



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



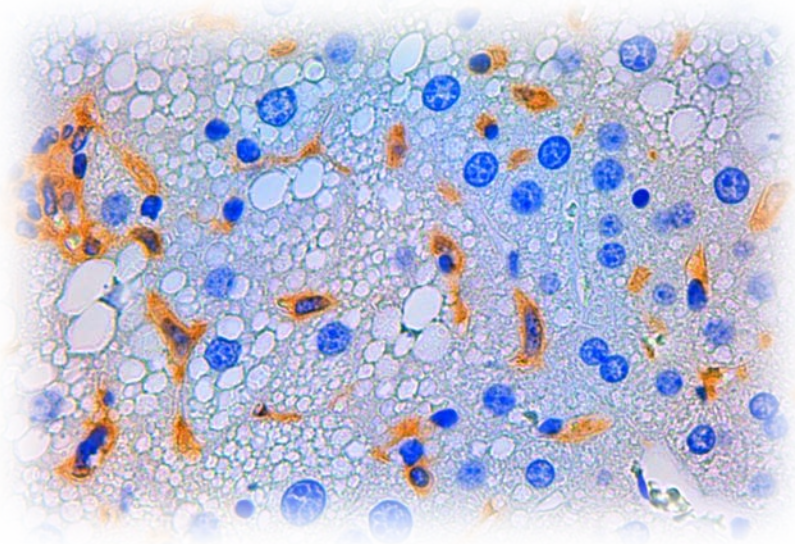
INCLIVA | VLC
Instituto de Investigación Sanitaria

Doctorado en Biotecnología

Papel de la citoquina LIGHT en la esteatosis hepática y la resistencia a insulina

Tesis doctoral

Andrea Herrero Cervera



Directora

Dra. Herminia González Navarro

Diciembre 2019



Dña. Herminia González Navarro, Investigadora de la Fundación del Hospital Clínico Universitario de Valencia, INCLIVA,

CERTIFICA

Que la presente memoria de investigación destinada a Tesis Doctoral bajo el título: **Papel de la citoquina LIGHT en la esteatosis hepática y la resistencia a insulina** presentada por Dña. Andrea Herrero Cervera, graduada en Bioquímica y Ciencias Biomédicas por la Universidad de Valencia, ha sido realizada en el INCLIVA bajo mi dirección para la obtención del título de Doctor.

Y para que así conste, expido el presente en Valencia el 9 de diciembre de 2019

Directora: Herminia González Navarro

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por las siguientes ayudas:

Título: Desarrollo preclínico nuevo tratamiento de la aterosclerosis
APOTIP/2018/02

Entidad financiadora: Generalitat Valenciana Conselleria de Investigació, Cultura i Esport

Investigadora principal: Herminia González Navarro.

Título: Papel de los procesos inflamatorios asociados a la diabetes en la estabilidad de la placa de ateroma y estudio del uso potencial de estrategias terapéuticas **PI16/00091**

Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III Acción Estratégica en Salud

Investigadora principal: Herminia González Navarro.

Título: Role of the cytokine LIGHT(TNFSF14) in the development of IR and fatty liver Disease **NN_2016_3**

Entidad financiadora: European foundation for the study of diabetes (EFSD)/Novo Nordisk Programme for Diabetes Research in Europe

Investigadora principal: Herminia González Navarro.

Título: Estudio de los mecanismos moleculares de la Diabetes Mellitus y su papel en el desarrollo de la aterosclerosis **PI13/00834**

Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III Acción Estratégica en Salud

Investigadora principal: Herminia González Navarro.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no habría sido posible sin mi directora Herminia. Muchas gracias por toda la formación que me has brindado a lo largo de estos años y por dirigir mi tesis con paciencia y cariño.

La elaboración de este trabajo también es fruto del esfuerzo y dedicación de mi compañera de laboratorio y amiga Ángela. Muchas gracias por transmitirme todos tus conocimientos y “trucos” de laboratorio. Y gracias, sobre todo, por todas las conversaciones sobre arte y cultura y por todos los consejos personales.

Gracias Ali por todos nuestros momentos “café y subo”, tan fundamentales para el desarrollo efectivo de esta tesis. Gracias por tus historias locas que alegran el día a cualquiera.

Gracias Irene por todo lo que me enseñaste en mis inicios y por estar ahí apoyándome a lo largo de estos años. Fuiste mi primera amiga de laboratorio con la que todo comenzó y con la que también acabo, aunque estemos a un pasillo de distancia.

Guadalupe, gracias por tu ayuda, dedicación y paciencia en citometría. Tantas horas de citometría al final acaban uniendo. Gracias por escucharme y por todos los buenos consejos.

Gracias a todo el personal del animalario, en especial a Ana, Eva y Pili por hacer sencillo el trabajo con los ratones. Gracias a todo el personal de la UCIM por su amabilidad y buen trabajo en los distintos servicios.

Thank you, Prof. Kenneth Walsh, for give me the opportunity to learn in your lab during my short stay at BU. Gracias José Javier por acogerme en EEUU, por enseñarme otras formas de trabajar y por todo lo que aprendí durante la estancia.

A Proyecto Paula y, en especial, a Cristina Ponce por toda su dedicación en la lucha contra la diabetes. Gracias por toda la ayuda que he recibido para poder realizar esta tesis.

Amigas mías, a todas vosotras gracias porque vuestra amistad y todas las vivencias que hemos compartido porque han contribuido de una manera u otra a que pudiese llegar hasta este momento.

Agradecimientos

Gracias a vosotros, mi familia. A mis padres millones de gracias por todo el esfuerzo invertido para que pudiese estudiar y formarme en lo que quería. Gracias por todos los valores y todo el amor que he recibido. A mi hermano, Mario, gracias por ser mi confidente, por estar siempre a mi lado y por preocuparte tanto por mi (aunque yo sea la mayor).

José Ángel, nuestra vida juntos empezó casi a la vez que esta tesis. Gracias por caminar conmigo en la etapa del doctorado, por saber cómo hacer que me olvide de vez en cuando del trabajo, por venirte conmigo a la otra punta del mundo y por hacer que estos años de doctorado sean inolvidables.

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

4-AAP	4-aminoantipirina
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
ABCG	<i>ATP-binding cassette transporter G</i>
ACC	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>
ACOX	<i>Acyl-CoA oxidase</i>
ACS	<i>Acyl-CoA synthetase</i>
ADP	<i>Adenosin diphosphate</i>
Akt	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog kinase</i>
ALIOS	<i>American lifestyle induced obesity syndrome</i>
ALT	<i>Alanine aminotransferase</i>
AMLN	<i>Amylin liver NASH model</i>
AMP	<i>Adenosine monophosphate</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
Apo	<i>Apolipoproteína</i>
AS160	<i>AKT substrate of 160kDa</i>
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
AST	<i>Aspartate aminotransferase</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>

Acrónimos y abreviaturas

AUC	<i>Area under the curve</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BTLA	<i>B and T lymphocyte attenuator</i>
c-apoB	Colesterol apoB
CHC	Carcinoma hepatocelular
c-HDL	Colesterol HDL
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
ChREBP	<i>Carbohydrate regulatory element binding protein</i>
CCL5/RANTES	<i>C-C chemokine ligand 5/regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
CPT	<i>Carnitine palmitoyltransferase</i>
CRD	<i>Cysteine-rich domain</i>
CRP	<i>C-reactive protein</i>
c-Total	Colesterol total
CX3CR1	<i>CX3C chemokine receptor 1</i>
CYP7A1	<i>Cytochrome P450 family 7 subfamily a member 1</i>
DAB	Diaminobencidina
DAGAC	Dieta alta en grasa y alta en colesterol
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DC	Dieta control
DDC	Dieta deficiente en colina

DDCM	Dieta deficiente en colina y metionina
DDM	Dieta deficiente en metionina
DIAMOND	<i>Diet induced animal model of NAFLD</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
EDTA	<i>Ethilenediaminetetraacetic acid</i>
EHGNA	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
EHNA	Esteohepatitis no alcohólica
eIF2	<i>Eukaryotic initiaton factor 2</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESPA	<i>N-ethyl-N-(3-sulfopropil) m-anisidina</i>
FABP	<i>Fatty acid binding protein</i>
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FAT	<i>Fatty acid translocase</i>
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FOXO	<i>Forkhead box-containing protein O subfamily</i>
FVE	Fracción vascular estromal
G-1-P	<i>Glycerol-1-phosphate</i>
GK	<i>Glycerol kinase</i>

Acrónimos y abreviaturas

GLUT	<i>Glucose transporter</i>
GPO	<i>Glycerol phosphate oxidase</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HveA	<i>Herpes virus entry mediator A</i>
HVEM	<i>Herpesvirus entry mediator</i>
IDL	<i>Intermediate density lipoprotein</i>
IFNγ	<i>Interferón γ</i>
Ig	<i>Inmunoglobulina</i>
IκB	<i>Inhibitor of κB</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL	<i>Interleuquina</i>
IRE1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
KLF	<i>Krüppel-like factor</i>
LC3	<i>Light chain 3</i>
LCAT	<i>Lecitin cholesterol acyl transferase</i>
LCM	<i>L929-cell conditioned medium</i>

LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDLr	<i>LDL receptor</i>
LDN	Lipogénesis d e n ovo
LIGHT	<i>Lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes</i>
LIGHTR	<i>LIGHT receptor</i>
LPS	Lipopolisacárido
LRP	<i>LDLr-related protein</i>
LT	Linfotoxina
LTβR	<i>Lymphotoxin β receptor</i>
LXR	<i>Liver X receptor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MCP1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulation factor</i>
MDMO	Macrófagos d erivados de m édula ó sea
MEC	Matriz e xtracelular
MEHA	<i>3-metil-N-etil-N-(hidroxietil)-anilina</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NAS	<i>NAFLD activity score</i>
NEFA	<i>Non-esterified fatty acids</i>

NF-κB	<i>Nuclear factor-kappaB</i>
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
NKT	<i>Natural killer T lymphocytes</i>
OMS	O rganización m undial de la s alud
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDK1	<i>Phosphatidylinositol dependent kinase 1</i>
PERK	<i>PKR-like ER kinase</i>
PFA	P araformaldehído
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PIP₂	<i>Phosphatidylinositol 3,4-diphosphate</i>
PIP₃	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i>
PTB	<i>Protein tyrosine-binding</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PNPLA3	<i>Patatin-like phospholipase domain containing 3</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPi	<i>Pirophosphate</i>
P/S/A	<i>Penicillin/streptomycin/amphotericin B</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RE	R etículo e ndoplasmático
RI	R esistencia a i nsulina

R-INS	Receptor de la insulina
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SH	<i>Src homology</i>
SMet	Síndrome metabólico
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
Sos	<i>Son of sevenless</i>
SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>
SRB1	<i>Scavenger receptor class B type 1</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory element binding protein</i>
TA	Temperatura ambiente
TAK1	<i>TGFβ-activated kinase 1</i>
TG	Triacilgliceroles
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
Th	<i>T helper</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TM6SF2	<i>Transmembrane 6 superfamily member 2</i>
TMB	<i>3,3', 5,5' tetramethylbenzidine</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor α</i>

Acrónimos y abreviaturas

TNFRSF	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily</i>
TNFSF14	<i>Tumor necrosis factor superfamily 14</i>
TR2	<i>TNF receptor-like molecule 2</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
Treg	T reguladores
TTG	Test de tolerancia a la g lucosa
TTI	Test de tolerancia a la insulina
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
WT	<i>Wild type</i>
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
ABSTRACT.....	1
RESUMEN.....	3
RESUM.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
1. El metabolismo de los carbohidratos.....	9
1.1. Control hormonal del metabolismo de los carbohidratos: la insulina y su señalización	10
1.1.1. Vía de PI3K/AKT	12
1.1.2. Vía de MAPK/ERK	13
2. Alteración del metabolismo de los carbohidratos: la diabetes mellitus tipo 2.....	14
2.1. Características de la DMT2.....	15
3. El metabolismo lipídico.....	16
3.1. Metabolismo de los ácidos grasos	16
3.2. Lipogénesis de novo (LDN) y el transporte de lípidos a tejidos periféricos	18
3.3. Regulación del metabolismo lipídico	19
4. Alteración del metabolismo lipídico: la enfermedad del hígado graso no alcohólico.....	21
4.1. Modelos de ratón de EHGNA inducida por dieta	22
4.1.1. Dietas deficientes en nutrientes	23
4.1.2. Dietas con grasa, colesterol e hidratos de carbono.....	23
4.2. La DMT2 y la RI como factor de riesgo para la EHGNA.....	24
4.3. Mecanismos moleculares que promueven la EHGNA: el estrés del RE y la alteración del proceso de autofagia	26

4.3.1.	El estrés del RE.....	26
4.3.2.	La alteración del proceso de autofagia	27
5.	La inflamación en las enfermedades metabólicas: DMT2 y EHGNA	28
5.1.	La inflamación del tejido adiposo	30
5.2.	La inflamación del hígado	33
6.	La citoquina LIGHT(TNFSF14).....	37
6.1.	Vías de señalización de LIGHT	38
6.1.1.	El eje LIGHT/LT β R.....	38
6.1.2.	El eje LIGHT/HVEM	39
6.1.3.	LIGHT y DcR3.....	41
6.2.	Implicación del eje LIGHT/LT β R-HVEM en la inflamación, la DMT2 y la EHGNA.....	42
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		45
MATERIALES Y MÉTODOS		49
1.	Estudios in vivo en ratones.....	51
1.1.	Ratones, genotipado y dietas.....	51
1.2.	Medidas metabólicas.....	52
1.2.1.	Determinación del peso corporal, peso del hígado y distribución de la grasa corporal.....	52
1.2.2.	Determinación de lípidos circulantes en plasma y del contenido de ácidos grasos libres	52
1.2.3.	Determinación de la actividad de las enzimas hepáticas ALT y AST	53
1.2.4.	Estudios de tolerancia a la glucosa y determinación de los niveles de glucosa e insulina	54
1.2.5.	Determinación de la resistencia a la insulina mediante la evaluación de la sensibilidad a la insulina.....	55
2.	Obtención y procesamiento de tejidos	56
3.	Caracterización histopatológica del hígado.....	56
3.1.	Determinación de la EHGNA en cortes histológicos de hígado...	57

3.2.	Determinación de la fibrosis hepática	59
3.3.	Determinación del contenido de triacilgliceroles hepáticos.....	59
3.4.	Determinación del contenido de macrófagos hepáticos	60
3.5.	Determinación del contenido de linfocitos T hepáticos	60
3.6.	Determinación de la autofagia en hígado mediante el marcador p62/SQSTM1	61
3.7.	Expresión de los receptores LT β R y HVEM y de la citoquina LIGHT en hígado	61
4.	Caracterización del tejido adiposo.....	63
4.1.	Cuantificación del tamaño de los adipocitos	63
4.2.	Expresión de los receptores LT β R y HVEM en macrófagos del tejido adiposo.....	64
4.3.	Análisis de la fracción vascular estromal del tejido adiposo mediante citometría de flujo.....	64
5.	Caracterización de la inflamación sistémica en ratón	65
5.1.	Análisis de las citoquinas circulantes en plasma	65
5.2.	Caracterización de las células circulantes mediante citometría de flujo	65
6.	Estudios in vitro y ex vivo	68
6.1.	Obtención de cultivos primarios de macrófagos de ratón	68
6.2.	Cultivo de explantes de tejido adiposo y caracterización de la secreción de citoquinas	68
7.	Estudios de expresión de proteínas mediante Western blot	69
7.1.	Obtención y cuantificación de extractos proteicos	69
7.2.	Análisis de la expresión proteica mediante SDS-PAGE y Western blot	69
8.	Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	71
8.1.	Obtención y cuantificación de extractos de ARN	71
8.2.	Retrotranscripción del ARN y análisis de la expresión génica mediante qPCR	72
9.	Análisis estadísticos	75

RESULTADOS	77
1. Estudio de la deficiencia de la citoquina LIGHT en ratones WT alimentados con dieta control	79
1.1. La deficiencia de <i>Light</i> no altera el metabolismo de carbohidratos en ratones WT alimentados con dieta control durante 16 semanas ...	79
1.2. Los ratones WT deficientes en <i>Light</i> y alimentados con dieta control no presentan cambios en la EHGNA.....	82
1.3. La inactivación de <i>Light</i> en ratones WT alimentados con dieta control no altera la inflamación del tejido adiposo.....	85
1.4. La inactivación de <i>Light</i> ^{-/-} en ratones alimentados con dieta control no produce cambios en la inflamación sistémica	87
2. Estudio de la deficiencia de la citoquina LIGHT en ratones WT alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol durante 16 semanas	91
2.1. Estudio de la expresión del eje LIGHT/LTβR-HVEM en ratones WT alimentados con dieta control o dieta alta en grasa y alta en colesterol.....	91
2.2. Estudio del impacto de la dieta alta en grasa y alta en colesterol en ratones WT en la EHGNA y la inflamación hepática	94
2.3. Estudio de la deficiencia de <i>Light</i> en ratones WT alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol durante 16 semanas	97
2.3.1. La deficiencia de <i>Light</i> mejora el metabolismo de los carbohidratos en ratones alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol durante 16 semanas.....	97
2.3.2. La inactivación de <i>Light</i> en ratones alimentados durante 16 semanas con dieta alta en grasa y alta en colesterol disminuye el desarrollo de la EHGNA	100
2.3.3. La inactivación de <i>Light</i> en ratones WT alimentados durante 16 semanas con dieta alta en grasa y alta en colesterol disminuye la inflamación del tejido adiposo.....	106
2.3.4. La inactivación de <i>Light</i> ^{-/-} reduce la inflamación sistémica en ratones alimentados durante 16 semanas con dieta alta en grasa y alta en colesterol.....	109
2.3.5. La inactivación de <i>Light</i> altera la expresión de genes hepáticos.....	113

2.3.5.1. Los ratones <i>Light</i> ^{-/-} presentan una desregulación de genes implicados en el metabolismo lipídico	113
2.3.5.2. La deficiencia de <i>Light</i> disminuye la expresión de genes asociados a la transición EHGNA-EHNA.....	116
3. Estudio de la deficiencia de la citoquina LIGHT en ratones parcialmente deficientes en <i>Irs2</i> y alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol durante 16 semanas.....	119
3.1. La deficiencia de <i>Light</i> mejora el metabolismo glucémico y disminuye la esteatosis hepática en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-}	119
3.2. La inactivación de <i>Light</i> ^{-/-} en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} reduce la inflamación sistémica.....	122
3.3. La deficiencia de <i>Light</i> en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} disminuye la esteatosis hepática	125
3.4. Caracterización del tejido adiposo en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} e <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>Light</i> ^{-/-}	127
3.4.1. Análisis de la inflamación en el tejido adiposo de ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} e <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>Light</i> ^{-/-}	127
3.4.2. Determinación del tamaño del adipocito en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} e <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>Light</i> ^{-/-}	130
3.4.3. Expresión del receptor HVEM y del receptor de la LTβ en el tejido adiposo.....	131
3.5. Estudio de la expresión génica en hígado en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} e <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>Light</i> ^{-/-}	133
3.5.1. La deficiencia de <i>Light</i> en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} altera la expresión de genes metabólicos en hígado.....	133
3.5.2. La deficiencia en <i>Light</i> en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} altera la expresión de genes asociados a la transición esteatosis hepática-EHNA	134
DISCUSIÓN.....	137
CONCLUSIONS	143
REFERENCIAS	147
ANEXO	163

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del R-INS y vías de señalización de la insulina.	14
Figura 2. Transición de hígado sano-esteatosis simple-EHNA	21
Figura 3. Procesos implicados en el desarrollo de la EHNA	26
Figura 4. Activación de las células estrelladas tras daño hepático.	34
Figura 5. Vías de señalización de LIGHT.....	42
Figura 6. Peso corporal, peso del hígado, grasa corporal y niveles basales de glucosa e insulina en estado de ayuno de ratones WT y ratones <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DC	80
Figura 7. Caracterización metabólica de ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DC.....	81
Figura 8. Niveles lipídicos en plasma de ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DC.....	82
Figura 9. Caracterización de la EHNA en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DC durante 16 semanas	83
Figura 10. Contenido hepático de células inmunes y fibrosis en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DC durante 16 semanas	84
Figura 11. Actividad de las enzimas plasmáticas ALT y AST en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DC.	85
Figura 12. Expresión de marcadores de células estrelladas hepáticas y de fibrosis en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-}	86
Figura 13. Análisis de los macrófagos de la FVE del tejido adiposo en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DC.....	87
Figura 14. Poblaciones leucocitarias y subtipos de monocitos en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DC.....	88
Figura 15. Análisis de los linfocitos en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DC.....	89
Figura 16. Análisis de la expresión de LIGHT/LTβR-HVEM en hígado y en tejido adiposo de ratones WT alimentados con DC o con DAGAC durante 16 semanas.	92

Figura 17. Expresión de LIGHT/LT β R-HVEM en hígado de ratones WT alimentados con DC o con DAGAC.....	93
Figura 18. Peso corporal, grasa corporal y su distribución en ratones WT alimentados con DC o DAGAC.....	94
Figura 19. Caracterización del hígado en ratones WT alimentados con DC o DAGAC.	95
Figura 20. Expresión de marcadores de células inmunes en hígado de ratones WT alimentados con DC o DAGAC.....	96
Figura 21. Peso corporal, peso del hígado, grasa corporal y niveles basales de glucosa e insulina en ratones WT y ratones <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC.	98
Figura 22. Caracterización metabólica de ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DAGAC.....	99
Figura 23. Niveles lipídicos en plasma de ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DAGAC.....	100
Figura 24. Caracterización de la EHGNA en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas.....	101
Figura 25. Contenido hepático de células inmunes y fibrosis en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas.....	102
Figura 26. Actividad de las enzimas plasmáticas ALT y AST en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-}	103
Figura 27. Expresión hepática de marcadores de células inmunes en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-}	104
Figura 28. Expresión de marcadores de células estrelladas hepáticas y de fibrosis en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-}	105
Figura 29. Análisis de la autofagia en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas.	106
Figura 30. Caracterización del tejido adiposo en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas.....	107
Figura 31. Expresión de marcadores de subtipos de linfocitos Th y Treg en el tejido adiposo de ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC.	108
Figura 32. Secreción de citoquinas de MDMO de ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-}	109

Figura 33. Poblaciones leucocitarias y subtipos de monocitos en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DAGAC.	110
Figura 34. Análisis de los linfocitos en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas.	111
Figura 35. Análisis de las citoquinas circulantes en plasma de ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas.....	112
Figura 36. Expresión de marcadores de diferenciación de linfocitos T en timo y bazo en ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC.....	113
Figura 37. Expresión de <i>Lxr</i> , <i>Abcg5</i> , <i>Abcg8</i> , <i>Cyp7a1</i> , <i>Fxr</i> y <i>Abca1</i> en hígado de ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-}	114
Figura 38. Expresión de <i>Srebf1c</i> , <i>Chrebp</i> , <i>Ldlr</i> , <i>Hl</i> , <i>Ppara</i> y <i>Pparg</i> en hígado de ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-}	115
Figura 39. Expresión de genes relacionados con la gluconeogénesis, lipogénesis y β -oxidación en hígado de ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas.	116
Figura 40. Expresión de <i>Klf2</i> , <i>Klf4</i> , <i>Klf6</i> , <i>Klf10</i> y <i>Tlr4</i> en hígado de ratones WT y <i>Light</i> ^{-/-}	117
Figura 41. Peso corporal, grasa corporal y niveles basales de glucosa e insulina en estado de ayuno en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} y ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC.....	120
Figura 42. Caracterización metabólica de ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} e <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>Light</i> ^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DAGAC.....	121
Figura 43. Niveles de lípidos en plasma de ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} e <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas.....	122
Figura 44. Poblaciones leucocitarias y subtipos de monocitos en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} y ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>Light</i> ^{-/-}	123
Figura 45. Análisis de los linfocitos circulantes en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} e <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>Light</i> ^{-/-}	124
Figura 46. Análisis de las citoquinas plasmáticas en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} e <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC 16 semanas.....	125
Figura 47. Caracterización del hígado en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} e <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>Light</i> ^{-/-}	126
Figura 48. Análisis de la autofagia en ratones <i>Irs2</i> ^{+/-} e <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>Light</i> ^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas.....	127

Figura 49. Caracterización de la inflamación del tejido adiposo en ratones <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-Light-/-</i>	128
Figura 50. Análisis de los linfocitos en la FVE del tejido adiposo de ratones <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-Light-/-</i>	129
Figura 51. Secreción de citoquinas de MDMO de ratones <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-Light-/-</i>	130
Figura 52. Tamaño de los adipocitos en ratones <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-Light-/-</i>	130
Figura 53. Análisis del receptor HVEM y LT β R del tejido adiposo en ratones <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-Light-/-</i>	132
Figura 54. Expresión de <i>Lxr</i> , <i>Abcg5</i> , <i>Abcg8</i> , <i>Cyp7a1</i> , <i>Fxr</i> y <i>Abca1</i> en hígado de ratones <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-Light-/-</i>	133
Figura 55. Expresión de <i>Srebf1c</i> , <i>Chrebp</i> , <i>Ldlr</i> , <i>Hl</i> , <i>Ppara</i> y <i>Pparg</i> en hígado de ratones <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-Light-/-</i>	134
Figura 56. Expresión de <i>Klf2</i> , <i>Klf4</i> , <i>Klf6</i> , <i>Klf10</i> y <i>Tlr4</i> en hígado de ratones <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-Light-/-</i>	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de la PCR de <i>Irs2</i> y Light.....	51
Tabla 2. Cebadores utilizados en la PCR para el genotipado.....	52
Tabla 3. Protocolo de desparafinación e hidratación de cortes histológicos en parafina.....	57
Tabla 4. Reactivos para la tinción histológica de hematoxilina/eosina....	58
Tabla 5. Puntuaciones para la evaluación del NAS	58
Tabla 6. Anticuerpos primarios empleados en las inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias	62
Tabla 7. Anticuerpos secundarios y reactivos empleados en las inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias	63
Tabla 8. Anticuerpos y reactivos utilizados en citometría de flujo	67
Tabla 9. Anticuerpos primarios utilizados en el Western blot.....	71
Tabla 10. Anticuerpos secundarios y reactivo utilizados en el Western blot	71
Tabla 11. Cebadores empleados en los estudios de expresión génica ..	75

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is frequently associated with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and adipose tissue dysfunction. Progression of NAFLD is mediated, among others, by activation of inflammatory pathways. In the present study, the role of the proinflammatory cytokine LIGHT(TNFSF14) was explored in NAFLD and T2DM in mice.

To this end, the expression of LIGHT and its receptors, herpes virus entry mediator (HVEM) and lymphotoxin β receptor (LT β R), was investigated in wild-type (WT) mice on a regular chow diet (RCD) and on a high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) for 16 weeks to induce fatty liver. The role of LIGHT in NAFLD was as well investigated by loss-of-function approaches using *Light*-deficient (*Light*^{-/-}) mice and WT controls which were fed either a RCD or HFHCD for 16 weeks. In addition, *Light* deficiency was also evaluated in mice partial deficient in *Irs2*, a major insulin effector which lack of function induces insulin resistance. Thus, *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} and control *Irs2*^{+/-} mice were fed a HFHCD for 16 weeks. To characterize mice, glucose tolerance, insulin sensitivity, non-alcoholic fatty liver (NAFL), systemic and tissue inflammation and metabolic gene expression were explored.

HVEM and LT β R expression, hepatic triacylglycerols (TG) and CD3+ T lymphocytes content, fibrosis and inflammatory markers were markedly increased in HFHCD-fed WT mice compared with RCD-fed WT. Consistent with the above findings, *Light* deficiency did not affect metabolism, NAFL and tissue and systemic inflammation in RCD-fed WT mice. However, under HFHCD, *Light* deficiency in WT mice and in *Irs2*^{+/-} mice improved glucose tolerance. Moreover, *Light*^{-/-} mice displayed improved insulin sensitivity. Fatty liver and hepatic F4/80+ macrophage content were decreased in both HFHCD-fed *Light*^{-/-} and *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} mice compared with their respective HFHCD-fed controls. A decrease in hepatic CD3+ T lymphocytes content and in expression levels of *Zbtb16*, the transcription factor essential for natural killer T (NKT) cell function, in HFHCD-fed *Light*^{-/-} mice compared to its controls was also observed. Consistent with a potential role of adipose tissue in hepatic homeostasis, *Light*^{-/-} and *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} mice exhibited augmented anti-inflammatory F4/80+CD206+

adipose tissue macrophages, reduced proinflammatory F4/80+CD11c+ adipose tissue macrophages and diminished secretion of cytokines. Systemic inflammation showed augmented anti-inflammatory monocytes and a decrease in proinflammatory lymphocytes in *Light*^{-/-} and *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} mice compared to their controls. Analysis of hepatic gene expression in *Light*^{-/-} and *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} mouse livers showed an alteration in metabolic gene expression pattern consistent with improved hepatic homeostasis and a reduction in the expression of genes involved in NAFL-to-non-alcoholic steatohepatitis (NASH) transition, hepatic stellate cells activation and hepatocellular carcinoma (HCC).

These results indicate that *Light* deficiency improves carbohydrate metabolism and reduces NAFL and inflammation induced by HFHCD. These results suggest that therapies to block LIGHT-dependent signalling might be useful to restore hepatic homeostasis, to restrain NAFLD and to alleviate inflammation in HFHCD conditions.

RESUMEN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es una complicación metabólica que se asocia frecuentemente a la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y a la disfunción del tejido adiposo. La progresión de la EHGNA está mediada, entre otras, por la activación de vías inflamatorias. En este estudio, se exploró el papel de la citoquina proinflamatoria LIGHT(TNFSF14) en el desarrollo de la EHGNA y la DMT2 en ratones.

Con este fin, se evaluó la expresión de LIGHT y de sus receptores, el mediador de entrada del virus herpes (HVEM, del inglés *herpes virus entry mediator*) y el receptor de la linfotoxina β (LT β R), en ratones silvestres (WT) tratados con dieta control (DC) y con dieta alta en grasa y alta en colesterol (DAGAC), que induce hígado graso, durante 16 semanas. Por otro lado, se investigó el papel de LIGHT mediante la pérdida de función en ratones deficientes en *Light* (*Light*^{-/-}) y en sus controles WT alimentados con DC o DAGAC durante 16 semanas. Además, se analizó la inactivación génica de *Light* en ratones parcialmente deficientes en *Irs2* (*Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}), que es un mediador clave en la señalización de la insulina, y sus controles (*Irs2*^{+/-}) alimentados con DAGAC durante 16 semanas. Para la caracterización de los ratones tratados con las diferentes dietas y condiciones se analizó la tolerancia a la glucosa, la sensibilidad a insulina, los parámetros determinantes de hígado graso, la inflamación tisular y sistémica y la expresión de genes metabólicos.

Los ratones WT alimentados con DAGAC mostraron un incremento en los niveles proteicos de los receptores LT β R y HVEM, junto con un aumento del contenido hepático de triacilglicerolos (TG), de linfocitos T CD3⁺, de la fibrosis y de marcadores inflamatorios comparado con ratones WT alimentados con DC. Los resultados del análisis de los ratones alimentados con DC mostraron que la deficiencia genética de *Light* no altera el metabolismo, el hígado graso o la inflamación. Sin embargo, en condiciones de DAGAC, la inactivación de *Light*, ratones *Light*^{-/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}, mejoró la tolerancia a la glucosa. Además, los ratones *Light*^{-/-} mostraron un aumento de la sensibilidad a insulina. En el análisis hepático se observó una disminución del hígado graso y del contenido de

macrófagos F4/80+ en los ratones *Light*^{-/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}. Además, los ratones *Light*^{-/-} mostraron también una reducción de linfocitos T CD3+ hepáticos y de la expresión del factor transcripcional *Zbtb16*, determinante en los linfocitos NKT. Consistente con el papel potencial del tejido adiposo en la homeostasis hepática, los ratones *Light*^{-/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} alimentados con DAGAC exhibieron un aumento de macrófagos antiinflamatorios F4/80+CD206+ y una reducción de macrófagos proinflamatorios F4/80+CD11c+ y de la secreción de las citoquinas proinflamatorias en el tejido adiposo. De manera similar, en el análisis de la inflamación sistémica se observó un aumento de los monocitos antiinflamatorios, una reducción de linfocitos proinflamatorios, y una disminución de los niveles de citoquinas proinflamatorias en los ratones *Light*^{-/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} comparado con los ratones WT e *Irs2*^{+/-}. El estudio de la expresión de genes hepáticos en los ratones *Light*^{-/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} mostró un patrón de expresión consistente con una mejora en la homeostasis hepática y una reducción en la expresión de genes previamente implicados en la transición esteatosis simple-esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), en la activación de células estrelladas y en el carcinoma hepatocelular (CHC).

Estos resultados indican que la deficiencia de *Light* mejora el metabolismo de carbohidratos, el hígado graso y la inflamación inducidos por una DAGAC. Por lo tanto, la señalización dependiente de LIGHT puede ser una diana terapéutica para restablecer la homeostasis hepática, moderar la EHNA y aliviar la inflamación en condiciones de DAGAC.

RESUM

La malaltia del fetge gras no alcohòlic (MFGNA) és una complicació metabòlica que s'associa freqüentment a la diabetis mellitus tipus 2 (DMT2) i a la disfunció del teixit adipós. La progressió de l'EFGNA es regeix, entre d'altres, per l'activació de vies inflamatòries. En aquest estudi, es va explorar el paper de la citocina pro inflamatòria LIGHT (TNFSF14) en el desenvolupament de la MFGNA i la DMT2 en ratolins.

Amb aquesta finalitat, es va avaluar l'expressió de LIGHT i dels seus receptors, el mediador d'entrada de l'herpes virus (HVEM, del anglès *herpes virus entry mediator*) i el receptor de la limfotoxina β (LT β R), en ratolins silvestres (WT) tractats amb dieta control (DC) i amb dieta alta en greixos i colesterol (DAGAC), que indueix fetge gras, al llarg de 16 setmanes. D'altra banda, es va investigar el paper de LIGHT mitjançant la pèrdua de funció en ratolins deficients en *Light* (*Light*^{-/-}) i els seus controls WT alimentats amb DC o DAGAC al llarg de 16 setmanes. A més a més, es va analitzar la inactivació gènica de *Light* en ratolins parcialment deficients en *Irs2* (*Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}), que és un mediador clau en la senyalització de la insulina, i els seus controls (*Irs2*^{+/-}) alimentats amb DAGAC 16 setmanes. Per caracteritzar els ratolins tractats amb les diferents dietes i condicions es va analitzar la tolerància a la glucosa, la sensibilitat a la insulina, els paràmetres determinats del fetge gras, la inflamació tissular i sistèmica, i l'expressió de gens metabòlics.

Els ratolins WT alimentats amb DAGAC van mostrar un increment als nivells proteics dels receptors LT β R i HVEM, junt amb un augment del contingut hepàtic de triacilglicerids (TG), de limfòcits T CD3⁺, de la fibrosi i de marcadors inflamatoris comparats amb ratolins WT alimentats amb DC. Els resultats de l'anàlisi dels ratolins alimentats amb DC van mostrar que la deficiència genètica de *Light* no altera el metabolisme, el fetge gras o la inflamació. Tanmateix, en condicions de DAGAC, la inactivació de *Light*, ratolins *Light*^{-/-} i *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}, millorà la tolerància a la glucosa. A més a més, els ratolins *Light*^{-/-} mostraren un augment de la sensibilitat a insulina. A l'anàlisi hepàtic es va observar una disminució del fetge gras i del contingut de macròfags F4/80⁺ en ratolins *Light*^{-/-} i *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}, i els ratolins *Light*^{-/-} van mostrar també una reducció de limfòcits T CD3⁺ hepàtics i de l'expressió del factor transcripcional *Zbtb16*, determinant als

limfòcits NKT. Consistent amb el paper potencial del teixit adipós en l'homeòstasi hepàtica, els ratolins *Light*^{-/-} i *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} alimentats amb DAGAC exhibiren un augment de macròfags antiinflamatoris F4/80⁺CD206⁺ i una reducció de macròfags pro inflamatoris F4/80⁺CD11c⁺ i de la secreció de les citocines pro inflamatòries al teixit adipós. De manera semblant, l'anàlisi de la inflamació sistèmica va mostrar un augment dels monòcits antiinflamatoris, una reducció dels limfòcits pro inflamatoris, i una disminució dels nivells de citocines pro inflamatòries en ratolins *Light*^{-/-} i *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} en comparació amb els ratolins WT i *Irs2*^{+/-}. L'estudi de l'expressió de gens hepàtics amb els ratolins *Light*^{-/-} i *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} va mostrar un patró d'expressió consistent amb una millora en l'homeòstasi hepàtica i una reducció en l'expressió de gens prèviament implicats en la transició esteatosi simple-esteatohepatitis no alcohòlica (EHNA), en l'activació de cèl·lules estrellades i en carcinoma hepatocel·lular (CHC).

Aquests resultats indiquen que la deficiència de *Light* millora el metabolisme de carbohidrats, el fetge gras i la inflamació induïts per la DAGAC. Per tant, la senyalització depenent de LIGHT pot ser una diana terapèutica per restablir l'homeòstasi hepàtica, moderar la MFGNA i mitigar la inflamació en condicions de DAGAC.

INTRODUCCIÓN

1. El metabolismo de los carbohidratos

Los carbohidratos son componentes esenciales de la dieta para la obtención de energía y sirven como fuente de vitaminas, minerales y otros micronutrientes. La ingesta diaria de carbohidratos en humanos oscila entre el 50 y el 60% de las calorías totales. Los carbohidratos de la dieta se encuentran en forma de monosacáridos (glucosa, fructosa y galactosa), disacáridos (maltosa, sacarosa y lactosa) y polisacáridos (almidón), siendo los principales la sacarosa y el almidón [1]. Durante el metabolismo, los carbohidratos se descomponen en monosacáridos que finalmente son utilizados como fuente de energía en la glucólisis o almacenados en forma de glucógeno en hígado y en músculo. El exceso de glucosa se almacena en forma de triacilgliceroles (TG) en el tejido adiposo que se utiliza como fuente de energía alternativa en ausencia de carbohidratos y mantiene la temperatura corporal [2].

La glucosa entra en la célula mediante las proteínas transportadoras GLUT (del inglés *glucose transporter*). Existen distintas isoformas de los transportadores GLUT con diferentes afinidades por la glucosa. El músculo esquelético y los adipocitos expresan GLUT4, mientras que GLUT2 se expresa en hígado y en células β pancreáticas de ratón. De hecho, ratones deficientes para *Glut2* mueren a las tres semanas de vida debido a una hiperglucemia acompañada por una elevación de ácidos grasos circulantes [3]. A su paso por la membrana la hexoquinasa convierte la glucosa en glucosa-6-fosfato lo que impide su salida de la célula [1] y se inicia la glucólisis, una vía metabólica que ocurre en el citosol y degrada la glucosa a piruvato [2].

El piruvato producido puede abandonar la célula e ir a otros tejidos como el músculo o puede ser descarboxilado a acetil-CoA mediante la piruvato deshidrogenasa [1]. El acetil-CoA entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs para su oxidación o se convierte en citrato para la biosíntesis de ácidos grasos [2]. El ciclo de Krebs ocurre en la matriz mitocondrial y en condiciones aeróbicas continua con la fosforilación oxidativa en la membrana interna mitocondrial. Mediante el ciclo de Krebs el citrato, formado a partir de acetil-CoA, se convierte en oxalacetato liberando CO_2 . El flujo de electrones generado durante el ciclo va a la cadena respiratoria mitocondrial a través de los coenzimas reducidos NADH (del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide*) y FADH_2

(del inglés *flavin adenine dinucleotide*) para producir moléculas de ATP (del inglés *adenosine triphosphate*) mediante la fosforilación oxidativa [2].

En ausencia de glucosa el glucógeno se degrada mediante la glucogenólisis produciéndose glucosa-1-fosfato mediante la glucógeno fosforilasa. A continuación, la fosfoglucomutasa convierte la glucosa-1-fosfato en glucosa-6-fosfato permitiendo su entrada en la vía de la glucólisis [2]. Además, la glucosa puede ser sintetizada a partir de fuentes no glucosídicas mediante el proceso de la gluconeogénesis a partir de piruvato, lactato, glicerol y del esqueleto de carbono de algunos aminoácidos. La gluconeogénesis ocurre mayoritariamente en el hígado, aunque también se puede producir en el riñón. La gluconeogénesis conlleva las mismas reacciones enzimáticas que la glucólisis, pero al revés, a excepción de las reacciones irreversibles [1].

Numerosas hormonas intervienen en la regulación del metabolismo de los carbohidratos para mantener la homeostasis de glucosa en sangre. Algunas de estas hormonas son la insulina, el glucagón o la adrenalina [1].

1.1. Control hormonal del metabolismo de los carbohidratos: la insulina y su señalización

La insulina se sintetiza en las células β pancreáticas y se secreta en respuesta a la ingesta de alimentos. La insulina mantiene la homeostasis de la glucosa reduciendo sus niveles sanguíneos, suprimiendo su producción hepática y promoviendo su captación en tejidos periféricos como el músculo y el tejido adiposo. Además, promueve la síntesis de proteínas y glucógeno en el músculo y en el hígado, la síntesis de lípidos y su almacenamiento en el tejido adiposo e inhibe la oxidación de los ácidos grasos, la glucogenólisis y la gluconeogénesis [4].

La insulina media sus efectos a través del receptor de la insulina (R-INS), una proteína tetramérica que pertenece a la subfamilia de los receptores tirosinquinasa. El tetrámero consiste en dos dímeros $\alpha\beta$ unidos por puentes disulfuro y cuyas subunidades α y β se unen, a su vez, por puentes disulfuro. La insulina se une a las subunidades α induciendo la activación y fosforilación en residuos de tirosina de las subunidades β . A estos residuos fosforilados se unen las proteínas IRS (del inglés *insulin receptor substrate*) que contienen un dominio PH (del inglés *pleckstrin*

homology) y un dominio PTB (del inglés *phosphotyrosine binding*) situado en el extremo N-terminal [5].

Existen varias isoformas de las proteínas IRS. En ratones se han caracterizado cuatro isoformas IRS1, IRS2, IRS3 e IRS4, mientras que en humanos se han identificado las proteínas IRS1, IRS2 e IRS4 [6]. IRS1 se expresa en diferentes tejidos, está implicado en el crecimiento somático celular [7] y parece ser el principal mediador de la señalización de insulina en músculo esquelético y en tejido adiposo [8]. La expresión de IRS2 es casi ubicua y se mantiene en células y tejidos. IRS2 es responsable de la acción de la insulina en el hígado y del mantenimiento de las células β pancreáticas.

Si bien tanto IRS1 como IRS2 se expresan en células β pancreáticas, IRS2 es el que desempeña un importante papel en la regulación de las células β [9]. El incremento en la expresión de IRS2 promueve la replicación, la neogénesis y la supervivencia de las células β del páncreas, mientras que la disminución de su expresión conduce a la deficiencia en la secreción de insulina y a la reducción en la masa de las células β debido a un aumento en la apoptosis [9]–[11].

Numerosos estudios han demostrado las funciones específicas de las proteínas IRS o del R-INS en la señalización de la insulina y cuyas alteraciones producen características de la resistencia a insulina (RI) y DMT2 [12]. Así, los ratones deficientes para IRS2 desarrollan DMT2 y presentan RI, tanto en tejidos periféricos como en hígado, pero también una disminución de la función de las células β pancreáticas [11]. A diferencia del fenotipo diabético grave de los ratones deficientes en IRS2, la inactivación de IRS1 en ratones sólo produce una moderada RI en tejidos periféricos y defectos en la tolerancia a la glucosa, pero no provoca diabetes [13]. La moderada RI en ratones deficientes en IRS1 va acompañada de una hiperplasia compensatoria de las células β pancreáticas mediada por IRS2 [11], [14], [15]. Además, la señalización por insulina es casi normal en el hígado de ratones *Irs1*^{-/-} cuya función es reemplazada presumiblemente por IRS2. Sin embargo, el crecimiento pre y post-natal de los ratones *Irs1*^{-/-} está fuertemente reducido [7], [11]. Estos resultados en modelos murinos indican que la señalización por insulina a través de IRS2 es necesaria para la diferenciación, crecimiento y/o supervivencia de las células β . IRS1 es un mediador del crecimiento somático, mientras que ambas proteínas están implicadas en la RI periférica.

Por otro lado, los ratones deficientes para el R-INS nacen con un ligero retraso en el crecimiento y se observa un incremento progresivo en los niveles de glucosa y un aumento transitorio de los niveles de insulina. A los pocos días del nacimiento se produce el daño en las células β y la muerte por cetoacidosis diabética. Este fenotipo indica que el R-INS es necesario para la supervivencia pero no para el control metabólico y el crecimiento prenatal [8].

Por último, los ratones *Irs3*^{-/-} poseen un crecimiento y un metabolismo normal y los *Irs4*^{-/-} solo muestran mínimas alteraciones en la tolerancia a la glucosa [5].

Las dos vías principales de la señalización de la insulina son la vía PI3K/AKT y la vía de las MAPK.

1.1.1. Vía de PI3K/AKT

Las proteínas IRS unidas al R-INS son fosforiladas por este y sirven de anclaje para proteínas que contienen dominios SH2 (del inglés *src homology 2*) como la proteína PI3K (del inglés *phosphatidylinositol 3 kinase*). PI3K está formada por dos subunidades, la subunidad reguladora p85 que será fosforilada por las proteínas IRS lo que permitirá la unión de la subunidad catalítica p110. Una vez PI3K está activada fosforila al fosfatidilinositol 3,4-difosfato (PIP₂, del inglés *phosphatidylinositol 3,4-diphosphate*) de la membrana convirtiéndolo en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃, del inglés *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*). PIP₃, produce el reclutamiento y activación de PDK1 (del inglés *phosphoinositide dependent kinase 1*) y esta última activa, mediante fosforilación, a AKT (del inglés *V-akt murine thymoma viral oncogene homolog kinase*). AKT, por su parte, activa vías implicadas en el control del crecimiento y la supervivencia celular y en el metabolismo glucídico y lipídico. Los principales sustratos de AKT son mTOR (del inglés *mammalian target of rapamycin*), implicado en la regulación de la síntesis de proteínas, GSK3 (del inglés *glycogen synthase kinase 3*) que regula la síntesis de glucógeno, el factor transcripcional FOXO1 (del inglés *forkhead box-containing protein O subfamily*) que regula genes gluconeogénicos y adipogénicos y AS160 (del inglés *AKT substrate of 160kDa*) involucrado en el transporte de glucosa [16], [17] (Figura 1).

La insulina, a través de AKT, suprime la producción hepática de glucosa mediante la inhibición de las enzimas gluconeogénicas, activa las enzimas

glucolíticas y promueve la síntesis y el almacenamiento de ácidos grasos y de glucógeno [4]. La señalización mediada por AKT induce la traslocación de los transportadores de glucosa GLUT, almacenados en vesículas intracelulares, a la membrana plasmática para la captación de glucosa. La falta de señalización mediada por AKT produce alteraciones del metabolismo glucémico. Así, ratones deficientes en *Akt2* presentan RI e intolerancia a la glucosa producida por una disminución de la captación de glucosa por parte del músculo esquelético y por un incremento de la producción hepática endógena de glucosa [18].

1.1.2. Vía de MAPK/ERK

La insulina, a través de las proteínas IRS, es capaz de activar la ruta de las MAPKs (del inglés *mitogen-activated protein kinase*) promoviendo el crecimiento y la diferenciación celular. Tras su activación por fosforilación, las proteínas IRS reclutan al adaptador Grb2 (del inglés *growth factor receptor bound protein 2*) que a su vez recluta a Sos (del inglés *son of sevenless*), formando el complejo Grb2-Sos que activa a Ras mediante el intercambio GTP-GDP. La proteína Ras activada fosforila y, consecuentemente, activa secuencialmente a MAPKK (del inglés *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*)/Raf, MAPKK/MEK y ERK1/2 (del inglés *extracelular signal regulated kinase*) (Figura 1). Las proteínas ERK1/2 pueden fosforilar proteínas citoplasmáticas o viajar al núcleo para fosforilar y activar factores transcripcionales de genes implicados en el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular [5].

