relacionado con trastornos del neurodesarrollo y neuropsiquiátricos, como el TEA [32]. Por otro lado, aunque la dieta de cafetería indujo obesidad visceral en estos ratones, no se observaron efectos de la dieta sobre el comportamiento social. Esto es relevante, ya que se ha propuesto que en personas con TEA los déficits de sociabilidad se correlacionan con un aumento de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-6, IL-17A y TNF- α [33]. Dado que la obesidad visceral se asocia con un estado proinflamatorio crónico [34], es posible que la dieta CAF haya generado una condición inflamatoria de base [25]. Sin embargo, la vulnerabilidad genética por ausencia de *Bex3* podría ser el principal factor en los déficits sociales observados, mientras que la inflamación inducida por la dieta, por sí sola, no habría sido suficiente para alterar este comportamiento. Para comprender mejor el efecto de la dieta en la sociabilidad, será necesario analizar el grado de inflamación que presentan los animales KO respecto los heterocigotos y WT.

En el test de ansiedad, los resultados muestran que la interacción entre la dieta de cafetería y el genotipo influye significativamente en el comportamiento de ansiedad. Los ratones KO mostraron una reducción de la ansiedad en comparación con los heterocigotos, mientras que la dieta de cafetería generó un efecto opuesto en función del genotipo: mientras que en los ratones KO para *bex3* redujo el número de entradas en los brazos abiertos, es decir aumentó la ansiedad, en los heterocigotos ocurrió lo contrario. Esto sugiere que la dieta modula diferencialmente el comportamiento ansioso según la presencia o ausencia del gen *Bex3*, lo cual puede estar vinculado con alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) o en el sistema de recompensa [35], [36]. Este patrón refleja una interacción clara entre factores ambientales y genéticos en el comportamiento [37]. Por otro lado, se observó un aumento significativo en la distancia total recorrida en los ratones KO para *Bex3*, independientemente de la dieta. Este resultado indica una hiperactividad o aumento

en la motivación exploratoria, lo cual puede interpretarse como un componente impulsivo o un déficit en la regulación emocional. En cuanto al *grooming*, se encontró un efecto claro de la dieta. La reducción del *grooming* observada especialmente en los ratones KO para Bex3 bajo dieta de cafetería contradice en cierta forma lo observado en el test de ansiedad. Un estudio reciente ha puesto de manifiesto que la ansiedad y el grooming están inducidos por circuitos neuronales distintos que pueden interactuar [38]. Es necesario más investigación en el futuro para comprender esta discrepancia.

Limitaciones del estudio y futuras investigaciones

Una de las limitaciones del estudio fue la ausencia de un grupo control de ratones WT. En su lugar, se utilizaron ratones heterocigotos como control. Aunque estos animales conservan una copia funcional del gen, es posible que esté silenciada en algunas células, lo que reduciría la expresión global de Bex3 en los tejidos, acentuando las diferencias con los ratones WT y dificultando una interpretación precisa de los resultados. Otra limitación fue que, aunque la dieta de cafetería permitió evaluar las preferencias alimentarias, el control de la ingesta presentó dificultades. Recuperar totalmente los fragmentos no ingeridos entre las virutas de la jaula al día siguiente fue difícil, lo cual complicó la medición precisa del consumo y, en consecuencia, afectar la consistencia de los resultados. Además, solo se estudió un sexo, por lo que no se puede descartar diferencias entre machos y hembras en los efectos observados. Por falta de tiempo, no se realizaron pruebas de memoria o reconocimiento de objetos, que habrían sido útiles para explorar funciones cognitivas. En futuras investigaciones, sería recomendable incluir un grupo WT como control, estudiar ambos sexos y ampliar las pruebas de comportamiento. También sería relevante estudiar los tejidos disponibles para verificar posibles alteraciones en la expresión y activación de mTOR en tejidos como músculo, tejido adiposo e hígado, lo cual podría aportar una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares implicados.

6 CONCLUSIONES

Este trabajo de fin de máster ha permitido caracterizar la respuesta metabólica y conductual frente a la obesidad inducida por una dieta de cafetería en ratones hembra deficientes en el gen Bex3, destacando su papel en el metabolismo y el comportamiento. Las conclusiones son:

- La dieta de cafetería exacerbó la obesidad en ratones KO para Bex3, aumentando significativamente el peso corporal y la adiposidad visceral especialmente en los tejidos perigonadal y mesentérico en comparación con los heterozigotos.
- La deficiencia en Bex3 provocó resistencia a la insulina en ratones KO para Bex3 bajo la dieta de cafetería, mientras que los heterozigotos, no mostraron afectación, sugiriendo un efecto protector por parte de Bex3.
- Aunque la ingesta energética total y de macronutrientes fue similar entre genotipos, los ratones KO para Bex3 prefirieron alimentos de texturas líquida o blanda y menos texturas crujientes, lo que parece indicar un rol de Bex3 en esta selección.
- La sociabilidad se vio reducida en ratones KO para Bex3, sin que la dieta cause ningún impacto.
- Los ratones KO para Bex3 mostraron menos ansiedad, mientras que la dieta de cafetería tuvo efectos opuestos en la ansiedad según el genotipo: la aumentó en ratones KO para Bex3 y la redujo en heterozigotos.