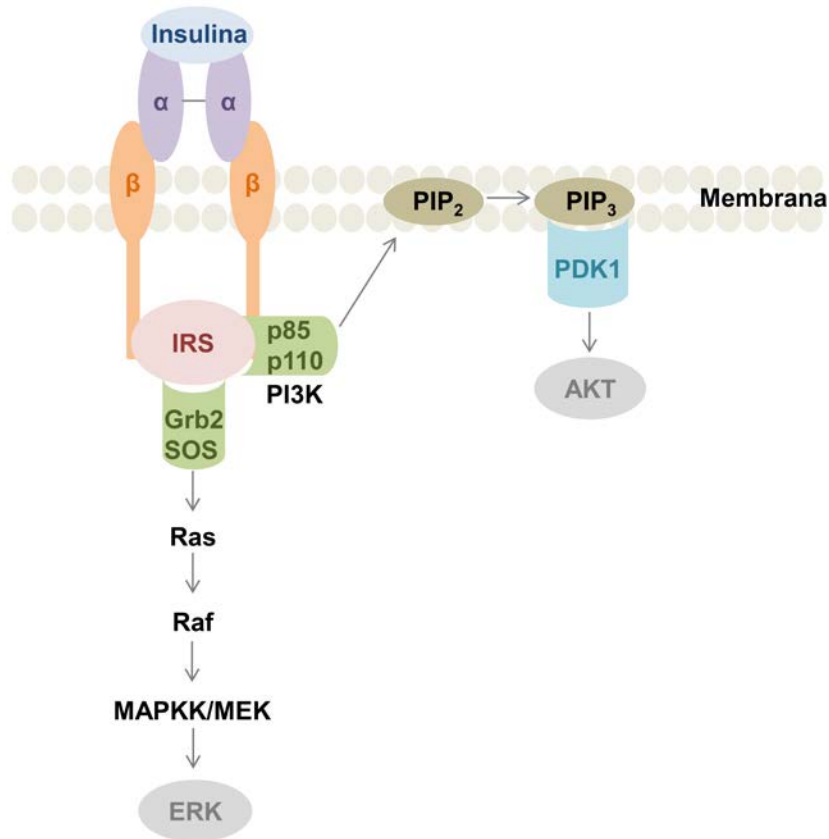


Figura 1. Estructura del R-INS y vías de señalización de la insulina. El R-INS se compone de dos subunidades α y de dos subunidades β unidas mediante puentes disulfuro. Tras la unión de la insulina, el R-INS se activa mediante fosforilación y transduce la señal mediante fosforilación a los efectores intracelulares IRS. A las proteínas IRS se unen diferentes proteínas efectoras que activarán las vías de señalización de PI3K/AKT y MAPK/ERK. Adaptado de Guo, 2014 [19].

2. Alteración del metabolismo de los carbohidratos: la diabetes mellitus tipo 2

La DMT2 se caracteriza por el incremento de los niveles de glucosa en sangre como consecuencia de la disfunción de las células β del páncreas y de la RI en los órganos diana [20]. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el número de personas diabéticas pasó de 108 millones en 1980 a 422 millones en 2014, aumentando la prevalencia de esta de un 4.7% a un 8.5% en adultos mayores de 18 años. Las estimaciones de la OMS sitúan a la diabetes como la séptima causa de mortalidad en 2030 [21]. Este incremento se debe a distintos factores de riesgo como el

síndrome metabólico (SMet) que incluye la obesidad, la hiperglicemia, la hiperlipidemia y la hipertensión, y otros factores como el sedentarismo y la dieta [19]. Por ello, la DMT2 supone un gran impacto socioeconómico y de salud global debido a las complicaciones asociadas entre las que se encuentran las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las alteraciones del sistema nervioso, las infecciones, la nefropatía diabética, la retinopatía y las enfermedades hepáticas [22].

2.1. Características de la DMT2

La DMT2 es una enfermedad metabólica compleja iniciada por un fallo en la señalización de la insulina en los tejidos sensibles a la hormona lo que promueve la aparición de la RI. La DMT2 está caracterizada por hiperinsulinemia, hiperglucemia y, en estadios avanzados, por una disfunción de las células β pancreáticas [20]. La RI es la pérdida de la sensibilidad a la hormona debido a la reducción de la señalización mediada por esta en los tejidos diana, lo que lleva a alteraciones en el metabolismo glucídico y lipídico [23]. En los primeros estadios, la pérdida de sensibilidad a insulina es compensada mediante la hipersecreción de insulina produciéndose un estado de hiperinsulinemia. Sin embargo, a medida que progresa la enfermedad, este incremento de insulina no es suficiente para compensar la RI y los niveles de glucosa se elevan de nuevo, desencadenándose un estado de hiperinsulinemia con hiperglucemia. Por otro lado, la disminución de la incorporación de glucosa en los tejidos sensibles a insulina activa los procesos de lipólisis en el tejido adiposo lo que provoca un aumento de ácidos grasos no esterificados (NEFA, del inglés *non-esterified fatty acids*) en la circulación sanguínea. Este estado de hiperglucemia y de niveles elevados de NEFA provoca glucotoxicidad y lipotoxicidad que, junto con el depósito de amiloides, conlleva la apoptosis de las células β a través de mecanismos de oxidación y de estrés del retículo endoplasmático (RE). La pérdida de la masa celular β , en sujetos humanos mayores de 30 años, no puede ser compensada mediante la generación de nuevas células β y conduce a una reducción de la producción de insulina y a un estado de hipoinsulinemia hiperglucémica, característica de las etapas tardías de la DMT2 [22].

Una de las causas de la aparición de la RI es la incapacidad del tejido adiposo de almacenar lípidos bien, por hipertrofia de los adipocitos causada por un exceso de nutrientes, o bien, por lipodistrofia caracterizada

por una deficiencia de tejido adiposo [24]. Estas condiciones llevan a una disfunción del tejido adiposo que provoca la liberación de NEFA. Los NEFA circulantes inhiben la secreción de insulina, afectando a la glucólisis y a la síntesis de glucógeno y disminuyendo el transporte y la fosforilación de la glucosa, lo que conduce a la RI en distintos tejidos como el hígado y el músculo. En concreto, la acumulación de lípidos en el hígado provoca la aparición de esteatosis y la reducción de la sensibilidad a insulina [25].

3. El metabolismo lipídico

El hígado, además de ser un órgano detoxificador, es el principal tejido encargado del mantenimiento de la homeostasis del metabolismo lipídico ya que participa en procesos como la captación, la esterificación, la oxidación y la secreción de ácidos grasos y en el metabolismo y almacenamiento del colesterol [26]. Los ácidos grasos circulantes son una fuente de energía alternativa a la glucosa, pero su acumulación en exceso provoca lipotoxicidad y, en consecuencia, la formación de ROS (del inglés *reactive oxygen species*). Los ácidos grasos se almacenan en forma de TG y provienen de la dieta, de la movilización desde el tejido adiposo (lipólisis), de la lipogénesis de novo (LDN) en el hígado y de la autofagia (lipofagia) [27]. El colesterol se almacena en el hígado y su acumulación excesiva promueve la apoptosis y activa las vías de señalización de estrés como JNK (del inglés *c-Jun N-terminal kinase*). En el hígado, el colesterol se utiliza para la formación de los ácidos biliares o puede ser incorporado a lipoproteínas para su transporte [28].

3.1. Metabolismo de los ácidos grasos

El metabolismo lipídico comienza con la absorción intestinal de los lípidos de la dieta. Estos son emulsionados por los ácidos biliares producidos en el hígado a partir de colesterol para facilitar la hidrólisis de los TG por la lipasa pancreática. Los TG hidrolizados se absorben por los enterocitos, donde se empaquetan en forma de quilomicrones. En los capilares, los TG de los quilomicrones son hidrolizados mediante la lipoproteinlipasa (LPL) en ácidos grasos que se almacenan en los adipocitos y se oxidan en el músculo. Los quilomicrones remanentes llegan al hígado donde son captados gracias al receptor de las LDL (LDLr, del inglés *LDL receptor*), la proteína relacionada con el LDLr (LRP, del

inglés *LDLr-related protein*) y/o el receptor basura B1 (SRB1, del inglés *scavenger receptor class B type 1*). Los TG de los quilomicrones captados pueden ser oxidados o ser utilizados como precursores para la formación de cuerpos cetónicos. El exceso de TG se hidroliza en los lisosomas y se empaqueta en las partículas VLDL [27], [29], cuya función se indica más abajo.

El tejido adiposo contribuye, mediante lipólisis, a la producción de los NEFA cuya captación hepática es mediada por la actividad de las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP, del inglés *fatty acid transport protein*) y FAT/CD36 (del inglés *fatty acid translocase*) situadas en la membrana sinusoidal de los hepatocitos [30]. Una vez en el interior de los hepatocitos, los ácidos grasos de cadena larga con 14 carbonos o más, se unen a la proteína de unión de ácidos grasos (FABP, del inglés *fatty acid binding protein*) y se transportan a los compartimentos intracelulares para su catabolismo o al núcleo para interactuar con diversos factores transcripcionales [31].

En el hígado, para disminuir el potencial lipotóxico, los lípidos se almacenan en forma de gotas lipídicas, que contienen un núcleo formado por lípidos neutros y rodeado por una capa de fosfolípidos, mayoritariamente fosfatidilcolina, y proteínas específicas como la perilipinas. [26], [29]. La formación de gotas lipídicas puede ser por síntesis de novo o por fusión de gotas lipídicas ya existentes. La formación de novo comienza con la síntesis y acumulación de los lípidos neutros en la bicapa del RE hasta alcanzar una concentración suficiente para producir las lentes lipídicas. Estas lentes lipídicas van creciendo y deformando la membrana del RE hasta alcanzar un tamaño crítico dando lugar a las gotas lipídicas que se liberan al citoplasma. Durante el proceso de formación van adquiriendo proteínas como las perilipinas, implicadas en el transporte desde el citoplasma a los orgánulos diana [26].

Los ácidos grasos constituyen, como se ha mencionado, una fuente alternativa de energía obtenida mediante la vía metabólica de la β -oxidación producida en las mitocondrias y en los peroxisomas que degradan los ácidos grasos a acetil-CoA. Los ácidos grasos de cadena corta o media (12 carbonos o menos) y de cadena larga (14 carbonos o más) se oxidan en la mitocondria mientras que, los ácidos grasos de cadena muy larga, al ser tóxicos, se oxidan en los peroxisomas. En situaciones de exceso de ácidos grasos, se activa la ω -oxidación

dependiente del citocromo P450 en el RE, pero dicho proceso desencadena la producción de ROS y la peroxidación de lípidos [27].

En la mitocondria, los ácidos grasos atraviesan la membrana tras la activación por la acil-CoA sintetasa (ACS, del inglés *acyl-CoA synthetase*) formándose acil-CoA y son convertidos posteriormente a acil-carnitina mediante la enzima CPT-I (del inglés *carnitine palmitoyltransferase I*), situada en la membrana externa de la mitocondria. En la matriz mitocondrial los ácidos grasos son reconvertidos a acil-CoA mediante la CPT-II localizada en la membrana interna mitocondrial. Los ácidos grasos de cadena corta o media pasan a través de la membrana por difusión y son activados por la ACS en la matriz mitocondrial [31].

El acetil-CoA producido tras la β -oxidación, se oxida completamente a CO_2 en el ciclo de Krebs que produce NADH y FADH_2 para generar ATP mediante fosforilación oxidativa. Sin embargo, en situaciones de acumulación de acetil-CoA se producen cuerpos cetónicos [30].

Cabe destacar que, a diferencia de la β -oxidación producida en las mitocondrias, en los peroxisomas la primera oxidación es catalizada por la acil-CoA oxidasa (ACOX, del inglés *acyl-CoA oxidase*) formándose H_2O_2 . Además, no hay cadena de transporte de electrones por lo que la producción de ATP es inferior [31].

3.2. Lipogénesis de novo (LDN) y el transporte de lípidos a tejidos periféricos

La LDN ocurre principalmente en el hígado y en el tejido adiposo y se trata de una vía metabólica altamente regulada por hormonas y condiciones nutricionales. Por otro lado, en el tejido adiposo la síntesis de ácidos grasos contribuye al depósito de grasa mediante el almacenamiento de los ácidos grasos a largo plazo [31].

La LDN incluye la síntesis de novo de ácidos grasos que comienza a partir de acetil-CoA que es transformado a malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa (ACC, del inglés *acetyl-CoA carboxylase*). La acción de la ácido graso sintasa (FAS, del inglés *fatty acid synthase*) produce, a partir de malonil-CoA, ácido palmítico que se elonga por la acil graso-CoA elongasa y se desatura por la acil graso-CoA desaturasa para generar ácidos grasos monoinsaturados [27], [30], que se exportan en las partículas VLDL. El colesterol es incorporado a las partículas de VLDL como éster de

colesterol. Su origen es la dieta o la síntesis de novo en el hígado a partir de acetil-CoA, en cuya vía metabólica el paso limitante está regulado por la enzima HMG-CoA reductasa. El colesterol, alternativamente, es utilizado para la producción de ácidos biliares, cuyo regulador principal es la enzima CYP7A1 (del inglés *cytochrome P450 family 7 subfamily a member 1*), que son secretados en el intestino para la emulsión de grasas [29].

Las VLDL maduras liberan ácidos grasos libres a los tejidos periféricos mediante la acción de la LPL dando lugar a las partículas LDL (del inglés *low density lipoprotein*) e IDL (del inglés *intermediate density lipoprotein*) [29]. Los ácidos grasos en los tejidos periféricos se almacenarán, contribuirán a la formación de membranas celulares o serán oxidados para la producción de ATP mientras que el colesterol será utilizado en la síntesis de hormonas y en las membranas celulares.

El transporte reverso de colesterol permite eliminar el exceso de colesterol de los tejidos mediante la síntesis de partículas HDL (del inglés *high density lipoprotein*) que tienen su origen en el hígado. Las lipoproteínas HDL se unen a la lecitina colesterol acil transferasa (LCAT, del inglés *lecitin cholesterol acyl transferase*), enzima que cataliza la formación de ésteres de colesterol, a ABCA1 (del inglés *ATP-binding cassette A1*), transportador de colesterol y fosfolípidos; y a SRB1. Para realizar su función se produce el intercambio de colesterol, TG y ésteres de colesterol entre las LDL y VLDL con las HDL. Las HDL eliminan el colesterol en el hígado en forma de ácidos biliares [29].

3.3. Regulación del metabolismo lipídico

La regulación de la expresión de genes lipogénicos está controlada por reguladores hormonales y nutricionales como la insulina, los carbohidratos y los ácidos grasos a través de diferentes factores transcripcionales y receptores nucleares.

La insulina incrementa la expresión del factor transcripcional SREBP (del inglés *sterol regulatory element binding protein*) mientras que el glucagón la disminuye. SREBP-1c es la isoforma más expresada en el hígado e induce la expresión de genes lipogénicos como FAS o ACC mientras que SREBP-2, con funciones solapantes con SREBP-1c, modula el metabolismo del colesterol [29]. SREBP también está regulado por

nutrientes. Así, los ácidos grasos polinsaturados suprimen la expresión de SREBP-1c y, consecuentemente, la síntesis de ácidos grasos y de TG se reduce. Por otro lado, la glucosa también promueve la lipogénesis activando la expresión del factor transcripcional ChREBP (del inglés *carbohydrate regulatory element binding protein*) [27].

Los receptores nucleares RXR (del inglés *retinoid X receptor*) y LXR (del inglés *liver X receptor*) juegan un papel importante en el metabolismo de la glucosa, de los ácidos grasos y del colesterol. Estos receptores forman heterodímeros con los factores transcripcionales PPAR (del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor*) y/o entre ellos mismos (PPAR-RXR y LXR-RXR) para modular la transcripción de genes diana.

Así, PPAR α , que se expresa mayoritariamente en el hígado, aumenta la transcripción de genes implicados en el transporte y catabolismo de los ácidos grasos como FABP, FAT y CPT-I. PPAR α regula la β -oxidación cuando forma heterodímeros con RXR por lo que la deficiencia en PPAR α provoca acumulación de ácidos grasos y esteatosis hepática. Por otro lado, PPAR γ tiene niveles de expresión muy bajos en el hígado, pero en situaciones de hipertrigliceridemia y de esteatosis hepática incrementa la síntesis y acumulación de lípidos al alterar la expresión de enzimas lipogénicas hepáticas como FAS [29].

El heterodímero LXR-RXR modula la expresión de genes involucrados en el catabolismo y eliminación del colesterol. LXR α es la isoforma más expresada en el hígado y regula la lipogénesis hepática activando la expresión de SREBP-1c. Cabe destacar que PPAR α suprime al eje LXR-SREBP-1c mientras que PPAR γ lo activa. Además, la activación de LXR-SREBP-1c suprime la señalización de PPAR α [30]. LXR regula la homeostasis del colesterol a través de CYP7A1, enzima limitante en la síntesis de ácidos biliares, y tiene otras dianas como ABCA1 y ABCG5 (del inglés *ATP-binding cassette sub-family G member 5*)/ABCG8, implicadas en la excreción de ácidos biliares y en la absorción intestinal de colesterol [30].

4. Alteración del metabolismo lipídico: la enfermedad del hígado graso no alcohólico

La EHGNA es un problema de salud a nivel global con una prevalencia del 20-30% de la población general y se prevé que aumente 2-3 veces para el año 2030 debido al incremento de personas con obesidad, DMT2 y SMet [32]. La EHGNA es asintomática y se define por la acumulación de más de un 5% de esteatosis en las células hepáticas en ausencia de consumo de alcohol y/o drogas, de enfermedades autoinmunes o de hepatitis viral [33]. La esteatosis simple se caracteriza por la acumulación de TG hepáticos en ausencia de inflamación y/o daño hepático y se considera inocua y reversible debido a su bajo riesgo de progresión a cirrosis o fallo hepático. Sin embargo, la presencia de inflamación o la esteatosis simple mantenida en el tiempo pueden promover la transición de esteatosis simple a EHNA caracterizada por, además de esteatosis, la degeneración balonzante de los hepatocitos, la inflamación lobular, la fibrosis y la activación de las células estrelladas (Figura 2). Un 2-5%, de pacientes con EHGNA de este modo desarrollarán EHNA y de estos un 1-2% progresarán a cirrosis y daño hepático [34]. La cirrosis aparece como consecuencia del reemplazamiento de los hepatocitos por el colágeno producido por las células estrelladas y puede provocar CHC. Este estadio es la causa principal del aumento de trasplantes de hígado en pacientes con EHNA en los últimos años [33], [35]. La esperanza de vida en pacientes con esteatosis simple es la misma que para la población general pero esta disminuye cuando los pacientes presentan EHNA debido a complicaciones cardiovasculares o hepáticas asociadas [35], [36].

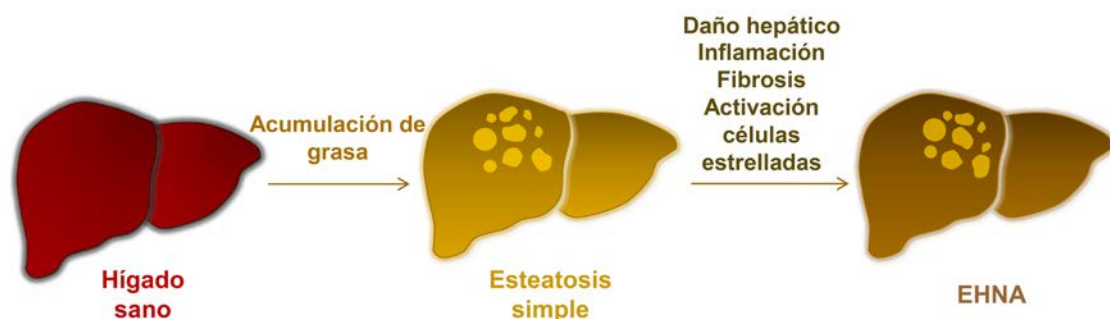


Figura 2. Transición de hígado sano-esteatosis simple-EHNA. La acumulación de grasa hepática desencadena la aparición de esteatosis simple que progresa a EHNA en presencia de daño hepático, inflamación, fibrosis y activación de células estrelladas. Adaptado de *Vinué, 2018* [37].

Los factores de riesgo para la evolución de la EHGNA, como se ha mencionado, son la dieta y la RI, pero también factores genéticos. Entre los factores genéticos se encuentran polimorfismos del gen PNPLA3 (del inglés *patatin-like phospholipase domain containing 3*) cuya proteína está involucrada en la hidrólisis de los TG en los adipocitos de manera independiente. También se ha descrito una mutación en el gen TM6SF2 (del inglés *transmembrane 6 superfamily member 2*), transportador lipídico que incrementa la acumulación de TG en el hígado. Sin embargo, el factor de riesgo principal para el desarrollo de la EHGNA es la presencia de RI y la obesidad [36].

La acumulación de TG hepáticos se produce en el 74% de los casos a partir de los NEFA liberados por el tejido adiposo y de los TG de la dieta mientras que solo el 26% provienen de la LDN del hígado. Sin embargo, en pacientes con EHGNA la LDN aumenta hasta tres veces cuando el tejido adiposo es incapaz de almacenar más TG, como en la obesidad. Aunque la excreción de los TG a través de las VLDL también está aumentada, no es suficiente para compensar el influjo de ácidos grasos hacia el hígado. Inicialmente se produce un almacenamiento de los TG en las gotas lipídicas, que equilibra el exceso de ácidos grasos libres y produce la esteatosis asintomática, pero la acumulación excesiva acaba provocando lipotoxicidad, inflamación, síntesis de ROS y disfunción hepatocelular [35], [38]. La esteatosis incrementa la inflamación hepática a través de la señalización de NF- κ B (del inglés *Nuclear factor-kappaB*), que induce la producción de citoquinas como TNF α (del inglés *tumor necrosis factor α*), interleuquina(IL)6 e IL1 β . Estas citoquinas reclutan monocitos y activan a los macrófagos residentes del hígado, las células de Kupffer. La producción de las citoquinas TNF α e IL6 desregulan a SOCS3 (del inglés *suppressor of cytokine signaling 3*) implicado en la RI en el hígado [35].

4.1. Modelos de ratón de EHGNA inducida por dieta

La EHGNA se ha estudiado en ratones sometidos a distintas dietas y de diferente duración. A pesar de ello, no existe consenso acerca de qué dieta mimetiza mejor las características desarrolladas en la patología humana. A continuación, se expondrán las distintas dietas y los efectos derivados de estas.

4.1.1. Dietas deficientes en nutrientes

Una de las dietas más utilizada es la dieta deficiente en colina (DDC), en metionina (DDM) o en ambas (DDCM) en combinación con grasa (10%) y altos porcentajes de sacarosa (40%). La metionina y la colina son esenciales en la β -oxidación y en la producción y secreción de VLDL por parte del hígado por lo que su deficiencia desencadena la acumulación de TG en forma de esteatosis. Además, producen estrés oxidativo, inflamación, fibrosis, apoptosis y, finalmente, daño hepático tras un tiempo de administración corto (8-10 semanas). Es por esto por lo que estas dietas consiguen recapitular las características histológicas de la EHNA. Sin embargo, la DDCM provoca pérdida de peso, disminución de la masa hepática, bajos niveles de glucosa, de insulina, de TG y de colesterol en sangre y no hay pérdida de la sensibilidad a insulina de modo que no incluye todas las características metabólicas de la EHNA en humanos. Aunque la DDCM ha sido utilizada para estudiar los mecanismos que inducen la progresión y severidad de la EHNA, la ausencia en colina y/o metionina, hace que difiera de las condiciones dietéticas que producen la esteatosis en humanos [39]–[41].

Una variante de la dieta anterior, la DDC con L-aminoácidos, ha sido utilizada como alternativa. Esta dieta induce en ratones la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos, un incremento en la síntesis de lípidos, estrés oxidativo, inflamación y fibrosis. Sin embargo, se requieren mayores tiempos de administración y no se producen cambios metabólicos [41].

4.1.2. Dietas con grasa, colesterol e hidratos de carbono

Los modelos murinos que incorporan colesterol e hidratos de carbono recapitulan numerosas características de la EHNA en humanos. El modelo murino ALIOS (del inglés *american lifestyle induced obesity syndrome*), que combina dieta alta en grasa y fructosa con sedentarismo induce muchas características de la EHNA, pero no produce la degeneración balonzante de los hepatocitos. Por otro lado, el modelo AMLN (del inglés *amylin liver NASH model*) consistente en dieta alta en grasa y fructosa, colesterol al 2% y ácidos grasos trans (45% sobre el total de grasa) induce esteatosis, inflamación lobular, degeneración balonzante de los hepatocitos y fibrosis media moderada. Una variación del modelo ALIOS, el modelo DIAMOND (del inglés *diet induced animal model of NAFLD*) utiliza ratones resultantes de cruzar dos cepas (1291S1/SvImJ y

C57BL/6J) que cuando son alimentados con dieta alta en grasa y fructosa desarrollan todas las características de la EHNA en tiempos cortos de dieta [39], [40].

Otras de las dietas empleadas que inducen obesidad, RI y SMet incorporan ácidos grasos saturados, colesterol y fructosa mimetizando el estilo de comida rápida conocido como dieta Western. Sin embargo, requiere de tiempos más largos de administración para que se desarrollen todas las características de EHNA [42]. El empleo de la dieta aterogénica típica que contiene colesterol, ácido cólico y grasa produce infiltración de leucocitos en el hígado, esteatosis, estrés oxidativo, fibrosis, hipercolesterolemia, RI hepática y puede producir tumores hepáticos [37], [41].

4.2. La DMT2 y la RI como factor de riesgo para la EHGNA

Los mecanismos que provocan la aparición de la EHGNA no están del todo elucidados, pero se cree que la RI podría ser el punto de unión entre la EHGNA y la diabetes.

En estados de RI, en los que se produce hiperinsulinemia crónica, la insulina promueve la LDN hepática a través de la desregulación de factores transcripcionales y receptores nucleares que controlan la expresión de los genes lipogénicos. Concretamente, la insulina y la alteración de IRS2 en situaciones de RI incrementan la expresión del factor transcripcional SREBP-1c que induce genes lipogénicos como FAS incrementándose así la LDN [30], [36], [43]. La actividad de la LPL del hígado aumenta e incrementa la producción de partículas LDL que, junto con la menor expresión del LDLr en el hígado, contribuye al incremento de las partículas LDL circulantes. Como consecuencia pacientes con EHGNA presentan hipertrigliceridemia [30]. Por otro lado, niveles elevados de CD36, que media la captación de ácidos grasos en el hígado, se han observado en pacientes con EHGNA, hallazgo que es consistente con una mayor acumulación de lípidos en modelos murinos que sobreexpresan CD36 [30]. Finalmente, pacientes con EHGNA y RI exhiben una inhibición de la β -oxidación mitocondrial, por el exceso de malonil-CoA y la inhibición de CPT-I, y consecuentemente una disminución de la producción de ATP. La inhibición de la β -oxidación mitocondrial favorece la β -oxidación en los peroxisomas y la ω -oxidación en el RE, procesos que contribuyen a la

lipotoxicidad y la formación de ROS acelerándose la progresión hacia EHNA [27], [30].

La RI en los adipocitos de pacientes obesos resulta en la liberación de NEFA lo que promueve su acumulación en otros tejidos como el hígado, músculo o páncreas, produciendo lipotoxicidad [44] y desencadena disfunción mitocondrial con producción aumentada de ROS y del estrés del RE lo que activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, del inglés *unfolded protein response*). Estos procesos incrementan la inflamación y el estrés celular que aceleran los procesos de apoptosis y la progresión hacia EHNA [44]. Además, la hipertrofia de los adipocitos en la obesidad produce un desequilibrio de adipoquinas que son liberadas al torrente sanguíneo y afectan también al hígado. Así pues, pacientes con EHNA presentan un aumento de la expresión de genes inflamatorios y de la activación de los macrófagos en el tejido adiposo e hígado y esto se correlaciona con la progresión de esteatosis simple a EHNA y fibrosis [36]. Del mismo modo, los pacientes obesos presentan un incremento en la LDN lo que contribuye al exceso de grasa. Además, la disminución de los niveles de expresión de FASN en el tejido adiposo de estos pacientes reduce la capacidad lipogénica del mismo [43] (Figura 3).

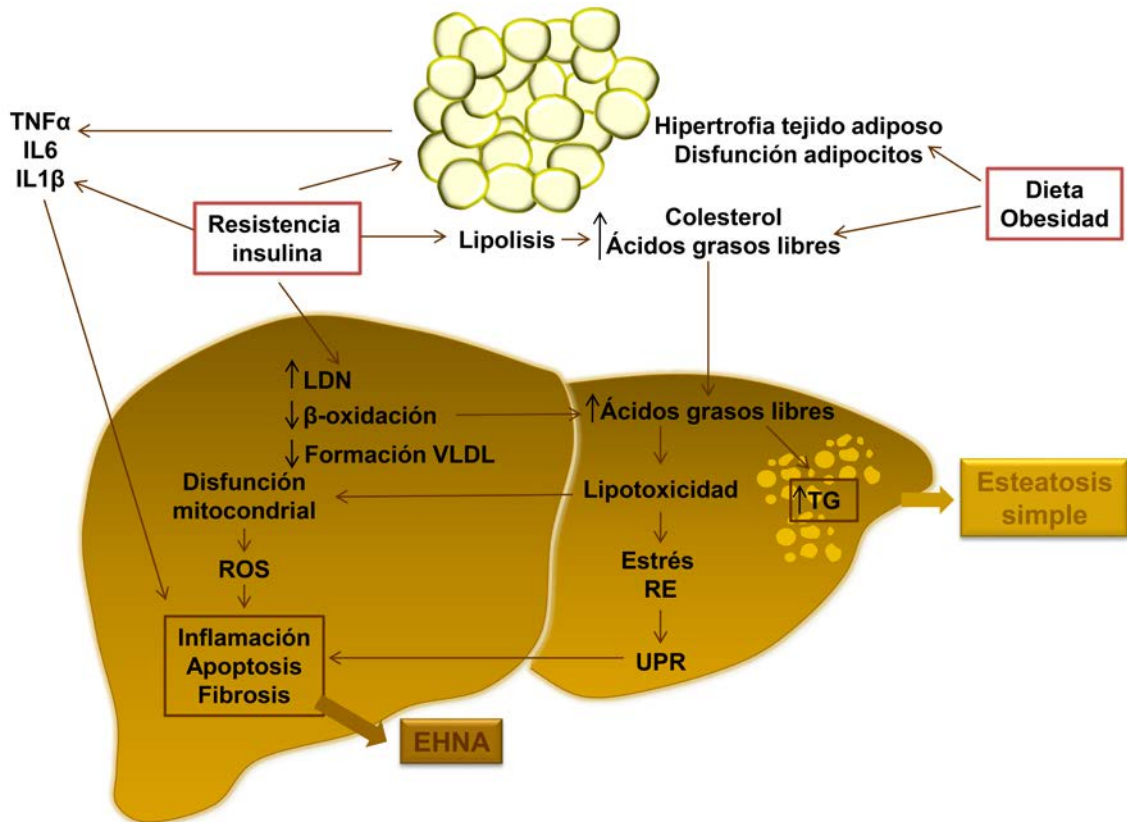


Figura 3. Procesos implicados en el desarrollo de la EHGNA. Factores como la dieta o la presencia de obesidad incrementan los niveles de ácidos grasos libres y colesterol plasmáticos, la RI, la hipertrofia de los adipocitos y la disfunción del tejido adiposo. La RI empeora la disfunción del tejido adiposo conduciendo a la lipólisis y a la secreción de citoquinas proinflamatorias. En el hígado, la RI incrementa la LDN, disminuye la β -oxidación y la formación de VLDL, alteraciones que incrementan la acumulación de ácidos grasos (esteatosis simple) y producen lipotoxicidad. La lipotoxicidad provoca disfunción mitocondrial que incrementa la producción de ROS y estrés del RE que activa la UPR. Todo ello desencadena la inflamación, la apoptosis y la fibrosis y la consecuente progresión hacia EHGNA. Adaptado de *Buzzetti, 2016* [36].

4.3. Mecanismos moleculares que promueven la EHGNA: el estrés del RE y la alteración del proceso de autofagia

4.3.1. El estrés del RE

El RE rugoso se encarga del plegamiento y maduración de las proteínas cuyo control de calidad está mediado por la vía de la UPR que se activa mediante tres sensores de estrés situados en la membrana del RE: IRE1 (del inglés *inositol-requiring enzyme 1*), PERK (del inglés *PKR-like ER kinase*) y ATF6 (del inglés *activating transcription factor 6*). Este mecanismo permite la vuelta a la homeostasis del RE. Sin embargo, si

estos mecanismos no son efectivos se produce el estrés del RE [45], [46]. El estrés crónico del RE en los hepatocitos altera el metabolismo lipídico, induce la LDN y altera la secreción de las VLDL, la señalización de insulina y la autofagia. Así se ha observado que los pacientes con EHGNA presentan marcadores de estrés del RE y de la activación de la UPR [47].

El eje IRE1 α -XBP1 (del inglés *X-box binding protein 1*) juega un papel crucial en el metabolismo lipídico en el hígado a través de la regulación de la secreción de las VLDL y de la lipogénesis. Consistentemente, la delección de IRE1 α en hepatocitos de ratón produce esteatosis hepática. Sin embargo, la delección de XBP1 reduce la LDN, los niveles de colesterol y TG plasmáticos y disminuye la esteatosis en ratones alimentados con dieta lipogénica [48]. El eje PERK-eIF2 α (del inglés *eukaryotic initiation factor 2*)-ATF4 regula la lipogénesis por lo que la desfosforilación de eIF2 α protege del desarrollo de EHGNA a los ratones obesos alimentados con dieta alta en grasa [48], [49] mientras que la delección de PERK inhibe la expresión de enzimas lipogénicas como FAS [48], [49]. ATF6 puede ser protector en la esteatosis al inhibir la activación de SREBP-2. Además, se ha observado que ratones *Atf6*^{-/-}, con estrés del RE inducido, desarrollan esteatosis hepática por una reducción en la β -oxidación y una menor producción de VLDL [48].

4.3.2. La alteración del proceso de autofagia

La macroautofagia degrada los componentes celulares mediante la formación de autofagosomas, que pueden contener lípidos (lipoautofagia) que serán oxidados en la mitocondria para producir energía celular. La disfunción de la lipoautofagia reduce la oxidación de los lípidos promoviendo su acumulación y la aparición de la esteatosis hepática [50]. Diversos estudios han relacionado la macroautofagia con la EHGNA en humanos [51], [52].

Durante la formación del autofagosoma participan proteínas adaptadoras como p62/SQSTM1 (del inglés *sequestosome 1*) que reconoce y libera proteínas ubiquitinadas al interior del autofagosoma para su degradación. El adaptador p62/SQSTM1 también reconoce a la proteína LC3II (del inglés *light chain 3 II*), forma lipídica que se produce por la conjugación de LC3I con fosfatidiletanolamina y se une a la membrana del autofagosoma [52], [53]. Se ha observado que la disminución de LC3 y la acumulación de p62, indicadores de autofagia

ineficiente, se asocian con un mayor grado de esteatosis en tejido hepático post-mortem humano. Además, en biopsias hepáticas de pacientes con EHGNA [54] y en ratones con alimentados con dieta alta en grasa [51] y que presentan obesidad [55] se ha demostrado una mayor acumulación de p62. Otros estudios asocian un aumento de la relación LC3II/LC3I con una acumulación de autofagosomas en ratones alimentados con dieta alta en grasa [51].

La autofagia puede promover también la apoptosis en condiciones de estrés crónico. En estos casos CHOP (del inglés *C/EBP homologous protein*), regulado por ATF4, podría ser el nexo de unión entre la autofagia y el estrés del RE, ya que la inhibición de CHOP disminuye la apoptosis y favorece la autofagia [46] produciéndose un equilibrio entre ambos procesos. En este sentido, se ha observado que la disfunción de la autofagia en el hígado de ratones delgados aumenta el estrés del RE mientras que este se reduce tras el restablecimiento de la autofagia en ratones obesos. En modelos murinos de EHNA se ha observado un aumento de LC3II y autofagosomas paralelamente al incremento del estrés del RE [49].

5. La inflamación en las enfermedades metabólicas: DMT2 y EHGNA

La inflamación se define como la respuesta adaptativa protectora que se desencadena debido a un daño tisular o a una infección. Las manifestaciones derivadas de esta respuesta como la hinchazón, el calor o el dolor son consecuencia de procesos como la vasodilatación, la acumulación de leucocitos, el incremento de la permeabilidad capilar y del líquido intersticial y la estimulación de terminaciones nerviosas. En principio, la inflamación es una respuesta beneficiosa para el organismo pues permite, por ejemplo, la defensa frente a infecciones. No obstante, una inflamación no resuelta induce la aparición de la inflamación crónica que es perjudicial para el organismo [56], [57].

La inflamación produce la activación del sistema inmune y se ha señalado como el punto de unión de la obesidad, la diabetes mellitus, la EHGNA y las enfermedades cardiovasculares. La inflamación crónica de bajo grado parece ser un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la DMT2. De hecho, la elevada presencia a nivel basal de factores

inflamatorios se correlaciona con la incidencia de DMT2 independientemente del grado inicial de RI y obesidad [56]. La inflamación del tejido adiposo causada por la disfunción e hipertrofia de los adipocitos en la obesidad, se cree que es uno de los mecanismos implicados en la inflamación sistémica de bajo grado y probablemente es el tejido principal que favorece el desarrollo de la RI y la DMT2. Así, pacientes obesos con RI presentan hipertrofia e inflamación del tejido adiposo que aumenta la activación del sistema inmune innato y adaptativo [58]. La activación perpetuada en el tiempo desencadena una inflamación crónica no resuelta que afecta a la señalización de la insulina y produce la acumulación de ácidos grasos en el hígado lo que conduce al desarrollo de la EHGNA.

La inflamación está directamente relacionada con la RI ya que interfiere en la acción de la insulina mediante distintos mecanismos directos o indirectos. Uno de los mecanismos directos está relacionado con la inhibición de la señalización de la insulina a través de JNK y del complejo IKK (del inglés *IκB kinase*) que produce una fosforilación inhibitoria en los residuos de serina de las proteínas IRS, atenuando la activación de estas mediante fosforilación en tirosina y, por lo tanto, la vía de señalización de la insulina. Además, la señalización mediada por JNK estabiliza los ARNm de las citoquinas proinflamatorias. Asimismo, la activación de los factores transcripcionales NF-κB y AP-1 (del inglés *Activator protein 1*) inhibe la expresión de numerosos genes metabólicos asociados con la sensibilidad a insulina como GLUT4, IRS1 y AKT e induce la expresión de SOCS que se une al R-INS e impide la fosforilación de IRS1 e IRS2 y la vía de señalización de la insulina. La inflamación también es acentuada por otras vías inflamatorias, como la vía de TLR4 (del inglés *Toll-like receptor 4*) que impide la expresión del microARN miR-223 el cual regula negativamente la expresión de genes inflamatorios [59], [60].

Por otra parte, la inflamación puede actuar disminuyendo la sensibilidad a la insulina de manera indirecta. Así, en el tejido adiposo, TNFα estimula la lipólisis en los adipocitos liberando ácidos grasos a la circulación e incrementando sus niveles plasmáticos. Además, otras citoquinas y adipoquinas secretadas por el tejido adiposo pueden llegar a tejidos periféricos como el hígado produciendo RI e incrementado la LDN [60]. Por otro lado, la producción y secreción de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias provoca el reclutamiento en los tejidos de leucocitos circulantes, predispone a un fenotipo proinflamatorio en estos y perpetúa la inflamación en estos tejidos.

5.1. La inflamación del tejido adiposo

El tejido adiposo es un tejido complejo y heterogéneo formado por los adipocitos y la fracción vascular estromal (FVE) compuesta por células endoteliales, células madre mesenquimales, preadipocitos, fibroblastos y células inmunes. El tejido adiposo está compuesto por el tejido adiposo blanco, para el almacenamiento energético, y el tejido adiposo marrón con funciones termogénicas [61]. El tejido adiposo blanco, cuyos depósitos principales son el subcutáneo y el visceral o abdominal, es además un órgano secretor por lo que juega un papel fundamental en la inflamación. Los adipocitos del tejido adiposo blanco se caracterizan por tener una gran gota lipídica que ocupa todo el citoplasma, resultante del almacenamiento de ácidos grasos en forma de TG, y pocas mitocondrias mientras que los adipocitos marrones se caracterizan por contener pequeñas gotas lipídicas con numerosas mitocondrias. Sin embargo, en condiciones de insuficiencia energética, los TG contenidos en las gotas lipídicas son hidrolizados a ácidos grasos libres y glicerol y secretados al torrente sanguíneo para abastecer a otros tejidos. Los adipocitos también regulan el metabolismo del colesterol mediante la producción de partículas HDL que realizan el transporte reverso de colesterol hacia el hígado [62].

Debido a la elevada actividad secretora, el tejido adiposo blanco también genera citoquinas, quimioquinas, factores angiogénicos, factores de coagulación y factores vasoactivos que modulan el metabolismo, el apetito, la función vascular, la inflamación, la coagulación y la función cardiovascular [62].

Además de los adipocitos, el tejido adiposo contiene la FVE compuesta por distintos tipos celulares entre los que se incluyen las células inmunes. En condiciones normales el tejido adiposo posee un infiltrado de macrófagos antiinflamatorios y linfocitos reguladores que suprimen la actividad inflamatoria de linfocitos efectores. Sin embargo, en condiciones de sobrenutrición u obesidad se produce la expansión del tejido adiposo por la hipertrofia de los adipocitos caracterizados por la hipoxia y el estrés del RE. La disfunción de los adipocitos en pacientes obesos provoca la secreción de moléculas como lípidos, quimioquinas y adipoquinas proinflamatorias [63]. Por ello, diversos estudios demuestran que pacientes obesos con RI presentan un incremento de los niveles de las citoquinas TNF α , IL6, IL8 e IL1 β , de los niveles de la proteína C reactiva (CRP, del inglés *C-reactive protein*) y de las quimioquinas MCP1 (del

inglés *monocyte chemoattractant protein 1*) y CCL5/RANTES (del inglés *C-C chemokine ligand 5/regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*).

Estos procesos favorecen el reclutamiento de novo al tejido adiposo de células inmunes [64], [65]. Así, la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF α e IL6 y quimioquinas como MCP1 favorecen el reclutamiento de monocitos al tejido adiposo que adquieren un fenotipo proinflamatorio debido al microambiente proinflamatorio que les rodea. Estos macrófagos a su vez secretan más citoquinas y quimioquinas incrementándose la infiltración de otros monocitos y células inmunes [58], [60], [66], [67]. Diversos estudios desde diferentes abordajes han concluido que la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo causaría el incremento de la inflamación característica de la obesidad con RI. Así pues, algunos estudios han demostrado que la disrupción de PPAR γ y PPAR δ en la línea mieloide de ratones alimentados con dieta alta en grasa inhibe el fenotipo antiinflamatorio en macrófagos, incrementándose la predisposición al desarrollo de inflamación del tejido adiposo, de RI y de intolerancia a la glucosa [58], [60]. En otro estudio, la ablación de las células mieloides CD11c+ o de los macrófagos del tejido adiposo en ratones obesos con RI mejoró la tolerancia a la glucosa. Además, se ha demostrado que los macrófagos del tejido adiposo de los ratones obesos alimentados con dieta alta en grasa tienen activada las vías de señalización de JNK y NF- κ B por lo que la inactivación de JNK e IKK β protege de la inflamación del tejido adiposo [60], [67].

Numerosos estudios indican que el balance entre los linfocitos antiinflamatorios (Th (del inglés *T helper*) 2 o T reguladores(reg)) y los linfocitos proinflamatorios (Th1 o Th17) es fundamental para mantener la correcta homeostasis y respuesta inmune. De hecho, pacientes con DMT2 y/u obesidad presentan un incremento en la infiltración de linfocitos CD4+ y CD8+, de linfocitos proinflamatorios Th1 y Th17 [58], [65] y de linfocitos Th22 [68] en el tejido adiposo y, por tanto, se produce una disminución de los linfocitos antiinflamatorios Th2 y Treg [58], [69]. Los niveles elevados de linfocitos Th17, los cuales producen IL17, promueven la síntesis de TNF α y, por lo tanto, favorecen la aparición de RI [65], [70]. Los linfocitos Treg se encargan de suprimir la acción de los linfocitos Th y mejoran la respuesta inflamatoria mediante diferentes vías como la inhibición de la secreción de citoquinas proinflamatorias, la modulación del microambiente y el cambio de expresión de los receptores de superficie de manera que,

en pacientes con RI, la ratio Treg/Th17 o Treg/Th1 disminuye [58], [65], [70]. La acumulación de linfocitos CD8+, tanto en tejido adiposo como en hígado, incrementa la concentración de Interferón γ (IFN γ) lo que promueve el desarrollo de la inflamación y RI [58], [65]. Consiguientemente, se ha observado que la depleción de linfocitos T CD8+ en ratones obesos inducidos por dieta mejora la RI [71].

Por otro lado, los linfocitos iNKT (del inglés *invariant natural killer T lymphocytes*) son muy abundantes en el tejido adiposo y mantienen la homeostasis mediante la secreción de citoquinas antiinflamatorias como IL4 e IL10 que regulan la función de los macrófagos M2 y de los linfocitos Treg. Los linfocitos iNKT se encuentran activados permanentemente en el tejido adiposo debido al microambiente rico en antígenos lipídicos, citoquinas y adipoquinas. La activación ocurre tras el reconocimiento del antígeno lipídico presentado por los adipocitos a través de CD1d. Curiosamente, se ha observado que en pacientes obesos el número de iNKT disminuye correlacionándose con el aumento del infiltrado inflamatorio. Consecuentemente, ratones alimentados con dieta alta en grasa y deficientes en iNKT son más susceptibles a desarrollar obesidad, inflamación del tejido adiposo y RI [72].

También se han encontrado niveles elevados de linfocitos B en el tejido adiposo de pacientes con obesidad y, consistente con este hallazgo, se ha observado un incremento de la concentración de IgG en sangre periférica de ratones obesos [58], [60], [71]. De hecho, la eliminación de linfocitos B en ratones obesos protege frente a la RI aunque no se produzcan cambios en la grasa corporal [71].

Por otro lado, estudios en ratones alimentados con dieta alta en grasa han demostrado un mayor número y activación de los linfocitos NK en el tejido adiposo que produce un aumento en la concentración de citoquinas proinflamatorias IFN γ y TNF α y promueve la generación de macrófagos proinflamatorios [58]. Por ello, la reducción de linfocitos NK mejora la RI disminuyendo el número de macrófagos infiltrados en el tejido adiposo. En pacientes obesos se ha observado una disminución del subtipo de linfocitos NK CD56^{dim}CD16^{bright}, cuya función es citotóxica, mientras que se produce un aumento de los linfocitos NK CD56^{bright}CD16^{dim/negativo} incrementándose la producción y secreción de citoquinas [58].

En ratones con obesidad inducida por dieta la inhibición de la elastasa, producida en los gránulos de los neutrófilos, resulta en una menor

inflamación del tejido. Esta menor inflamación fue consecuencia de una menor infiltración de neutrófilos y macrófagos lo que mejoró la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina [73].

Recientemente, se ha implicado a los eosinófilos en procesos como la regulación negativa de la inflamación del tejido adiposo. Los eosinófilos residentes en el tejido adiposo secretan IL4 lo que mantiene la polarización de los macrófagos hacia macrófagos M2. Además, pueden secretar la citoquina antiinflamatoria IL10 incrementando el ambiente antiinflamatorio en el tejido adiposo [69]. En sujetos delgados se observa un gran número de eosinófilos en el tejido adiposo que va decreciendo a medida que aumenta la adiposidad. Así, modelos murinos deficientes en eosinófilos desarrollan obesidad, intolerancia a la glucosa y RI. Consecuentemente, la restauración de la eosinofilia mediante la sobreexpresión de IL5 disminuye la adiposidad y la RI e incrementa el número de macrófagos M2 del tejido adiposo en ratones alimentados con dieta alta en grasa [58], [60].

5.2. La inflamación del hígado

El hígado está compuesto por células parenquimales y células no parenquimales. Los hepatocitos son las células parenquimales, suponen el 60% de todas las células hepáticas y desempeñan las principales funciones del hígado. Por otro lado, las células no parenquimales incluyen un grupo más heterogéneo constituyendo un 20% de todas las células hepáticas. Entre las células no parenquimales se encuentran las células endoteliales sinusoidales, las células de Kupffer, las células estrelladas y otras poblaciones de células inmunes como las células dendríticas, los neutrófilos y los linfocitos NKT [74]. En condiciones de sensibilidad a insulina y homeostasis metabólica, el hígado posee un infiltrado celular caracterizado por linfocitos reguladores y células de Kupffer de fenotipo antiinflamatorio. El desarrollo de RI en el tejido adiposo, entre otros, activa las vías de estrés inflamatorias aumentando la secreción de mediadores inflamatorios al torrente sanguíneo. La inflamación sostenida en el tiempo favorece la proliferación y cambio fenotípico de las células de Kupffer así como el reclutamiento de linfocitos proinflamatorios [75].

Las células de Kupffer, además de tener un papel muy importante en la inflamación, promueven la fibrogénesis a través de la activación de las células estrelladas. Las células estrelladas son células mesenquimales situadas en el espacio de Disse que en estado quiescente acumulan

vitamina A en sus gotas lipídicas. Cuando se produce daño hepático las células estrelladas se transdiferencian a células parecidas a miofibroblastos y migran a los sitios dañados donde secretan proteínas de la matriz extracelular (MEC), proteínas inhibitoras de las metaloproteinasas (TIMPs, del inglés *tissue inhibitor of metalloproteinases*), citoquinas, factores de crecimiento y factores angiogénicos. Las células de Kupffer secretan $TGF\beta$ (del inglés *tumor growth factor \beta*) que activa a las células estrelladas, y $TNF\alpha$ e IL1 que activan la vía de señalización de NF- κ B, promoviendo la supervivencia de las células estrelladas. La activación prolongada de las células estrelladas es la causante de la aparición de la fibrosis hepática. El desequilibrio en la producción de componentes de la MEC y de TIMPs altera el balance de la síntesis/degradación de la MEC produciéndose fibrosis [76], [77] (Figura 4).

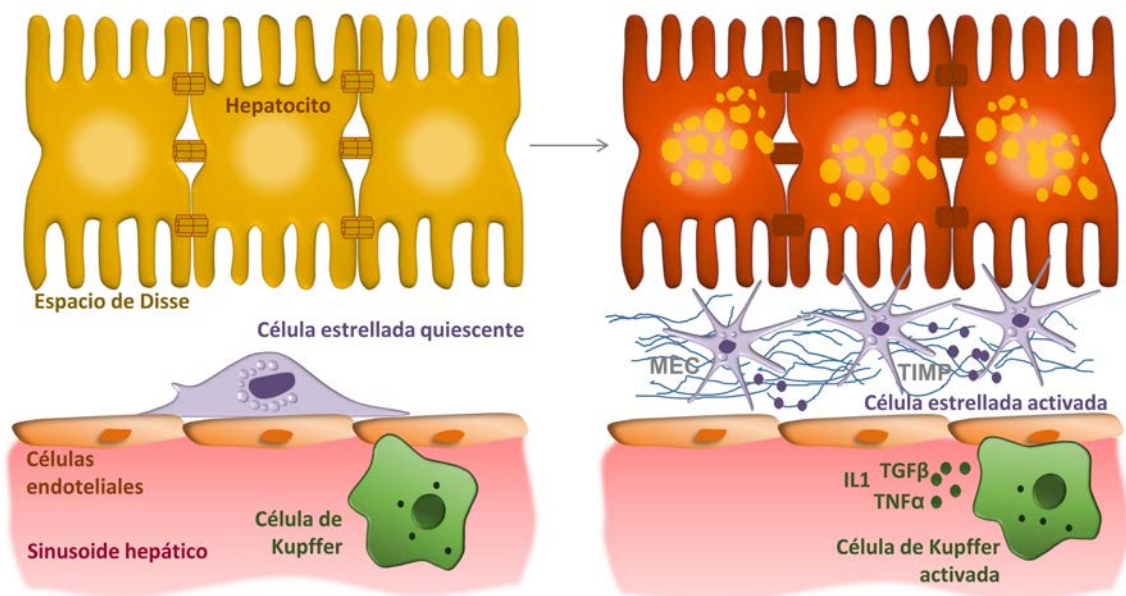


Figura 4. Activación de las células estrelladas tras daño hepático. El daño hepático induce en las células estrelladas la transición desde un estado quiescente a un estado activado, en donde adquieren un fenotipo de miofibroblasto. Las células estrelladas activadas secretan proteínas de la MEC y TIMPs, entre otros. Las células de Kupffer activadas liberan $TGF\beta$, $TNF\alpha$ e IL1 que activan y promueven la supervivencia de las células estrelladas. Adaptado de Asselah, 2009 [78].

El estudio del papel de las células dendríticas en la EHGNA es controvertido. Por un lado, se ha observado que durante el daño hepático

hay un aumento de células dendríticas maduras y proinflamatorias capaces de expresar IL6, TNF α y MCP1. Sin embargo, la depleción de estas empeora la inflamación y la fibrosis en la EHNA. Por otro lado, otro estudio confirió características proinflamatorias a un subtipo de células dendríticas que derivan de los monocitos y expresan el marcador CX3CR1 (del inglés *CX3C chemokine receptor 1*). Al eliminar este subtipo se observó una reducción de los niveles de TNF α y un menor daño hepático [79]. No obstante, se ha observado que las células dendríticas participan en la regresión de la fibrosis. Además, la acumulación de células dendríticas en el tejido adiposo se asocia con la diferenciación hacia linfocitos Th17. Los linfocitos Th17 y la secreción de IL17 están implicados en la transición de esteatosis simple a EHNA por lo que las células dendríticas podrían tener un papel clave en la balance Th17/Treg en el hígado [77].

La acumulación de neutrófilos en la EHNA contribuye al daño hepatocelular al incrementar el reclutamiento de macrófagos. Los neutrófilos acumulan en sus gránulos mieloperoxidasa, que se ha visto aumentada en pacientes que presentan EHNA, lo que incrementa la citotoxicidad de los macrófagos. Además de contribuir al incremento de la inflamación, la mieloperoxidasa contribuye a la progresión a EHNA a través de la muerte de los hepatocitos, el estrés oxidativo y la fibrogénesis. También está implicada en la activación de las células estrelladas de manera que, ratones dobles deficientes en LDLr y mieloperoxidasa alimentados con dieta alta en grasa presentaron una disminución de la acumulación de colesterol, de la inflamación y de la fibrosis. Igualmente, ratones deficientes para mieloperoxidasa alimentados con DDCM demostraron una reducción en la activación de las células estrelladas [77], [79].

Los linfocitos NKT también contribuyen al daño hepático y existen dos subtipos implicados en el mismo: los linfocitos NKT tipo I con un papel proinflamatorio y los linfocitos NKT tipo II con un papel protector. Los estudios centrados en comprender el papel de los linfocitos NKT han obtenido resultados complejos. Ratones que no poseen linfocitos NKT y que han sido alimentados con dieta alta en grasa desarrollaron hígado graso. No obstante, los linfocitos NKT se han implicado en la activación de las células de Kupffer [79]. En pacientes con EHNA y en ratones alimentados con DAGAC se observa una acumulación de los linfocitos NKT hepáticos [80]. Se cree, por tanto, que en los primeros estadios el

hígado no posee apenas linfocitos NKT y que estos se van acumulando con la progresión de la enfermedad [79].

Los linfocitos T también contribuyen a la EHNA y son activados por el estrés oxidativo. La infiltración de linfocitos T correlaciona con el grado de severidad de la EHNA [81]. En modelos murinos de EHNA alimentados con DDCM se observó un incremento de los linfocitos Th1 en el hígado en estados tardíos de la enfermedad. Otro modelo de ratón alimentado con DDC mostró un incremento de las citoquinas IFN γ , IL12 y TNF α secretadas por los linfocitos Th1, además de un incremento del factor transcripcional TBET. Consecuentemente, en humanos se observa un incremento de los linfocitos Th1 en pacientes con EHGNA comparado con pacientes sanos [75]. Los linfocitos Th17 promueven la inflamación hepática al activar a las células de Kupffer mediante la producción de IL6, IL1 y TNF α , y la fibrogénesis al activar a las células estrelladas a través de IL17. De hecho, ratones obesos deficientes en IL17 desarrollaron menos esteatosis y daño hepatocelular [77]. En cuanto a los linfocitos Th9 se ha demostrado un aumento de estos en pacientes y en ratones con fibrosis así como un incremento de la secreción de IL9 de manera que al neutralizar IL9, se observa una disminución de la fibrosis y de la inflamación [82]. Por otro lado, Th22 podría tener un papel protector en el desarrollo de EHNA en ausencia de IL17 ya que ratones *IL17*^{-/-} alimentados con DDCM presentan infiltración de linfocitos Th22 que inhiben la vía de señalización de JNK a través de la secreción de IL22 [83]. Por tanto, IL22 secretado por los linfocitos Th22 parece tener un papel beneficioso al reducir la esteatosis, los niveles de transaminasas y la fibrosis. A pesar de ello, algunos de estos ratones desarrollan de CHC [75]. No obstante, en contraposición, otro estudio demostró que la inhibición de IL22 reduce la fibrosis hepática [84]. En modelos murinos de esteatosis inducido por dieta alta en grasa se ha observado una disminución de los linfocitos Treg junto con una activación de la vía de señalización de TNF. Por consiguiente, la transferencia de Treg disminuyó la inflamación [77]. Otro modelo murino de EHGNA demostró un aumento de la apoptosis inducida por ROS de las Treg hepáticas, lo que reducía su número. Por tanto, la expansión de las Treg atenuó la esteatosis y los niveles de transaminasas. A parte de regular el sistema inmune, se cree que las Treg podrían tener un papel antifibrótico gracias a su capacidad de secretar IL10 y TGF β [75].

6. La citoquina LIGHT(TNFSF14)

Los miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) están implicados en diversos procesos como la proliferación, la diferenciación, la producción de citoquinas, la apoptosis, el cambio de la clase de inmunoglobulinas y la coestimulación de los linfocitos T [85]. Las linfoquinas (LT) y la citoquina LIGHT/TNFSF14 (del inglés *lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes*) son miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral 14 (TNFSF14, del inglés *tumor necrosis factor superfamily 14*) [86].

LIGHT es una proteína transmembrana tipo II de 29 kDa compuesta por 239 aminoácidos con un dominio extracelular C-terminal con homología a TNF que forma homotrímeros para interactuar con sus receptores. Se localiza en el cromosoma 16p11.2 [87], [88]. En ratones, LIGHT presenta dos isoformas, una de ellas se encuentra en forma soluble en el citosol, mientras que la otra se encuentra anclada a la membrana mediante un dominio transmembrana. Esta isoforma es procesada proteolíticamente para producir la forma soluble [88].

LIGHT se expresa en células de sangre periférica entre las que se incluyen los linfocitos T, los linfocitos B, los linfocitos NK, los monocitos y los granulocitos y también se expresa en células dendríticas inmaduras. Esta proteína está implicada en el mantenimiento de la homeostasis en células dendríticas, plaquetas, monocitos y granulocitos, y actúa como molécula coestimuladora al estar involucrada en la regulación de la supervivencia y proliferación celular y en la respuesta inmune innata y adaptativa [89].

LIGHT se une a tres receptores: HVEM, expresado mayoritariamente en linfocitos T pero también en linfocitos B y en células dendríticas, el LT β R, expresado en las células estromales del tejido linfoide, en monocitos, mastocitos y en células dendríticas [90] y el TR6/DcR3 (del inglés *decoy receptor 3*) que sólo se ha detectado en humanos e inhibe la función de LIGHT [91]. La señalización de LIGHT/LT β R regula la interacción entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno y el eje LIGHT/HVEM está implicado en la coseñalización de los linfocitos T [88].

El LT β R y HVEM son receptores transmembrana glicosilados de tipo I que poseen tres dominios: extracelular, transmembrana e intracelular. En

el dominio extracelular se sitúan 4 dominios ricos en cisteína (CRD, del inglés *cysteine-rich domain*) que les confieren la especificidad y afinidad por los distintos ligandos. Estos receptores se clasifican a su vez en la familia de receptores TNF de no muerte pues carecen del dominio de muerte en su dominio intracelular. Sin embargo, poseen sitios de unión para las proteínas TRAF (del inglés *TNF receptor-associated factor*) que median la activación de las vías de señalización [92].

La citoquina LIGHT presenta gran homología con otros ligandos de la familia del TNF compartiendo receptores con los mismos de manera que la linfoxina $\alpha\beta$ (LT $\alpha\beta$) se une al LT β R, LT α a HVEM, y FasL y TL1A a TR6/DcR3 [93] (Figura 5).

6.1. Vías de señalización de LIGHT

6.1.1. El eje LIGHT/LT β R

El LT β R se une a dos miembros de la familia de TNF, a heterodímeros de LT $\alpha\beta$ y a LIGHT. LT $\alpha_1\beta_2$ y LIGHT se unen al receptor con alta afinidad mientras que LT $\alpha_2\beta_1$ se une con baja afinidad. La unión de los ligandos al LT β R produce su agregación iniciándose las distintas vías de señalización [94]. El LT β R se expresa de manera constitutiva en el estroma de los órganos linfoides, en el timo y en las células mieloides [92].

LIGHT, mediante su unión a LT β R, activa las vías de señalización canónica y no canónica del factor transcripcional NF- κ B. La activación de la vía clásica de NF- κ B está mediada por TRAF2/5 que, a su vez, activa la expresión de genes implicados en la inflamación, respuesta inmune, apoptosis y genes de respuesta a estrés. Por el contrario, la unión del receptor LT β R a TRAF3 activa la vía alternativa de NF- κ B que está implicada en la organogénesis linfóide, transformación celular y muerte celular por apoptosis [95]–[97]. En algunos contextos, TRAF3 conduce a la apoptosis celular a través de la activación de las caspasas [93].

La vía canónica implica a las proteínas p50, RELA y c-REL y se activa de manera rápida y transitoria por diversos estímulos como el estrés del RE, los ácidos grasos saturados y las citoquinas proinflamatorias. La cascada de señalización comienza con la activación de TAK1 (del inglés *TGF β -activated kinase 1*) que a su vez fosforila y activa el complejo trimérico IKK compuesto por las subunidades catalíticas IKK α e IKK β y la subunidad reguladora IKK γ o NEMO. A continuación, el complejo IKK

fosforila al inhibidor de la familia NF- κ B, I κ B (del inglés *inhibitor of κ B*) y a p105 lo que conlleva a la ubiquitinación y degradación de p105 por el proteasoma. Este proceso permite la liberación y maduración de p50 que es traslocada al núcleo junto a otras proteínas de la familia de NF- κ B como RELA y c-REL. Estas proteínas forman los complejos diméricos RELA-p50, c-REL-p50 y p50-p50 que se unen a secuencias específicas del ADN permitiendo la transcripción de diversos genes.

La vía no canónica implica a p52 y RELB, se activa de manera lenta y constante y sus inductores son los ligandos de la superfamilia TNFRSF. Esta vía comienza con la activación de la proteína NIK (del inglés *NF- κ B-inducing kinase*) que activa a la quinasa IKK α que fosforila a p100 permitiendo su maduración a p52 mediante ubiquitinación y degradación por el proteasoma. Una vez procesada, p52 se une a RELB formando dímeros que actúan como factores transcripcionales [98] (Figura 5).

Por tanto, la señalización de LIGHT a través de LT β R media la apoptosis in vitro, la diferenciación y el crecimiento celular, la producción de citoquinas inflamatorias, la linforganogénesis y la función de los órganos linfoides secundarios [93], [99], [100].

6.1.2. El eje LIGHT/HVEM

HVEM también es conocido como TNFRSF14 (del inglés *tumor necrosis factor receptor superfamily 14*), HveA (del inglés *herpes virus entry mediator A*), TR2 (del inglés *TNF receptor-like molecule 2*) y LIGHTR (del inglés *LIGHT receptor*). Este receptor posee varios ligandos: LT α , LIGHT, BTLA (del inglés *B and T lymphocyte attenuator*), CD160 y, dependiendo de qué ligando se una, producirá un tipo de señal diferente. De esta forma la unión de CD160 o BTLA en los linfocitos T produce una señal coinhibitoria mientras que la unión de LIGHT o LT α resulta en una señal activadora del sistema inmune. De hecho, LIGHT regula la actividad inhibitoria de BTLA/HVEM puesto que la forma unida a membrana bloquea la interacción de BTLA con HVEM. Por consiguiente, LIGHT, a través de su unión a HVEM y de la disrupción de BTLA/HVEM, activa la respuesta inmune [101].

Además, HVEM se une a la glicoproteína D del virus del herpes simple. HVEM se expresa en forma de monómero, pero tras la unión de sus ligandos forma complejos 3:3 [102], [103]. HVEM contiene 4 CRD. Los

ligandos BTLA, glicoproteína D y CD160 se unen al CRD1, mientras que LIGHT y LT α interactúan con el CRD2 y el CRD3 [104].

HVEM se expresa de manera constitutiva en los linfocitos T inmaduros y su expresión decrece a medida que aumenta su activación por lo que está implicado en la coestimulación de estos [104]. Por otro lado, HVEM está implicado en la regulación de la homeostasis de las células dendríticas, la inflamación y la defensa frente a patógenos. También tiene un papel fuera del sistema inmune regulando el desarrollo de neuronas sensoriales y el metabolismo de los adipocitos [103], [105].

La unión de LIGHT a HVEM recluta a TRAF2 y TRAF5 que activan las vías de señalización clásica de NF- κ B y de la MAPK de estrés JNK induciendo la expresión de genes implicados en la supervivencia celular, la proliferación celular y la producción de citoquinas [103], [105] (Figura 5). Específicamente, en los linfocitos T y B, el eje LIGHT/HVEM estimula su proliferación y la producción de IFN γ o Ig respectivamente [103]. Asimismo, HVEM se expresa en otras células hematopoyéticas como células dendríticas, linfocitos Treg, monocitos, neutrófilos y linfocitos NK; y células no hematopoyéticas como las células parenquimales. La activación de HVEM en estas células conlleva al desarrollo de sus funciones efectoras [102].

JNK pertenece a la superfamilia de las MAPKs y tiene varias isoformas. La señalización a través de JNK se induce por señales de estrés como la hiperlipidemia, las citoquinas y la hipoxia, entre otras. JNK se activa mediante la activación secuencial de las quinasas MAP3K o MKKK y MAP2K o MKK. Una de las isoformas de MAP3K implicadas en la vía de señalización de JNK es ASK1 (del inglés *apoptosis-sensing kinase 1*), que se encuentra formando un complejo inactivo en condiciones basales. MAPK2 tiene dos isoformas MKK4 y MKK7 que activan a JNK mediante la fosforilación en residuos de tirosina y treonina respectivamente. JNK activada fosforila a c-Jun en dos residuos de serina y forma dímeros con miembros de la familia de Fos (c-Fos), Jun (JunB y JunD) y ATF. Estos dímeros componen el factor transcripcional AP-1 que regula la inflamación, la producción de citoquinas, la apoptosis, la diferenciación, la proliferación y la migración celular, entre otras. [106], [107].

6.1.3. LIGHT y DcR3

El DcR3/TNFRSF6B (del inglés *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6b*)/TR6/M68 es un receptor soluble que carece del dominio transmembrana y del segmento citoplasmático. La proteína DcR3 humana posee 4 dominios CRD en el dominio N-terminal y unos 100 residuos del dominio C-terminal son de unión a proteoglicanos de heparán sulfato [108], [109].

El DcR3 neutraliza los efectos de los ligandos FasL, LIGHT y TLA1. El DcR3 inhibe la interacción de FasL-Fas lo que impide la inducción de la apoptosis y contribuye al desarrollo de desórdenes autoinmunes. Esta inhibición supone en células tumorales una ventaja ya que se vuelven resistentes a la apoptosis [105]. De hecho, niveles elevados de DcR3 se asocian a invasión y metástasis tumoral en mieloma múltiple. Por otro lado, la interacción de DcR3 con TLA1 reduce la respuesta de los linfocitos T desregulando la respuesta de las células inmunes. Así pues, la administración in vivo de DcR3 reduce la enfermedad de injerto contra huésped, inhibe el rechazo del aloinjerto de corazón y podría ser una posible estrategia para tratar enfermedades autoinmunes [108], [110].

La unión de DcR3 soluble a LIGHT bloquea la interacción LIGHT-HVEM en los linfocitos T mientras que el DcR3 en fase sólida coestimula a los linfocitos T mediante la señalización reversa de LIGHT [111]. Por tanto, la disrupción de la señalización LIGHT-HVEM disminuye la activación de los linfocitos T y la respuesta de estos a los aloantígenos [110]. El bloqueo de la interacción de LIGHT-LT β R bloquea la apoptosis inducida por esta vía de señalización [111].

Además, se ha demostrado que tras la activación de los linfocitos T, los leucocitos son capaces de secretar DcR3 lo que regula la interacción de los linfocitos T con otros leucocitos. Asimismo, DcR3 es capaz de modular la maduración de las células dendríticas [110], [111].

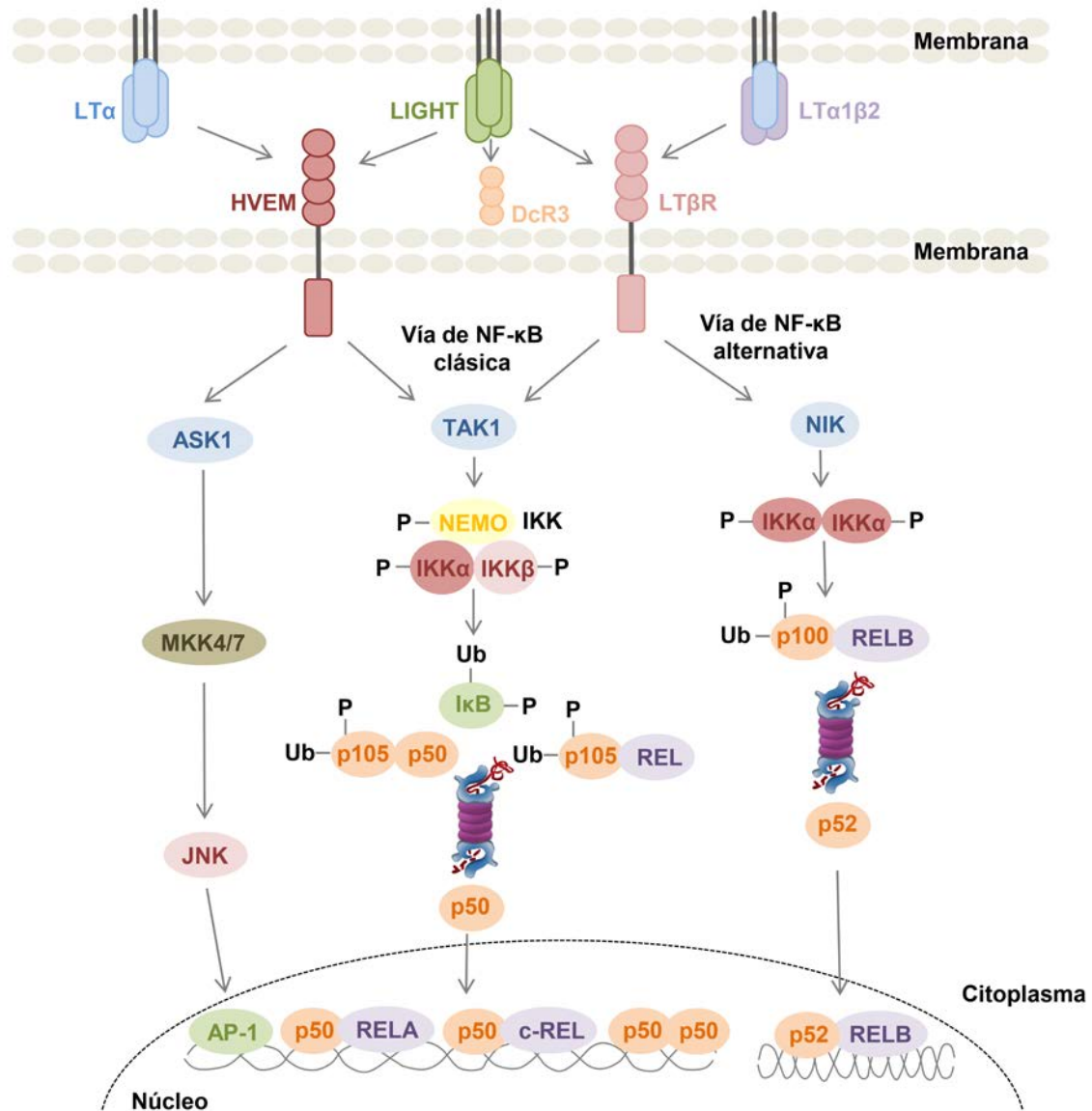


Figura 5. Vías de señalización de LIGHT. LIGHT se une a dos receptores de membrana, LTβR y HVEM y a un receptor soluble DcR3. HVEM y LTβR activan la vía de señalización clásica y alternativa de NF-κB. Además, HVEM activa la vía de JNK. LTα1β2 y LTα son otros ligandos de LTβR y HVEM, respectivamente. Adaptado de Lu, 2014 [96], Granger, 2003 [93] y Sun, 2017 [98].

6.2. Implicación del eje LIGHT/LTβR-HVEM en la inflamación, la DMT2 y la EHGNA

La citoquina LIGHT, a través de su señalización por los receptores de membrana LTβR y HVEM, se ha implicado en enfermedades en las que la inflamación juega un papel fundamental.

Se ha observado que ratones deficientes en HVEM y alimentados con dieta alta en grasa presentan una disminución de la inflamación del tejido adiposo y una mejora de la tolerancia a la glucosa. La reducción de la inflamación del tejido adiposo fue consecuencia de un menor contenido de macrófagos y linfocitos T CD4 y CD8 activados así como de una menor secreción por parte del tejido adiposo de TNF α , IL6 y MCP1 [112]. De acuerdo a los resultados anteriores, otro estudio concluyó que la deficiencia de HVEM disminuía la inflamación del tejido adiposo al reducir el número de macrófagos proinflamatorios y linfocitos T CD4 y CD8 en ratones que habían sido sometidos a ovariectomía [113].

Consistente con los estudios en el modelo murino, en otro estudio en humanos se observó un incremento en la expresión de HVEM en la grasa visceral de sujetos obesos comparado con sujetos delgados. El estudio de la expresión demostró la presencia de HVEM en células vasculares estromales y en los adipocitos maduros del tejido adiposo [114].

Estudios tanto in vitro como in vivo con ratones *Light*^{-/-} han demostrado que LIGHT inhibe la biogénesis de la grasa parda. Esta inhibición está mediada por el LT β R a través de la atenuación de la vía JNK. Además, se observó que LIGHT inhibe la adipogénesis del tejido adiposo blanco en presencia de exceso energético [115]. Del mismo modo, en adipocitos en cultivo LIGHT actúa como un inhibidor de la adipogénesis en los primeros estados de la diferenciación de los adipocitos e induce una respuesta inflamatoria en los adipocitos mediante la activación de la vía de NF- κ B [116]. Sin embargo, Liu y colaboradores en otro estudio concluyeron que la diferenciación hacia adipocitos podría estar regulada mediante la señalización LIGHT/LT β R en las células madre mesenquimales [117].

En línea con los resultados anteriores, en pacientes con obesidad mórbida y en sujetos con DMT2 se produce un aumento de la expresión de LIGHT [118], [119]. Además, el tratamiento con LIGHT de adipocitos cultivados incrementó la secreción de citoquinas proinflamatorias dependiente de NF- κ B y disminuyó la secreción de adiponectina y la expresión de genes adipogénicos [118]. En pacientes con DMT2 el tratamiento de células pancreáticas con un estímulo inflamatorio incrementa la secreción de LIGHT y altera la expresión de los receptores LT β R y HVEM. Además, en presencia de alta concentración de glucosa, LIGHT inhibe la secreción de insulina en las células pancreáticas [119].

Otros estudios, también asocian a LIGHT con la inflamación y el desajuste del metabolismo hepático. Ratones transgénicos para LIGHT (Tg-LIGHT) presentaron hepatomegalia y una histología hepática anormal, efectos que fueron asociados a la señalización mediada por $LT\beta R$. En este mismo estudio, la hepatectomía parcial resultó en la expresión de $LT\beta R$ en los hepatocitos y de $LT\alpha$ y LIGHT en los linfocitos y esta señalización fue esencial para la regeneración hepática [120]. Por otro lado, la señalización de $LT\beta/LT\beta R$ induce la producción de quimioquinas por las células estrelladas que favorecen el reclutamiento de leucocitos, de células progenitoras hepáticas y otras células estrelladas que promueven la regeneración y cicatrización hepática tras daño crónico [121]. Sin embargo, ratones deficientes $LT\beta R$ en hígado presentaron una menor incidencia de CHC. Además, los ratones *Light*^{-/-} alimentados con DDC y alta en grasa presentaron menor daño hepático que se correspondía con una reducción de linfocitos NKT intrahepáticos [122].

Otros estudios indicaron que LIGHT es capaz de regular la homeostasis lipídica, ya que ratones Tg-LIGHT presentan hipercolesterolemia e hiperlipidemia mediada por el $LT\beta R$. Estos efectos fueron mediados por una disminución de la expresión de la lipasa hepática la cual está implicada en la homeostasis lipídica [91], [123].

Consistente con un papel perjudicial de LIGHT, pacientes con EHGNA presentan niveles elevados de la citoquina circulante y mayores niveles de ARNm de HVEM y $LT\beta R$ en el hígado. En estudios in vitro, LIGHT incrementó la producción de IL8 en los hepatocitos Huh7 promovida por estrés oxidativo causado por el tratamiento con H_2O_2 [89].

Todos estos estudios indican que la citoquina LIGHT posee un papel relevante en enfermedades metabólicas como son la DMT2 y la EHGNA en las cuales la inflamación juega un papel fundamental.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Con todos los antecedentes anteriores que describen un papel inflamatorio de LIGHT a través de sus receptores LT β R y HVEM, y la asociación previa de estos genes con alteraciones metabólicas se planteó la siguiente hipótesis:

La dieta alta en grasa y alta en colesterol en ratones aumentará la vía de señalización LIGHT/LT β R-HVEM y la inflamación asociada a la esteatosis mientras que la inactivación génica de la citoquina LIGHT disminuirá la inflamación y la esteatosis hepática.

Para abordar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos generales y específicos:

OBJETIVO 1: Estudio de la deficiencia de la citoquina LIGHT en ratones WT alimentados con dieta control

- 1.1. Estudio de la función de LIGHT en el metabolismo en ratones alimentados con dieta control
- 1.2. Estudio de la función de LIGHT en la inflamación tisular y sistémica en ratones alimentados con dieta control

OBJETIVO 2: Estudio de la deficiencia de la citoquina LIGHT en ratones WT alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol durante 16 semanas

- 2.1. Estudio de la expresión del eje LIGHT/LT β R-HVEM en ratones WT en diferentes condiciones dietéticas
- 2.2. Estudio de la función de LIGHT en el metabolismo en ratones alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol
- 2.3. Estudio de la función de LIGHT en la inflamación tisular y sistémica en ratones alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol

OBJETIVO 3: Estudio de la deficiencia de la citoquina LIGHT en ratones parcialmente deficientes en *Irs2* y alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol durante 16 semanas

- 3.1. Estudio de la función de LIGHT en el metabolismo en ratones *Irs2*^{+/-} alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol
- 3.2. Estudio de la función de LIGHT en la inflamación tisular y sistémica en ratones *Irs2*^{+/-} alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudios in vivo en ratones

1.1. Ratones, genotipado y dietas

Los ratones utilizados para la realización de esta tesis fueron estabulados en el animalario de la Unidad Central de Investigación en Medicina (UCIM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. El manejo de los ratones y los procedimientos experimentales siguieron la directiva europea 2010/63/EU y el Real Decreto nacional 53/2013 para la protección de animales utilizados para fines científicos. El procedimiento fue autorizado por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural con el código 2016/VSC/PEA/00032.

Los ratones silvestres (WT, del inglés *Wild Type*) fueron obtenidos de CHARLES RIVER (Lyon, Francia), los ratones deficientes en la citoquina LIGHT, ratones *Light*^{-/-}, se obtuvieron del Laboratorio del profesor Dr. Klaus Pfeffer y rederivados en la empresa Vivotecnica (Tres Cantos, Madrid, España) y los ratones parcialmente deficientes en la proteína IRS2, ratones *Irs2*^{+/-}, fueron cedidos por la profesora Dr. Deborah J Burks. Los ratones *Irs2*^{+/-} se cruzaron con los ratones *Light*^{-/-} para obtener los ratones doble mutantes *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} y fueron genotipados mediante dos reacciones independientes de PCR (del inglés *polymerase chain reaction*) para detectar la ausencia parcial del gen *Irs2* y la ausencia total del gen *Light*. Los cebadores y condiciones de la PCR se indican en la [Tabla 1](#) y en la [Tabla 2](#). Todos los grupos de ratones utilizados fueron sometidos a retrocruces para su obtención en fondo genético C57BL/6J.

GEN	CICLOS	DESNATURALIZACIÓN	EMPAREJAMIENTO	ELONGACIÓN
<i>Irs2</i>	34	94°C, 1 minuto	94°C, 30 segundos	57°C, 30 segundos
<i>Light</i>	30	94°C, 5 minutos	94°C, 1 minuto	63°C, 30 segundos

Tabla 1. Condiciones de la PCR de *Irs2* y *Light*

GEN	CEBADOR	SECUENCIA 5'→3'
<i>Irs2</i>	OIMR upper	CTTGGCTACCATGTTGTTATTGTC
	OIMR lower	AGCTCTGGAGGTTTACTTTTCCTAG
	OIMR neo	GCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG
<i>Light</i>	pneo1	GACGTAAACTCCTCTTCAGAC
	type1	ACGCATGTGTCTCTGCGTGTGG
	type2	CGACAGACATGCCAGGAATGG

Tabla 2. Cebadores utilizados en la PCR para el genotipado

Los ratones fueron alimentados con dieta control (DC) (2.8% de grasa, PANLAB, Barcelona, España) y, a las 8 semanas de edad, se reemplazó por una dieta con alto contenido en grasa y en colesterol (DAGAC) (10.8% de grasa total, 0.75% de colesterol, S8492-E010, SSNIFF, Alemania) o se mantuvieron con la DC durante 16 semanas. Todos los experimentos se llevaron a cabo en ratones macho y ratones hembra.

1.2. Medidas metabólicas

1.2.1. Determinación del peso corporal, peso del hígado y distribución de la grasa corporal

Para determinar el peso corporal, los ratones se pesaron en una balanza. El hígado y la grasa epididimal, inguinal y mesentérica se diseccionaron del ratón mediante tijeras y se pesaron. El peso del hígado se expresó relativizado al peso corporal y la distribución de la grasa corporal se expresó como el porcentaje relativo al peso corporal de los ratones.

1.2.2. Determinación de lípidos circulantes en plasma y del contenido de ácidos grasos libres

Para la determinación de lípidos en sangre, los ratones fueron ayunados entre 15-20 horas. El plasma se aisló de sangre obtenida en presencia de anticoagulante EDTA (*Ethilenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate*, SIGMA, St. Louis, EEUU) mediante centrifugación durante 30 minutos a 13500g a 4°C.

Para el análisis de los niveles de lípidos se utilizaron kits comerciales. Para los triglicéridos se empleó el kit "*LabAssay Triglyceride*" (WAKO, St. Louis, MI, EEUU) y para el colesterol total (c-Total) y el colesterol HDL (c-HDL) se empleó el kit "*LabAssay Cholesterol*" (WAKO), procedimientos enzimáticos que dan lugar a un producto azulado que se lee a una longitud de onda de 600nm con un espectrofotómetro. Los valores se determinaron a partir de una curva patrón con concentraciones conocidas.

El c-HDL se determinó tras la precipitación de lipoproteínas ricas en apoB: para los ratones alimentados con DAGAC se utilizó para dicha precipitación $MgCl_2$ 1M y 20g/L de sulfato de dextrano (SIGMA) mientras que para los ratones alimentados con DC la precipitación se realizó con $CaCl_2$ 0.3M y 140U/mg de heparina cálcica (SIGMA).

Para analizar el contenido de NEFA se empleó un kit colorimétrico enzimático llamado "*Free Fatty Acid Quantitation Kit*" (SIGMA) que determina los ácidos grasos de más de 8 átomos de carbono. Para ello, el plasma se trató con ACS durante 30 minutos a 37°C. La reacción enzimática da lugar a tres productos: acil-CoA, adenosin monofosfato (AMP) y pirofosfato (PPi). Los acil-CoA, tras la adición en agitación de una mezcla de reacción a 37°C durante 30 minutos, se oxidan por la acción de la ACOX y generan peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 en presencia de peroxidasa reacciona con 3-metil-N-etil-N-(hidroxietil)-anilina (MEHA) dando un producto final de color púrpura que se lee a 570nm de longitud de onda. Para la cuantificación del color se utilizó una curva patrón obtenida a partir de concentraciones conocidas de ácido palmítico (1nmol/ μ l).

1.2.3. Determinación de la actividad de las enzimas hepáticas ALT y AST

Los niveles en sangre de ALT y AST (del inglés *alanine aminotransferase* y *aspartate aminotransferase*, respectivamente) fueron utilizados como marcadores de la función hepática y se analizó su actividad mediante kits comerciales (SIGMA) basados en reacciones cinéticas enzimáticas siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes. El análisis de la actividad se llevó a cabo mediante un ensayo enzimático acoplado que genera un producto colorimétrico con absorbancia a 570nm, para el ensayo ALT, y a 450nm para el ensayo AST.

Con una curva patrón de concentraciones conocidas de enzima como valores de referencia, la actividad enzimática se determinó a partir de plasma que, junto con la mezcla de reacción, se incubó a 37°C, tomando la medida inicial (T_{inicial}) de absorbancia a los 3 minutos de incubación. Se siguió realizando medidas cada 5 minutos hasta que el valor de la muestra con mayor actividad fue superior al valor más alto del patrón. La medida de absorbancia final fue la correspondiente al tiempo de la penúltima lectura del valor superior al patrón (T_{final}). Las curvas standard para ALT/AST se generan usando la lectura de las absorbancias de las concentraciones patrón a tiempo final. Se comparó entonces el valor medido de ΔA_{nm} para cada muestra con la curva estándar para determinar la cantidad de piruvato/glutamato generado entre el tiempo inicial y el tiempo final.

El cambio en la medida de la absorbancia de las muestras entre T_{inicial} y T_{final} da un valor de ΔA_{nm} :

$$\Delta A_{\text{nm}} = (A_{\text{nm}})_{\text{final}} - (A_{\text{nm}})_{\text{inicial}}$$

La actividad ALT/AST se calculó como:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{B \times \text{Factor de dilución}}{(T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}}) \times \text{Volumen}}$$

B: nmoles de piruvato (ALT) o glutamato (AST) generados entre el tiempo inicial y el tiempo final

T_{inicial} : tiempo, en minutos, de la primera lectura

T_{final} : tiempo, en minutos, de la penúltima lectura

V: volumen de muestra (ml) añadida al pocillo

La actividad de ALT/AST se expresa en nmol/min/ml, o lo que es lo mismo, en miliunidades(mU)/ml, donde una mU se define como la cantidad de enzima que genera 1 nmol de piruvato/glutamato por minuto.

1.2.4. Estudios de tolerancia a la glucosa y determinación de los niveles de glucosa e insulina

La tolerancia a la glucosa se determinó mediante el test de tolerancia a la glucosa (TTG). Los ratones fueron ayunados entre 15-17 horas y se les inyectó intraperitonealmente una dosis de glucosa de 2g/Kg de peso corporal a partir de una solución estéril al 20% de glucosa (SIGMA). Tras

la inyección, los niveles de glucosa e insulina se analizaron a diferentes tiempos: 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. Los niveles de glucosa se midieron directamente en sangre utilizando un glucómetro (Ascensia Elite, BAYER, Sant Joan Despí, España) y los niveles de insulina se determinaron en el plasma mediante ELISA (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) según las instrucciones del fabricante (CRYSTALCHEM, Zaandam, Holanda). 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. Durante la incubación de 2 horas a temperatura ambiente (TA) con agitación, la insulina de la muestra reacciona con el anticuerpo anti-insulina unido a la placa y con el anticuerpo anti-insulina conjugado a la enzima peroxidasa. Tras varios lavados, para la eliminación del exceso de enzima no unido a la insulina, el inmunocomplejo se detecta por reacción con el sustrato TMB (3,3', 5,5' tetramethylbenzidine). La reacción se detiene mediante la adición de H_2SO_4 0.5M para dar un producto final con color que se lee a 450nm. Las concentraciones se determinaron a partir de una curva patrón con concentraciones conocidas de insulina. A partir de esta curva se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras.

Los resultados del test se analizaron calculando el parámetro del área debajo de la curva (AUC, del inglés *area under the curve*) que es el área resultante de la curva generada al representar la concentración de glucosa frente a diferentes tiempos ($AUC_{glucosa}$) y la concentración de insulina frente a diferentes tiempos ($AUC_{insulina}$).

1.2.5. Determinación de la resistencia a la insulina mediante la evaluación de la sensibilidad a la insulina

Los estudios de sensibilidad a la insulina se llevaron a cabo mediante el test de tolerancia a la insulina (TTI) en ratones ayunados durante 4 horas. Para ello se inyectó intraperitonealmente insulina recombinante (ACTRAPID 100UI/ml, NovoNordisk, Bagsvaerd, Alemania) a una dosis de 0.5U/Kg de peso corporal. Tras la inyección se analizaron los niveles de glucosa en sangre a diferentes tiempos: 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Los resultados fueron analizados mediante el $AUC_{glucosa}$ resultante de la curva generada al representar la concentración de glucosa respecto a los diferentes tiempos.

2. Obtención y procesamiento de tejidos

Tras los tiempos de dieta indicados, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se procedió a la disección longitudinal desde la base del abdomen hasta la parte superior del tórax para dejar visibles las vísceras. Para eliminar la sangre de los tejidos, se seccionó la aorta a nivel de la bifurcación ilíaca y los ratones se perfundieron con 1-2ml de tampón fosfato salino (PBS1X, del inglés *phosphate buffered saline*) mediante una aguja 23G introducida en el ápice del corazón. Se extrajeron el hígado, la grasa epididimal, inguinal y mesentérica, el bazo y el timo. Para los estudios de expresión, el hígado, la grasa, el bazo y el timo fueron congelados rápidamente en N₂ líquido y guardados a -80°C hasta su procesado. Para los estudios histopatológicos, el hígado y la grasa fueron fijados in situ mediante perfusión con PFA (paraformaldehído) al 4% (SIGMA) durante 4 horas. Tras la fijación, se hizo un lavado con PBS1X de 5 minutos y se dejaron los tejidos durante toda la noche en etanol al 70% a 4°C. Al día siguiente, se procedió a la deshidratación en cadena de alcoholes de gradación creciente para su posterior inclusión en parafina como se indica a continuación: un lavado de 15 minutos con etanol al 80%, un lavado de 15 minutos con etanol al 96%, dos lavados de 7 minutos con etanol absoluto, dos lavados de 7 minutos con etanol absoluto/xileno (50/50) y dos lavados de 7 minutos con xileno, incubación en parafina 15-17h e inclusión en parafina en moldes histológicos con una estación de parafina Leica EG1150H y una placa fría EG1150C (LEICA, Wetzlar, Alemania) . Posteriormente los tejidos se cortaron con un microtomo Leica RM2125RTS (LEICA) a un grosor de 5µm para realizar las diferentes tinciones.

3. Caracterización histopatológica del hígado

La caracterización histopatológica del hígado se realizó en cortes histológicos consecutivos. Para la desparafinación e hidratación, los cortes se sometieron de forma secuencial a lavados de xileno y alcohol de gradación decreciente como se indica en la [Tabla 3](#).

Desparafinación e hidratación	Repeticiones y tiempo
Xileno	3 lavados de 5 minutos
Etanol absoluto	2 lavados de 5 minutos
Etanol 95%	2 lavados de 5 minutos
Etanol 70%	2 lavados de 2 minutos
Etanol 50%	2 lavados de 2 minutos
Agua MilliQ	1 lavado de 5 minutos

Tabla 3. Protocolo de desparafinación e hidratación de cortes histológicos en parafina

3.1. Determinación de la EHGNA en cortes histológicos de hígado

La determinación del grado de la EHGNA se realizó mediante diferentes parámetros basados en la tinción de hematoxilina/eosina en secciones de hígado y consistió en: inmersión de los cortes durante 4 minutos en una solución comercial de hematoxilina de Harris (SIGMA), aclaramiento con agua unos 5 minutos, 2 lavados rápidos en solución de diferenciación (0.25% (v/v) de HCl en etanol al 70%), un lavado de 2 minutos en una solución hidroalcohólica de eosina (SIGMA) al 50 %, deshidratación en etanol de gradación creciente (2 minutos en etanol 50%, 2 minutos en etanol 70% y 2 minutos en etanol absoluto) y xileno (2 minutos) y montaje con Eukitt (DELTALAB). Los reactivos utilizados se indican en la [Tabla 4](#). La captura de las imágenes tanto de las tinciones como de las inmunohistoquímicas se realizó con una cámara acoplada al microscopio Leica DMD108 (LEICA).

REACTIVO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Solución de Hematoxilina de Harris	SIGMA, St. Louis, EEUU	HHS32
Eosina	SIGMA, St. Louis, EEUU	E4382

Tabla 4. Reactivos para la tinción histológica de hematoxilina/eosina

Los parámetros utilizados para cuantificar las distintas características indicativas del grado de severidad de la EHGNA fueron: la esteatosis, la degeneración balonizante de los hepatocitos y la inflamación lobular. Estos parámetros se valoraron mediante puntuaciones como se indica en la [Tabla 5](#). La suma de todas ellas proporciona el grado de EHGNA conocido como NAS (del inglés *NAFLD activity score*) [124].

CARACTERÍSTICA	DEFINICIÓN	PUNTUACIÓN
Esteatosis	<5%	0
	5%-33%	1
	>33%-66%	2
	>66%	3
Inflamación lobular	Sin focos (~3mm ² área)	0
	<2 focos (~3mm ² área)	1
	2-4 focos (~3mm ² área)	2
	>4 focos (~3mm ² área)	3
Degeneración balonizante	Ninguna célula	0
	Alguna célula	1
	Muchas células	2

Tabla 5. Puntuaciones para la evaluación del NAS

3.2. Determinación de la fibrosis hepática

Para la cuantificación de la fibrosis, los cortes histológicos de hígado fueron teñidos mediante la tinción tricrómica de Masson utilizando un kit comercial (BIO-OPTICA, Milán, Italia) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el porcentaje del área de colágeno relativo al área total (μm^2).

3.3. Determinación del contenido de triacilgliceroles hepáticos

Para la determinación del contenido lipídico en el hígado de ratón, 90-120mg de tejido fue sometido a digestión y saponificación en 350 μl de hidróxido de potasio etanólico durante toda la noche a 55°C. Al día siguiente, las muestras se llevaron a un volumen final de 1000 μl con H₂O:EtOH (50:50). Las muestras se centrifugaron a 13500g durante 5 minutos. El sobrenadante resultante se diluyó hasta un volumen de 1200 μl de H₂O:EtOH (50:50) y, de este volumen total, 200 μl se precipitaron con 215 μl de MgCl₂ 1M durante 10 minutos en hielo. Tras una centrifugación a 13500g durante 5 minutos se determinó el contenido en glicerol con 3 μl del sobrenadante. Se utilizó el reactivo "*Free Glycerol Reagent*" (SIGMA), donde la enzima glicerol quinasa (GK, del inglés *glycerol kinase*) cataliza la fosforilación del glicerol con ATP formando glicerol-1-fosfato (G-1-P, del inglés *glycerol-1-phosphate*) y adenosín difosfato (ADP, del inglés *adenosin diphosphate*). Tras esto, el G-1-P es oxidado por la glicerol fosfato oxidasa (GPO, del inglés *glycerol phosphate oxidase*) a dihidroxiacetona fosfato (DAP, del inglés *dihydroxiacetone phosphate*) y H₂O₂. La peroxidasa cataliza la reacción entre H₂O₂, 4-aminoantipirina (4-AAP) y N-ethyl-N-(3-sulfopropil) m-anisidina (ESPA) para producir una quinoneimina que absorbe a un máximo de 540nm y es proporcional a la concentración de glicerol libre de la muestra. Para calcular el contenido de triacilglicerol en el hígado se aplicó la fórmula para el contenido en equivalentes de trioleína [125]:

$$\text{CET} = \text{CTG (mg/dl)} * 415/200 * 0.012 \text{ (dl)} / \text{peso en gramos} * 9,61$$

CET: contenido en equivalentes de trioleína

CTG: contenido de triacilgliceroles

3.4. Determinación del contenido de macrófagos hepáticos

Para determinar el contenido en macrófagos o células de Kupffer en hígado se realizó una inmunohistoquímica empleando un anticuerpo frente al antígeno específico de macrófagos F4/80 (Tabla 6). Las secciones histológicas desparafinadas e hidratadas (Tabla 3) se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno al 0.3% en PBS1X durante 30 minutos para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Tras tres lavados con PBS1X de 5 minutos, las secciones histológicas fueron sometidas a exposición del antígeno en tampón citrato de sodio (10mM, pH 6.5 a alta presión y temperatura) seguido del bloqueo de las interacciones no específicas durante 90 minutos con una solución de bloqueo de PBS1X-suero de caballo al 5%. Seguidamente, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario anti-F4/80 diluido 1/50 en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado a biotina (diluido 1/200 en solución de bloqueo) durante 45 minutos seguido de 3 lavados con PBS1X (Tabla 7). La detección del inmunocomplejo se realizó con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*) diluida 1/10000 en PBS1X durante 30 minutos seguido del revelado con el cromógeno DAB (diaminobencidina) un compuesto que, en presencia de la enzima HRP, forma un precipitado marrón. Finalmente, se realizó una contratinción con hematoxilina de Harris para la detección de núcleos celulares y se procedió a la deshidratación y montaje de las muestras teñidas como se ha descrito en el apartado 3.1. Tras la toma de imágenes el contenido de macrófagos se expresó como número de células positivas para el marcador F4/80 con respecto al área total del hígado (μm^2).

3.5. Determinación del contenido de linfocitos T hepáticos

La detección del infiltrado de linfocitos T en el hígado se realizó mediante inmunofluorescencia. Tras la hidratación del tejido, según lo indicado en la Tabla 3, los cortes histológicos fueron sometidos a exposición del antígeno como se indica en el apartado 3.4 y bloqueo de interacciones no específicas con suero de caballo al 5% durante 90 minutos a TA. A continuación, los cortes fueron incubados con el anticuerpo policlonal humano frente al marcador de linfocitos T CD3 (Tabla 6) diluido 1/75 en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche y, tras

3 lavados con PBS1X, se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 (Tabla 7) diluido 1/200. La tinción nuclear se realizó con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Las muestras se montaron con el reactivo Slow-Fade Gold. Las inmunofluorescencias fueron fotografiadas con una cámara acoplada al microscopio confocal Leica TCS SP8 (LEICA). Tras la toma de imágenes se cuantificó el número de células T, es decir, células positivas para el marcador CD3 por área de hígado (μm^2).