7 BIBLIOGRAFÍA

- [1] F. Rubino *et al.*, "Definition and diagnostic criteria of clinical obesity," *Lancet Diabetes Endocrinol*, vol. 13, no. 3, pp. 221–262, Mar. 2025, doi: 10.1016/S2213-8587(24)00316-4
- [2] "Obesidad y sobrepeso." Accessed: Aug. 03, 2025. [Online]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- [3] J. Powis, R. Thompson, and R. Jackson-Leach, "Source information compiled by Tim Lobstein," 2025, Accessed: Aug. 03, 2025. [Online]. Available: www.worldobesity.org
- [4] R. J. F. Loos and G. S. H. Yeo, "The genetics of obesity: from discovery to biology," *Nat Rev Genet*, vol. 23, no. 2, pp. 120–133, Feb. 2022, doi: 10.1038/S41576-021-00414-Z
- [5] K. D. Hall *et al.*, "Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake," *Cell Metab*, vol. 30, no. 1, pp. 67-77.e3, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.cmet.2019.05.008.
- [6] A. Dakanalis *et al.*, "The Association of Emotional Eating with Overweight/Obesity, Depression, Anxiety/Stress, and Dietary Patterns: A Review of the Current Clinical Evidence," *Nutrients*, vol. 15, no. 5, p. 1173, Mar. 2023, doi: 10.3390/NU15051173.
- [7] H. Cai, L. Q. Dong, and F. Liu, "Recent Advances in Adipose mTOR Signaling and Function: Therapeutic Prospects," *Trends Pharmacol Sci*, vol. 37, no. 4, pp. 303–317, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.tips.2015.11.011.
- [8] A. Lee, M. Cardel, and W. T. Donahoo, "Social and Environmental Factors Influencing Obesity," *Endotext*, Oct. 2019, Accessed: Aug. 03, 2025. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278977/>

- [9] M. Blüher, “An overview of obesity-related complications: The epidemiological evidence linking body weight and other markers of obesity to adverse health outcomes,” *Diabetes Obes Metab*, vol. 27, no. S2, pp. 3–19, Apr. 2025, doi: 10.1111/DOM.16263
- [10] M. Blüher, “Obesity: global epidemiology and pathogenesis,” *Nat Rev Endocrinol*, vol. 15, no. 5, pp. 288–298, May 2019, doi: 10.1038/S41574-019-0176-8
- [11] G. Fahed *et al.*, “Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 2, p. 786, Jan. 2022, doi: 10.3390/IJMS23020786.
- [12] F. Emanuela, M. Grazia, D. R. Marco, L. Maria Paola, F. Giorgio, and B. Marco, “Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome,” *J Nutr Metab*, vol. 2012, p. 476380, 2012, doi: 10.1155/2012/476380.
- [13] G. Y. Liu and D. M. Sabatini, “mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 21, no. 4, pp. 183–203, Apr. 2020, doi: 10.1038/S41580-019-0199-Y
- [14] B. K. Kennedy and D. W. Lamming, “The mechanistic Target of Rapamycin: The grand conductor of metabolism and aging,” *Cell Metab*, vol. 23, no. 6, p. 990, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.CMET.2016.05.009.
- [15] C. Allard, C. Miralpeix, A. J. López-Gamero, and D. Cota, “mTORC1 in energy expenditure: consequences for obesity,” *Nat Rev Endocrinol*, vol. 20, no. 4, pp. 239–251, Apr. 2024, doi: 10.1038/S41574-023-00934-0.
- [16] R. A. Saxton and D. M. Sabatini, “mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease,” *Cell*, vol. 168, no. 6, p. 960, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.CELL.2017.02.004.
- [17] E. Navas-Pérez *et al.*, “Characterization of an eutherian gene cluster generated after transposon domestication identifies Bex3 as relevant for advanced neurological functions,” *Genome Biol*, vol. 21, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1186/S13059-020-02172-3
- [18] Z. Xu *et al.*, “Transcriptomic profiling of mice brain under Bex3 regulation,” *Turkish Journal of Biology*, vol. 46, no. 1, p. 57, 2021, doi: 10.3906/BIY-2108-96.
- [19] E. Alvarez, W. Zhou, S. E. Witta, and C. R. Freed, “Characterization of the Bex gene family in humans, mice, and rats,” *Gene*, vol. 357, no. 1, pp. 18–28, Aug. 2005, doi: 10.1016/J.GENE.2005.05.012.
- [20] C. Herrera-Úbeda and J. Garcia-Fernández, “New Genes Born-In or Invading Vertebrate Genomes,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, Jul. 2021, doi: 10.3389/FCELL.2021.713918
- [21] M. Yang, J. L. Silverman, and J. N. Crawley, “Automated Three-Chambered Social Approach Task for Mice,” *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]*, vol. CHAPTER 8, no. SUPPL. 56, p. Unit, 2011, doi: 10.1002/0471142301.NS0826S56.
- [22] G. Santos-Sánchez *et al.*, “A Lupin (*Lupinus angustifolius*) Protein Hydrolysate Exerts Anxiolytic-Like Effects in Western Diet-Fed ApoE^{-/-} Mice,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 17, Sep. 2022, doi: 10.3390/IJMS23179828
- [23] G. Furlan and R. Galupa, “Mechanisms of Choice in X-Chromosome Inactivation,” *Cells*, vol. 11, no. 3, p. 535, Feb. 2022, doi: 10.3390/CELLS11030535.
- [24] J. F. Lanza and E. M. S. Snoeren, “The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior,” *Neurosci Biobehav Rev*, vol. 122, pp. 92–119, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.11.003.
- [25] P.-J. J. Antonio, S.-R. Isela, and A.-H. O. Elind, “Hypercaloric Cafeteria Diet-Induces Obesity, Dyslipidemia, Insulin Resistance, Inflammation and Oxidative Stress in Wistar Rats,” *The Journal*