3.6. Determinación de la autofagia en hígado mediante el marcador p62/SQSTM1

Para la determinación de la autofagia, secciones de hígado fueron desparafinadas e hidratadas (Tabla 3) y se procedió a la exposición del antígeno con tampón citrato (apartado 3.4), bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en PBS1X y bloqueo de las interacciones inespecíficas con suero de caballo al 10% como se describe en los apartados anteriores. A continuación, se procedió a la incubación con el anticuerpo anti-SQSTM1 diluido 1/100 en suero de caballo al 10% durante toda la noche a 4°C (Tabla 6) seguido de lavados con PBS1X e incubación durante 1 hora a TA con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP diluido 1/200 (en suero de caballo al 10%) (Tabla 7). Los inmunocomplejos se detectaron mediante revelado con el cromógeno DAB y se realizó contratinción (apartado 3.4), deshidratación y montaje de las muestras como se describe en el apartado 3.1. La expresión de SQSTM1 se calculó como el porcentaje del área de p62/SQSTM1+ con respecto al área total del hígado (μm^2).

3.7. Expresión de los receptores LT β R y HVEM y de la citoquina LIGHT en hígado

Para analizar la expresión de los receptores de LIGHT, LT β R y HVEM, y de la propia citoquina LIGHT se llevaron a cabo inmunofluorescencias. Para una mejor localización de las proteínas se realizaron inmunofluorescencias dobles con el marcador de macrófagos F4/80. Tras la hidratación del tejido (Tabla 3) se procedió al desenmascaramiento del antígeno con tampón citrato sódico, bloqueo de las interacciones no específicas con suero de caballo al 5% (apartado 3.4) e incubación con los anticuerpos primarios de rata anti-F4/80 (D1/50) combinado con el

anticuerpo de conejo anti-LT β R (D1/200), anti-HVEM (D1/100) o anti-LIGHT (D1/100) durante toda la noche a 4°C (Tabla 6). Tras lavados con PBS1X se procedió a la incubación durante 1 hora con los anticuerpos secundarios fluorescentes anti-ratón IgG Alexa Fluor 594 y anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 diluidos 1/200 en solución de bloqueo (Tabla 7), tinción nuclear con DAPI y montaje con Slow-Fade Gold. Tras el montaje, se tomaron las imágenes con un microscopio confocal.

ANTICUERPO		CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Anti-F4/80	Monoclonal de rata	AbD SEROTEC (Bio-Rad Laboratories), Hercules, CA, EEUU	MCA497G
Anti-CD3	Monoclonal de conejo	DAKO, Brüsseler Straße, Berlín, Alemania	A0452
Anti-SQSTM1(p62)	Policlonal de conejo	INVITROGEN (Thermofisher), Waltham, MA, EEUU	PA5-27247
Anti-LT β R	Policlonal de conejo	ABCAM, Cambridge, Reino Unido	ab70063
Anti-HVEM	Policlonal de conejo	THERMOFISHER, Waltham, MA, EEUU	PA5-20237
Anti-LIGHT	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Dallas, TX, EEUU	sc2880

Tabla 6. Anticuerpos primarios empleados en las inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Cabra anti-rata IgG biotinilado	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Dallas, TX, EEUU	sc-2041
Cabra anti-conejo IgG biotinilado	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Dallas, TX, EEUU	sc-2040
Alexa Fluor-488 anti-conejo IgG	LIFE TECHNOLOGIES (Thermofisher), Waltham, MA, EEUU	A21206
Alexa Fluor-594 anti-rata IgM	LIFE TECHNOLOGIES (Thermofisher), Waltham, MA, EEUU	A11005
Estreptavidina-HRP	ABCAM, Cambridge, Reino Unido	ab7403
DAB	AbD SEROTEC (Bio-Rad Laboratories), Oxford, Reino Unido	BUF021A
DAPI	LIFE TECHNOLOGIES (Thermofisher), Waltham, MA, EEUU	D1306
Eukitt	DELTALAB, Barcelona, España	A10500
Slow-Fade Gold	INVITROGEN (Thermofisher), Carlsbad, CA, EEUU	S36936

Tabla 7. Anticuerpos secundarios y reactivos empleados en las inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias

4. Caracterización del tejido adiposo

4.1. Cuantificación del tamaño de los adipocitos

Para cuantificar el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo, las secciones histológicas fueron hidratadas y teñidas con hematoxilina/eosina. Los reactivos empleados para esta tinción se encuentran en la [Tabla 4](#). El protocolo seguido se describe en el apartado 3.1. Tras la tinción se tomaron las imágenes de los cortes y se cuantificó el tamaño de los adipocitos que se expresó como área de adipocito (μm^2).

4.2. Expresión de los receptores LT β R y HVEM en macrófagos del tejido adiposo

La evaluación de la expresión de los dos receptores de LIGHT en los macrófagos del tejido adiposo se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia doble LT β R-F4/80 y HVEM-F4/80 (Tabla 6) como se describe en el apartado 3.7. Se cuantificó el porcentaje de área de macrófagos positivos para el LT β R o para el HVEM con respecto al área total de tejido adiposo (μm^2).

4.3. Análisis de la fracción vascular estromal del tejido adiposo mediante citometría de flujo

La FVE fue aislada de la grasa epididimal tras la digestión con 1mg/ml de colagenasa tipo I (LS004194, WORTHINGTON, Lakewood, NJ, USA) durante 30 min a 37°C. A continuación, las células de la FVE fueron recogidas, lavadas y fijadas con *Zombie Aqua fixable viability kit* (BIOLEGENED, San Diego, CA, EEUU). Todos los anticuerpos y reactivos utilizados se encuentran en la Tabla 8.

Se determinaron los subtipos de monocitos con 30 μl de células que se tiñeron durante 30 minutos a TA con los anticuerpos anti-F4/80, anti-CD11c y anti-CD206 y se lisaron los eritrocitos con el tampón de lisis. Las distintas poblaciones fueron analizadas utilizando el citómetro de flujo *FACSVerse*. Se determinaron los macrófagos M1 como las poblaciones F4/80+CD11c+CD206- y los macrófagos alternativos M2 como las poblaciones F4/80+CD11c-CD206+.

Para analizar los linfocitos de la FVE, 40 μl de células fueron incubadas durante 30 minutos con los siguientes anticuerpos: se añadió 5 μl de tampón *Brilliant Stain*, seguido de los anticuerpos, anti-CD4, anti-CD45, anti-CD69 y anti-CD3e. Tras el lisado de los eritrocitos con 250 μl de solución de lisis se analizaron los linfocitos T CD3+ y CD4+ totales y sus respectivas activaciones, CD3+CD69+ y CD4+CD69+ mediante citometría de flujo.

Para caracterizar los linfocitos Treg se incubó 100 μl de células con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25 durante 30 min a TA. A continuación, se procedió a la fijación/permeabilización de las células con 1ml del tampón correspondiente durante 30 minutos a 4°C. Tras varias centrifugaciones

para eliminar el tampón, se trataron las células con el tampón de permeabilización durante 30 minutos a 4°C. Seguidamente, tras lavados mediante centrifugaciones, se incubaron las células durante 30 minutos a 4°C con el anticuerpo anti-Foxp3. Se repitió el lavado de las células mediante centrifugaciones y se lisaron los eritrocitos con 300µl de solución de lisis. Se analizó por un citómetro de flujo. Los linfocitos Tregs son la población CD4+CD25+Foxp3+.

Para el análisis de los subtipos de los linfocitos Th, 100µl de células se incubó durante 30 minutos a TA con los siguientes anticuerpos: anti-CCR4(CD194), anti-CD4, anti-CXCR3(CD183) y anti-CCR6(CD196). Tras la incubación se lisaron los eritrocitos con tampón de lisis y se analizó mediante el citómetro de flujo *Fortessa Flow cytometers* (BD BIOSCIENCES). Los linfocitos Th se determinaron a partir de las células CD4+ y, de estas, los linfocitos Th1 CXCR3+, Th2 CCR6-CCR4+, Th9 CCR6+CCR4- y Th17 CCR6+CCR4+.

5. Caracterización de la inflamación sistémica en ratón

5.1. Análisis de las citoquinas circulantes en plasma

Para el estudio de las citoquinas circulantes, el plasma fue aislado a partir de sangre heparinizada (10U heparina/ml) mediante centrifugación a 13500g durante 30 minutos a 4°C. Los niveles circulantes en plasma de las citoquinas MCP1, TNF α , IL6, IFN γ , IL17, TGF β , IL2, IL4 e IL1 β se midieron mediante técnicas de ELISA utilizándose los "*Quantikine ELISA kits*" (R&D SYSTEMS, Minneapolis, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.2. Caracterización de las células circulantes mediante citometría de flujo

La caracterización de las células circulantes se realizó mediante citometría de flujo en sangre entera. Todos los anticuerpos y reactivos empleados en la citometría se muestran en la [Tabla 8](#).

Para la caracterización de las diferentes poblaciones leucocitarias circulantes y los subtipos de monocitos se incubó 10µl de sangre heparinizada con los anticuerpos murinos anti-CD45, anti-Ly6C y anti-

CD115 durante 30 minutos a TA. Seguidamente se procedió al lisado de los eritrocitos con 250µl de solución de lisis durante 10 minutos a TA y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo con el citómetro *FACSVerse* (BD BIOSCIENCES, CA, EEUU). Los linfocitos, monocitos y neutrófilos se determinaron mediante el marcador CD45. Las subpoblaciones monocitarias Ly6C^{low} y Ly6C^{hi} fueron determinadas dentro de la población doble positiva para los marcadores de monocitos CD115 y leucocitario CD45.

Para analizar los linfocitos circulantes, 10µl de sangre heparinizada fueron incubados durante 30 minutos con los siguientes anticuerpos: se añadió 5 µl de tampón *Brilliant Stain*, seguido de los anticuerpos, anti-CD4, anti-CD8a, anti-CD69 y anti-CD3e. Tras el lisado de los eritrocitos con 250µl de solución de lisis se analizaron los linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ totales y sus respectivas activaciones, CD3+CD69+, CD4+CD69+ y CD8+CD69+ mediante citometría de flujo.

Para caracterizar los linfocitos Treg se incubó 50µl de sangre heparinizada con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25 durante 30 min a TA. A continuación, se procedió como en el protocolo descrito en el apartado 4.3. Los linfocitos Tregs son la población CD4+CD25+Foxp3+.

Para el análisis de los subtipos de los linfocitos Th, 30µl de sangre heparinizada se incubaron con los anticuerpos correspondientes como se describe en el apartado 4.3. Los linfocitos Th se determinaron a partir de las células CD4+ y, de estas, los linfocitos Th1 CXCR3+, Th2 CCR6-CCR4+, Th9 CCR6+CCR4- y Th17 CCR6+CCR4+.

ANTICUERPO		CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Anti-Ly6C PerCP	Producido en rata	BD PHARMINGEN, Madrid, España	560525
Anti-CD115 APC	Producido en rata	BIOLEGEN, San Diego, CA, EEUU	135509
Anti-CD45 FITC	Producido en rata	BD PHARMINGEN, Madrid, España	553079
Anti-CD4 Brilliant violet (BV)	Producido en rata	BD PHARMINGEN, Madrid, España	562891
Anti-CD8a Brilliant violet (BV)	Producido en rata	BD PHARMINGEN, Madrid, España	563068
Anti-CD69 phycoerythrin (PE)	Producido en hamster	BD PHARMINGEN, Madrid, España	553237
Anti-CD3e allophycocyanin	Producido en hámster	BD PHARMINGEN, Madrid, España	553066
Brilliant Stain Buffer		BD PHARMINGEN, Madrid, España	563794
Anti-CD4 VioBlue	Producido en rata	MILTENYI, Bergisch Gladbach, Alemania	130-102-774
Anti-CD25 APC	IgG recombinante humano	MILTENYI, Bergisch Gladbach, Alemania	130-109-052
Anti-Foxp3 PE	Producido en ratón	MILTENYI, Bergisch Gladbach, Alemania	130-093-014
FoxP3 Staining Buffer Set		MILTENYI, Bergisch Gladbach, Alemania	130-093-142
Anti-CD4 FITC	Producido en rata	MILTENYI, Bergisch Gladbach, Alemania	130-102-541
Anti-CCR4 (CD194) BV421	Producido en hámster	BIOLEGEN, San Diego, CA, EEUU	131217
Anti-CXCR3(CD183) APC	Producido en hámster	eBIOSCIENCE, (Thermofisher), Waltham, MA, EEUU	17-1831-80
Anti-CCR6(CD196) PEVio770	IgG recombinante humano	MILTENYI, Bergisch Gladbach, Alemania	130-103-818
anti-F4/80 APC	Producido en rata	AbD SEROTEC (Bio-Rad Laboratories), Hercules, CA, EEUU	MCA497APTC
anti-CD11c PE	Producido en hámster	eBIOSCIENCE, (Thermofisher), Waltham, MA, EEUU	12-0114-81
Anti-CD206 AlexaFluor488	Producido en rata	AbD SEROTEC (Bio-Rad Laboratories), Hercules, CA, EEUU	MCA2235A488T
Facs Lysing solution		BD PHARMINGEN, Madrid, España	349202

Tabla 8. Anticuerpos y reactivos utilizados en citometría de flujo

6. Estudios in vitro y ex vivo

6.1. Obtención de cultivos primarios de macrófagos de ratón

La manipulación de cultivos celulares se realizó en campana de flujo laminar de bioseguridad nivel 1I-A. El crecimiento de las células se llevó a cabo en condiciones constantes de temperatura (37°C) y concentración de CO₂ (5%). Las células se cultivaron con medios en presencia de penicilina (100U/ml), estreptomycin (0.1mg/ml) y anfotericina B (P/S/A).

Los macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) fueron obtenidos a partir de precursores de médula ósea diferenciados in vitro en presencia de M-CSF (del inglés *macrophage colony stimulation factor*) como factor de crecimiento y de diferenciación. Dichos precursores se obtuvieron a partir de la médula ósea del fémur y de la tibia mediante la disgregación mecánica con dos pases a través de una aguja 19G. La suspensión celular obtenida se sembró en placas de cultivo estándar con medio de cultivo DMEM (del inglés *Dulbecco's modified eagle medium*)-P/S/A, 10% suero bovino fetal (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) y 10% de medio condicionado de células L929 (LCM, del inglés *L929-cell conditioned medium*) como fuente de M-CSF. Los progenitores de médula ósea se plaquearon a una concentración de 3x10⁶ células/ml y se cultivaron durante 7 días con cambios de medio al tercer y sexto día [126]. El medio LCM se obtuvo recogiendo el sobrenadante de células L929 mantenidas en confluencia durante 5-7 días con medio DMEM-P/S/A y 10%FBS.

6.2. Cultivo de explantes de tejido adiposo y caracterización de la secreción de citoquinas

Para los cultivos de explantes de grasa, grasa epididimal de los diferentes grupos de ratones fue seccionada y mantenida en hielo. A continuación, la grasa fue troceada en pequeñas secciones de 2-3mm³ e incubada en placas de cultivos de 6 pocillos a 100mg/ml con medio DMEM-P/S/A y 10% de FBS durante 24 horas. Tras tres lavados con PBS1X se reemplazó el medio por medio de ayuno consistente en DMEM-P/S/A y 0.1%FBS durante otras 24 horas. Tras este tiempo, se recogió el sobrenadante y se guardó a -80°C para el posterior análisis de la secreción de citoquinas mediante los kits comerciales DuoSet ELISA (R&D SYSTEMS).

7. Estudios de expresión de proteínas mediante Western blot

7.1. Obtención y cuantificación de extractos proteicos

Para la extracción de proteínas se utilizaron entre 50mg y 100mg de tejido por muestra. Los extractos proteicos fueron obtenidos por homogeneización con la ayuda de micromorteros manuales. Los extractos de grasa se obtuvieron en presencia de un tampón de lisis (HEPES 50mM, NaCl 150mM, 10% glicerol y 1% Triton X-100) suplementado con 100mM Dithiothreitol (DTT), Complete Mini cocktail (ROCHE, Mannheim, Alemania), 100mM β -glicerolphosphate (SIGMA), 100mM PhenylMethylSulfonyl Fluorid (PMSF) (ROCHE), 1mM Na_3VO_4 (SIGMA) e inhibidores de fosfatasas PhosSTOP (ROCHE). Para los extractos proteicos de hígado se empleó el tampón de lisis TNG (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 1% Tween-20 y 0.2% NP-40) suplementado con Complete Mini cocktail, 50mM β -glicerolphosphate, 2mM PhenylMethylSulfonyl Fluorid, 200 μ M Na_3VO_4 e inhibidores de fosfatasas PhosSTOP. Los homogeneizados se sometieron a tres ciclos de congelación en N_2 líquido, descongelación en baño a 37°C y agitación durante 30 segundos. A continuación, se centrifugaron a 13500g durante 30 minutos a 4°C para eliminar los restos no disgregados y el sobrenadante resultante se cuantificó y se congeló a -80°C para su posterior análisis por Western blot.

La cuantificación de los extractos proteicos se realizó mediante el método de Bradford [127] con Coomassie Blue G-250 (BIO-RAD LABORATORIES), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, que al reaccionar con la proteína produce un producto azulado que se lee a 595nm. Las concentraciones se obtuvieron a partir de una curva patrón con disoluciones de concentraciones conocidas de BSA (del inglés *bovine serum albumin*) en un rango de entre 0.25 y 2 μ g/ μ l en la que se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras.

7.2. Análisis de la expresión proteica mediante SDS-PAGE y Western blot

El análisis de las proteínas presentes en los distintos extractos proteicos se realizó mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE

(del inglés *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*), Western blot e inmunodetección de las proteínas, de acuerdo con lo descrito en "*Current Protocols in Protein Science*" [128] utilizando los anticuerpos primarios y secundarios descritos en las [Tablas 9 y 10](#). La electroforesis SDS-PAGE permite separar las proteínas en función de su peso molecular [129]. Previamente a su carga en el gel, los extractos proteicos se diluyeron en agua milliQ y laemmlí en presencia de SDS y se calentaron a 95°C durante 5 minutos con el fin de desnaturalizar las proteínas y hacer constante su relación carga/masa. De esta forma se consigue una separación dependiente exclusivamente del tamaño. Se empleó un sistema vertical de electroforesis discontinua con un gel superior de concentración de las bandas de poliacrilamida al 4% y uno un gel inferior al 12% para la separación de las proteínas LTβR, HVEM, LIGHT y CHOP. La electroforesis se llevó a cabo en un tampón compuesto por 25mM Tris, 192mM glicina y 0.1% SDS durante 90 minutos a un voltaje variable entre 80 y 120V. La transferencia de las proteínas desde el gel de acrilamida a la membrana Immobilon-P de Polifluoruro de vinilideno (PVDF, MERCK, Kenilworth, NJ EEUU) se realizó con un sistema MiniProtean (BIO-RAD LABORATORIES) en frío durante 90 minutos a 100V constantes y en un tampón compuesto por 25mM Tris, 192mM glicina y 20% metanol (pH 8.3). Tras la transferencia, las membranas se incubaron en solución de bloqueo consistente en 0.1% BSA en PBS1X con 0.05% Tween 20 durante 1 hora a TA en agitación. La incubación con los anticuerpos primarios específicos se realizó en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Tras tres lavados de 5 minutos con TPBS1X (0.05% Tween-20 en PBS1X) para eliminar los restos de anticuerpo primario, las membranas se incubaron durante 1 hora a TA con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a HRP. La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante quimioluminiscencia con el reactivo ECL-Plus y empleando el sistema de adquisición y análisis de imagen Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (FUJIFILM, Tokio, Japón).

ANTICUERPO		CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Anti-CHOP (D46F1)	Monoclonal de conejo	CELL SIGNALING, Danvers, MA, EEUU	5554
Anti-HVEM(TNFRSF14)	Policlonal de conejo	THERMOFISHER, Waltham, MA, EEUU	PA5-20237
Anti-LIGHT	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, CA, EEUU	sc2880
Anti-LT β R	Policlonal de conejo	ABCAM, Cambridge, Reino Unido	ab70063
Anti- β -actina	Monoclonal de ratón	SIGMA, St. Louis, EEUU	A5441

Tabla 9. Anticuerpos primarios utilizados en el Western blot

ANTICUERPO		CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Producido en cabra	DAKO, Brüsseler Straße, Berlín, Alemania	P0488
Goat anti-mouse IgG-HRP	Producido en cabra	DAKO, Brüsseler Straße, Berlín, Alemania	P0447
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent		GE HEALTHCARE, Chicago, IL, EEUU	RPN2236

Tabla 10. Anticuerpos secundarios y reactivo utilizados en el Western blot

8. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

8.1. Obtención y cuantificación de extractos de ARN

Para la extracción de ARN, aproximadamente 100 mg de hígado, grasa, bazo y timo fueron homogenizados utilizando 1ml del reactivo TRIzol (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EEUU) con un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA WERKE GMBH&Co., Staufen, Alemania). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadió cloroformo y se procedió a la separación de las fases mediante centrifugación (12000g, 15 minutos,

4°C). El ARN se precipitó con isopropanol durante toda la noche a -20°C. Tras un lavado del ARN precipitado con etanol al 75% y secado al aire, el ARN se resuspendió en agua libre de ADNasa/ARNasa (SIGMA) ultrapura comercial y se cuantificó en un Nanodrop (THERMO SCIENTIFIC, Waltham, MA, EEUU) mediante medida espectrofotométrica a 260nm de longitud de onda. La pureza se estimó mediante la relación $A_{260/280}$, siendo esta superior a 1.8 en todos los extractos analizados. El extracto de ARN obtenido se almacenó a -80°C hasta su análisis. En todo momento, a lo largo del protocolo de extracción de ARN, se emplearon reactivos y tubos libres de ARNasas.

8.2. Retrotranscripción del ARN y análisis de la expresión génica mediante qPCR

Para la obtención de ADN complementario a partir de ARN total, entre 0.5-1µg por muestra fueron retrotranscritos usando el kit comercial “*Maxima First Strand cDNA Synthesis kit*” (FERMENTAS, Waltham, MA, EEUU) siguiendo el protocolo del fabricante. Para el análisis de la expresión génica por qPCR se utilizó el kit “*Luminars Color HiGreen (High ROX)-qPCR Master Mix*” (FERMENTAS) mediante el termociclador 7900Fast System (APPLIED BIOSYSTEM, Foster City, CA, EEUU). Los cebadores utilizados se obtuvieron de la base de datos *PrimerBank PCR Primers for Gene Expression Detection and Quantification* del Massachusetts General Hospital de la Harvard Medical School (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) y se muestran en la [Tabla 11](#). Para la cuantificación de la expresión génica la estrategia empleada fue la cuantificación relativa que requiere de estándares y permite la obtención de la magnitud de los cambios fisiológicos en niveles de expresión genética de un gen en estudio respecto con otro de referencia. La cuantificación se llevó a cabo en base al valor del ciclo umbral (Ct) mediante el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [130]. Este método permite hallar la relación entre los valores Ct de la muestra y de control a través de la ecuación:

$$\text{Ratio} = 2^{-(\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ referencia})} \rightarrow \text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Mediante la transformación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ eliminamos las variaciones debidas al efecto “tubo” (diferencias producidas por la degradación parcial del ARN en alguna muestra, distinta eficiencia en la transcripción inversa, errores de pipeteo, etc) al incluir un control endógeno y obtenemos un valor directamente proporcional a la cantidad total de transcrito de cada gen,

pudiendo comparar así cantidades de expresión de un gen respecto a otro dentro de un mismo grupo o entre grupos. Siguiendo este método los niveles de ARNm de cada gen fueron normalizados a los niveles del ARNm del control endógeno, el gen *ciclofilina* y la expresión de los genes fue relativizada a las muestras control (RQ=1 para el control) en cada experimento.

GEN	CEBADOR	SECUENCIA 5'→3'
<i>Abca1</i>	Forward Reverse	CAGATGAAGCAGTTTTTCAGTCCT CACATTCCGGCTCTTTAGAAGG
<i>Abcg5</i>	Forward Reverse	AGAGGGCCTCACATCAACAGA CTGACGCTGTAGGACACATGC
<i>Abcg8</i>	Forward Reverse	CTGTGGAATGGGACTGTACTTC GTTGGACTGACCACTGTAGGT
<i>Acox</i>	Forward Reverse	TAACTTCCTCACTCGAAGCCA AGTTCCATGACCCATCTCTGTC
<i>Acta2</i>	Forward Reverse	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA TCGGATACTTCAGCGTCAGGA
<i>Cd11c</i>	Forward Reverse	ATGGAGCCTCAAGACAGGAC GGATCTGGGATGCTGAAATC
<i>Cd206</i>	Forward Reverse	GCATGGGTTTTACTGCTACTTGATT CAGGAATGCTTGTTTCATATCTGTCTT
<i>Cd36</i>	Forward Reverse	ATGGGCTGTGATCGGAACTG GTCTTCCAATAAGCATGTCTCC
<i>Chrebp</i>	Forward Reverse	AGATGGAGAACCGACGTATCA ACTGAGCGTGCTGACAAGTC
<i>Ciclofilina</i>	Forward Reverse	TGGAGAGCACCAAGACAGACA TGCCGGAGTCGACAATGAT
<i>Col1a1</i>	Forward Reverse	GCTCCTTTAGGGGCCACT CCACGTCTCACCATTGGGG
<i>Cyp7a1</i>	Forward Reverse	GGGATTGCTGTGGTAGTGAGC GGTATGGAATCAACCCGTTGTC
<i>Fasn</i>	Forward Reverse	GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT TGGGTAATCCATAGAGCCCAG
<i>Foxp3</i>	Forward Reverse	GCCAACGCCCAACAAG CCCCGCCACCTTTTCT
<i>Fxr</i>	Forward Reverse	GCTTGATGTGCTACAAAAGCTG CGTGGTGATGGTTGAATGTCC
<i>G6pase</i>	Forward Reverse	CGACTCGCTATCTCCAAGTGA GTTGAACCAGTCTCCGACCA
<i>Gata3</i>	Forward Reverse	GGTGGACGTACTTTTTAACATCGA CGTAGCCCTGACGGAGTTTC
<i>Hi</i>	Forward Reverse	CCCTGCGGGCCCTATG TTGGCATCATCAGGAGAAAGG
<i>Hvem(Tnfrsf14)</i>	Forward Reverse	CAGGCCCTACAGACAACAC ACTCGTCTCCCACAAGGAACT
<i>Klf2</i>	Forward Reverse	CTCAGCGAGCCTATCTTGCC CACGTTGTTTAGGTCCTCATCC
<i>Klf4</i>	Forward Reverse	GTGCCCCGACTAACCGTTG GTCGTTGAACTCCTCGGTCT

<i>Klf6</i>	Forward Reverse	GTTTCTGCTCGGACTCCTGAT TTCCTGGAAGATGCTACACATTG
<i>Klf10</i>	Forward Reverse	ATGCTCAACTTCGGCGCTT CGCTTCCACCGCTTCAAAG
<i>Ldlr</i>	Forward Reverse	TGACTCAGACGAACAAGGCTG ATCTAGGCAATCTCGGTCTCC
<i>Light</i>	Forward Reverse	CTCCAGCATTGCCACCACACT GGTGGCTGGAAACCAATGC
<i>Ltβr</i>	Forward Reverse	GCAAGCCTGAGACCTAGTTTCAG CCTTGTGTCCGAGGCTCAAT
<i>Lxr</i>	Forward Reverse	CTCAATGCCTGATGTTTCTCCT TCCAACCCTATCCCTAAAGCAA
<i>Mmp9</i>	Forward Reverse	CTGGACAGCCAGACACTAAAG CTCGCGGCAAGTCTTCAGAG
<i>Pepck</i>	Forward Reverse	CTGCATAACGGTCTGGACTTC CAGCAACTGCCCGTACTCC
<i>Pgc1a</i>	Forward Reverse	TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT CCACTTCAATCCACCCAGAAAG
<i>Ppara</i>	Forward Reverse	AGAGCCCCATCTGTCCTCTC ACTGGTAGTCTGCAAACCAAA
<i>Pparg</i>	Forward Reverse	GGAAGACCACTCGCATTCTT GTAATCAGCAACCATTGGGTCA
<i>Rorc</i>	Forward Reverse	GACCCACACCTCACAAATTGA AGTAGGCCACATTACTGCT
<i>Srbepc1</i>	Forward Reverse	TGACCCGGCTATTCCGTGA CTGGGCTGAGCAATACAGTTC
<i>Tbet</i>	Forward Reverse	GCCAGGGAACCGCTTATATG AACTTCCTGGCGCATCCA
<i>Tgfb1</i>	Forward Reverse	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG
<i>Tlr4</i>	Forward Reverse	ATGGCATGGCTTACACCACC GAGGCCAATTTGTCTCCACA
<i>Zbtb16</i>	Forward Reverse	CTGGGACTTTGTGCGATGTG CGGTGGAAGAGGATCTCAAACA

Tabla 11. Cebadores empleados en los estudios de expresión génica

9. Análisis estadísticos

Previo a la experimentación, se determinó el tamaño muestral mediante el programa GPower3.1 utilizando datos a priori obtenidos en experimentaciones anteriores. Los datos obtenidos fueron analizados y utilizados a menos que los datos estuvieran fuera de rango de la curva

estándar o las muestras se perdieran durante el experimento. Todos los datos cuantitativos se mostraron como la media \pm error estándar de la media e incluyen datos de los dos sexos. Se evaluó la normalidad de las muestras mediante el test D'Agostino-Pearson ómnibus (Software GraphPad Prism, La Jolla, CA, EEUU). En los experimentos con dos grupos, la existencia de diferencias estadísticamente significativas se evaluó mediante el test t-Student pareado de dos colas o el test Mann-Whitney U test no paramétrico (Software GraphPad Prism). En los experimentos con más de dos grupos se empleó un análisis de varianza unidireccional, el test One-way ANOVA, seguido de test de comparación múltiple Bonferroni (Software GraphPad Prism). El test de Grubbs se empleó para la identificación y eliminación de valores atípicos (Software GraphPad Prism). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

1. Estudio de la deficiencia de la citoquina LIGHT en ratones WT alimentados con dieta control

1.1. La deficiencia de *Light* no altera el metabolismo de carbohidratos en ratones WT alimentados con dieta control durante 16 semanas

El análisis del peso corporal ([Figura 6A](#)), el peso del hígado ([Figura 6B](#)), la grasa corporal y su distribución ([Figura 6C](#)) no mostró diferencias entre ratones WT y ratones *Light*^{-/-} alimentados con DC durante 16 semanas. Del mismo modo no hubo diferencias en los niveles de glucosa e insulina en estado de ayuno entre ambos grupos ([Figura 6D, E](#)).

La caracterización del metabolismo de carbohidratos en ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DC no mostró diferencias en la tolerancia a la glucosa, medido mediante el parámetro AUC_{glucosa} obtenido del TTG ([Figura 7A](#)). Tampoco se encontraron diferencias entre ambos grupos de ratones en la secreción de insulina estimulada por glucosa durante el TTG medido con el AUC_{insulina} ([Figura 7B](#)) ni en la sensibilidad a insulina, medida como el AUC_{glucosa} del TTI ([Figura 7C](#)).

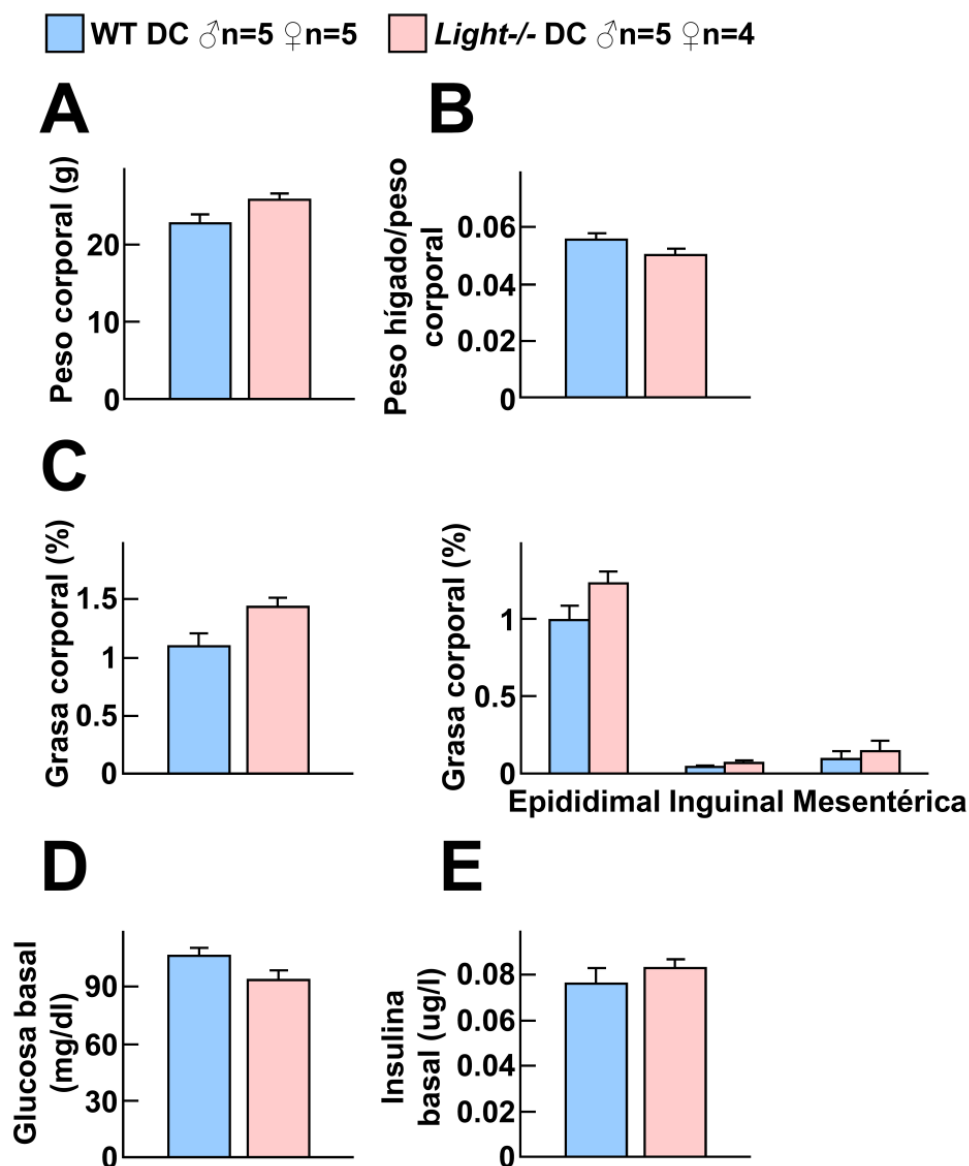


Figura 6. Peso corporal, peso del hígado, grasa corporal y niveles basales de glucosa e insulina en estado de ayuno de ratones WT y ratones *Light-/-* alimentados con DC. (A) Peso corporal (g), (B) peso del hígado relativo al peso total, (C) porcentaje de grasa corporal y porcentaje de la grasa epididimal, inguinal y mesentérica en ratones WT y ratones *Light-/-* alimentados con DC. (D) Glucosa e (E) insulina basal en estado de ayuno en ambos grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante la t de student's.

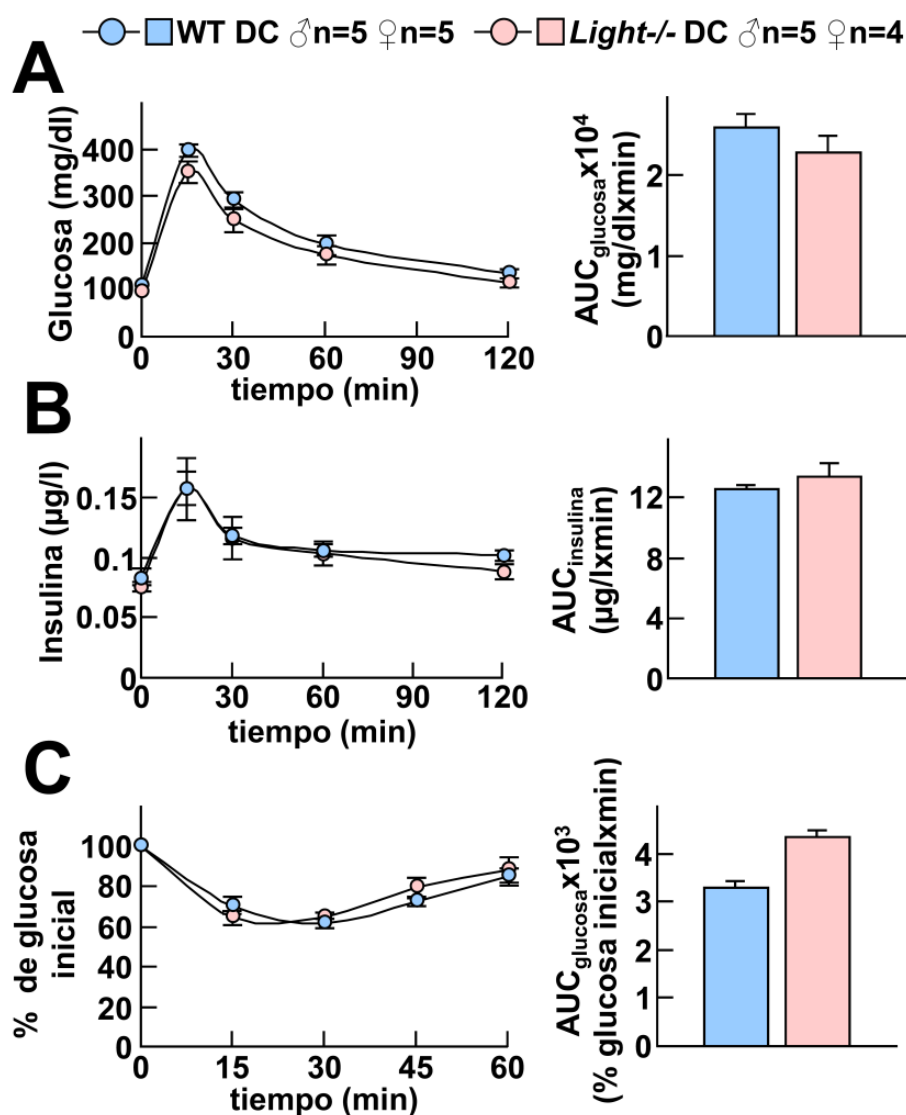


Figura 7. Caracterización metabólica de ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DC. (A) Niveles de glucosa y (B) de insulina en plasma a diferentes tiempos durante el TTG en ambos grupos de ratones que se utilizaron para calcular el $AUC_{glucosa}$ y el $AUC_{insulina}$ mostrados a la derecha de las curvas. (C) Niveles de glucosa plasmática (en porcentaje relativo a los niveles iniciales de glucosa) durante el TTI en ratones WT y ratones *Light*^{-/-} alimentados con DC durante 16 semanas. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's.

Los niveles plasmáticos de c-Total, c-apoB, c-HDL y triglicéridos fueron similares entre los ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DC (Figura 8).

Por tanto, la deficiencia en *Light* en ratones WT alimentados con DC no altera el metabolismo de los carbohidratos ni los niveles de lípidos plasmáticos.

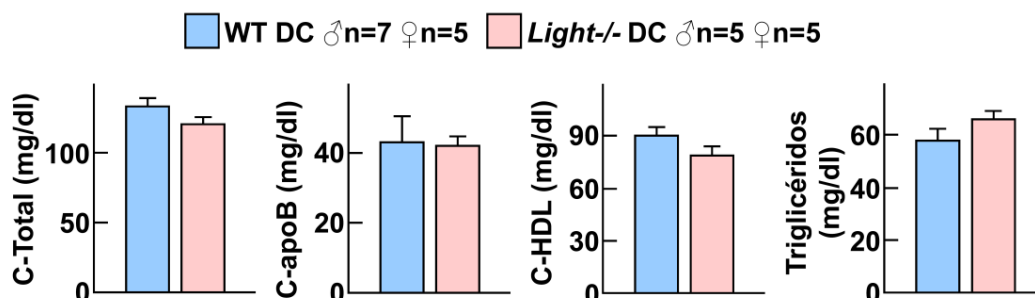


Figura 8. Niveles lipídicos en plasma de ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DC. C-Total, c-apoB, c-HDL y triglicéridos en ratones deficientes en *Light* y controles WT. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's.

1.2. Los ratones WT deficientes en *Light* y alimentados con dieta control no presentan cambios en la EHGNA

Seguidamente, se investigó el efecto de la deficiencia de *Light* en ratones WT en el desarrollo de la EHGNA en DC mediante el análisis del contenido de triglicéridos, la esteatosis hepática, la degeneración balonzante de los hepatocitos, la inflamación lobular y el NAS.

Los resultados obtenidos tras el análisis hepático no mostraron cambios en ninguno de estos parámetros entre ambos grupos de ratones alimentados con DC durante 16 semanas (Figura 9).

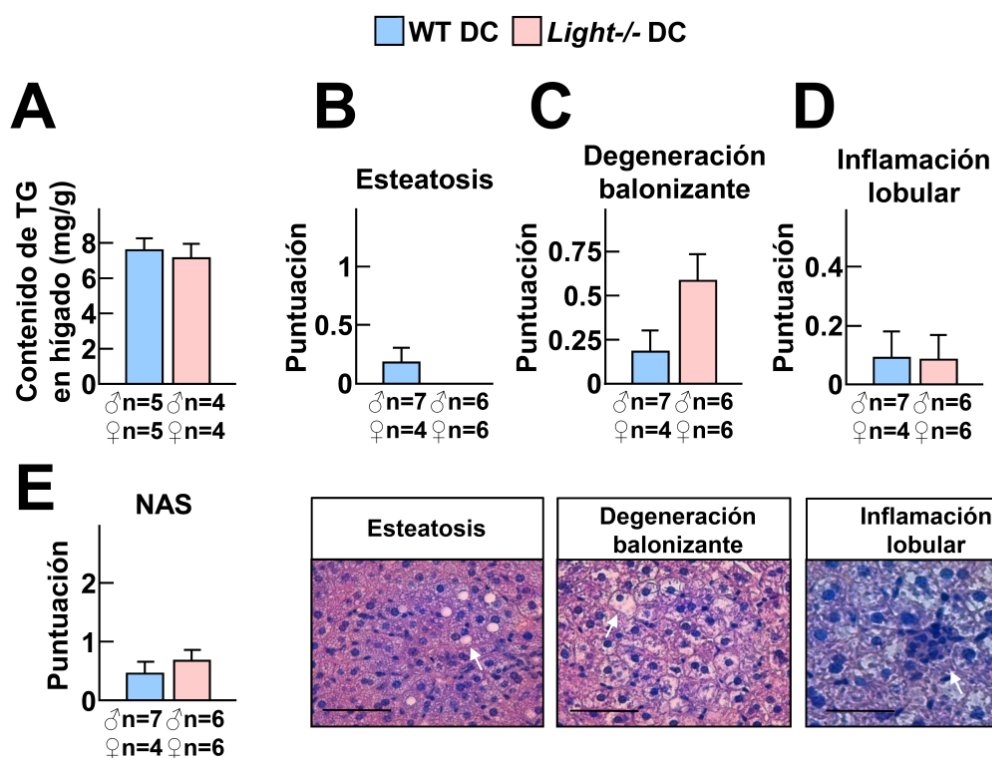


Figura 9. Caracterización de la EHGNA en ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DC durante 16 semanas. Análisis del (A) contenido de TG (mg/g), (B) de la esteatosis, (C) de la degeneración balonzante, (D) de la inflamación lobular y (E) del NAS en ambos grupos de ratones. Escala: 50µm. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (A, E) y el test de U Mann–Whitney (B-D).

Asimismo, la infiltración de macrófagos F4/80+ (Figura 10A) y de linfocitos T CD3+ (Figura 10B) y la fibrosis, medida como porcentaje de colágeno (Figura 10C), no se vieron alteradas en los ratones *Light*^{-/-} comparado con los ratones WT alimentados con DC.

Además, se analizaron los niveles plasmáticos de la actividad enzimática de ALT y AST, para determinar el daño hepático, y no se encontraron diferencias entre los ratones WT y los ratones *Light*^{-/-} alimentados con DC (Figura 11A, B).

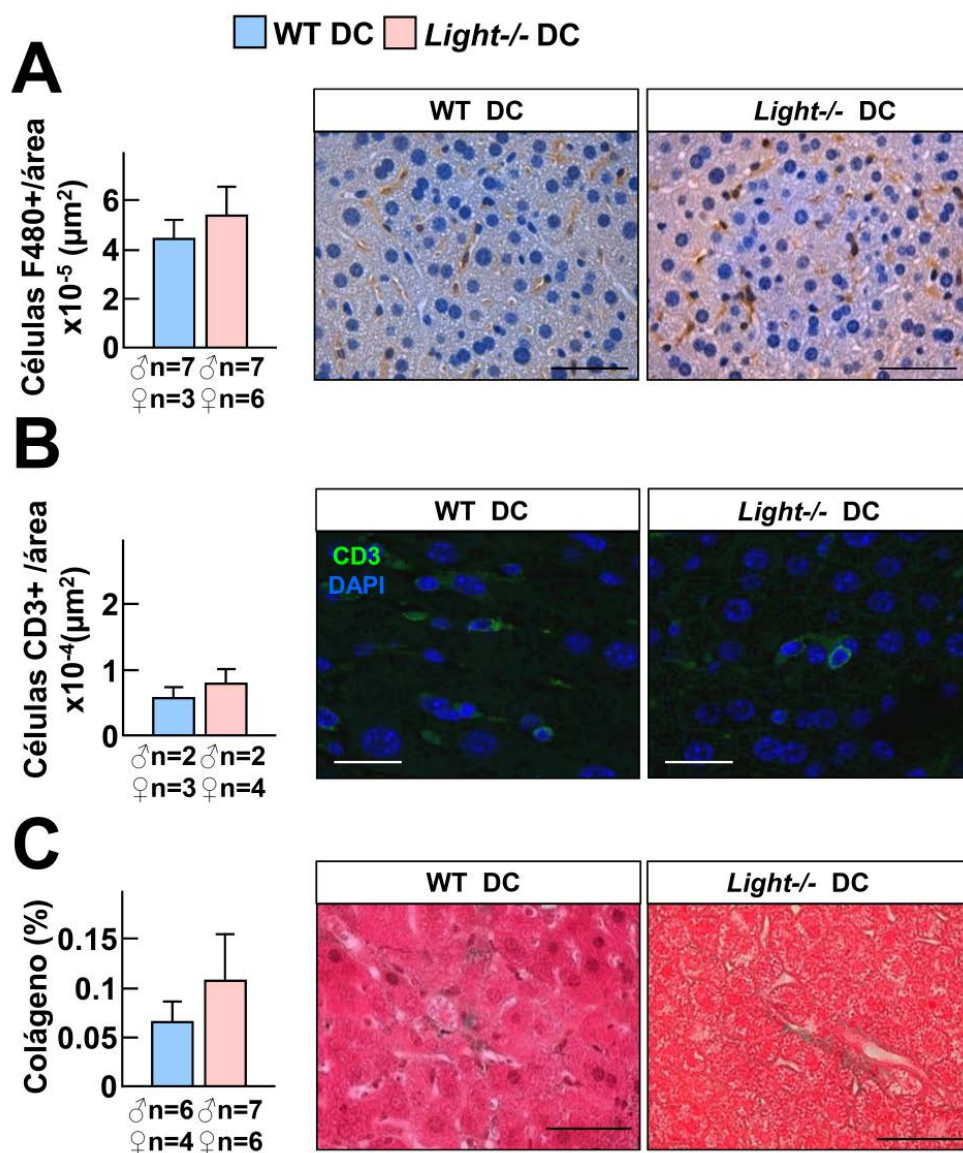


Figura 10. Contenido hepático de células inmunes y fibrosis en ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DC durante 16 semanas. Contenido de macrófagos **(A)** F4/80+ y de **(B)** linfocitos T CD3+ relativo al área total (μm²). **(C)** Fibrosis medida como porcentaje de colágeno (%) respecto al área total en cortes histológicos de ratones WT y ratones *Light*^{-/-} alimentados con DC. Escala: 50μm. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (A, C) y el test de U Mann–Whitney (B).

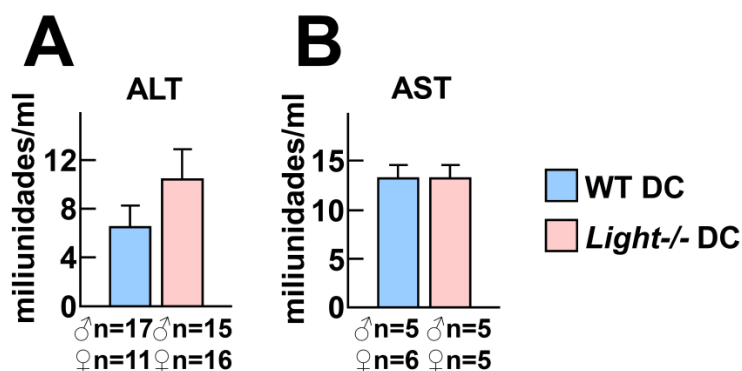


Figura 11. Actividad de las enzimas plasmáticas ALT y AST en ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DC. Niveles plasmáticos de la actividad de las enzimas **(A)** ALT y **(B)** AST en ambos grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's.

Además, la expresión de genes relacionados con la activación de las células hepáticas estrelladas, *Col1a1*, (Figura 12A) disminuyó en los ratones *Light*^{-/-} comparado con los WT ambos alimentados con DC. No se encontraron diferencias en *Acta2* (Figura 12A) ni en los genes asociados con la fibrosis *Mmp9*, *Timp1* y *Tgfb1* (Figura 12B) entre ambos grupos de ratones.

1.3. La inactivación de *Light* en ratones WT alimentados con dieta control no altera la inflamación del tejido adiposo

El exceso de acumulación de lípidos y la inflamación del tejido adiposo produce una liberación de ácidos grasos libres y citoquinas que promueven la aparición de hígado graso que, junto a la inflamación, conlleva al desarrollo de EHGNA y EHNA [131], [132].

Por lo que se caracterizó, a continuación, el fenotipo M1/M2 de los macrófagos de la FVE en ratones WT y *Light*^{-/-}. El análisis de los macrófagos y sus subtipos en la FVE del tejido adiposo no mostró diferencias en el porcentaje de macrófagos totales F4/80+ ni en los macrófagos proinflamatorios M1 F4/80+CD11c+ y antiinflamatorios M2 F4/80+CD206+ (Figura 13).

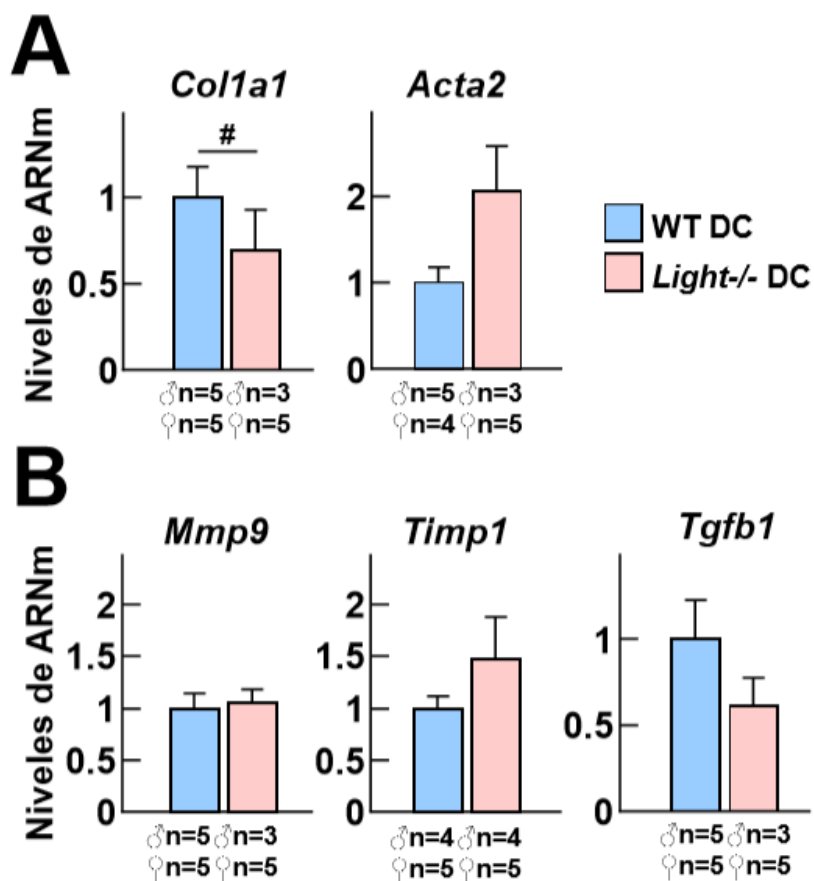


Figura 12. Expresión de marcadores de células estrelladas hepáticas y de fibrosis en ratones WT y *Light*^{-/-}. Niveles de ARNm de (A) *Col1a1*, *Acta2*, (B) *Mmp9*, *Timp1* y *Tgfb1*. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron con respecto al control, los ratones WT alimentados con DC. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (B *Timp1*) y el test de U Mann–Whitney (A, B *Mmp9* y *Tgfb1*) (# p=0.05).

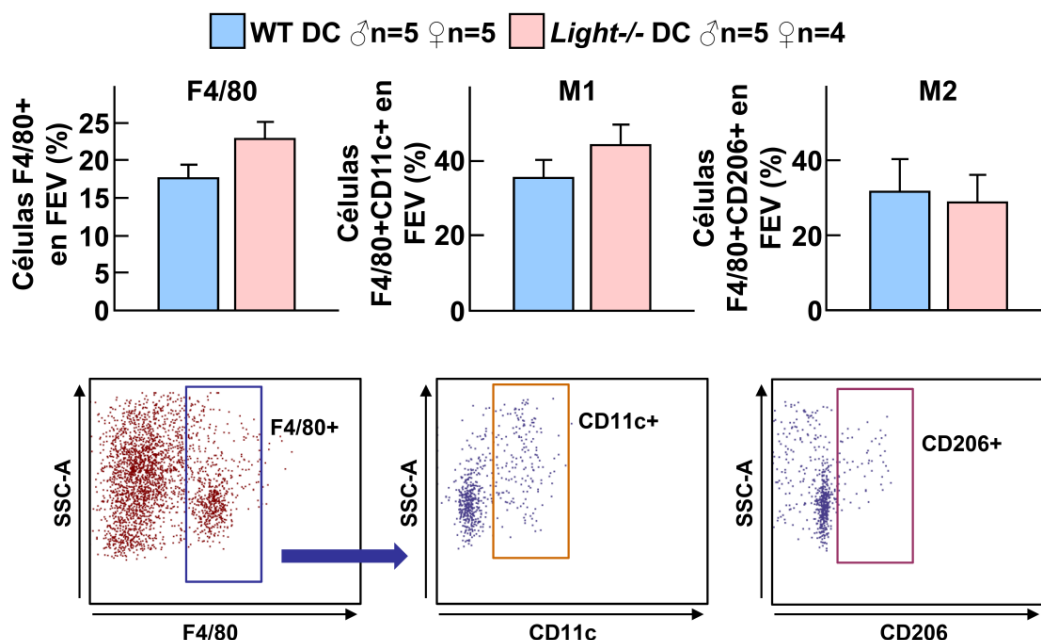


Figura 13. Análisis de los macrófagos de la FVE del tejido adiposo en ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DC. Porcentaje de macrófagos F4/80+, macrófagos M1 F4/80+CD11c+ y M2 F4/80+CD206+ en ambos grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's.

1.4. La inactivación de *Light*^{-/-} en ratones alimentados con dieta control no produce cambios en la inflamación sistémica

La inflamación se ha señalado como una característica de la EHGNA que induce la transición hacia la EHNA [133]. Sin embargo, el análisis de los leucocitos circulantes no mostró diferencias en las poblaciones totales de linfocitos, monocitos y neutrófilos entre ratones *Light*^{-/-} y sus controles WT alimentados con DC (Figura 14A). De manera similar, el análisis de los subtipos de monocitos Ly6C^{low} y Ly6C^{hi} tampoco reveló diferencias entre ambos grupos de ratones (Figura 14B).

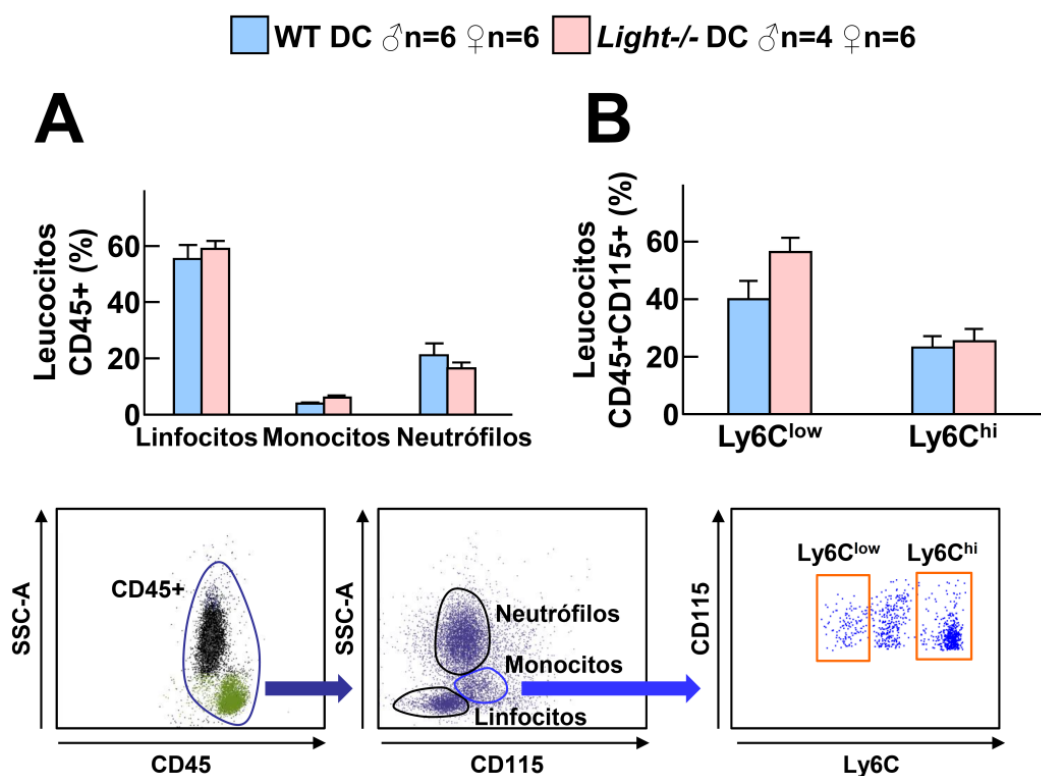


Figura 14. Poblaciones leucocitarias y subtipos de monocitos en ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DC. (A) Porcentaje de linfocitos, monocitos y neutrófilos de ratones WT y ratones deficientes en *Light* alimentados con DC. (B) Porcentaje de monocitos Ly6C^{low} y Ly6C^{hi} en ambos grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's.

El análisis de los linfocitos T totales CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺, los subtipos activados CD3⁺CD69⁺, CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ (Figura 15A) y los linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Figura 15B) no mostró diferencias en los ratones *Light*^{-/-} y WT. Los niveles de los subtipos de linfocitos Th1 CXCR3⁺, Th2 CCR4⁺CCR6⁻ y Th17 CCR4⁺CCR6⁺ fueron similares entre ambos grupos de ratones (Figura 15C). Curiosamente, se observó un incremento en los linfocitos Th9 CCR4⁻CCR6⁺ en los ratones *Light*^{-/-} comparado con los ratones WT (Figura 15C).

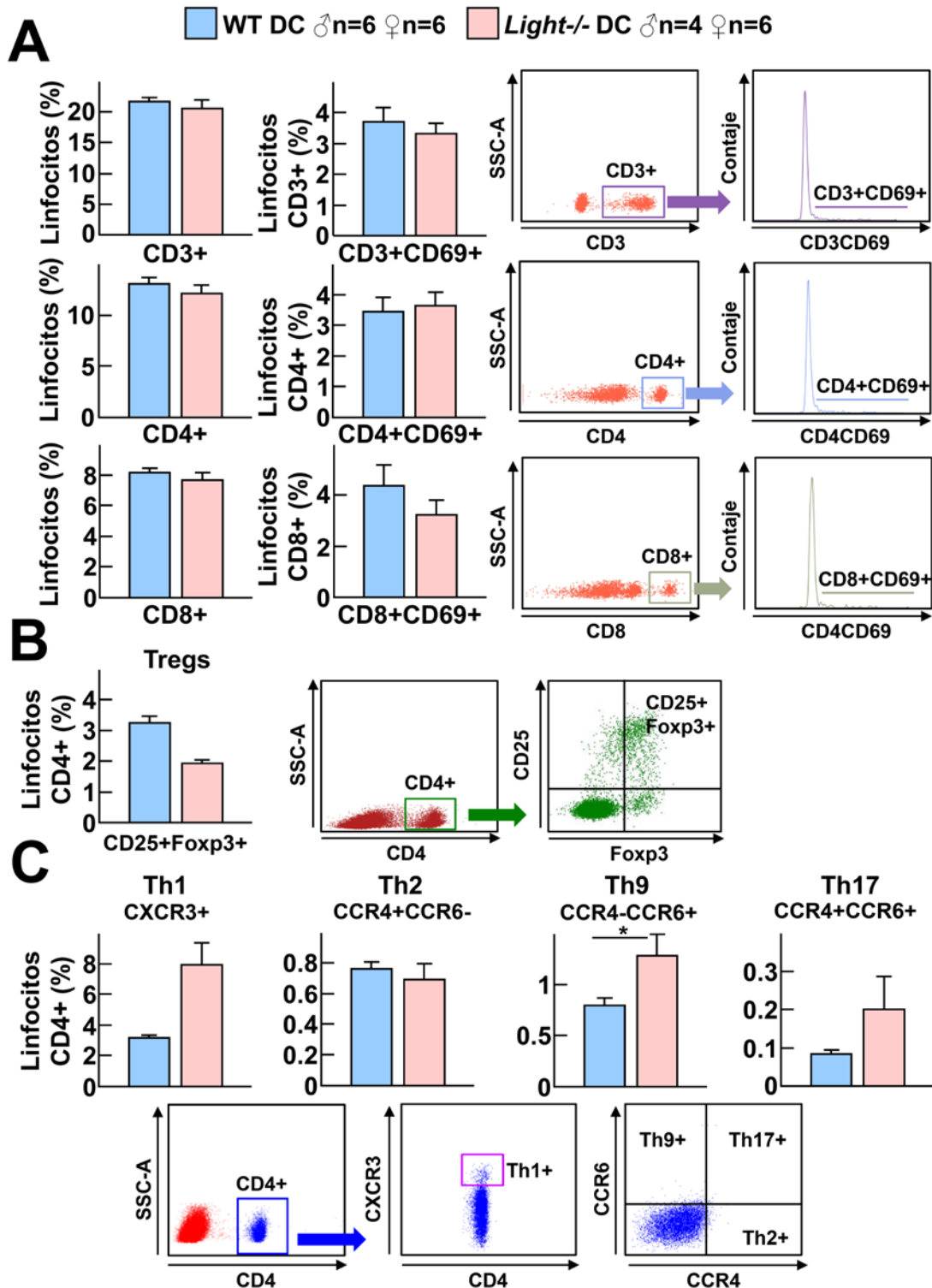


Figura 15. Análisis de los linfocitos en ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DC. (A) Porcentaje de linfocitos CD3⁺ y CD3⁺CD69⁺, CD4⁺ y CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺ y CD8⁺CD69⁺ en ratones WT y *Light*^{-/-}. (B) Porcentaje de linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en ambos grupos de ratones (C) Subtipos de linfocitos Th: Th1 CXCR3⁺, Th2 CCR4+CCR6⁻, Th 9 CCR4-CCR6⁺ y Th17 CCR4+CCR6⁺. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's para todas las poblaciones, excepto para la población Th17 que se aplicó el test de U Mann-Whitney (* p<0.05)

2. Estudio de la deficiencia de la citoquina LIGHT en ratones WT alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol durante 16 semanas

Dado que la ausencia de *Light* no afecta a la homeostasis hepática ni al metabolismo en condiciones de DC se procedió al estudio del impacto de la citoquina en condiciones de DAGAC. Con este fin, se evaluó el efecto de la DAGAC en la expresión del eje LIGHT/LT β R-HVEM, seguido del estudio del impacto de esta en los parámetros hepáticos y la inflamación. Además, por otro lado, se analizó el metabolismo, la inflamación y el desarrollo de la EHGNA en ratones WT y *Light*^{-/-} sometidos a dicha dieta durante 16 semanas.

2.1. Estudio de la expresión del eje LIGHT/LT β R-HVEM en ratones WT alimentados con dieta control o dieta alta en grasa y alta en colesterol

El análisis de los niveles circulantes de LIGHT no mostró diferencias entre los ratones WT alimentados con DC o DAGAC (Figura 16A). Asimismo, los niveles de ARNm de *Light* en tejido adiposo fueron similares en los ratones WT alimentados con DAGAC o DC (Figura 16B). Sin embargo, los niveles de ARNm de *Light* en hígado (Figura 16B) y de proteína de los receptores LT β R y HVEM en hígado (Figura 16C) y en tejido adiposo (Figura 16D) aumentaron en los ratones WT tras ser sometidos a 16 semanas de DAGAC comparado con los ratones WT alimentados con DC.

El estudio en hígado de la expresión de LIGHT/LT β R-HVEM, mediante inmunofluorescencias dobles del marcador de macrófagos F4/80+ con LT β R (Figura 17A), HVEM (Figura 17B) o LIGHT (Figura 17C) mostró expresión mayoritariamente de los receptores en las células parenquimales del hígado. Sin embargo, la expresión de LIGHT se localizó tanto en macrófagos como en los otros tipos celulares hepáticos.

Estos resultados indican que la DAGAC incrementa la señalización de LIGHT/LT β R-HVEM.

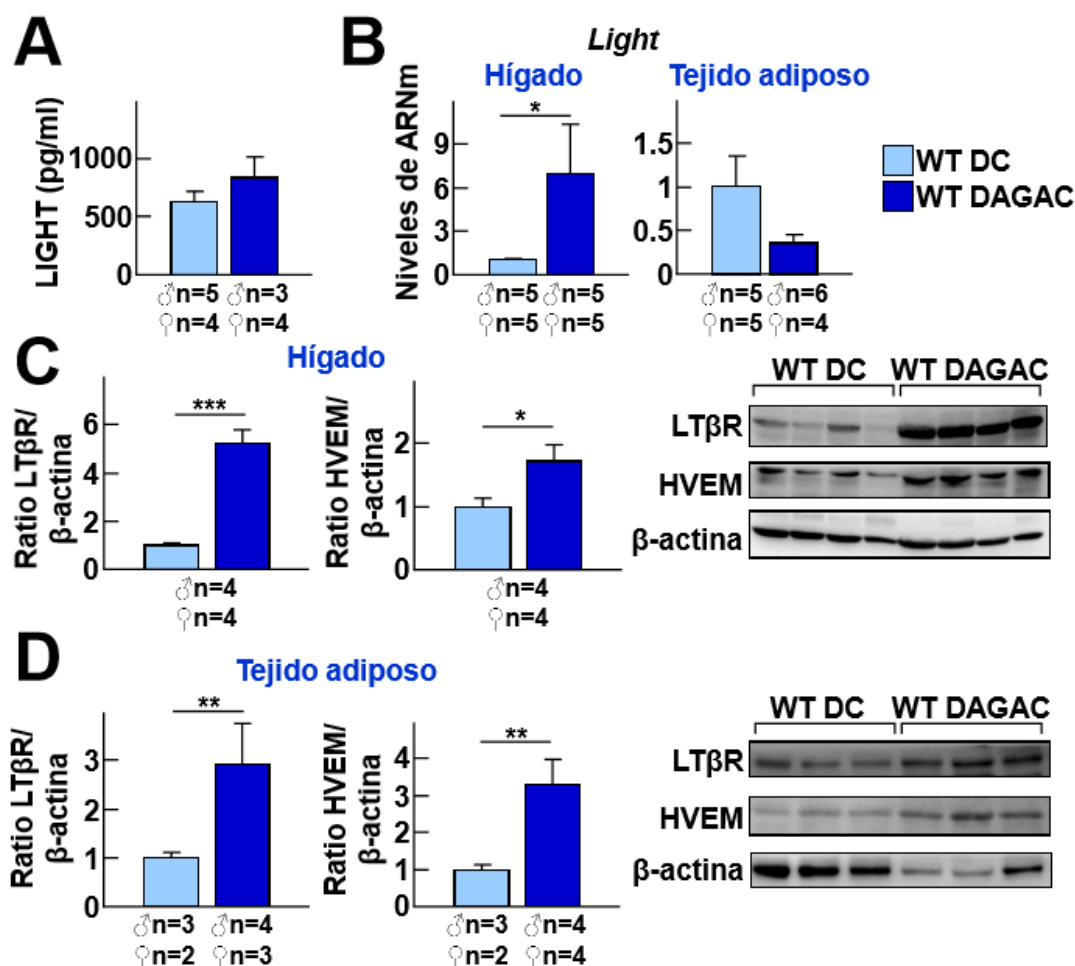


Figura 16. Análisis de la expresión de LIGHT/LTβR-HVEM en hígado y en tejido adiposo de ratones WT alimentados con DC o con DAGAC durante 16 semanas. (A) Niveles plasmáticos circulantes de LIGHT en ratones WT alimentados con DC o con DAGAC. **(B)** Niveles de ARNm de *Light* en hígado y en tejido adiposo en ambos grupos de ratones. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron a los niveles del control, los ratones WT alimentados con DC. Niveles proteicos del LTβR y de HVEM en **(C)** hígado y **(D)** tejido adiposo en ambos grupos. Los niveles de proteína total se normalizaron con los niveles proteicos de la proteína β-actina y se relativizaron a los niveles del control, ratones WT alimentados con DC. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (* p<0.05, ** p<0.01 y *** p<0.001).

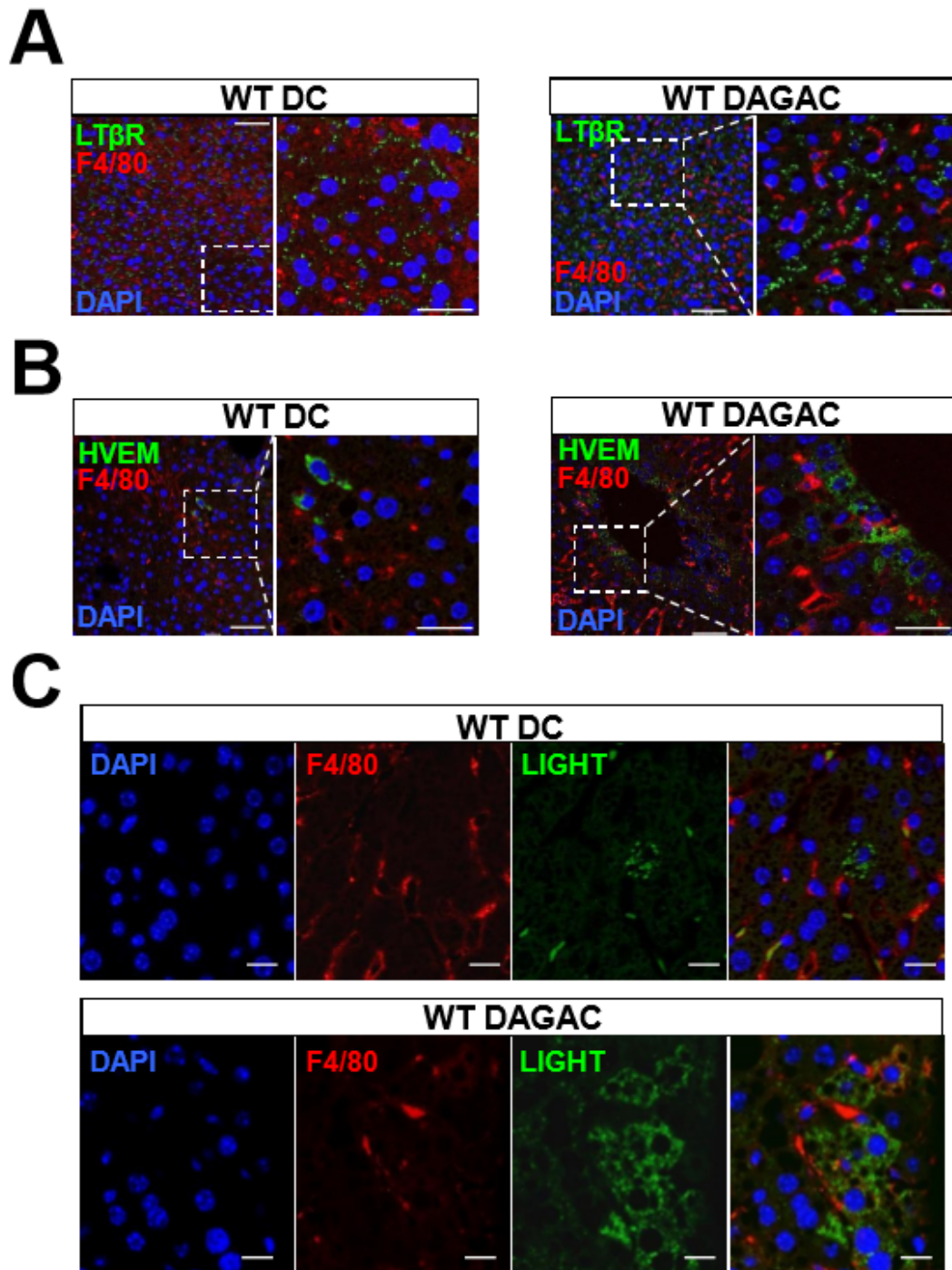


Figura 17. Expresión de LIGHT/LTβR-HVEM en hígado de ratones WT alimentados con DC o con DAGAC. Doble inmunofluorescencia del marcador de macrófagos F4/80 con (A) LTβR, (B) HVEM o (C) LIGHT en ratones WT alimentados con DC o DAGAC durante 16 semanas. Escala: 50 μm en A y B; 20 μm en las ampliaciones de A y B y en todas las imágenes de C.

2.2. Estudio del impacto de la dieta alta en grasa y alta en colesterol en ratones WT en la EHGNA y la inflamación hepática

Dado que la DAGAC aumenta la señalización de LIGHT/LT β R-HVEM a continuación se estudió el impacto de la DAGAC sobre la homeostasis hepática.

No se observaron cambios en el peso corporal entre ambos grupos de ratones (Figura 18A). Sin embargo, los ratones WT sometidos a DAGAC mostraron un mayor porcentaje de grasa corporal (Figura 18B) que se reflejó en un aumento del porcentaje de la grasa epididimal, inguinal y mesentérica (Figura 18C).

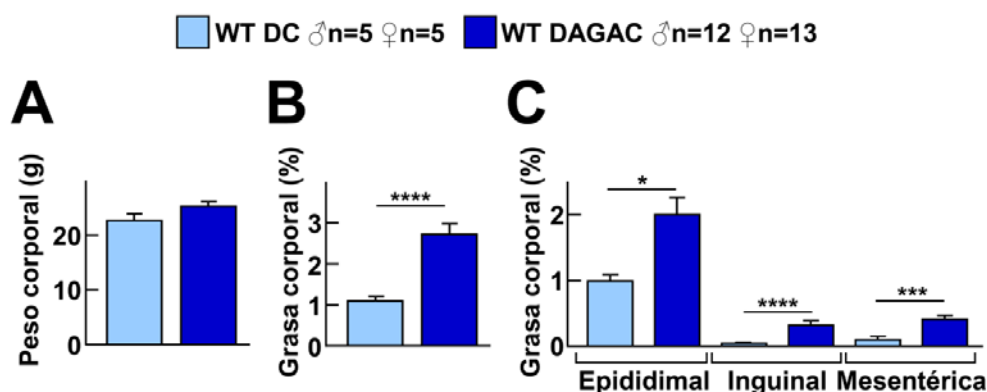


Figura 18. Peso corporal, grasa corporal y su distribución en ratones WT alimentados con DC o DAGAC. (A) Peso corporal, (B) porcentaje de grasa corporal y (C) porcentaje de la grasa epididimal, inguinal y mesentérica en ambos grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (* p<0.05, * p<0.001 y **** p<0.0001).**

Además, el análisis del hígado demostró que la DAGAC incrementa el contenido de TG en el hígado (Figura 19A), la EHGNA medida mediante la puntuación NAS (Figura 19B) y la fibrosis (Figura 19C). Además, se produjo un mayor infiltrado de linfocitos T CD3+ (Figura 19E) aunque en el hígado de los ratones WT sometidos a DAGAC no se observaron cambios en el contenido de macrófagos F4/80+(Figura 19D).

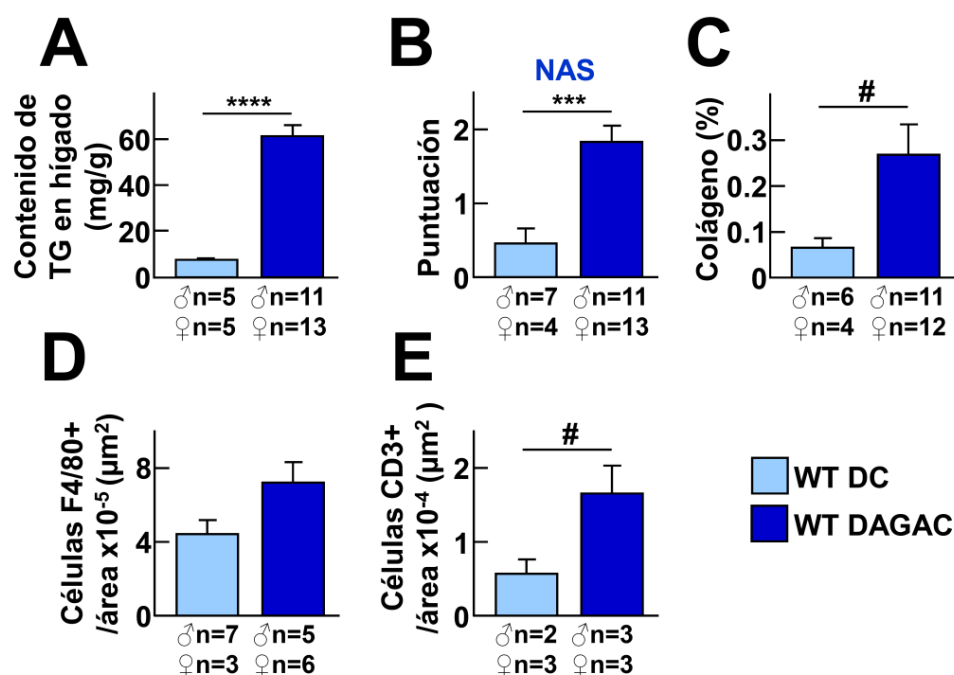


Figura 19. Caracterización del hígado en ratones WT alimentados con DC o DAGAC. (A) Contenido de TG, (B) puntuación NAS y (C) porcentaje de colágeno en hígado de ratones WT alimentados con DC o DAGAC. Infiltración de (D) macrófagos F4/80+ y (E) linfocitos T CD3+ en el hígado en ambos grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (# p=0.05, *** p<0.001 y **** p<0.0001).

Por otro lado, se evaluaron los niveles de expresión de marcadores y factores transcripcionales de macrófagos y linfocitos en el hígado. Así, los ratones WT tratados con DAGAC revelaron una mayor expresión hepática del marcador del subtipo de macrófagos M1 (*Cd11c*) (Figura 20A), del factor transcripcional de los linfocitos proinflamatorios Th1 (*Tbet*) (Figura 20C) y del factor *Zbtb16*, determinante en los linfocitos NKT, (Figura 20D) comparado con los ratones WT alimentados con DC. Consistente con los resultados anteriores, la DAGAC redujo los niveles de expresión del marcador de macrófagos M2 (*Cd206*) (Figura 20A), del factor transcripcional determinante para los linfocitos Th2 (*Gata3*) y para los linfocitos Treg (*Foxp3*) (Figura 20B) comparado con el grupo control.

Estos resultados indican que la DAGAC en ratones WT incrementa la grasa corporal, la EHGNA y la inflamación hepática.

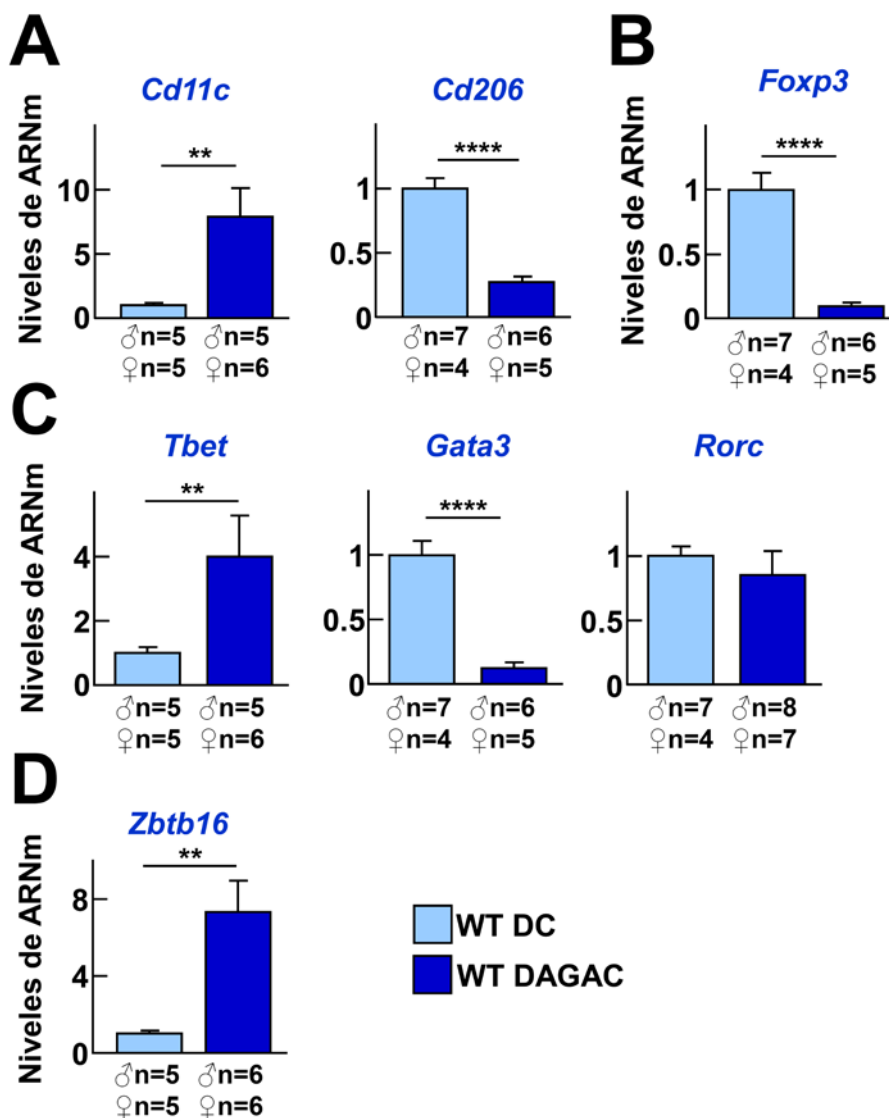


Figura 20. Expresión de marcadores de células inmunes en hígado de ratones WT alimentados con DC o DAGAC. Niveles de ARNm de los marcadores de: **(A)** macrófagos M1 *Cd11c* y M2 *Cd206*, **(B)** de células T reguladoras, *Foxp3*, **(C)** de células Th1 *Tbet*, Th2 *Gata3* y Th17 *Rorc*. **(D)** Marcador de células NKT, *Zbtb16*. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron con los niveles de expresión del control, los ratones WT alimentados con DC. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (** p<0.01 y **** p<0.0001).

2.3. Estudio de la deficiencia de *Light* en ratones WT alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol durante 16 semanas

Seguidamente se evaluó el impacto de la deficiencia de *Light* en ratones sometidos a DAGAC durante 16 semanas.

2.3.1. La deficiencia de *Light* mejora el metabolismo de los carbohidratos en ratones alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol durante 16 semanas

El análisis del peso corporal (Figura 21A), el peso del hígado (Figura 21B), la grasa corporal y la distribución de grasa (Figura 21C) no mostró diferencias entre ratones WT y ratones *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC. Igualmente, no hubo diferencias en los niveles de glucosa e insulina en estado de ayuno entre ambos grupos de ratones (Figura 21D, E).

Los ratones *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC presentaron una mejora de la tolerancia a la glucosa, evaluada mediante el TTG y mostrada como una disminución en el parámetro AUC_{glucosa} comparado con los ratones WT alimentados con DAGAC (Figura 22A). No se observaron diferencias en la secreción de insulina estimulada por glucosa durante el TTG entre ambos grupos de ratones, medido por el AUC_{insulina}, a tiempo final del test (120 min). Sin embargo, a los 30 minutos del test se observó una mayor liberación de insulina en los ratones *Light*^{-/-} comparado con los ratones WT (AUC_{insulina} a 30 min) (Figura 22B). La sensibilidad a insulina, medida mediante el TTI, demostró una mayor sensibilidad a insulina en los ratones *Light*^{-/-}, indicado por un menor AUC_{glucosa}, comparado con los ratones WT alimentados con DAGAC (Figura 22C).

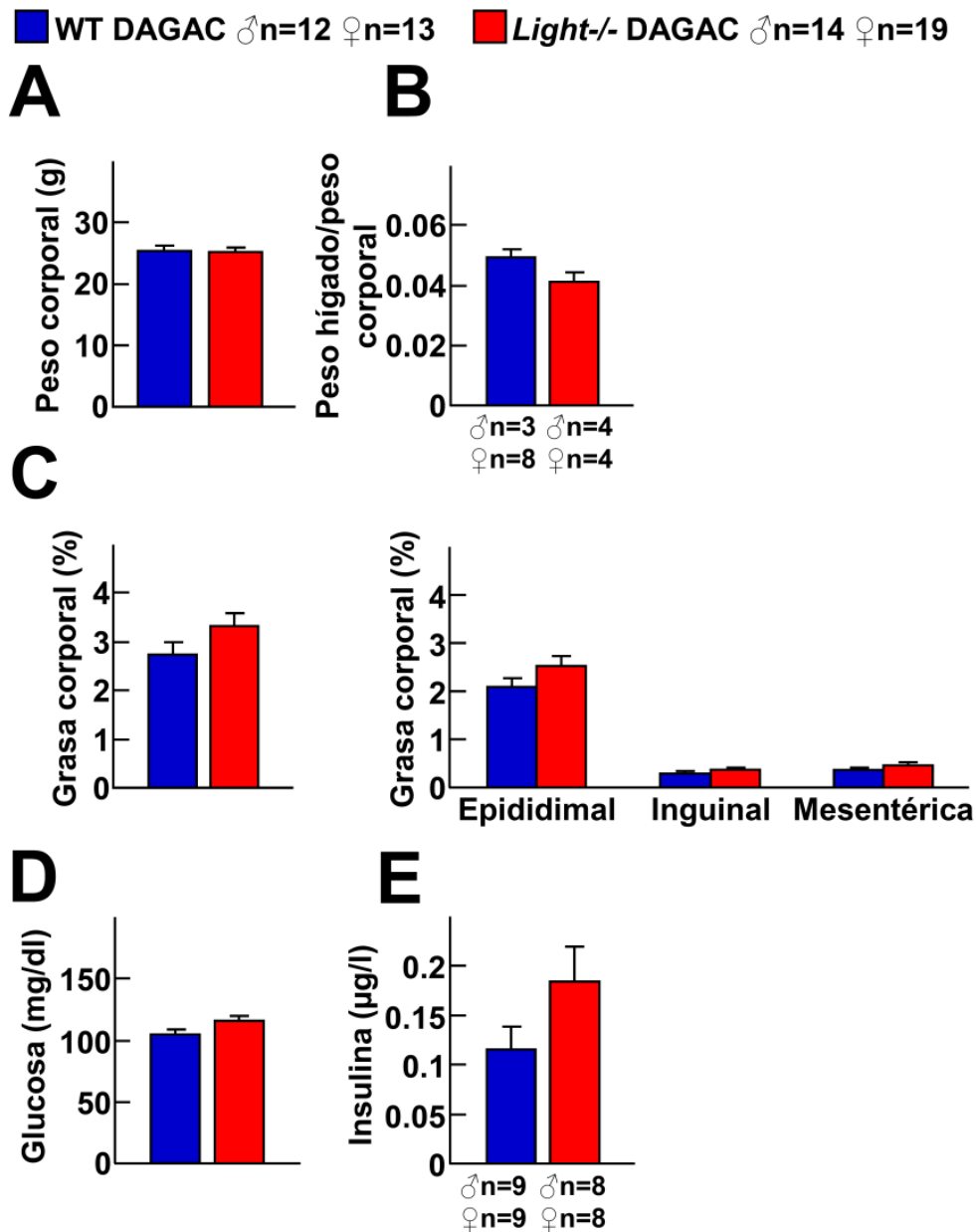


Figura 21. Peso corporal, peso del hígado, grasa corporal y niveles basales de glucosa e insulina en ratones WT y ratones *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC. (A) Peso corporal, (B) peso del hígado relativo al peso corporal, (C) porcentaje de grasa corporal y porcentaje de la grasa epididimal, inguinal y mesentérica. Niveles circulantes de (D) glucosa e (E) insulina basal en estado de ayuno en ambos grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's.

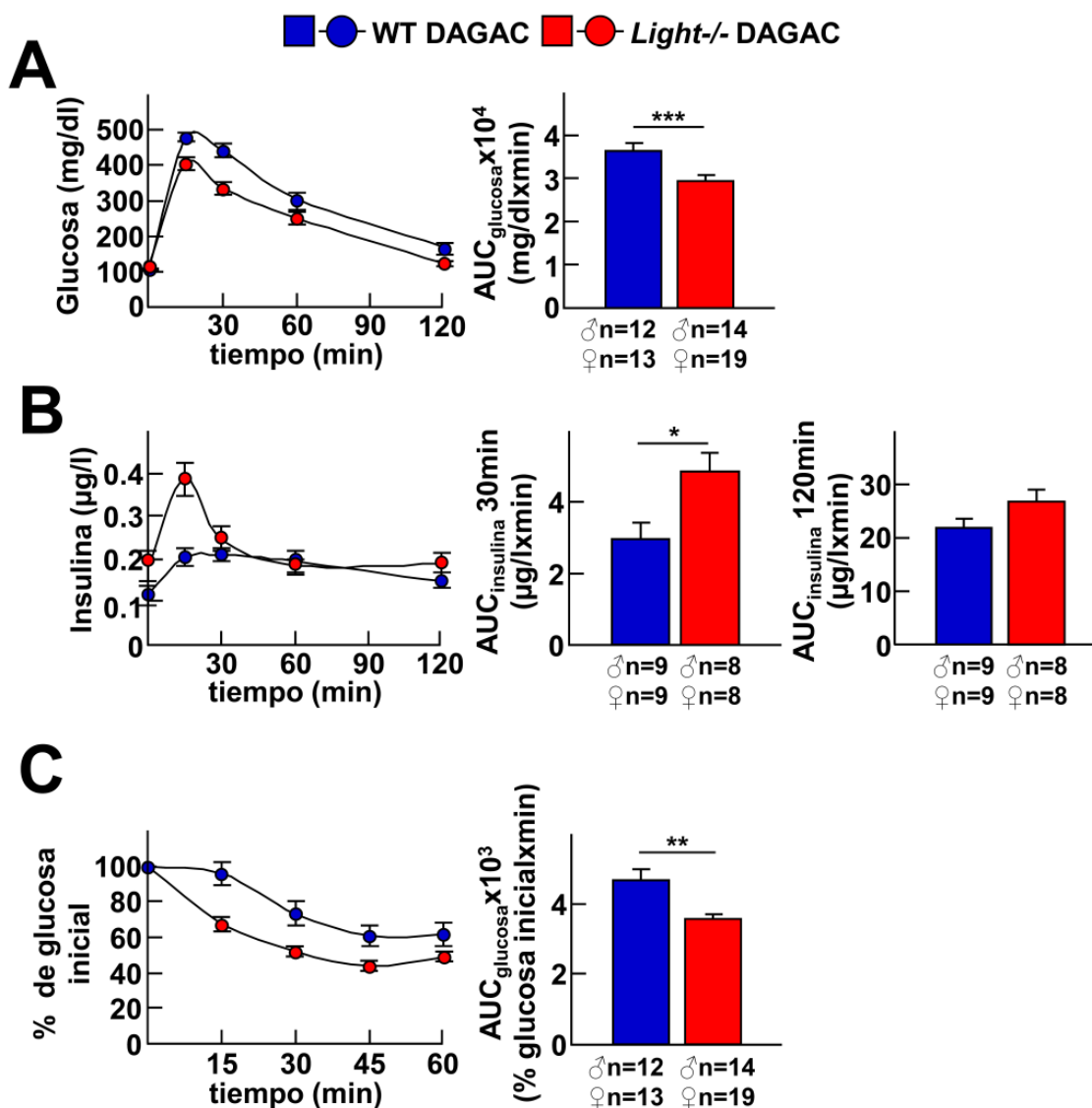


Figura 22. Caracterización metabólica de ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DAGAC. (A) Glucosa plasmática y (B) niveles de insulina a diferentes tiempos durante el TTG para calcular el AUC_{glucosa} y el AUC_{insulina} a los 30 y 120 minutos en ambos grupos de ratones. (C) Niveles de glucosa plasmática (en porcentaje relativo a los niveles iniciales de glucosa) durante el TTI en ratones WT y ratones *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (* p<0.05, ** p<0.01 y * p<0.001).**

Los ratones WT y *Light*^{-/-} no mostraron diferencias en los niveles plasmáticos de c-Total, c-apoB, c-HDL y triglicéridos y NEFA (Figura 23).

Por tanto, la deficiencia en *Light* en ratones WT en condiciones de DAGAC mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina.

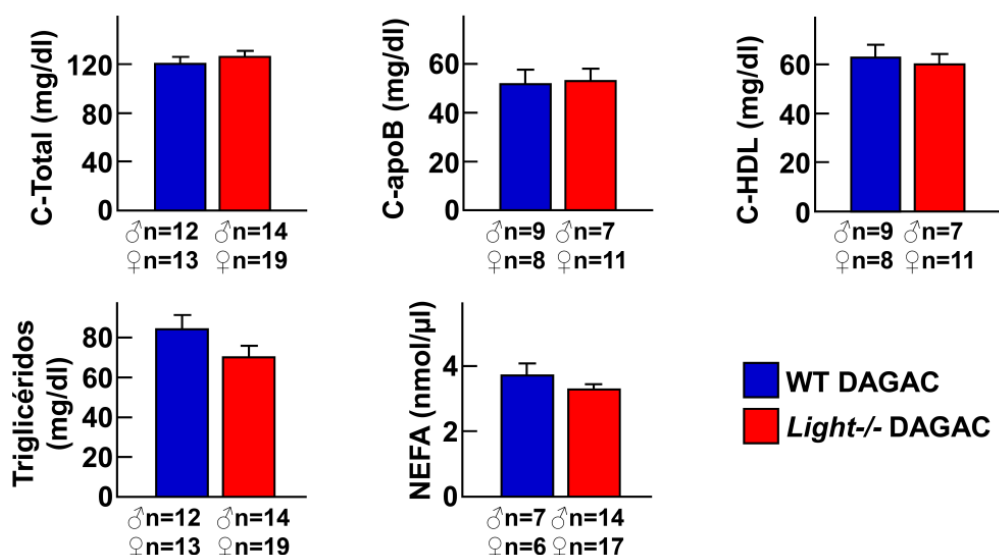


Figura 23. Niveles lipídicos en plasma de ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DAGAC. C-Total, c-apoB, c-HDL, triglicéridos y NEFA en ratones deficientes en *Light* y sus respectivos controles. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's.

2.3.2. La inactivación de *Light* en ratones alimentados durante 16 semanas con dieta alta en grasa y alta en colesterol disminuye el desarrollo de la EHGNA

El análisis de los parámetros hepáticos reveló que los ratones *Light*^{-/-} comparado con los ratones WT tratados con DAGAC durante 16 semanas, presentan una disminución del contenido de TG, de la esteatosis, de la inflamación lobular y del NAS sin cambios en la degeneración balonzante de los hepatocitos (Figura 24).

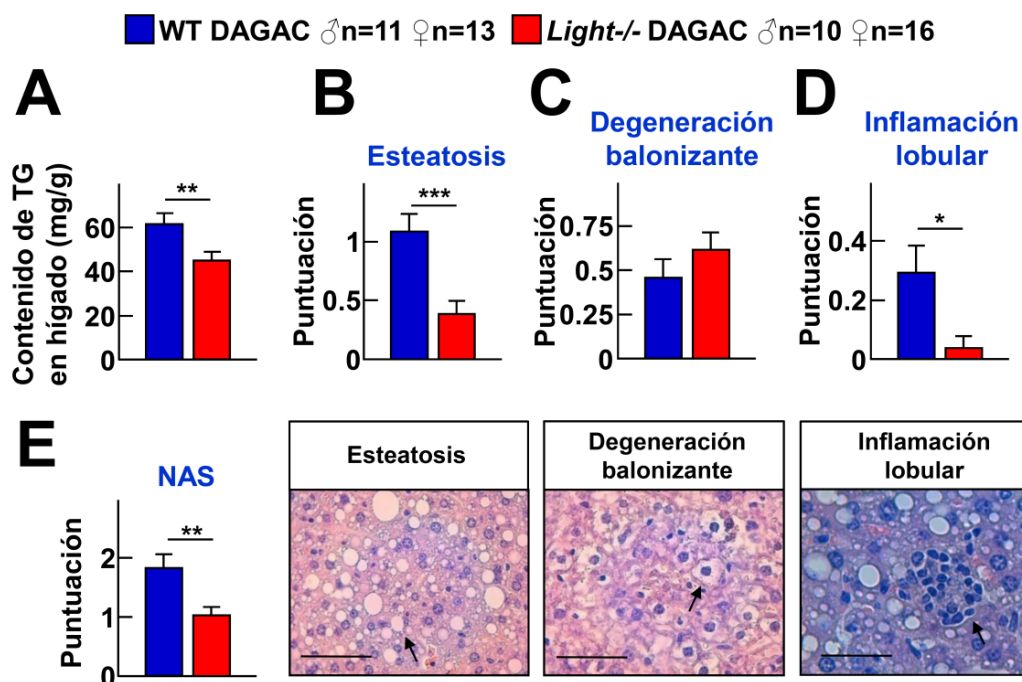


Figura 24. Caracterización de la EHGNA en ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas. Análisis del (A) contenido de TG (mg/g), (B) de la esteatosis, (C) de la degeneración balonzante, (D) de la inflamación lobular y (E) del NAS en ambos grupos de ratones. Escala: 50µm. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (A, B, E) y el test de U Mann–Whitney (C, D) (* p<0.05, ** p<0.01 y *** p<0.001).