- of Experimental Life Sciences*, vol. 13, no. 1, pp. 17–23, Feb. 2023, doi: 10.21776/UB.JELS.2023.013.01.03.
- [26] A. Szwed, E. Kim, and E. Jacinto, “REGULATION AND METABOLIC FUNCTIONS OF mTORC1 AND mTORC2,” *Physiol Rev*, vol. 101, no. 3, pp. 1371–1426, Jul. 2021, doi: 10.1152/PHYSREV.00026.2020,.
 - [27] A. Klockars, T. Pal, A. S. Levine, and P. K. Olszewski, “Neural Basis of Dysregulation of Palatability-Driven Appetite in Autism,” *Curr Nutr Rep*, vol. 10, no. 4, pp. 391–398, Dec. 2021, doi: 10.1007/S13668-021-00368-Y/METRICS.
 - [28] J. Goldschlager *et al.*, “Taste processing in autism spectrum disorder: A translational scoping review,” *Neurosci Biobehav Rev*, vol. 170, p. 106031, Mar. 2025, doi: 10.1016/J.NEUBIOREV.2025.106031.
 - [29] Y. Li *et al.*, “High fat diet-induced obesity leads to depressive and anxiety-like behaviors in mice via AMPK/mTOR-mediated autophagy,” *Exp Neurol*, vol. 348, p. 113949, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.EXPNEUROL.2021.113949.
 - [30] F. Zatterale *et al.*, “Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes,” *Front Physiol*, vol. 10, Jan. 2020, doi: 10.3389/FPHYS.2019.01607,.
 - [31] T. Takeuchi, A. J. Duszkievicz, and R. G. M. Morris, “The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 369, no. 1633, p. 20130288, Jan. 2014, doi: 10.1098/RSTB.2013.0288.
 - [32] H. Ganesan *et al.*, “mTOR signalling pathway - A root cause for idiopathic autism?,” *BMB Rep*, vol. 52, no. 7, p. 424, 2019, doi: 10.5483/BMBREP.2019.52.7.137.
 - [33] M. García-Juárez *et al.*, “Intermittent Fasting Improves Social Interaction and Decreases Inflammatory Markers in Cortex and Hippocampus,” *Mol Neurobiol*, vol. 62, no. 2, pp. 1511–1535, Feb. 2025, doi: 10.1007/S12035-024-04340-Z,.
 - [34] M. S. Ellulu, I. Patimah, H. Khaza’ai, A. Rahmat, and Y. Abed, “Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications,” *Archives of Medical Science*, vol. 13, no. 4, pp. 851–863, 2017, doi: 10.5114/AOMS.2016.58928,.
 - [35] H. E. Auvinen *et al.*, “The effects of high fat diet on the basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice,” *Journal of Endocrinology*, vol. 214, no. 2, pp. 191–197, Aug. 2012, doi: 10.1530/JOE-12-0056,.
 - [36] I. Muhammad, E. Cremonini, P. Mathieu, A. M. Adamo, and P. I. Oteiza, “Dietary Anthocyanins Mitigate High-Fat Diet-Induced Hippocampal Inflammation in Mice,” *J Nutr*, vol. 154, no. 9, pp. 2752–2762, Sep. 2024, doi: 10.1016/J.TJNUT.2024.07.028.
 - [37] G. Castellano, J. Bonnet Da Silva, and S. Pietropaolo, “The role of gene-environment interactions in social dysfunction: Focus on preclinical evidence from mouse studies,” *Neuropharmacology*, vol. 261, Dec. 2024, doi: 10.1016/J.NEUROPHARM.2024.110179.
 - [38] H. Liu, X. Huang, J. Xu, H. Mao, Y. Li, K. Ren, G. Ma, Q. Xue, H. Tao, S. Wu, and W. Wang, “Dissection of the relationship between anxiety and stereotyped self-grooming using the Shank3B mutant autistic model, acute stress model and chronic pain model,” *Neurobiol. Stress*, vol. 15, p. 100417, 2021, doi: 10.1016/j.ynstr.2021.100417.