Además, se observó un menor contenido de macrófagos F4/80+ y linfocitos T CD3+ en los ratones *Light*^{-/-} comparado ratones WT alimentados con DAGAC (Figura 25A, B). No se encontraron diferencias en el contenido hepático de colágeno entre ambos grupos de ratones alimentados con DAGAC (Figura 25C).

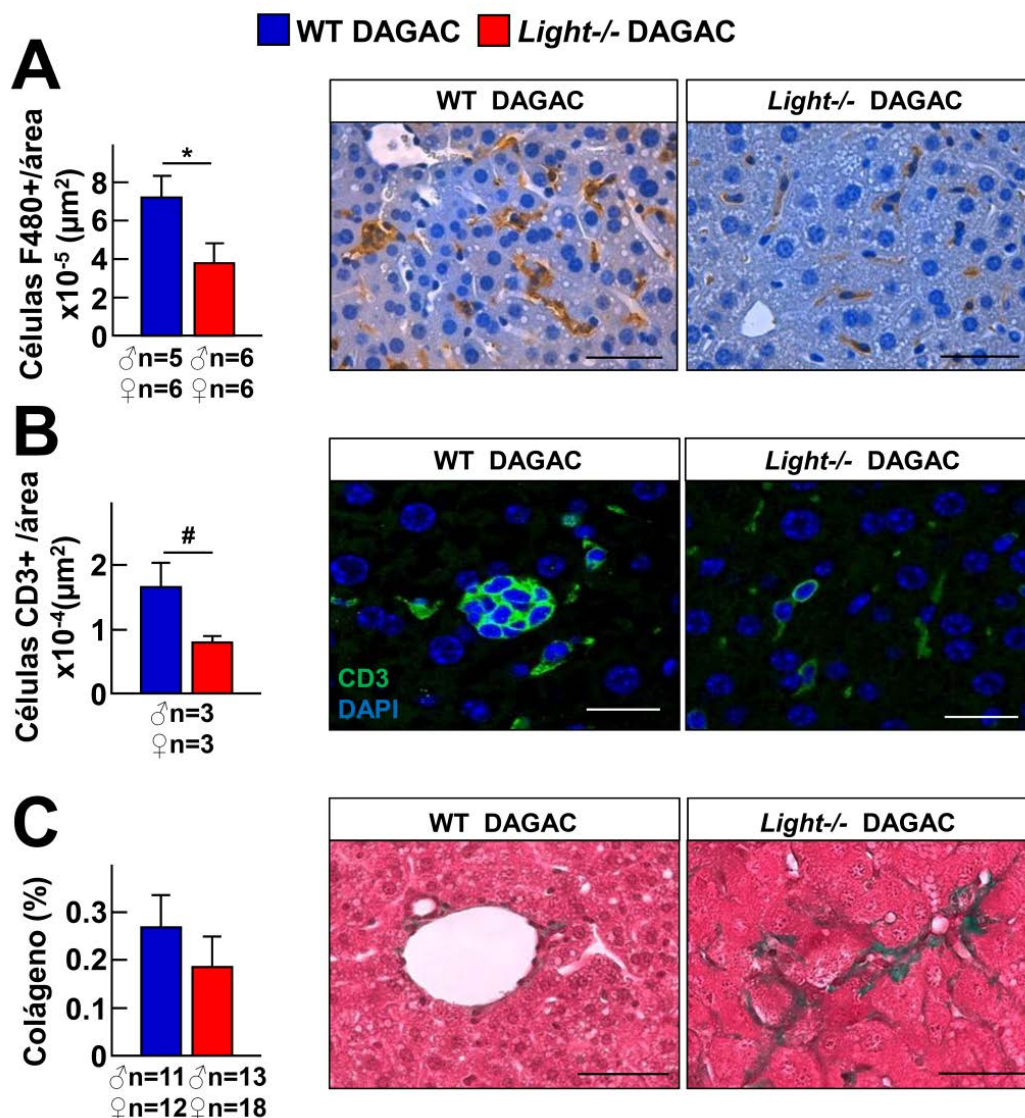


Figura 25. Contenido hepático de células inmunes y fibrosis en ratones WT y *Light-/-* alimentados con DAGAC durante 16 semanas. Contenido de (A) macrófagos F4/80+ y de (B) linfocitos T CD3+ relativo al área total hepática (μm^2). (C) Fibrosis, medida como porcentaje de colágeno (%) respecto al área total hepática en cortes histológicos de ratones WT y ratones *Light-/-* alimentados con DAGAC. Escala: 50 μm . El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (# $p=0.05$ y * $p<0.05$).

No se encontraron diferencias en el daño de la función hepática ya que los niveles plasmáticos de la actividad ALT (Figura 26A) y AST (Figura 26B) fueron similares en los ratones WT y *Light-/-* alimentados con DAGAC.

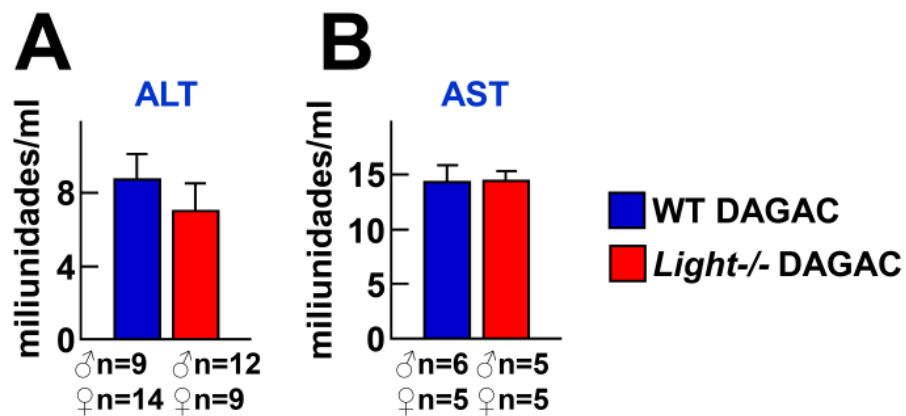


Figura 26. Actividad de las enzimas plasmáticas ALT y AST en ratones WT y *Light*^{-/-}. Niveles plasmáticos de la actividad (A) ALT y (B) AST en ratones alimentados con DAGAC durante 16 semanas. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's.

A continuación, se estudió la expresión hepática de los marcadores de diferentes subtipos de células inmunes. El análisis mostró una disminución de los niveles de expresión del marcador de células NKT, *Zbtb16*, en los ratones *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC comparado con sus respectivos controles, los ratones WT alimentados con DAGAC (Figura 27D).

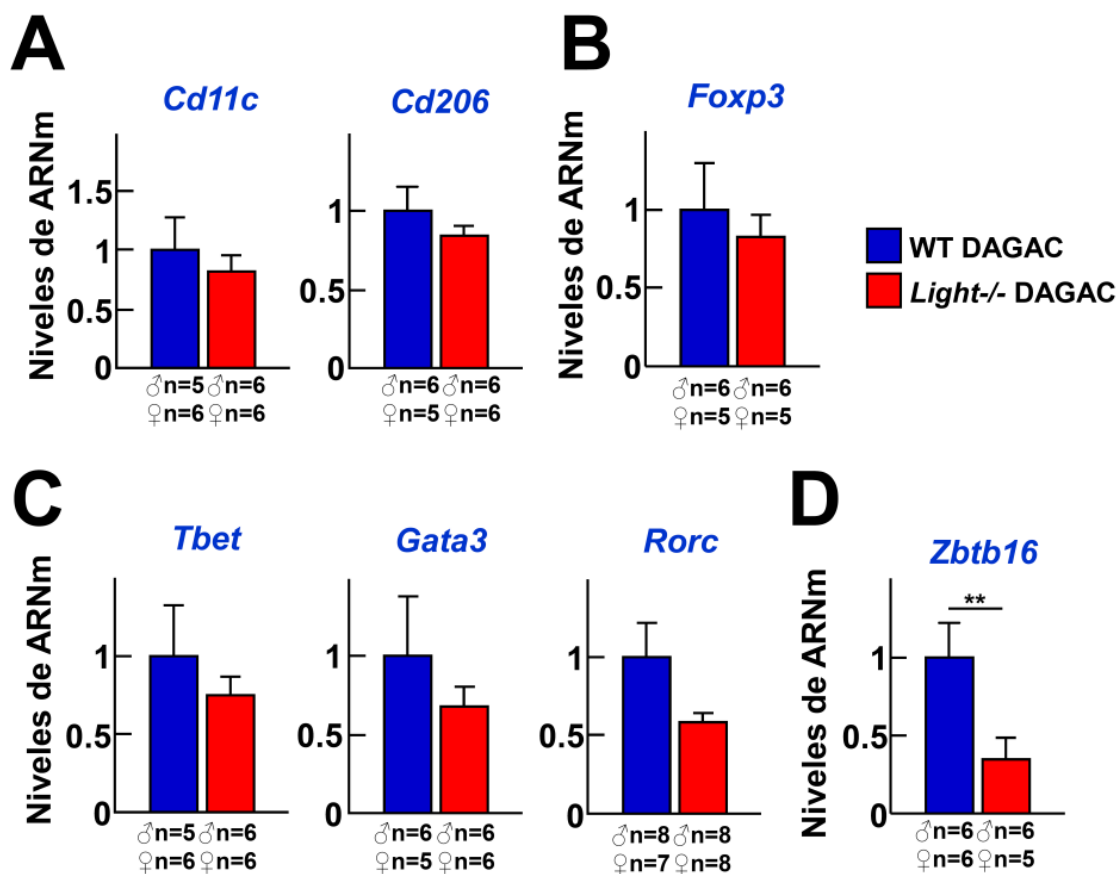


Figura 27. Expresión hepática de marcadores de células inmunes en ratones WT y *Light*^{-/-}. Niveles de ARNm del marcador de (A) macrófagos proinflamatorios M1 *Cd11c* y antiinflamatorios M2 *Cd206*. (B) Marcadores de linfocitos Treg, *Foxp3*, (C) de linfocitos Th: *Tbet* (Th1), *Gata3* (Th2), *Rorc* (Th17). (D) Marcador de linfocitos NKT, *Zbtb16*. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron a los niveles de ratones control WT alimentados con DAGAC. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (A) y el test de U Mann–Whitney (B, C, D) (** p<0.01).

El estudio de la expresión de genes relacionados con la activación de las células hepáticas estrelladas, *Col1a1* y *Acta2*, de genes asociados con la fibrosis como la citoquina *Tgfb1* o *Mmp9* y *Timp1* no mostraron diferencias entre ratones *Light*^{-/-} y ratones WT alimentados con DAGAC (Figura 28).

Por tanto, la inactivación de *Light* en ratones alimentados con DAGAC disminuye la severidad de la EHGNA, el contenido hepático de macrófagos y linfocitos T y la expresión hepática del marcador de linfocitos NKT, *Zbtb16*.

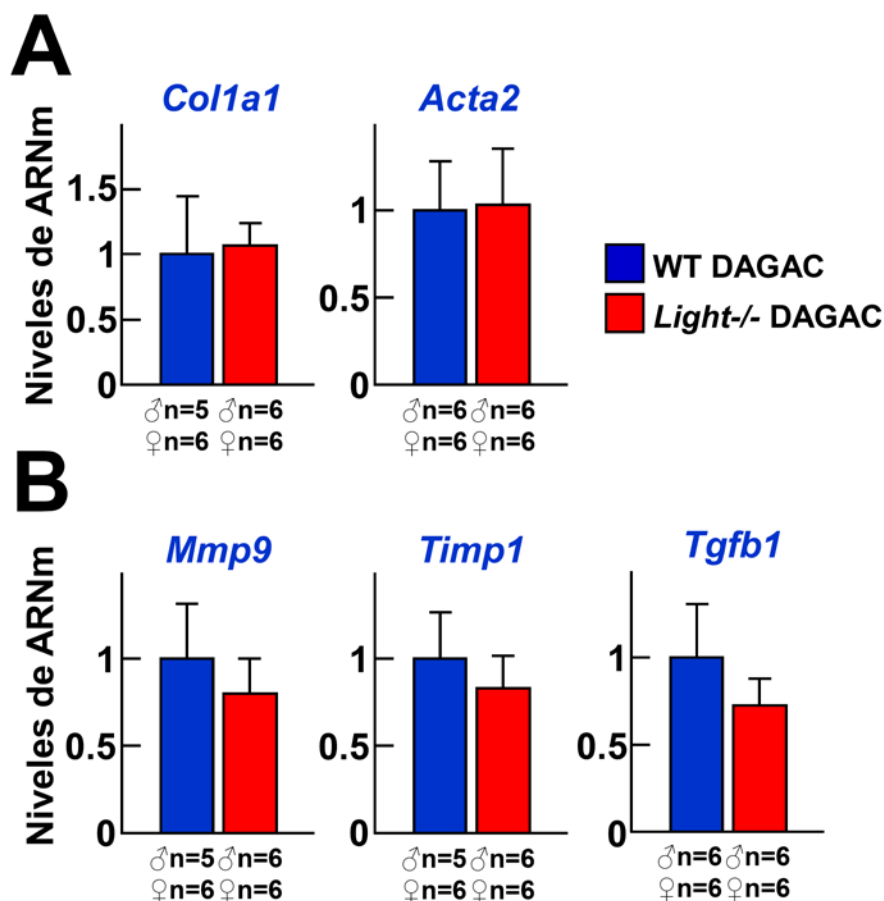


Figura 28. Expresión de marcadores de células estrelladas hepáticas y de fibrosis en ratones WT y *Light*^{-/-}. Niveles de ARNm de *Col1a1*, *Acta2*, *Tgfb1*, *Mmp9* y *Timp1*. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron a los niveles de ratones control WT alimentados con DAGAC. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (B *Timp1*) y el test de U Mann–Whitney (A, B *Mmp9* y *Tgfb1*).

Estudios previos han descrito que la inhibición de la autofagia en los hepatocitos incrementa el contenido de gotas lipídicas [53]. Así pues se analizó el marcador de autofagia p62(SQSTM1), proteína que facilita la formación del autofagosoma y que se degrada rápidamente durante la autofagia [134]. El análisis no mostró diferencias en el porcentaje de p62, entre los ratones deficientes para *Light* comparado con los controles WT (Figura 29A).

Consistentemente, el análisis de la proteína CHOP, que actúa como factor transcripcional de p62 [135], no mostró diferencias en los niveles proteicos entre ambos grupos de ratones (Figura 29B). Estos resultados

indican que, en nuestra aproximación experimental, el proceso de la autofagia no está implicado.

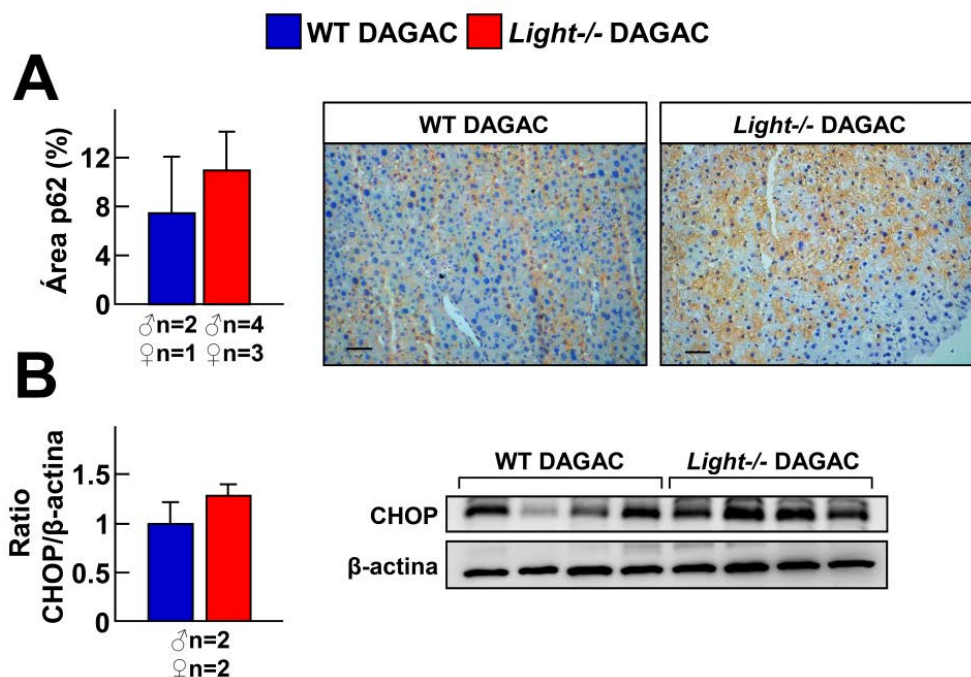


Figura 29. Análisis de la autofagia en ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas. (A) Cuantificación de la autofagia mediante el marcador p62 medido como porcentaje de área p62+ con respecto al área total de hígado (μm^2) en ratones WT y ratones *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC. A la derecha del gráfico se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica. Escala: 50 μm . (B) Niveles proteicos de CHOP en ambos grupos de ratones. Los niveles de proteína total se normalizaron con los niveles proteicos de β -actina y se relativizaron al control, los ratones WT alimentados con DAGAC. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's.

2.3.3. La inactivación de *Light* en ratones WT alimentados durante 16 semanas con dieta alta en grasa y alta en colesterol disminuye la inflamación del tejido adiposo

El análisis de la secreción de citoquinas del tejido adiposo ex vivo, reveló una menor secreción de las citoquinas MCP1, TNF α e IL17 en explantes de ratones *Light*^{-/-} en comparación con la secreción mostrada por explantes de ratones WT alimentados ambos con DAGAC (Figura 30A). No se observaron cambios en la secreción de IL6 en el tejido adiposo

proveniente de ambos grupos de ratones (Figura 30A). Consistente con los resultados anteriores, el análisis de la FVE de tejido adiposo en los ratones *Light*^{-/-} mostró un menor contenido de macrófagos proinflamatorios M1 F4/80+CD11c+ y un mayor contenido de macrófagos antiinflamatorios M2 F4/80+CD206+ comparado con los niveles observados en la FVE de tejido adiposo de ratones WT en condiciones de DAGAC (Figura 30B).

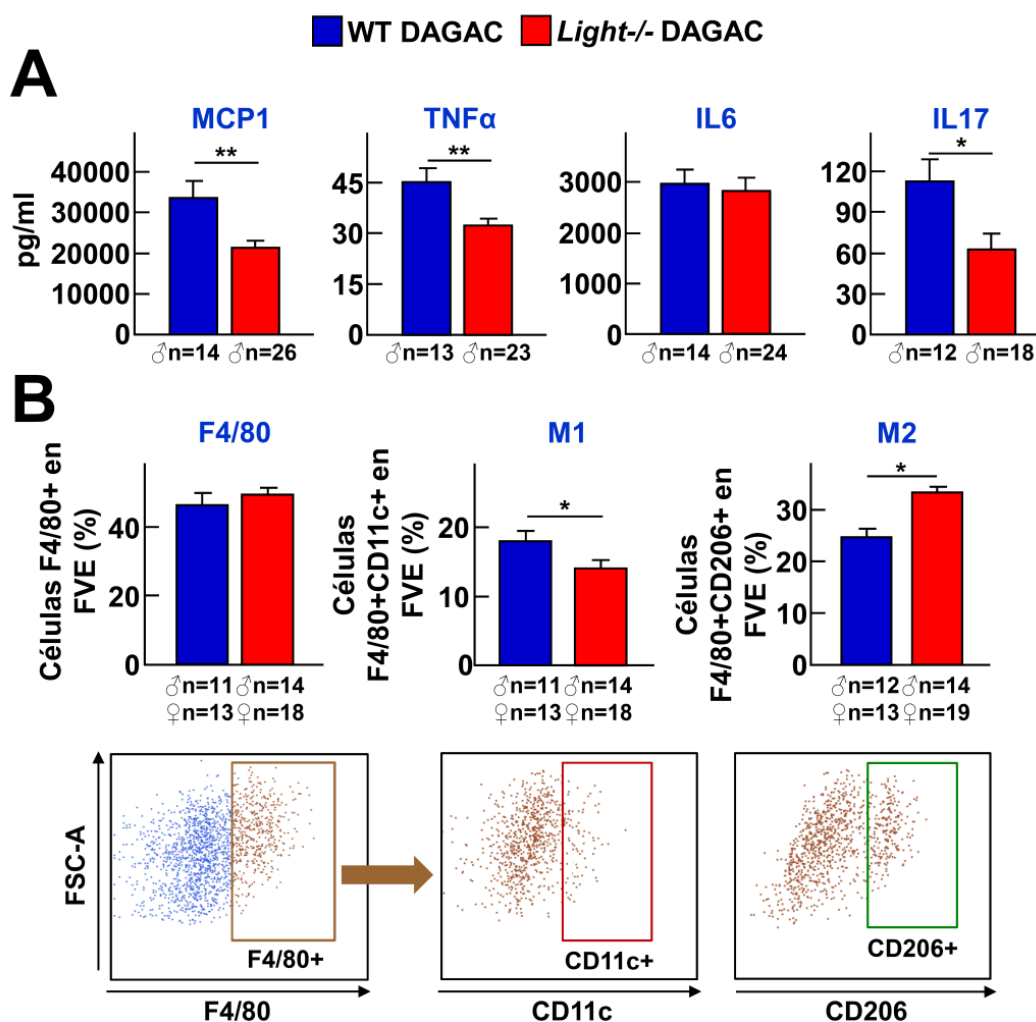


Figura 30. Caracterización del tejido adiposo en ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas. (A) Secreción de las citoquinas MCP1, TNFα, IL6 e IL17 del tejido adiposo de ratones WT y ratones *Light*^{-/-}. (B) Análisis de los macrófagos totales F4/80+, macrófagos M1 F4/80+CD11c+ y macrófagos M2 F4/80+CD206+ en las células de la FVE del tejido adiposo en ratones WT y *Light*^{-/-}. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (* p<0.05 y ** p<0.01).

El análisis en grasa de ratones alimentados con DAGAC de la expresión génica de factores transcripcionales determinantes para la diferenciación de linfocitos Th, *Tbet*, *Gata3* y *Rorc* y de linfocitos Treg *Foxp3*, no mostró diferencias entre ambos grupos de ratones (Figura 31).

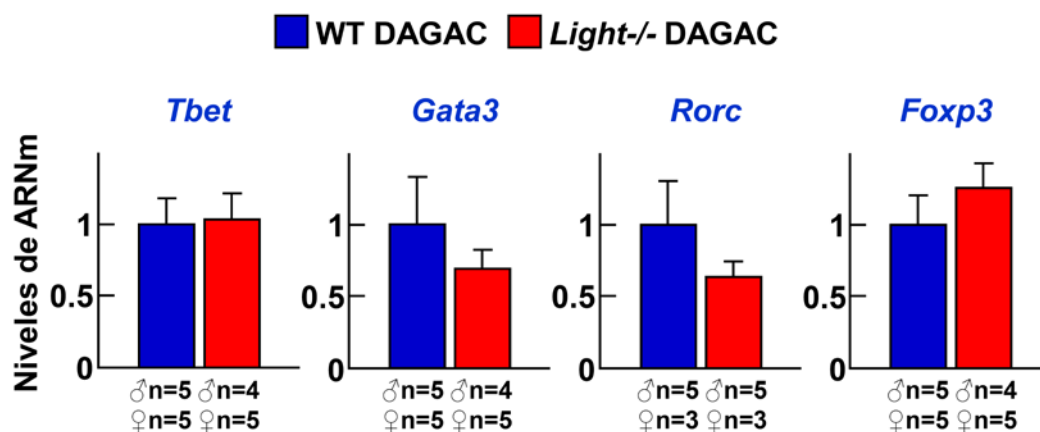


Figura 31. Expresión de marcadores de subtipos de linfocitos Th y Treg en el tejido adiposo de ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC. Niveles de ARNm de *Tbet*, *Gata3*, *Rorc* y *Foxp3* en tejido adiposo. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron con respecto al control, los ratones WT alimentados con DAGAC. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's.

Con el fin de determinar el impacto de *Light* sobre el fenotipo de los macrófagos se generaron macrófagos in vitro a partir de células madre hematopoyéticas de médula ósea. En contraste con los resultados anteriores, el análisis de la secreción de citoquinas de los MDMO mostró un aumento de las citoquinas TNF α e IL6, así como disminución de los niveles de IL10 en macrófagos derivados de *Light*^{-/-} comparado con los macrófagos derivados de los ratones WT (Figura 32).

Por lo tanto, la deficiencia de *Light* promueve un fenotipo antiinflamatorio en los macrófagos del tejido adiposo en ratones alimentados con DAGAC in vivo, a pesar de que in vitro esta deficiencia promueve un fenotipo proinflamatorio.

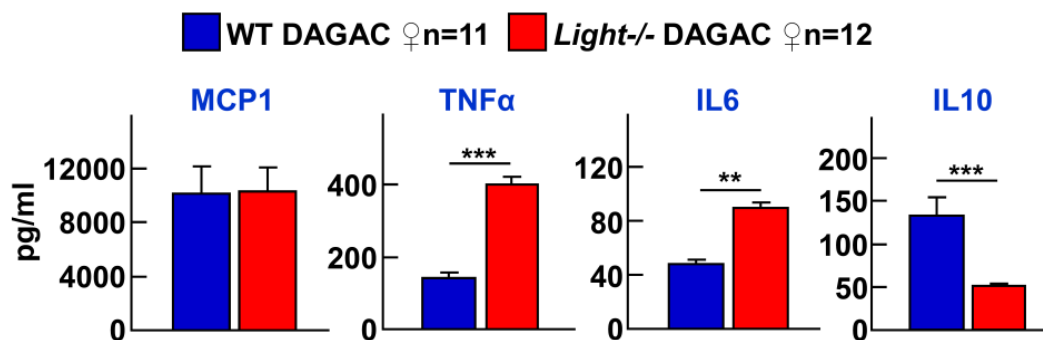


Figura 32. Secreción de citoquinas de MDMO de ratones WT y *Light*^{-/-}. Secreción de las citoquinas MCP1, TNF α , IL6 e IL10 de MDMO en ambos grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

2.3.4. La inactivación de *Light*^{-/-} reduce la inflamación sistémica en ratones alimentados durante 16 semanas con dieta alta en grasa y alta en colesterol

Seguidamente, se analizó el impacto de la deficiencia de *Light* en la inflamación sistémica en ratones alimentados con DAGAC. El análisis de los leucocitos circulantes mostró una disminución en el porcentaje de monocitos en los ratones *Light*^{-/-} sin cambios en las poblaciones de linfocitos y neutrófilos (Figura 33A). Además, los ratones *Light*^{-/-} presentaron un aumento en el porcentaje de los monocitos Ly6C^{low} comparado con los controles WT (Figura 33B).

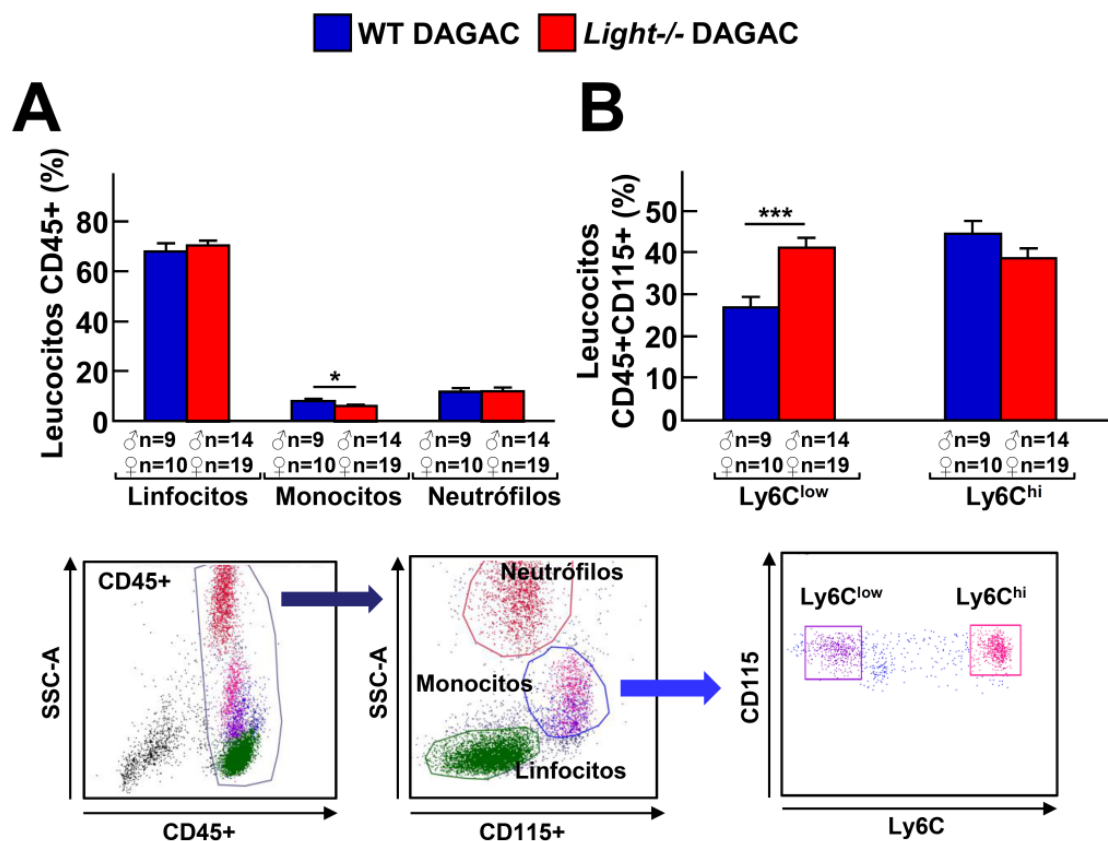


Figura 33. Poblaciones leucocitarias y subtipos de monocitos en ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DAGAC. (A) Porcentaje de linfocitos, monocitos y neutrófilos y (B) porcentaje de monocitos Ly6C^{low} y Ly6C^{hi} de ratones WT y de ratones deficientes en *Light*. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (* p<0.05 y * p<0.001).**

Los ratones *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC presentaron un aumento significativo de los linfocitos totales CD3+, CD4+ y CD8+ sin cambios en la activación de estos (CD3+CD69+, CD4+CD69+ y CD8+CD69+, respectivamente) comparado con sus controles WT (Figura 34A). No se observaron cambios entre ambos grupos de ratones ni en los niveles circulantes de los linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ Treg (Figura 34B) ni en los subtipos de linfocitos Th1 CXCR3+, Th2 CCR4+CCR6- o Th17 CCR4+CCR6+. Por el contrario, se observó una disminución de las células Th9 CCR4-CCR6- en los ratones *Light*^{-/-} comparado con sus controles WT en condiciones de DAGAC (Figura 34C).

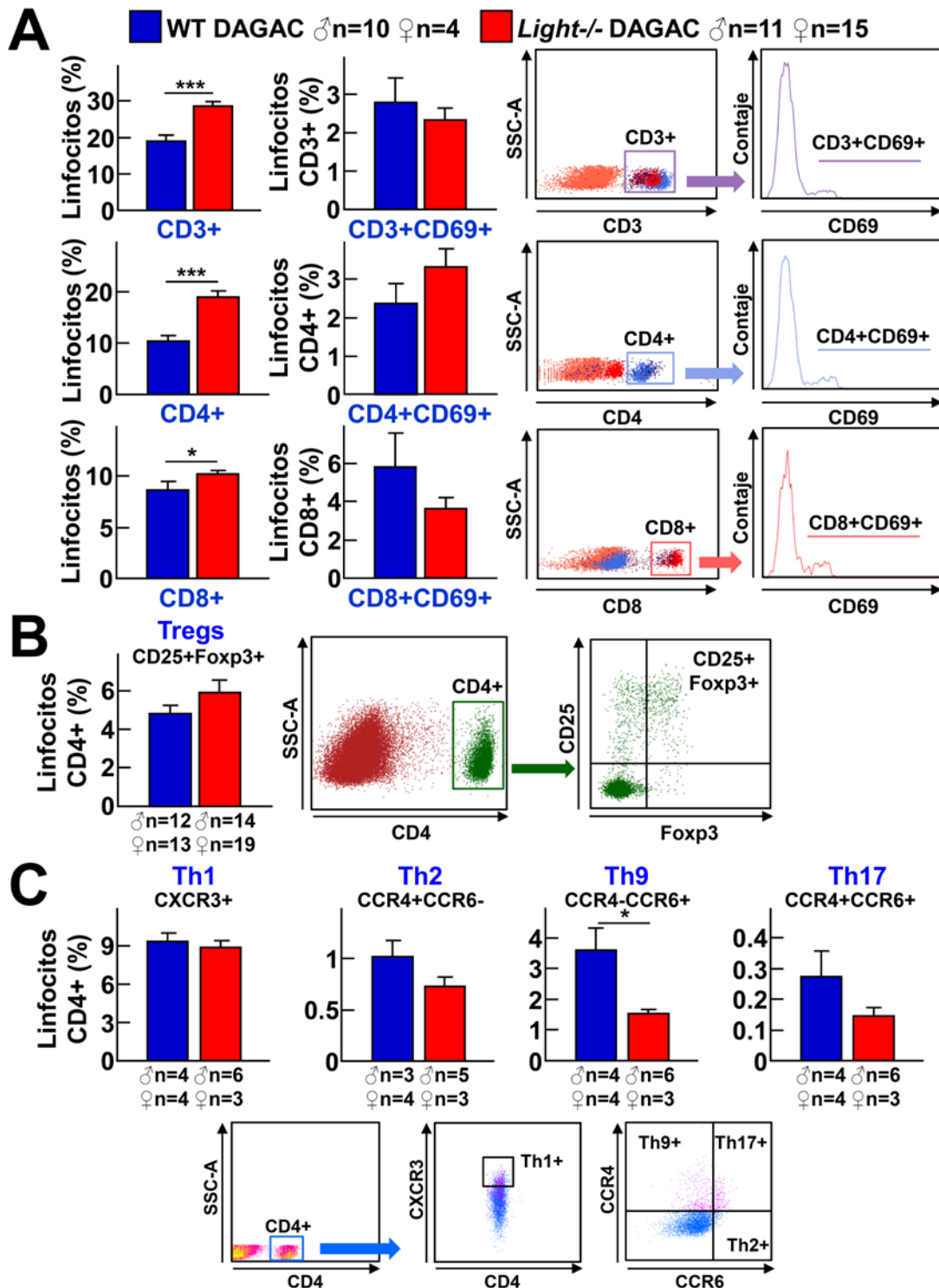


Figura 34. Análisis de los linfocitos en ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas. (A) Porcentaje de linfocitos CD3+ y CD3+CD69+, CD4+ y CD4+CD69+ y CD8+ y CD8+CD69+ en ratones WT y ratones deficientes en *Light*. (B) Porcentaje de linfocitos Treg CD4+CD25+Foxp3+ y (C) subtipos de linfocitos Th1 CXCR3+, Th2 CCR4+CCR6-, Th 9 CCR4-CCR6+ y Th17 CCR4+CCR6+ en ambos grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (* p<0.05 y *** p<0.001).

Consistente con los resultados anteriores, se observó una disminución en los niveles de citoquinas $TNF\alpha$, IL6 e IL1 β circulantes en el plasma de los ratones *Light*^{-/-} comparado con los ratones WT alimentados con DAGAC, no encontrándose diferencias en el resto de las citoquinas analizadas (Figura 35).

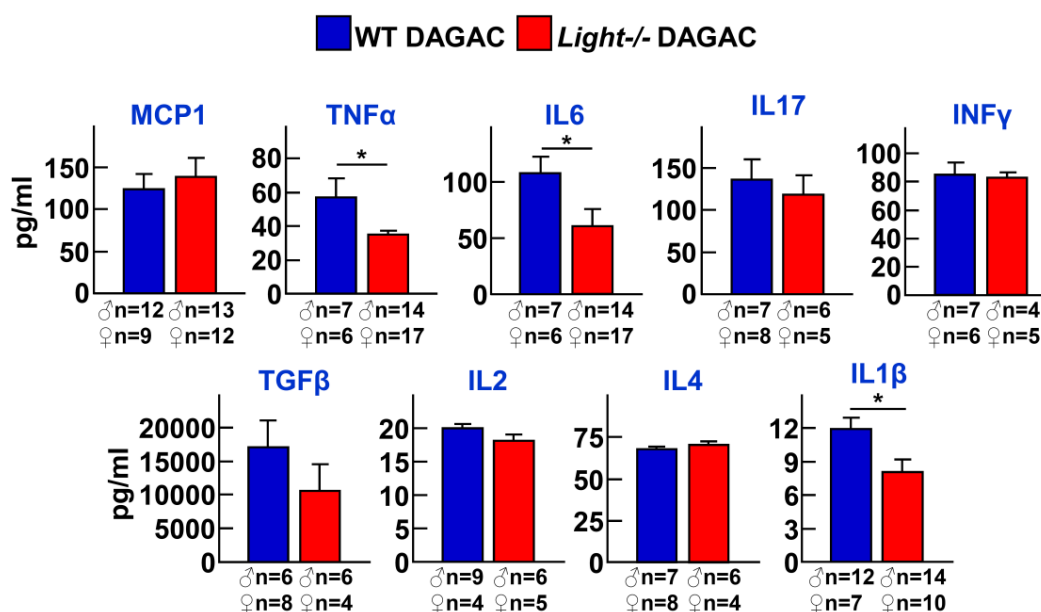


Figura 35. Análisis de las citoquinas circulantes en plasma de ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas. Niveles plasmáticos de MCP1, $TNF\alpha$, IL6, IL17, $INF\gamma$, TGF β , IL2, IL4 e IL1 β en ratones WT y ratones *Light*^{-/-}. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's para todas las citoquinas excepto para $TNF\alpha$ e IL6 en las que se aplicó el test de U Mann-Whitney (* $p < 0.05$).

Para determinar el origen del efecto de *Light* en los linfocitos se analizaron los órganos linfoides primarios. El análisis de la expresión de los factores transcripcionales mostró una disminución del factor transcripcional determinante para los linfocitos Th17, *Rorc*, en timo (Figura 36A) y bazo (Figura 36B) en los ratones *Light*^{-/-} comparado con sus controles WT ambos alimentados con DAGAC, sin cambios en el resto de los genes analizados.

Estos resultados indican que la deficiencia en *Light* disminuye la inflamación sistémica en condiciones de DAGAC.

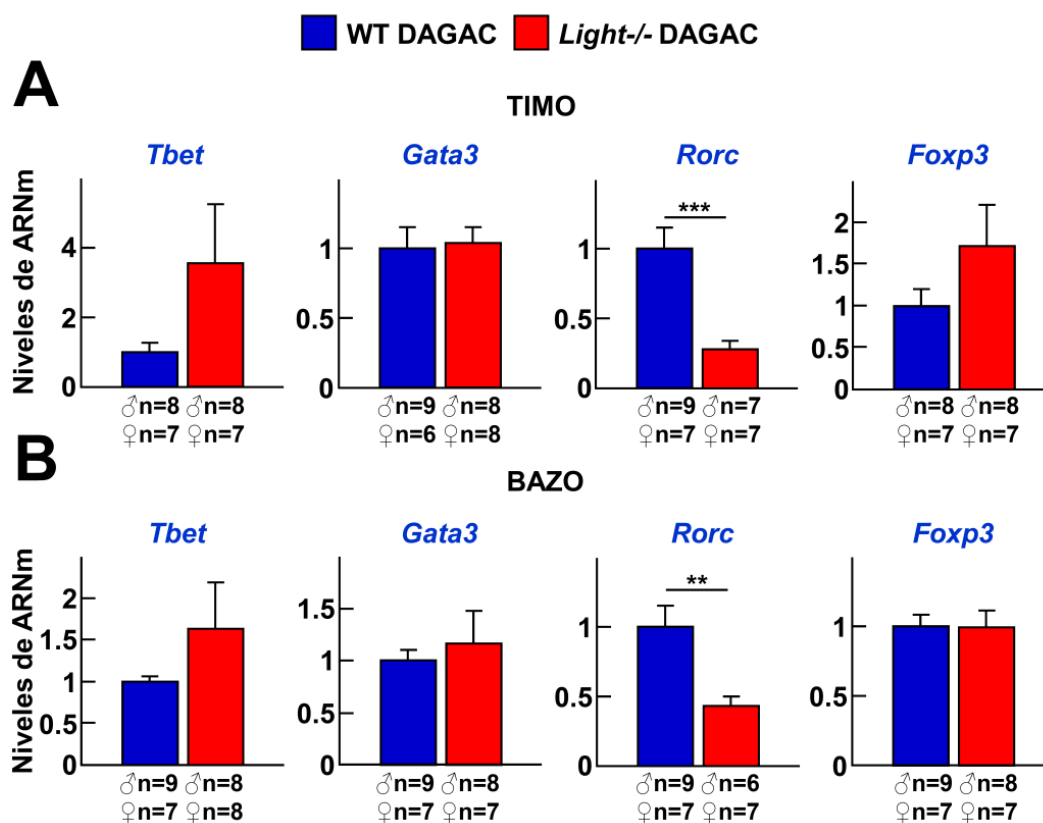


Figura 36. Expresión de marcadores de diferenciación de linfocitos T en timo y bazo en ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC. Niveles de ARNm de *Tbet*, *Gata3*, *Rorc* y *Foxp3* en (A) timo y (B) bazo. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron con respecto al control, los ratones WT alimentados con DAGAC. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's.

2.3.5. La inactivación de *Light* altera la expresión de genes hepáticos

Los resultados anteriores indican una mejora importante del metabolismo hepático en ratones *Light*^{-/-}. Dado que la señalización dependiente de LIGHT puede producir cambios en la homeostasis lipídica [146], se estudió la expresión en hígado de genes del metabolismo lipídico.

2.3.5.1. Los ratones *Light*^{-/-} presentan una desregulación de genes implicados en el metabolismo lipídico

El análisis de la expresión génica hepática mostró una disminución en la expresión de los genes *Lxr*, *Fxr* y *Abca1*, sin cambios en *Abcg5*, *Abcg8* y *Cyp7a1* en los ratones *Light*^{-/-} comparado con los ratones WT en condiciones de DAGAC (Figura 37).

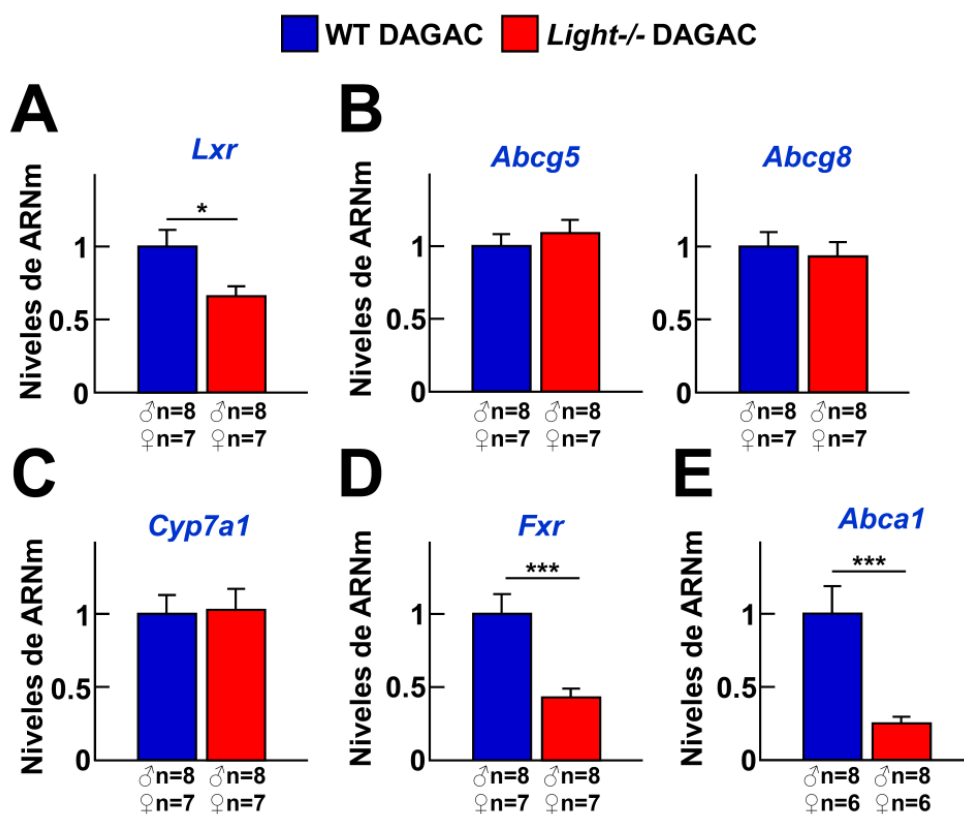


Figura 37. Expresión de *Lxr*, *Abcg5*, *Abcg8*, *Cyp7a1*, *Fxr* y *Abca1* en hígado de ratones WT y *Light*^{-/-}. Niveles de ARNm de (A) *Lxr*, (B) *Abcg5*, *Abcg8*, (C) *Cyp7a1*, (D) *Fxr* y (E) *Abca1* en hígado en ambos grupos de ratones. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron con respecto al control, los ratones WT alimentados con DAGAC. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (* p<0.05, *** p<0.001).

El análisis de la expresión génica de *Srebf1c* y *Ldlr* implicados en la acumulación de colesterol hepático mostró, por el contrario, niveles aumentados en los ratones *Light*^{-/-} comparado con los ratones WT alimentados con DAGAC (Figura 38A, C). Los niveles del enzima *Hl* y de *Ppara* y *Pparg* fueron significativamente menores en los ratones deficientes en *Light* comparado con sus controles WT alimentados con DAGAC (Figura 38D, E). No se encontraron cambios en la expresión del gen *Chrebp* entre ambos grupos de ratones (Figura 38B).

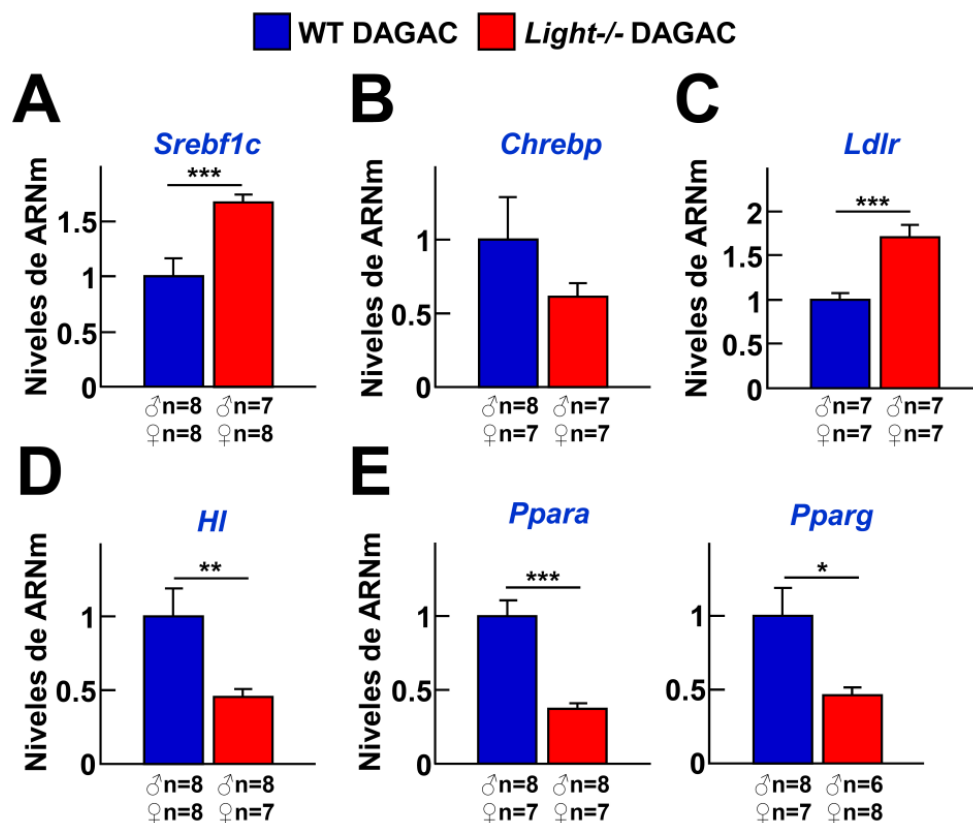


Figura 38. Expresión de *Srebf1c*, *Chrebp*, *Ldlr*, *Hl*, *Ppara* y *Pparg* en hígado de ratones WT y *Light*^{-/-}. Niveles de ARNm de (A) *Srebf1c*, (B) *Chrebp*, (C) *Ldlr*, (D) *Hl*, (E) *Ppara* y *Pparg* en el hígado de ambos grupos de ratones. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron con respecto al control, los ratones WT alimentados con DAGAC. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's para todos los genes excepto para *Pparg* en el que se aplicó el test de U Mann-Whitney (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Seguidamente se estudió la expresión de genes relacionados con la gluconeogénesis, lipogénesis y β -oxidación [136]–[138]. No se encontraron diferencias en los genes gluconeogénicos *Pgc1a*, *G6pase* y *Pepck* (Figura 39A), en el transportador de ácidos grasos *Cd36* (Figura 39B) ni en el gen de la β -oxidación *Acox* (Figura 39C). Sin embargo, se observó un aumento en la expresión de la sintetasa de ácidos grasos *Fasn* en los ratones deficientes en *Light*^{-/-} comparado con los ratones WT (Figura 39B).

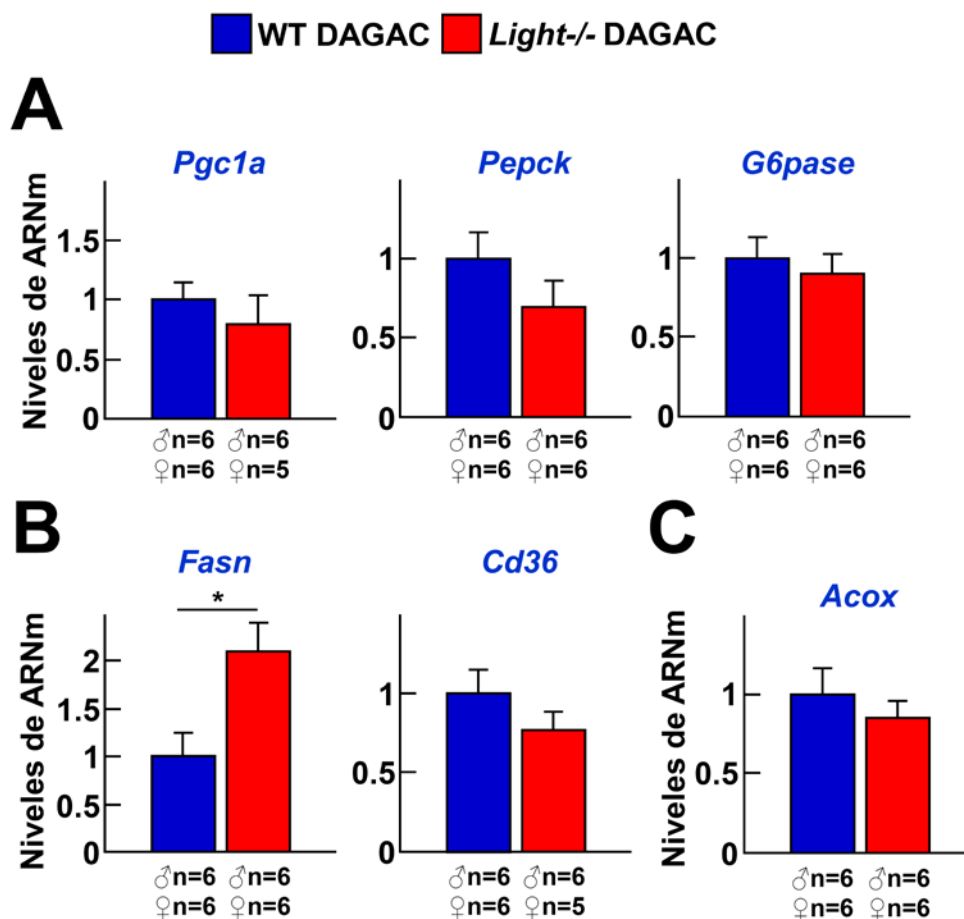


Figura 39. Expresión de genes relacionados con la gluconeogénesis, lipogénesis y β -oxidación en hígado de ratones WT y *Light*^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas. Niveles de ARNm de (A) *Pgc1a*, *Pepck*, *G6pase*, (B) *Fasn*, *Cd36* y (C) *Acox* en hígado de ambos grupos de ratones. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron con respecto al control, los ratones WT alimentados con DAGAC. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's para todos los genes excepto para el *Pepck* en el que se aplicó el test de U Mann–Whitney (* $p < 0.05$).

2.3.5.2. La deficiencia de *Light* disminuye la expresión de genes asociados a la transición EHGNA-EHNA

Seguidamente se investigó la expresión génica de los genes *Klf* (del inglés, *krüppel-like factor*) y *Tlr4* los cuales han sido asociados con la transición de EHGNA-EHNA [139], [140]. El estudio de expresión desveló una reducción significativa de los niveles de *Klf6* y de *Tlr4* en los ratones *Light*^{-/-} comparado con los ratones control WT alimentados con DAGAC

(Figura 40A, B). No se encontraron cambios en los otros genes *Klf* analizados (Figura 40A).

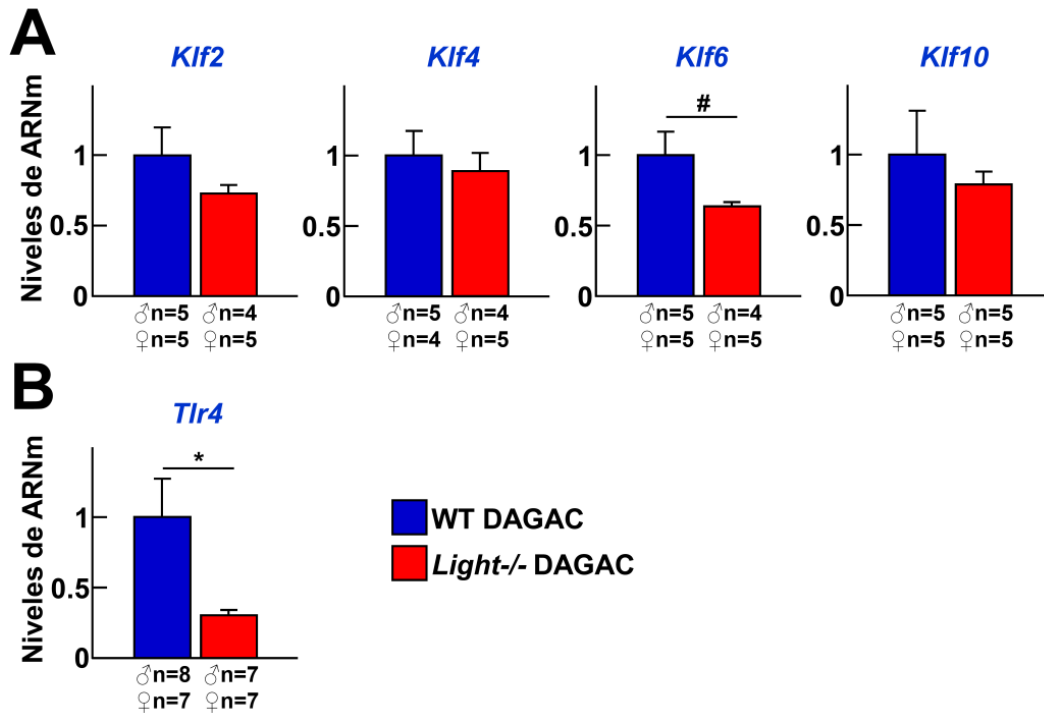


Figura 40. Expresión de *Klf2*, *Klf4*, *Klf6*, *Klf10* y *Tlr4* en hígado de ratones WT y *Light*^{-/-}. Niveles de ARNm de (A) *Klf2*, *Klf4*, *Klf6*, *Klf10* y (B) *Tlr4* en el hígado de ambos grupos de ratones. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron con respecto al control, los ratones WT alimentados con DAGAC. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (# p=0.05 y * p<0.05).

3. Estudio de la deficiencia de la citoquina LIGHT en ratones parcialmente deficientes en *Irs2* y alimentados con dieta alta en grasa y alta en colesterol durante 16 semanas

Irs2 es un mediador clave de la señalización de la insulina y su inactivación produce alteraciones en el metabolismo de la glucosa como RI, DMT2 y disfunción de la célula β [141]. Dada la relación entre la RI y la EHGNA se investigó a continuación el efecto de la inactivación de *Light* en ratones parcialmente deficientes en *Irs2*, ratones *Irs2*^{+/-}, alimentados con DAGAC durante 16 semanas.

3.1. La deficiencia de *Light* mejora el metabolismo glucémico y disminuye la esteatosis hepática en ratones *Irs2*^{+/-}

La deficiencia de *Light* en ratones *Irs2*^{+/-} demostró una reducción del peso corporal (Figura 41A), sin cambios en el contenido de grasa corporal o la distribución de esta (Figura 41B) comparado con los ratones control *Irs2*^{+/-}. Además, los niveles de glucosa en estado de ayuno fueron inferiores en los ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} comparado con sus controles *Irs2*^{+/-} (Figura 41C). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de insulina en estado de ayuno entre ambos grupos de ratones (Figura 41D).

Por otro lado, los ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} presentaron una mejora en el metabolismo de la glucosa medido por el AUC_{glucosa} comparado con los ratones control *Irs2*^{+/-} (Figura 42A). La liberación de insulina estimulada por glucosa durante el TTG mostró una menor secreción en los ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} a los 30 minutos del test medido con el AUC_{insulina}, sin cambios significativos cuando se midió a tiempo final (AUC_{insulina} a 120 minutos) (Figura 42B). Ambos grupos de ratones presentaron una sensibilidad a insulina similar, medido mediante al AUC_{glucosa} obtenido tras el TTI (Figura 42C).

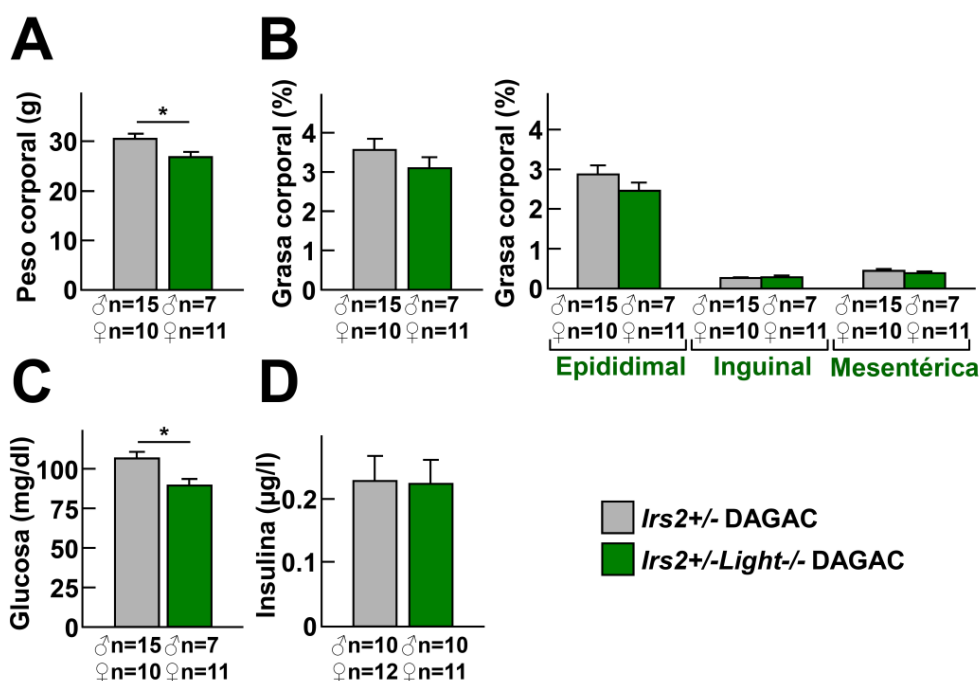


Figura 41. Peso corporal, grasa corporal y niveles basales de glucosa e insulina en estado de ayuno en ratones *Irs2*^{+/-} y ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} alimentados con DAGAC. (A) Peso corporal, (B) porcentaje de grasa corporal y porcentaje de la grasa epididimal, inguinal y mesentérica en ratones *Irs2*^{+/-} y ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}. (C) Glucosa e (D) insulina basal en ayunas en ambos grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (* p<0.05).

Similar a los resultados obtenidos con los ratones *Light*^{-/-}, los niveles lipídicos plasmáticos de c-Total, c-apoB, c-HDL, triglicéridos y NEFA entre ambos grupos de ratones fueron similares (Figura 43).

Por tanto, consistente con el modelo anterior, la deficiencia en *Light* en ratones *Irs2*^{+/-} mejora el metabolismo de la glucosa.

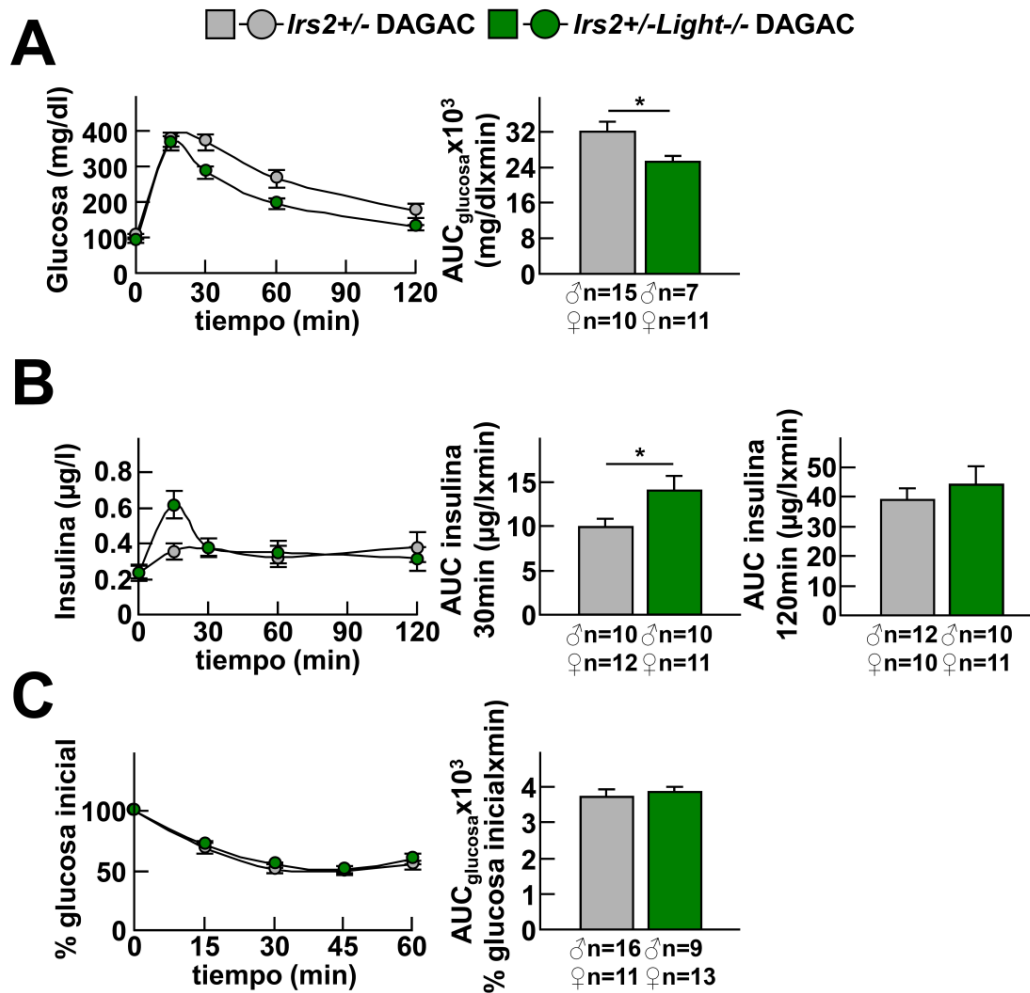


Figura 42. Caracterización metabólica de ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} alimentados durante 16 semanas con DAGAC. (A) Glucosa plasmática a diferentes tiempos durante el TTG para calcular el AUC_{glucosa} y (B) niveles de insulina para calcular el AUC_{insulina} a los 30 y 120 minutos del TTG en ambos grupos de ratones. (C) Niveles de glucosa plasmática (en porcentaje relativo a los niveles iniciales de glucosa) durante el TTI en ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} y sus controles. El análisis estadístico se realizó con el test t de Student (* p<0.05).

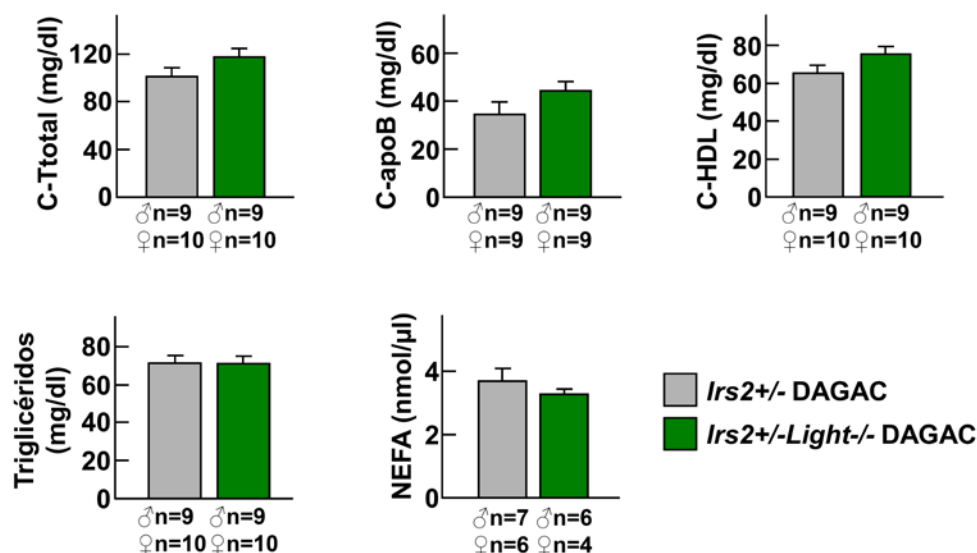


Figura 43. Niveles de lípidos en plasma de ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas. C-Total, c-apoB, c-HDL, triglicéridos y NEFA en ratones *Irs2*^{+/-} deficientes en *Light* y sus respectivos controles. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student.

3.2. La inactivación de *Light*^{-/-} en ratones *Irs2*^{+/-} reduce la inflamación sistémica

El análisis de los leucocitos circulantes no mostró diferencias en el porcentaje de linfocitos, monocitos ni neutrófilos en los ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} comparado con los ratones *Irs2*^{+/-} (Figura 44A). Además, los monocitos antiinflamatorios Ly6C^{low} estaban aumentados en los ratones *Irs2*^{+/-} deficientes en *Light*^{-/-} comparado con sus controles (Figura 44B).

No se encontraron diferencias en los linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ totales entre ambos grupos de ratones (Figura 45A). El análisis de la activación de los linfocitos T (CD3⁺CD69⁺, CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺) mostró una disminución del porcentaje de estos en los ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} comparado con los ratones *Irs2*^{+/-} (Figura 45A). Los ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} no presentaron diferencias en los linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ comparado con los ratones control (Figura 45B). Además, el análisis de las subpoblaciones de linfocitos Th CD4⁺ reveló una reducción en los ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} de los niveles de linfocitos Th1 CXCR3⁺, Th9 CCR4⁺CCR6⁺ y Th17 CCR4⁺CCR6⁺ y un aumento de los niveles de las células Th2 CCR4⁺CCR6⁺ comparado con los ratones *Irs2*^{+/-} (Figura 45C).

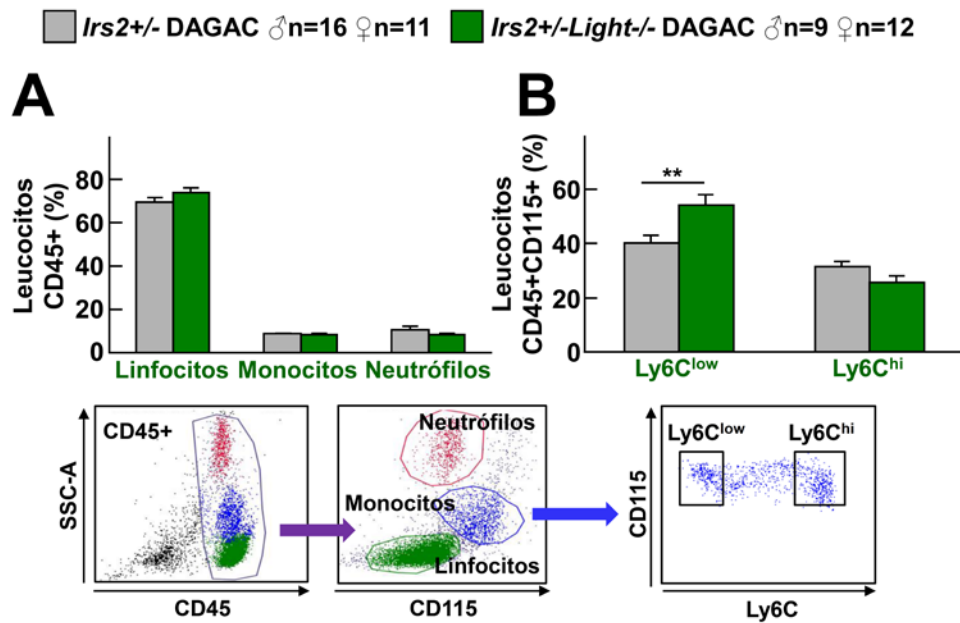


Figura 44. Poblaciones leucocitarias y subtipos de monocitos en ratones *Irs2*^{+/-} y ratones *Irs2*^{+/-}*-Light*^{-/-}. (A) Porcentaje de linfocitos, monocitos y neutrófilos de ratones *Irs2*^{+/-}*-Light*^{-/-} y sus controles. (B) Porcentaje de monocitos Ly6C^{low} y Ly6C^{hi} en ambos grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (** p<0.01).

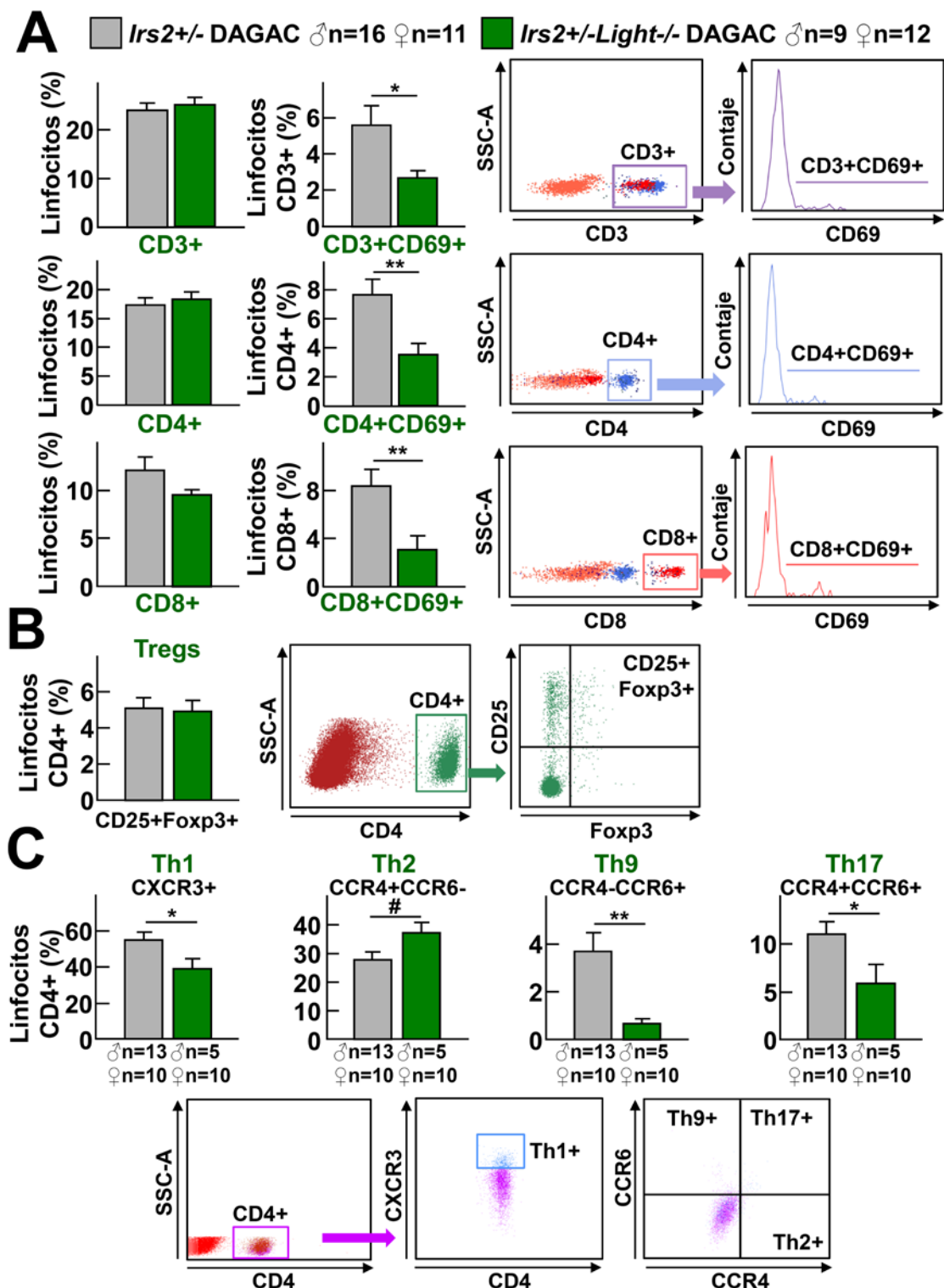


Figura 45. Análisis de los linfocitos circulantes en ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}. (A) Porcentaje de linfocitos CD3+, CD4+, CD8+ y linfocitos activados CD3+CD69+, CD4+CD69+, CD8+CD69+ en ambos grupos de ratones. (B) Porcentaje de linfocitos Treg CD4+CD25+Foxp3+ y (C) linfocitos Th1 CXCR3+, Th2 CCR4+CCR6-, Th9 CCR4-CCR6+ y Th17 CCR4+CCR6+ en ratones *Irs2*^{+/-} y ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (# p=0.05, * p<0.05 y ** p<0.01).

Los niveles de las citoquinas plasmáticas TNF α e IL17 disminuyeron en los ratones *Irs2+/-Light-/-* comparado con los ratones *Irs2+/-*, sin cambios en las otras citoquinas analizadas (Figura 46).

Consistente con los resultados obtenidos en el modelo WT alimentados con DAGAC, la inactivación de *Light-/-* en ratones *Irs2+/-* disminuye la inflamación sistémica en estas mismas condiciones.

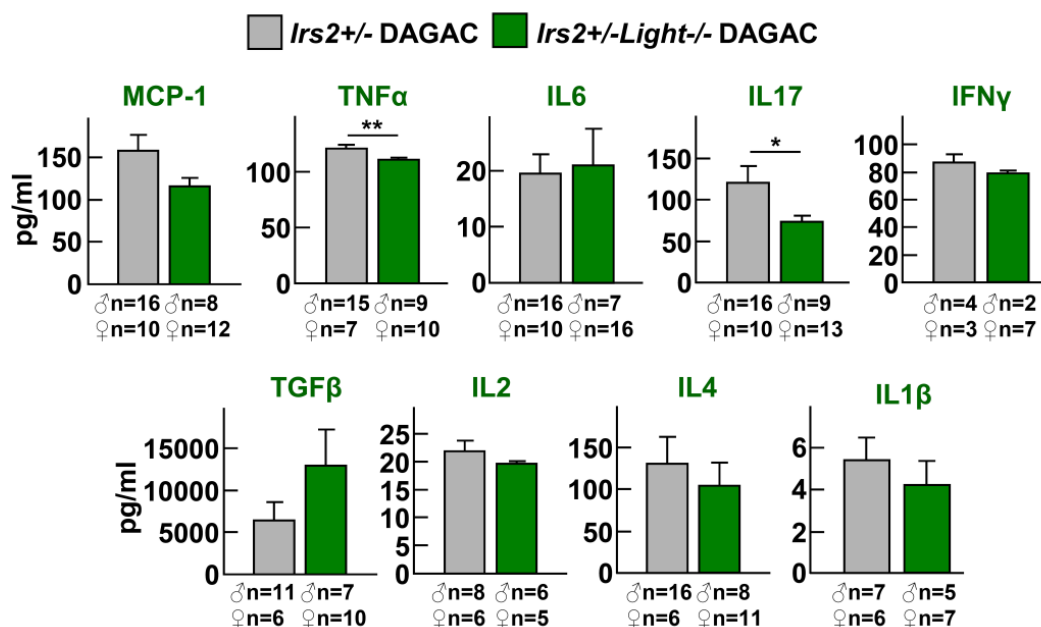
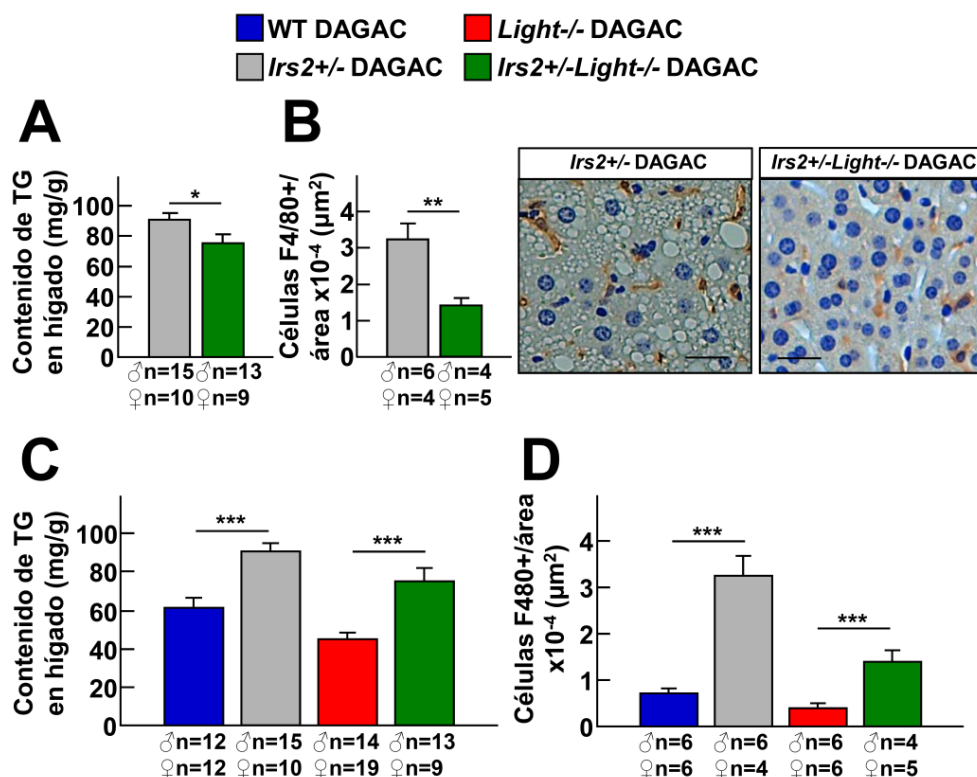


Figura 46. Análisis de las citoquinas plasmáticas en ratones *Irs2+/-* e *Irs2+/-Light-/-* alimentados con DAGAC 16 semanas. Niveles plasmáticos de MCP1, TNF α , IL6, IL17, IFN γ , TGF β , IL2, IL4 e IL1 β en ratones *Irs2+/-Light-/-* y sus controles, los ratones *Irs2+/-*. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* p<0.05, ** p<0.01).

3.3. La deficiencia de *Light* en ratones *Irs2+/-* disminuye la esteatosis hepática

Seguidamente se procedió al análisis fisiopatológico de los ratones *Irs2+/-* e *Irs2+/-Light-/-* alimentados con DAGAC. El análisis del hígado demostró un menor contenido de TG (Figura 47A) y de macrófagos F4/80+ (Figura 47B) en los ratones *Irs2+/-Light-/-* comparado con sus controles, los ratones *Irs2+/-*.

El estudio comparativo del impacto de *Light* en los modelos WT e *Irs2*^{+/-} mostró un incremento del contenido de TG (Figura 47C) y de macrófagos F4/80+ (Figura 47D) en los ratones *Irs2*^{+/-} independientemente de la deficiencia de *Light*.



Consistente con los resultados anteriores en el modelo WT, el análisis de la autofagia, medido mediante el marcador p62, no mostró diferencias entre los ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} (Figura 48).

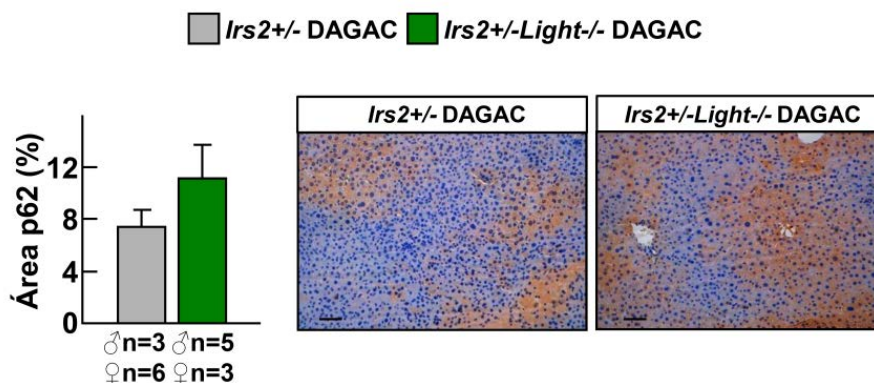


Figura 48. Análisis de la autofagia en ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} alimentados con DAGAC durante 16 semanas. Cuantificación de la autofagia mediante el marcador p62 medido como porcentaje de área p62+ con respecto al área total de hígado (μm^2) en ambos grupos de ratones. A la derecha del panel se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica. Escala: 50 μm El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student.

3.4. Caracterización del tejido adiposo en ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}

3.4.1. Análisis de la inflamación en el tejido adiposo de ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}

El análisis de la secreción de citoquinas del tejido adiposo demostró una reducción de la secreción de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL17, sin cambios en MCP1 e IL6, en ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} comparado con ratones control *Irs2*^{+/-} (Figura 49A). El análisis de la FVE demostró una disminución del porcentaje de macrófagos M1 F4/80+CD11c+ y un mayor porcentaje de macrófagos M2 F4/80+CD206+ en ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}, comparado con sus controles (Figura 49B).

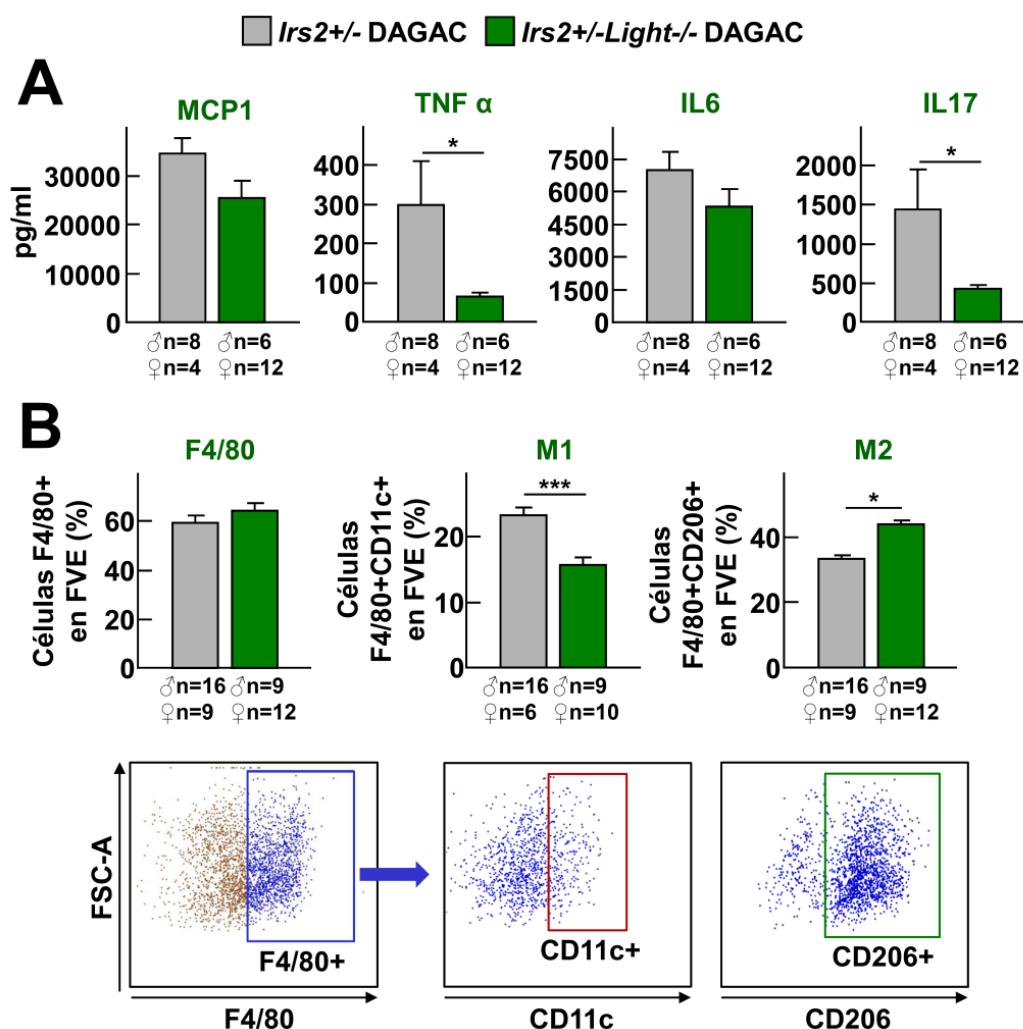


Figura 49. Caracterización de la inflamación del tejido adiposo en ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}. (A) Secreción de las citoquinas MCP1, TNF α , IL6 e IL17 en el tejido adiposo en ambos grupos de ratones. (B) Análisis de los macrófagos totales F4/80+, macrófagos proinflamatorios M1 F4/80+CD11c+ y macrófagos antiinflamatorios M2 F4/80+CD206+ en las células de la FVE en ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} y sus controles. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* p<0.05 y *** p<0.001).

No se observaron diferencias ni en el porcentaje de linfocitos totales (CD3+ y CD4+) ni en la activación de estos (CD3+CD69+ y CD4+CD69+) (Figura 50A) ni en los linfocitos Treg CD4+CD25+Foxp3+ (Figura 50B) ni en los subtipos de linfocitos Th, Th1 CXCR3+, Th2 CCR6-CCR4+, Th9 CCR6+CCR4- y Th17 CCR6+CCR4+ (Figura 50C) de la FVE del tejido adiposo procedente de ambos grupos de ratones.

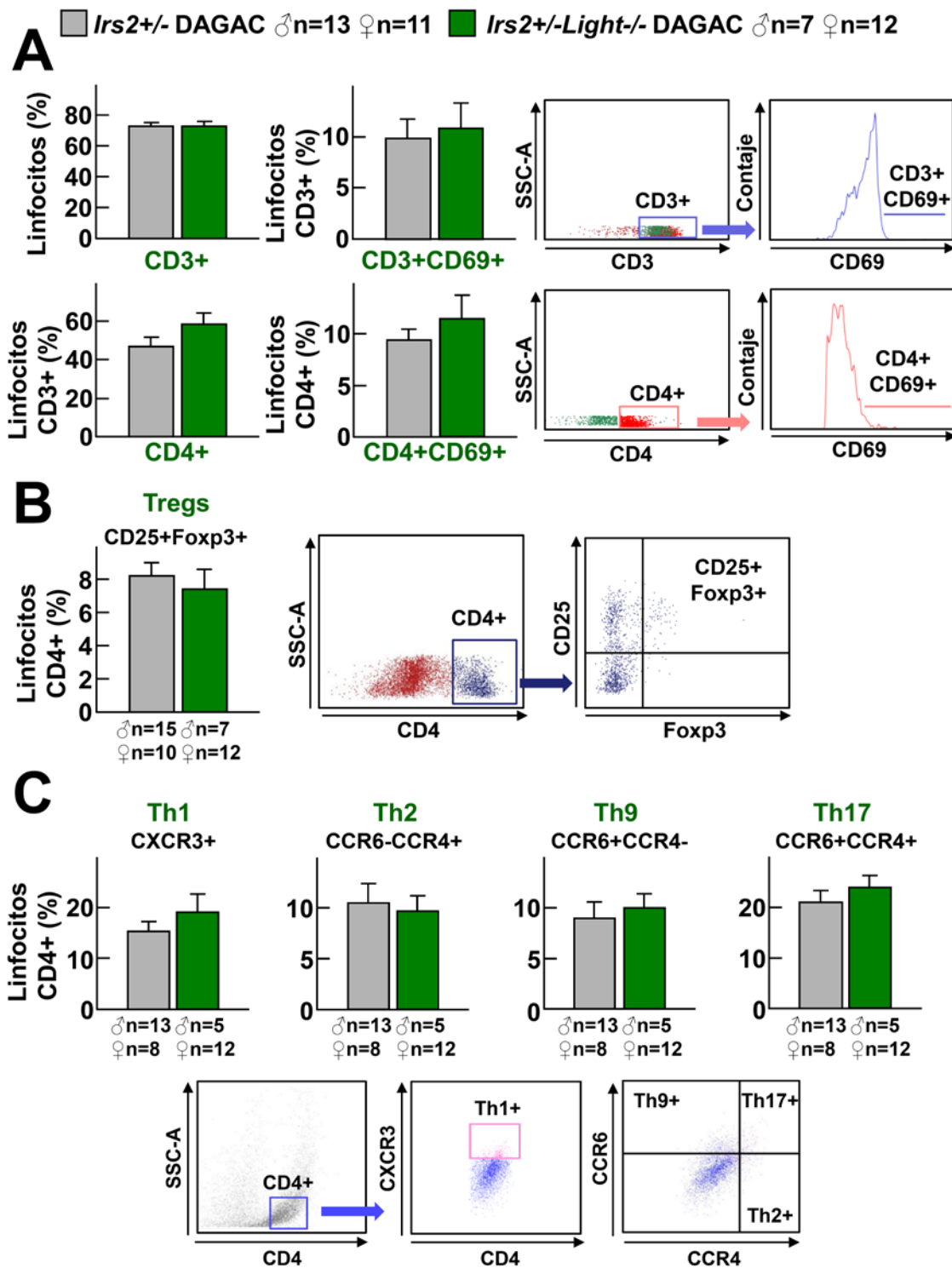


Figura 50. Análisis de los linfocitos en la FVE del tejido adiposo de ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}-*Light*^{-/-}. (A) Porcentaje de linfocitos CD3+, CD4+, y CD3+CD69+, CD4+CD69+, (B) porcentaje de linfocitos Treg CD25+Foxp3+ y (C) porcentaje de linfocitos Th1 CXCR3+, Th2 CCR6-CCR4+, Th9 CCR6+CCR4- y Th17 CCR6+CCR4+ en ratones *Irs2*^{+/-} y ratones *Irs2*^{+/-}-*Light*^{-/-}. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student.

A pesar de los resultados obtenidos anteriormente in vivo, el cultivo de MDMO de ambos grupos de ratones demostró que los macrófagos de ratones *Irs2*^{+/-} deficientes en *Light* secretan mayores niveles las citoquinas TNF α e IL6 y menores niveles de IL10 sin cambios en MCP1, comparado con los ratones *Irs2*^{+/-} (Figura 51).

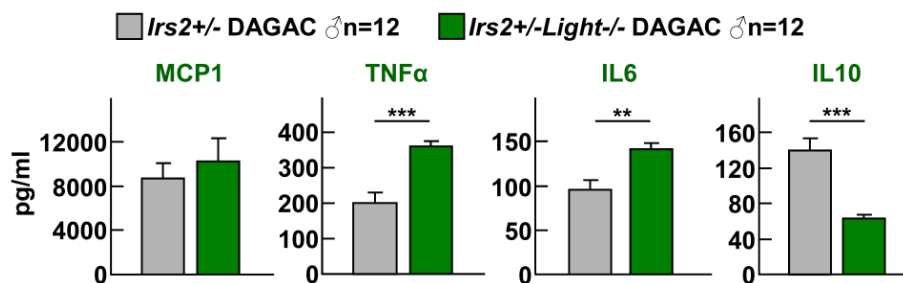


Figura 51. Secreción de citoquinas de MDMO de ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}. Secreción de las citoquinas MCP1, TNF α , IL6 e IL10 de MDMO de ambos grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (** p<0.01 y *** p<0.001).

3.4.2. Determinación del tamaño del adipocito en ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}

Dado que se observó una disminución del peso corporal en los ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}, se determinó el tamaño de los adipocitos. El análisis reveló un tamaño de adipocito inferior en los ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}, comparado con sus controles (Figura 52).

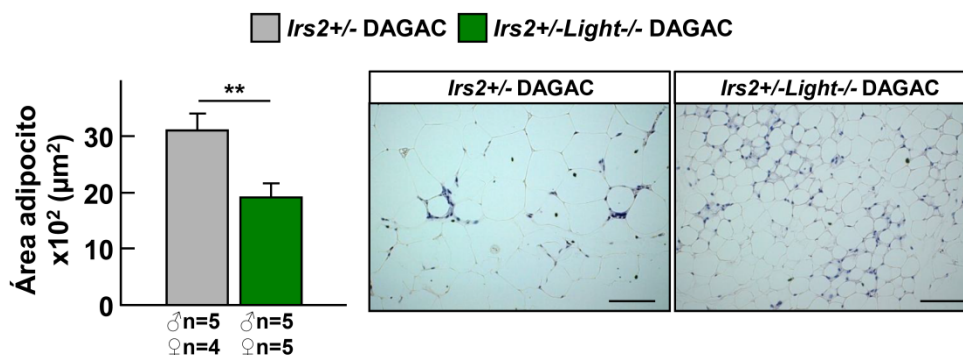


Figura 52. Tamaño de los adipocitos en ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}. Tamaño de los adipocitos medido en área (μm²) en ambos grupos de ratones. Escala: 100μm. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (** p<0.01).

Por lo tanto, la deficiencia de *Light* en ratones *Irs2*^{+/-} disminuye la inflamación del tejido adiposo mediante el aumento de los macrófagos M2 y la disminución de la producción de las citoquinas TNF α e IL17 y reduce la hipertrofia de los adipocitos.

3.4.3. Expresión del receptor HVEM y del receptor de la LT β en el tejido adiposo

Dado el cambio fenotípico de los macrófagos del tejido adiposo y la disminución del tamaño del adipocito en los ratones *Irs2*^{+/-} deficientes en *Light* se estudió la expresión de sus receptores, LT β R y HVEM, en el tejido adiposo. El análisis mediante inmunofluorescencia doble del receptor HVEM y del LT β R mostró expresión de ambos en los macrófagos del tejido adiposo, aunque no se observaron cambios en el nivel de expresión (Figura 53A). Consistentemente, el análisis de la expresión génica de ambos receptores no se vio alterada entre los ratones *Irs2*^{+/-} y los ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} (Figura 53B).

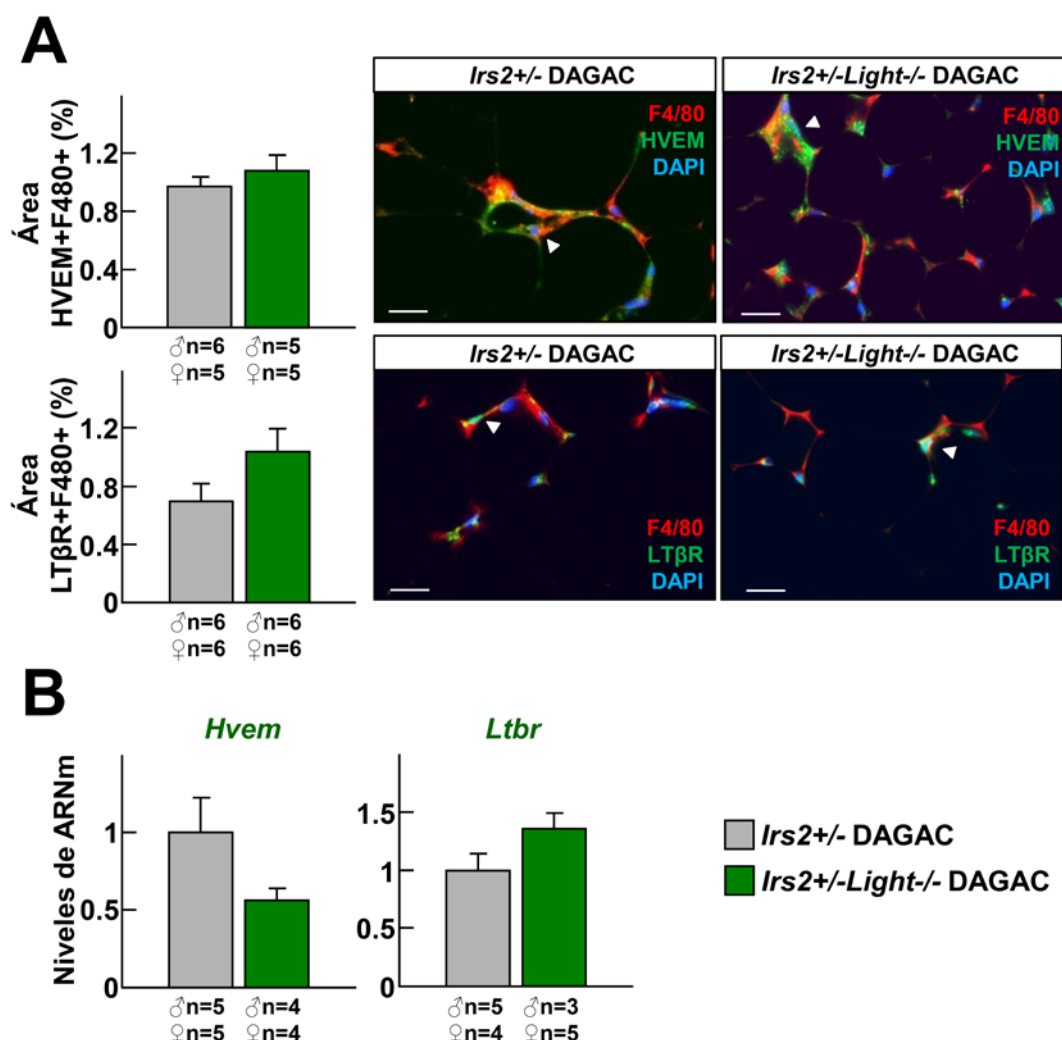


Figura 53. Análisis del receptor HVEM y LTβR del tejido adiposo en ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}. (A) Porcentaje de área de F4/80 doble positivos para HVEM o para el LTβR relativo al área total de tejido adiposo (μm²) en ambos grupos de ratones. Al lado de cada panel se muestran imágenes de la inmunofluorescencia. Escala: 25μm. **(B)** Expresión de *Hvem* y *Ltbr* en el tejido adiposo de ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron con respecto al control, los ratones *Irs2*^{+/-}. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student.

3.5. Estudio de la expresión génica en hígado en ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}

3.5.1. La deficiencia de *Light* en ratones *Irs2*^{+/-} altera la expresión de genes metabólicos en hígado

El análisis de expresión mostró un aumento en la expresión del gen *Abcg8*, *Cyp7a1* y *Fxr* (Figura 54B, C y D), sin cambios en *Lxr*, *Abcg5* y *Abca1* (Figura 54A, B y E) en los ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} comparado con los ratones *Irs2*^{+/-}. Estos resultados indican una disminución de la expresión de genes implicados en el transporte reverso de colesterol en los ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}.

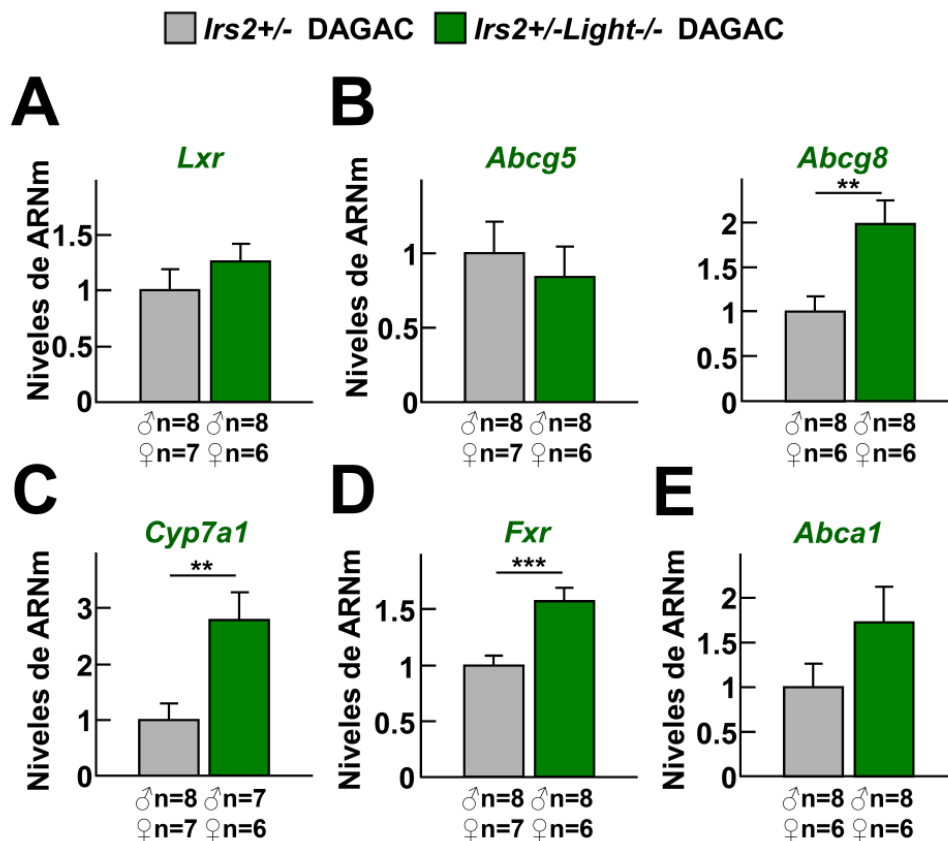


Figura 54. Expresión de *Lxr*, *Abcg5*, *Abcg8*, *Cyp7a1*, *Fxr* y *Abca1* en hígado de ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}. Niveles de ARNm de (A) *Lxr*, (B) *Abcg5*, *Abcg8*, (C) *Cyp7a1*, (D) *Fxr* y (E) *Abca1* en hígado en ambos grupos de ratones. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron con respecto al control, los ratones *Irs2*^{+/-}. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (** p<0.01, *** p<0.001).

Los niveles de expresión de *Hl* aumentaron en los ratones *Irs2+/-Light-/-* comparado con los ratones *Irs2+/-* (Figura 55D). Mientras que los niveles de *Srebf1c*, *Chrebp*, *Ldlr*, *Ppara* y *Pparg* fueron similares entre ambos grupos (Figura 55).

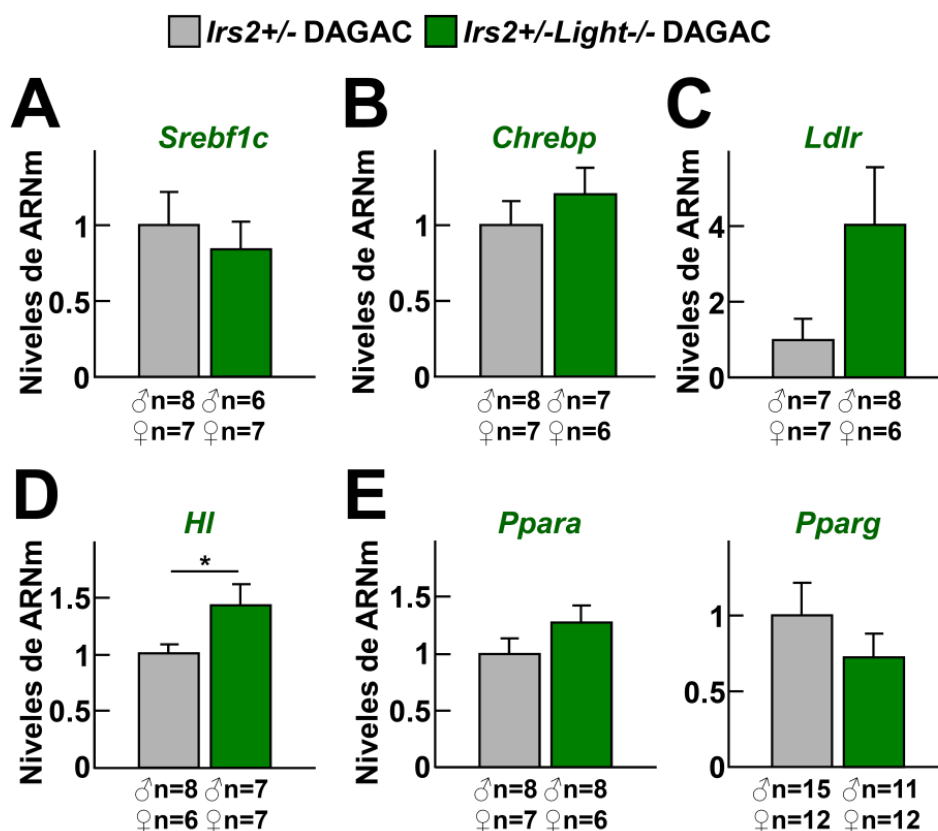


Figura 55. Expresión de *Srebf1c*, *Chrebp*, *Ldlr*, *Hl*, *Ppara* y *Pparg* en hígado de ratones *Irs2+/-* e *Irs2+/-Light-/-*. Niveles de ARNm de (A) *Srebf1c*, (B) *Chrebp*, (C) *Ldlr*, (D) *Hl*, (E) *Ppara* y *Pparg* en el hígado de ambos grupos de ratones. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron con respecto al control, los ratones *Irs2+/-*. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* $p < 0.05$).

3.5.2. La deficiencia en *Light* en ratones *Irs2+/-* altera la expresión de genes asociados a la transición esteatosis hepática-EHNA

Los análisis de expresión de genes relacionados con la transición hacia EHNA [142] revelaron una disminución de los niveles de *Klf10* en los ratones *Irs2+/-Light-/-* comparado con los ratones controles. No se

encontraron cambios en los otros genes *Klf* analizados (Figura 56A). A diferencia del modelo WT, los niveles de *Tlr4* fueron similares entre *Irs2*+/- *Light*-/- e *Irs2*+/- (Figura 56B).

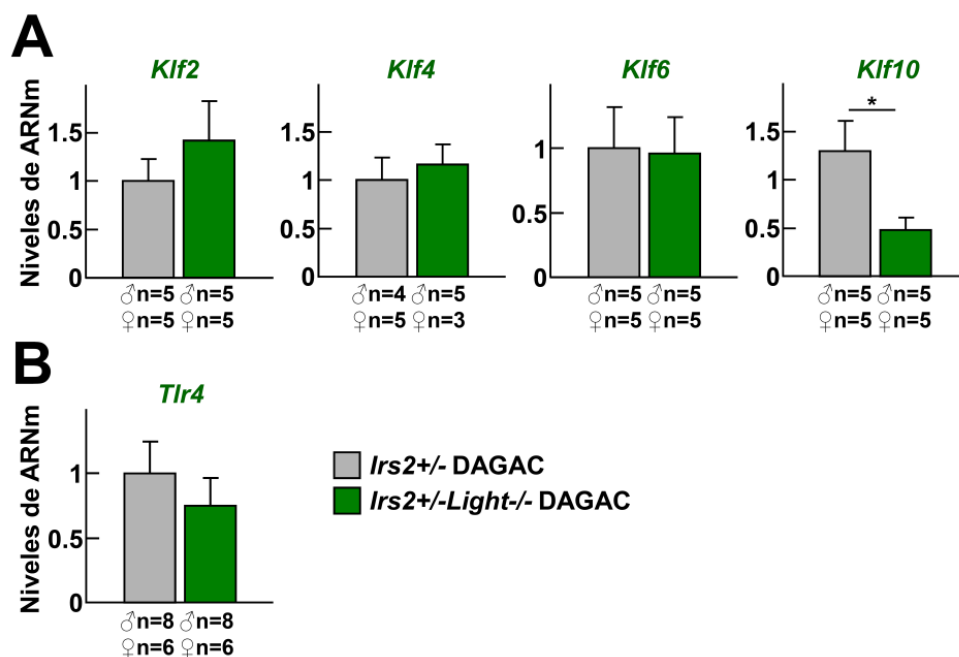


Figura 56. Expresión de *Klf2*, *Klf4*, *Klf6*, *Klf10* y *Tlr4* en hígado de ratones *Irs2*+/- e *Irs2*+/-*Light*-/-. Niveles de ARNm de (A) *Klf2*, *Klf4*, *Klf6*, *Klf10* y (B) *Tlr4* en el hígado de ambos grupos de ratones. Los niveles de ARNm se normalizaron con la expresión del gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron con respecto al control, los ratones *Irs2*+/-. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student (* p<0.05).

DISCUSIÓN

La EHGNA es una complicación metabólica asociada a la DMT2 y a la disfunción del tejido adiposo. En este estudio, se demuestra que la deficiencia genética de *Light*, una citoquina proinflamatoria, no altera el metabolismo, el hígado graso o la inflamación en ratones WT alimentados con DC. La comparación entre ratones WT alimentados con DC y DAGAC reveló, en estos últimos, un incremento en los niveles proteicos de los receptores de LIGHT, LT β R y HVEM, junto con un aumento del contenido hepático de TG, de linfocitos T CD3+, de la fibrosis y de marcadores inflamatorios. Por todo ello, la señalización dependiente de LIGHT puede tener un papel en la EHGNA inducida por la DAGAC. Consecuentemente, los ratones deficientes en *Light*, *Light*^{-/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}, alimentados con DAGAC mostraron una mejora en la tolerancia a la glucosa y, además, los ratones *Light*^{-/-} mejoraron la sensibilidad a insulina. Los ratones *Light*^{-/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-}, mostraron una disminución del hígado graso y de macrófagos F4/80+, y los ratones *Light*^{-/-} mostraron también una reducción de linfocitos T CD3+ hepáticos y de la expresión del factor transcripcional *Zbtb16*, determinante en los linfocitos NKT. De manera similar, el tejido adiposo de los ratones *Light*^{-/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} alimentados con DAGAC consistentemente mostró una disminución de la inflamación y de la secreción de las citoquinas proinflamatorias. El análisis de la inflamación sistémica mostró un aumento de monocitos antiinflamatorios CD115+Ly6C^{low} en los ratones *Light*^{-/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} comparado con sus controles y una reducción de linfocitos proinflamatorios así como de los niveles de citoquinas proinflamatorias. Los ratones *Light*^{-/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} también presentaron una alteración en la expresión de genes metabólicos que fue consistente con una mejora de la homeostasis hepática y una reducción de genes implicados en la transición esteatosis simple-EHNA y EHNA-CHC comparado con los ratones WT e *Irs2*^{+/-}. Estos resultados indican que la deficiencia de *Light* mejora el metabolismo de carbohidratos, el hígado graso y la inflamación inducidos por la DAGAC. Por tanto, la señalización dependiente de LIGHT puede ser una diana terapéutica para restablecer la homeostasis hepática y aliviar la inflamación en condiciones de DAGAC.

Estudios previos han demostrado que individuos con RI/SMet [143] y con DMT2 [144] presentan niveles elevados de LIGHT circulante. En nuestro estudio la deficiencia de *Light* mejoró la tolerancia a la glucosa en ratones WT y en ratones *Irs2*^{+/-} y disminuyó la RI en los ratones *Light*^{-/-} alimentados todos con DAGAC. Estos datos sugieren que LIGHT podría

interferir en la sensibilidad a insulina, como se observa para otras citoquinas como TNF α [145]. De hecho, el tratamiento con un estímulo inflamatorio de células pancreáticas de pacientes con DMT2 produjo un incremento de la secreción de LIGHT y, a altas concentraciones de glucosa, inhibió la secreción de insulina [119].

Por otro lado, LIGHT regula los niveles de lípidos circulantes mediante la modulación de la expresión de genes hepáticos y de los linfocitos T hepáticos [91], [146]. Sin embargo, en nuestro estudio la deficiencia de *Light* no modificó los niveles circulantes de lípidos.

De acuerdo con investigaciones previas en la que se observa un aumento de los niveles de LIGHT en sujetos con EHGNA [89], la deficiencia de *Light* redujo el hígado graso y el contenido de macrófagos en los ratones WT e *Irs2*^{+/-} y de linfocitos T en ratones *Light*^{-/-} en DAGAC. Sin embargo, aunque estudios previos relacionan la autofagia con la EHGNA [53], no se encontraron diferencias en este proceso entre los grupos de ratones.

La reducción de la inflamación hepática en los ratones deficientes para *Light* se acompañó con una disminución del contenido macrófagos CD11c⁺ en el tejido adiposo, consistente con resultados que indican una asociación entre la inflamación del tejido adiposo con la progresión de la EHGNA [131]. Por otro lado, se ha demostrado que el trasplante de tejido adiposo de ratones obesos con un alto contenido en células CD11c⁺, induce la acumulación hepática de macrófagos y el daño hepático en ratones *Ldlr*^{-/-} alimentados con dieta alta en colesterol, mientras que este efecto no se produce en ratones alimentados con DC [147]. Estos resultados sugieren que, en presencia de DAGAC, el tejido adiposo rico en células CD11c⁺ puede promover la inflamación hepática y que la deficiencia en *Light* podría aliviar esta inflamación mediante la modulación de la disfunción del tejido adiposo. De hecho, se ha demostrado que LIGHT promueve la disfunción del tejido adiposo mediante la inhibición de la adipogénesis [116] y de la biogénesis de la grasa parda [115] e incrementa la respuesta inflamatoria de los adipocitos en cultivo [148]. Consistente con estos estudios, los explantes de tejido adiposo de ratones *Light*^{-/-} e *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} alimentados con DAGAC mostraron una disminución de la secreción de las citoquinas proinflamatorias, TNF α e IL17 y de MCP1 en ratones *Light*^{-/-}. De hecho, estas citoquinas se han relacionado con la progresión de la RI, el daño hepático, la fibrosis y la

EHNA [149]. De manera similar, en otro estudio se demostró que los ratones deficientes para el receptor de LIGHT, HVEM, presentan una menor secreción de MCP1 y TNF α junto con un menor contenido de macrófagos M1 en el tejido adiposo [112].

Los ratones *Irs2+/-Light-/-* presentaron, además, una disminución del tamaño de los adipocitos indicando una mayor funcionalidad de este, ya que los adipocitos hipertróficos inducen la activación de la vía inflamatoria de NF- κ B y la expresión de citoquinas proinflamatorias mediante la producción de NEFA [150]. Por ello, la reducción del tamaño de los adipocitos es consistente con la disminución de la secreción de citoquinas proinflamatorias del tejido adiposo.

Los resultados anteriores indican que LIGHT podría influir en la homeostasis hepática y en su función mediante la reducción de la acumulación de células inflamatorias y de la secreción de citoquinas inflamatorias del tejido adiposo. No obstante, la deficiencia de *Light* también afectó a la inflamación sistémica ya que los ratones *Light-/-* e *Irs2+/-Light-/-* en DAGAC mostraron un incremento de monocitos circulantes CD115+Ly6C^{low} y una disminución de los linfocitos y citoquinas proinflamatorias. Estos datos indican que la deficiencia de *Light* reduce el potencial inflamatorio de las células inmunes. Sin embargo, a pesar de los resultados anteriores, se observó un incremento en la secreción de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL6 junto con una disminución de la citoquina antiinflamatoria IL10 en MDMO en los ratones deficientes en *Light* comparado con sus respectivos controles. Coincidiendo con nuestros resultados en un estudio anterior, de trasplante de médula ósea, los macrófagos deficientes en *Light* mostraron un papel protector de LIGHT en un modelo de obesidad inducida por dieta [151]. Adicionalmente, las células inmunes en los ratones alimentados con DC no se vieron alteradas, a excepción de los linfocitos Th9 que aumentaron en los ratones *Light-/-*. Todos estos resultados indican que el fenotipo de las células inmunes observado en nuestras condiciones experimentales es dependiente de la dieta y no del desarrollo.

Por otro lado, en un estudio en el que se empleó una DDC y alta en grasa durante un periodo prolongado se demostró que los linfocitos NKT intrahepáticos aumentaban la secreción de LIGHT durante la transición de EHNA a CHC y, como consecuencia, la deficiencia de *Light* en ratones WT alimentados con DAGAC disminuyó la progresión de la enfermedad [122].

Consistente con esto, en este estudio la deficiencia de *Light* en ratones alimentados con DAGAC redujo la expresión hepática del factor transcripcional de los linfocitos NKT (ZBTB16). Estos resultados le confieren a LIGHT un papel proinflamatorio modulando las diferentes células inmunes y la progresión hacia EHNA en el hígado.

Los estudios de expresión mostraron un aumento de LT β R y HVEM en el hígado esteatótico e inflamado tras la DAGAC indicando que la señalización dependiente de LIGHT es relevante e inducida por señales de estrés como la DAGAC en la EHGNA y que la señalización defectuosa a través de este eje modera la progresión de la EHGNA.

Los resultados en las diferentes condiciones analizadas sugieren que LIGHT tiene un papel complejo en las enfermedades metabólicas hepáticas observándose diferentes efectos dependiendo de la aproximación experimental, la dieta y el modelo murino empleado. Nuestro estudio, donde la deficiencia de *Light* confiere protección frente a la EHGNA, podría ser relevante tanto en escenarios clínicos como en presencia de dietas con un alto contenido en colesterol o RI. Así, la deficiencia de *Light* puede ser potencialmente protectora en condiciones de ausencia de obesidad y en dietas ricas en colesterol ya que datos de la clínica en individuos delgados con EHGNA han asociado la presencia de colesterol en la dieta con la progresión a EHNA [152], [153]. Del mismo modo, la deficiencia de *Light* podría ser protectora en estados de RI ya que individuos no obesos con RI/SMet y señalización de la insulina defectuosa [154] presentan niveles elevados de LIGHT circulante [143]. En este sentido, en condiciones de DAGAC, la deficiencia de *Light* en ratones *Irs2*^{+/-}, con señalización de la insulina defectuosa y una mayor disfunción hepática que los ratones WT, disminuyó tanto la inflamación sistémica como la inflamación hepática y la del tejido adiposo y el desarrollo de esteatosis. Por tanto, en estos casos clínicos, las terapias dirigidas a la inhibición de LIGHT podrían ser especialmente ventajosas.

La señalización dependiente del LT β R modula la homeostasis lipídica mediante cambios en la expresión génica del hígado [146]. El análisis de genes lipogénicos, de la β -oxidación y gluconeogénicos no mostró de manera consistente una mejora en estas vías de señalización en los ratones deficientes en *Light*. Los niveles de expresión de los genes *Ppara*, *Pparg*, *Fxr* y *Hl* disminuyeron mientras que los niveles de *Srebf1c*, *Ldlr* y *Fasn* relacionados con la lipogénesis y la captura de lípidos aumentaron lo

que podría indicar un mecanismo compensatorio inducido por la reducción de los lípidos hepáticos. De hecho, en los ratones *Light*^{-/-} se encontró una reducción de *Lxr* y *Abca1* cuyas actividades se relacionan con el almacenamiento defectuoso de lípidos y la acumulación de colesterol hepático en la EHGNA [155], [156]. En el modelo *Irs2*^{+/-} la deficiencia de *Light* incrementó la expresión de los genes *Abcg8*, *Cyp7a1*, *Fxr* y *Hl* comparado con sus controles de manera que son necesarios estudios adicionales para entender la regulación del metabolismo hepático mediado por la señalización de LIGHT.

La expresión de genes hepáticos asociados al daño hepático en ratones *Light*^{-/-} mostró una disminución en el gen *Zbtb16*, factor transcripcional determinante para los linfocitos NKT [122], [157], y en los genes *Klf6* y *Tlr4* cuya función es importante en la transición de esteatosis simple a EHNA, la activación de las células estrelladas y el CHC [139], [157]. Asimismo, en los ratones *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} se produjo una disminución de la expresión de *Klf10*, implicado también en la transición hacia EHNA [142] por lo que la deficiencia de *Light* también podría reducir la progresión del hígado graso mediante la modulación de genes hepáticos relevantes involucrados en la EHGNA.

En resumen, el presente estudio muestra que la deficiencia de *Light* en ratones alimentados con DAGAC mejora la tolerancia a la glucosa y, en algunos casos, la sensibilidad a insulina. Además, la ausencia de la citoquina reduce la EHGNA, la inflamación hepática y la secreción de citoquinas proinflamatorias desde el tejido adiposo. Por otro lado, la inactivación génica de *Light* produjo un cambio en la expresión hepática que le confirió protección frente a la inflamación asociada a la transición de esteatosis simple a EHNA mediante la disminución de la expresión hepática de *Klf6*, *Klf10* y *Tlr4*. Estos resultados sugieren que el bloqueo de la señalización dependiente de LIGHT puede ser útil en la EHGNA en estados de RI y en la EHGNA causada por dietas ricas en colesterol.

CONCLUSIONS

1. The HFHCD feeding in mice increases LIGHT-dependent signalling.
2. *Light* deficiency in RCD-fed WT mice does not have an effect in metabolism, in NAFL or in tissue and systemic inflammation.
3. *Light* genetic inactivation improves carbohydrate metabolism, NAFL and systemic, hepatic and adipose tissue inflammation in HFHCD-fed WT and *Irs2*^{+/-} mice.
4. *Light* deficiency in HFHCD-fed mice decreases expression levels of genes involved with NAFLD progression.
5. Therapies to block LIGHT-dependent signalling might be of use in NAFLD in insulin resistance states and in NAFLD caused by fat and cholesterol-enriched diets.

REFERENCIAS

- [1] O. P. McGuinness and M. Shiota, "Carbohydrate metabolism". *Clin. Chem. Lab. Anim. Third Ed.*: 2017; 27: 745–776.
- [2] M. Dashty, "A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism". *Clin. Biochem.*: 2013; 46: 1339–1352.
- [3] M. S. Remedi and C. G. Nichols, "Hyperinsulinism and diabetes: genetic dissection of beta cell metabolism-excitation coupling in mice". *Cell Metab.*: 2009; 10: 442–53.
- [4] J. Zhang and F. Liu, "Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging". *IUBMB Life*: 2014; 66: 485–495.
- [5] A. R. Saltiel, "Insulin Signaling in the Control of Glucose and Lipid Homeostasis". *Handb. Exp. Pharmacol.*: 2015; 233: 51–71.
- [6] M. Björnholm *et al.*, "Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans". *Diabetologia*: 2002; 45: 1697–702.
- [7] E. Araki *et al.*, "Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene". *Nature*: 1994; 372: 186–190.
- [8] A. NANDI, Y. KITAMURA, C. R. KAHN, and D. ACCILI, "Mouse Models of Insulin Resistance". *Physiol. Rev.*: 2004; 84: 623–647.
- [9] C. J. Rhodes, "Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death?". *Science*: 2005; 307: 380–4.
- [10] N. Kubota *et al.*, "Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia". *Diabetes*: 2000; 49: 1880–9.
- [11] D. J. Withers *et al.*, "Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice". *Nature*: 1998; 391: 900–904.
- [12] S. B. Biddinger and C. R. Kahn, "FROM MICE TO MEN: Insights into the Insulin Resistance Syndromes". *Annu. Rev. Physiol.*: 2006; 68: 123–158.
- [13] L. Chang, S.-H. Chiang, and A. R. Saltiel, "Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport". *Mol. Med.*: 2004; 10: 65–71.
- [14] Y. Kido *et al.*, "Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2". *J. Clin. Invest.*: 2000; 105: 199–205.

Referencias

- [15] D. J. Withers, D. J. Burks, H. H. Towery, S. L. Altamuro, C. L. Flint, and M. F. White, "Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling". *Nat. Genet.*: 1999; 23: 32–40.
- [16] P. De Meyts, "The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network". *MDText.com, Inc.*, 2000.
- [17] P. M. Titchenell, M. A. Lazar, and M. J. Birnbaum, "Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin". *Trends Endocrinol. Metab.*: 2017; 28: 497–505.
- [18] H. Cho *et al.*, "Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)". *Science*: 2001; 292: 1728–31.
- [19] S. Guo, "Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms". *J. Endocrinol.*: 2014; 220: 1–23.
- [20] S. Chatterjee, K. Khunti, and M. J. Davies, "Type 2 diabetes". *Lancet*. 2017; 389: 2239–2251.
- [21] Organización Mundial de la Salud, "Informe mundial sobre la diabetes," 2016. [Online]. Available: <https://www.who.int/diabetes/global-report/es/>.
- [22] D. P. S. Kahn S, Cooper M, "Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future". *Lancet*. 2014; 383: 1068–1083.
- [23] A. E. Brown and M. Walker, "Genetics of Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome". *Curr. Cardiol. Rep.*: 2016; 18.
- [24] M. Bluher, "Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance?". *Clin. Sci.*: 2016; 130: 1603–1614.
- [25] K. Cusi, "Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications". *Gastroenterology*. 2012; 142: 711-725.e6.
- [26] N. L. Gluchowski, M. Becuwe, T. C. Walther, and R. V. Farese, "Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications". *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*: 2017; 14: 343–355.

- [27] A. Canbay, L. Bechmann, and G. Gerken, “Lipid Metabolism in the Liver”. *Z. Gastroenterol.*: 2007; 45: 35–41.
- [28] F. Marra and G. Svegliati-Baroni, “Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis”. *J. Hepatol.*: 2018; 68: 280–295.
- [29] F. R. Ponziani, S. Pecere, A. Gasbarrini, and V. Ojetti, “Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism”. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*: 2015; 9: 1055–1067.
- [30] Y. Kawano and D. E. Cohen, “Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease”. *J. Gastroenterol.*: 2013; 48: 434–441.
- [31] M. M. Nelson, David L; Cox, "*Lehninger. Principios de bioquímica*", 7th ed., 2018; Barcelona.
- [32] J. T. Haas, S. Francque, and B. Staels, “Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease”. *Annu Rev Physiol*: 2016; 78: 181–205.
- [33] M. Marcuccilli and M. Chonchol, “NAFLD and Chronic Kidney Disease”. *Int J Mol Sci*: 2016; 17: 562.
- [34] B. A. Neuschwander-Tetri, “Non-alcoholic fatty liver disease”. *BMC Med.*: 2017; 15: 45.
- [35] E. Cobbina and F. Akhlaghi, “Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters”. *Drug Metab. Rev.*: 2017; 49: 197–211.
- [36] E. Buzzetti, M. Pinzani, and E. A. Tsochatzis, “The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)”. *Metabolism*: 2016; 65: 1038–1048.
- [37] Á. Vinué, A. Herrero-Cervera, and H. González-Navarro, “Understanding the Impact of Dietary Cholesterol on Chronic Metabolic Diseases through Studies in Rodent Models”. *Nutrients*: 2018; 10: 939.
- [38] S. Marchisello *et al.*, “Pathophysiological, Molecular and Therapeutic Issues of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview”. *Int. J. Mol. Sci.*: 2019; 20: 1948.

- [39] B. K. Cole, R. E. Feaver, B. R. Wamhoff, and A. Dash, “Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) models in drug discovery”. *Expert Opin. Drug Discov.*: 2018; 13: 193–205.
- [40] H. H. Hansen, M. Feigh, S. S. Veidal, K. T. Rigbolt, N. Vrang, and K. Fosgerau, “Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis in preclinical drug development”. *Drug Discov. Today*: 2017; 22: 1707–1718.
- [41] S. H. Ibrahim, P. Hirsova, H. Malhi, and G. J. Gores, “Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation”. *Dig. Dis. Sci.*: 2016; 61: 1325–1336.
- [42] M. V. Machado *et al.*, “Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease”. *PLoS One*: 2015; 10: e0127991.
- [43] F. Ameer, L. Scandiuzzi, S. Hasnain, H. Kalbacher, and N. Zaidi, “De novo lipogenesis in health and disease”. *Metabolism*: 2014; 63: 895–902.
- [44] A. J. Sanyal, “Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease”. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*: 2019; 16: 377–386.
- [45] C. L. Gentile, M. Frye, and M. J. Pagliassotti, “Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response in Nonalcoholic Fatty Liver Disease”. *Antioxid. Redox Signal.*: 2011; 15: 505–521.
- [46] R. Ghemrawi, S.-F. Battaglia-Hsu, and C. Arnold, “Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disorders”. *Cells*: 2018; 7: 63.
- [47] C. Lebeaupin, D. Vallée, Y. Hazari, C. Hetz, E. Chevet, and B. Bailly-Maitre, “Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease”. *J. Hepatol.*: 2018; 69: 927–947.
- [48] X. Q. Zhang, C. F. Xu, C. H. Yu, W. X. Chen, and Y. M. Li, “Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease”. *World J. Gastroenterol.*: 2014; 20: 1768–1776.
- [49] C. Lebeaupin, D. Vallée, Y. Hazari, C. Hetz, E. Chevet, and B. Bailly-Maitre, “Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease”. *J. Hepatol.*: 2018;

- 69: 927–947.
- [50] F. Bessone, M. V. Razori, and M. G. Roma, “Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression”. *Cell. Mol. Life Sci.*: 2019; 76: 99–128.
- [51] Á. González-Rodríguez *et al.*, “Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD”. *Cell Death Dis.*: 2014; 5: 1179.
- [52] M. J. Czaja, “Function of Autophagy in Nonalcoholic Fatty Liver Disease”. *Dig. Dis. Sci.*: 2016; 61: 1304–1313.
- [53] C. Garc *et al.*, “Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm”. *FEBS J.*: 2015; 458: 215–237.
- [54] W. J. Kwanten *et al.*, “Role of autophagy in the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease: A controversial issue”. *World J Gastroenterol*: 2014; 20: 7325–7338.
- [55] S. Yan, N. Huda, B. Khambu, and X.-M. Yin, “Relevance of autophagy to fatty liver diseases and potential therapeutic applications”. *Amino Acids*: 2017; 49: 1965–1979.
- [56] J. C. Pickup, “Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes”. *Diabetes Care*: 2004; 27: 813–23.
- [57] R. Medzhitov, “Origin and physiological roles of inflammation”. *Nature*: 2008; 454: 428–435.
- [58] T. Zhou, Z. Hu, S. Yang, L. Sun, Z. Yu, and G. Wang, “Role of Adaptive and Innate Immunity in Type 2 Diabetes Mellitus”. *J. Diabetes Res.*: 2018; 2018: 1–9.
- [59] J. I. Odegaard and A. Chawla, “Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis”. *Science (80-. .)*: 2013; 339: 172–177.
- [60] J. C. McNelis and J. M. Olefsky, “Macrophages, Immunity, and Metabolic Disease”. *Immunity*: 2014; 41: 36–48.
- [61] M. Esteve Ràfols, “Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional”. *Endocrinol. y Nutr.*: 2014; 61: 100–112.
- [62] P. Matafome and R. Seiça, “Function and Dysfunction of Adipose Tissue”. *Adv. Neurobiol.*: 2017; 19: 3–31.

Referencias

- [63] N. Ouchi, J. L. Parker, J. J. Lugus, and K. Walsh, “Adipokines in inflammation and metabolic disease”. *Nat. Rev. Immunol.*: 2011; 11: 85–97.
- [64] C. de Luca and J. M. Olefsky, “Inflammation and insulin resistance”. *FEBS Lett.*: 2008; 582: 97–105.
- [65] S. Touch, K. Clément, and S. André, “T Cell Populations and Functions Are Altered in Human Obesity and Type 2 Diabetes.” *Curr. Diab. Rep.*: 2017; 17: 81.
- [66] J. M. Fernández-Real and J. C. Pickup, “Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes”. *Trends Endocrinol. Metab.*: 2008; 19: 10–16.
- [67] A. Kohlgruber and L. Lynch, “Adipose Tissue Inflammation in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes”. *Curr. Diab. Rep.*: 2015; 15: 92.
- [68] E. Fabbrini *et al.*, “Association between specific adipose tissue CD4+ T-cell populations and insulin resistance in obese individuals”. *Gastroenterology*: 2013; 145: 366–374.
- [69] M. Mraz and M. Haluzik, “The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation”. *J. Endocrinol.*: 2014; 222: R113–R127.
- [70] C. Xia, X. Rao, and J. Zhong, “Role of T Lymphocytes in Type 2 Diabetes and Diabetes-Associated Inflammation”. *J. Diabetes Res.*: 2017; 18: 1–6.
- [71] L. A. Velloso, D. L. Eizirik, and M. Cnop, “Type 2 diabetes mellitus—an autoimmune disease?”. *Nat. Rev. Endocrinol.*: 2013; 9: 750–755.
- [72] Y. J. Park, J. Park, J. Y. Huh, I. Hwang, S. S. Choe, and J. B. Kim, “Regulatory roles of invariant natural killer T cells in adipose tissue inflammation: Defenders against obesity-induced metabolic complications”. *Front. Immunol.*: 2018; 9: 1–7.
- [73] S. Talukdar *et al.*, “Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase”. *Nat. Med.*: 2012; 18: 1407–12.
- [74] N. Duarte, I. C. Coelho, R. S. Patarrão, J. I. Almeida, C. Penha-Gonçalves, and M. P. Macedo, “How Inflammation Impinges on NAFLD: A Role for Kupffer Cells”. *Biomed Res. Int.*: 2015; 2015: 1–

- 11.
- [75] M. A. Van Herck *et al.*, “The Differential Roles of T Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Obesity”. *Front. Immunol.*: 2019; 10: 82.
- [76] A. Alisi, G. Carpino, F. L. Oliveira, N. Panera, V. Nobili, and E. Gaudio, “The Role of Tissue Macrophage-Mediated Inflammation on NAFLD Pathogenesis and Its Clinical Implications”. *Mediators Inflamm.*: 2017; 2017: 1–15.
- [77] M. Nati, D. Haddad, A. L. Birkenfeld, C. A. Koch, T. Chavakis, and A. Chatzigeorgiou, “The role of immune cells in metabolism-related liver inflammation and development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)”. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*: 2016; 17: 29–39.
- [78] T. Asselah *et al.*, “Gene expression and hepatitis C virus infection”. *Gut.* 2009; 58: 846–858.
- [79] M. Arrese, D. Cabrera, A. M. Kalergis, and A. E. Feldstein, “Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH”. *Dig. Dis. Sci.*: 2016; 61: 1294–1303.
- [80] J. Bhattacharjee *et al.*, “Hepatic natural killer T-cell and CD8+ T-cell signatures in mice with nonalcoholic steatohepatitis”. *Hepatol. Commun.*: 2017; 1: 299–310.
- [81] B. Gao and H. Tsukamoto, “Inflammation in Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Friend or Foe?”. *Gastroenterology*: 2016; 150: 1704–1709.
- [82] M. Hu *et al.*, “Relationship between Oxidative Stress, Inflammation and Dyslipidemia with Fatty Liver Index in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus”. *Sci. Rep.*: 2016; 123: 1531–1545.
- [83] S. Rolla *et al.*, “The balance between IL-17 and IL-22 produced by liver-infiltrating T-helper cells critically controls NASH development in mice”. *Clin. Sci.*: 2015; 130: 193–203.
- [84] D.-H. Lu *et al.*, “Interleukin-22 ameliorates liver fibrogenesis by attenuating hepatic stellate cell activation and downregulating the levels of inflammatory cytokines”. *World J. Gastroenterol.*: 2015; 21: 1531.
- [85] L. A. Madge, M. S. Kluger, J. S. Orange, and M. J. May,

- “Lymphotoxin-alpha 1 beta 2 and LIGHT induce classical and noncanonical NF-kappa B-dependent proinflammatory gene expression in vascular endothelial cells”. *J. Immunol.*: 2008; 180: 3467–77.
- [86] A. W. Owens *et al.*, “Circulating lymphotoxin β receptor and atherosclerosis: observations from the Dallas Heart Study”. *Atherosclerosis*: 2010; 212: 601–6.
- [87] Y. Zhai *et al.*, “LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin β receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer”. *J. Clin. Invest.*: 1998; 102: 1142–1151.
- [88] M.-L. del Rio *et al.*, “Immunotherapeutic targeting of LIGHT/LT β R/HVEM pathway fully recapitulates the reduced cytotoxic phenotype of LIGHT-deficient T cells”. *MAbs*: 2016; 8: 478–490.
- [89] K. Otterdal *et al.*, “Increased Serum Levels of LIGHT/TNFSF14 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Possible Role in Hepatic Inflammation”. *Clin. Transl. Gastroenterol.*: 2015; 6: 95.
- [90] P. Stopfer, D. N. Mannel, and T. Hehlhans, “Lymphotoxin-beta receptor activation by activated T cells induces cytokine release from mouse bone marrow-derived mast cells”. *J. Immunol.*: 2004; 172: 7459–7465.
- [91] B. Chellan *et al.*, “LIGHT/TNFSR14 Can Regulate Hepatic Lipase Expression by Hepatocytes Independent of T Cells and Kupffer Cells”. *PLoS One*: 2013; 8: e54719.
- [92] C. Remouchamps, L. Boutaffala, C. Ganef, and E. Dejardin, “Biology and signal transduction pathways of the Lymphotoxin- $\alpha\beta$ /LT β R system”. *Cytokine Growth Factor Rev.*: 2011; 22: 301–310.
- [93] S. W. Granger and S. Rickert, “LIGHT–HVEM signaling and the regulation of T cell-mediated immunity”. *Cytokine Growth Factor Rev.*: 2003; 14: 289–296.
- [94] P. S. Norris and C. F. Ware, “The LT β R Signaling Pathway”. *TNF Recept. Assoc. Factors*: 2007; 597: 160–172.
- [95] N. Nadiminty, J. Y. Chun, Y. Hu, S. Dutt, X. Lin, and A. C. Gao, “LIGHT, a member of the TNF superfamily, activates Stat3 mediated by NIK pathway”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: 2007; 359:

- 379–384.
- [96] T. T. Lu and J. L. Browning, “Role of the lymphotoxin/LIGHT system in the development and maintenance of reticular networks and vasculature in lymphoid tissues”. *Front. Immunol.*: 2014; 5: 1–15.
- [97] T. Maeda, H. Suetake, T. Odaka, and T. Miyadai, “Original Ligand for LT β R Is LIGHT: Insight into Evolution of the LT/LT β R System”. *J. Immunol.*: 2018; 201: 202–214.
- [98] S.-C. Sun, “The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation”. *Nat. Rev. Immunol.*: 2017; 17: 545–558.
- [99] J. Bechill and W. J. Muller, “Herpesvirus entry mediator (HVEM) attenuates signals mediated by the lymphotoxin β receptor (LT β R) in human cells stimulated by the shared ligand LIGHT”. *Mol. Immunol.*: 2014; 62: 96–103.
- [100] I. a Rooney *et al.*, “The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells”. *J. Biol. Chem.*: 2000; 275: 14307–15.
- [101] C. F. Ware, “Targeting the LIGHT-HVEM Pathway”. *Adv. Exp. Med. Biol.*: 2009; 647: 146–155.
- [102] M. L. del Rio, C. L. Lucas, L. Buhler, G. Rayat, and J. I. Rodriguez-Barbosa, “HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation”. *J. Leukoc. Biol.*: 2010; 87: 223–235.
- [103] G. Cai and G. J. Freeman, “The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation”. *Immunol. Rev.*: 2009; 229: 244–58.
- [104] T. C. Cheung, “Modulation of T cell proliferation through the LIGHT-HVEM-BTLA cosignaling pathway”. *Recent Pat. DNA Gene Seq.*: 2009; 3: 177–82.
- [105] M. W. Steinberg, T. C. Cheung, and C. F. Ware, “The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation”. *Immunol. Rev.*: 2011; 244: 169–87.
- [106] A. Coope, A. S. Torsoni, and L. A. Velloso, “Mechanisms in endocrinology: Metabolic and inflammatory pathways on the pathogenesis of type 2 diabetes”. *Eur. J. Endocrinol.*: 2016; 174: 175–187.

- [107] G. Sabio and R. J. Davis, “TNF and MAP kinase signalling pathways”. *Semin. Immunol.*: 2014; 26: 237–245.
- [108] W.-W. Lin and S.-L. Hsieh, “Decoy receptor 3: A pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer”. *Biochem. Pharmacol.*: 2011; 81: 838–847.
- [109] W. Liu *et al.*, “Mechanistic Basis for Functional Promiscuity in the TNF and TNF Receptor Superfamilies: Structure of the LIGHT:DcR3 Assembly”. *Structure*: 2014; 22: 1252–1262.
- [110] X. Wan, G. Shi, M. Semenuk, J. Zhang, and J. Wu, “DcR3/TR6 modulates immune cell interactions”. *J. Cell. Biochem.*: 2003; 89: 603–612.
- [111] G. Shi, Y. Wu, J. Zhang, and J. Wu, “Death Decoy Receptor TR6/DcR3 Inhibits T Cell Chemotaxis In Vitro and In Vivo”. *J. Immunol.*: 2003; 171: 3407–3414.
- [112] H. J. Kim *et al.*, “HVEM-deficient mice fed a high-fat diet are protected from adipose tissue inflammation and glucose intolerance”. *FEBS Lett.*: 2011; 585: 2285–2290.
- [113] E. K. Choi *et al.*, “TNFRSF14 deficiency protects against ovariectomy-induced adipose tissue inflammation”. *J. Endocrinol.*: 2014; 220: 25–33.
- [114] J. Bassols, J. M. Moreno, F. Ortega, W. Ricart, and J. M. Fernandez-Real, “Characterization of herpes virus entry mediator as a factor linked to obesity”. *Obesity*: 2010; 18: 239–246.
- [115] Y. Kou *et al.*, “LIGHT/TNFSF14 signaling attenuates beige fat biogenesis”. *FASEB J.*: 2019; 33: 1595–1604.
- [116] G. Tiller *et al.*, “LIGHT (TNFSF14) inhibits adipose differentiation without affecting adipocyte metabolism”. *Int. J. Obes.*: 2011; 35: 208–216.
- [117] C. Liu, H. Ding, W. Zhu, S. Jiang, J. Xu, and G. M. Zou, “LIGHT regulates the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells”. *J. Cell. Biochem.*: 2013; 114: 346–353.
- [118] J. Bassols, J. M. Moreno-Navarrete, F. Ortega, W. Ricart, and J. M. Fernandez-Real, “LIGHT is associated with hypertriglyceridemia in

- obese subjects and increased cytokine secretion from cultured human adipocytes”. *Int. J. Obes.*: 2010; 34: 146–156.
- [119] B. Halvorsen *et al.*, “LIGHT/TNFSF14 is increased in patients with type 2 diabetes mellitus and promotes islet cell dysfunction and endothelial cell inflammation in vitro”. *Diabetologia*: 2016; 59: 2134–2144.
- [120] R. A. Anders, S. K. Subudhi, J. Wang, K. Pfeffer, and Y.-X. Fu, “Contribution of the Lymphotoxin Receptor to Liver Regeneration”. *J. Immunol.*: 2005; 175: 1295–1300.
- [121] R. G. Ruddell *et al.*, “Lymphotoxin-beta receptor signaling regulates hepatic stellate cell function and wound healing in a murine model of chronic liver injury”. *Hepatology*: 2009; 49: 227–239.
- [122] M. J. Wolf *et al.*, “Metabolic Activation of Intrahepatic CD8 + T Cells and NKT Cells Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Cancer via Cross-Talk with Hepatocytes”. *Cancer Cell*: 2014; 26: 549–564.
- [123] J. C. Lo *et al.*, “Lymphotoxin beta receptor-dependent control of lipid homeostasis”. *Science*: 2007; 316: 285–8.
- [124] A. Asgharpour *et al.*, “A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer”. *J. Hepatol.*: 2016; 65: 579–88.
- [125] A. W. Norris *et al.*, “Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones”. *J. Clin. Invest.*: 2003; 112: 608–18.
- [126] S. M. Sanz-González *et al.*, “Increased p53 gene dosage reduces neointimal thickening induced by mechanical injury but has no effect on native atherosclerosis”. *Cardiovasc. Res.*: 2007; 75: 803–12.
- [127] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal. Biochem.*: 1976; 72: 248–54.
- [128] I. Palmer and P. T. Wingfield, “Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*”. *Curr. Protoc. Protein Sci.*: 2004; Chapter 6: Unit 6.3.
- [129] U. K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly

- of the head of bacteriophage T4". *Nature*: 1970; 227: 680–5.
- [130] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method". *Methods*: 2001; 25: 402–8.
- [131] C. Duval *et al.*, "Adipose tissue dysfunction signals progression of hepatic steatosis towards nonalcoholic steatohepatitis in C57BL/6 mice". *Diabetes*: 2010; 59: 3181–91.
- [132] S. Petta *et al.*, "Pathophysiology of Non Alcoholic Fatty Liver Disease". *Int. J. Mol. Sci.*: 2016; 17: 2082.
- [133] M. Arrese, D. Cabrera, A. M. Kalergis, and A. E. Feldstein, "Innate immunity and inflammation in NAFLD/NASH". *Dig. Dis. Sci.*: 2016; 61: 1294.
- [134] T. Lamark, S. Svenning, and T. Johansen, "Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm". *Essays Biochem.*: 2017; 61: 609–624.
- [135] F. Alegre *et al.*, "Role of p62/SQSTM1 beyond autophagy: a lesson learned from drug-induced toxicity *in vitro*". *Br. J. Pharmacol.*: 2018; 175: 440–455.
- [136] R. Noguchi *et al.*, "The selective control of glycolysis, gluconeogenesis and glycogenesis by temporal insulin patterns". *Mol. Syst. Biol.*: 2013; 9: 664.
- [137] K. L. Mendes *et al.*, "Distinct metabolic effects of resveratrol on lipogenesis markers in mice adipose tissue treated with high-polyunsaturated fat and high-protein diets". *Life Sci.*: 2016; 153: 66–73.
- [138] F. Ouali, F. Djouadi, C. Merlet-Bénichou, B. Riveau, and J. Bastin, "Regulation of Fatty Acid Transport Protein and Mitochondrial and Peroxisomal β -Oxidation Gene Expression by Fatty Acids in Developing Rats". *Pediatr. Res.*: 2000; 48: 691–696.
- [139] L. Miele *et al.*, "The Kruppel-like factor 6 genotype is associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease". *Gastroenterology*. 2008; 135: 282-291.e1.
- [140] C. Jin, J. Henao-Mejia, and R. A. Flavell, "Innate immune receptors: key regulators of metabolic disease progression". *Cell Metab.*: 2013;

- 17: 873–82.
- [141] Á. Vinué *et al.*, “Ink4/Arf locus restores glucose tolerance and insulin sensitivity by reducing hepatic steatosis and inflammation in mice with impaired IRS2-dependent signalling”. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*: 2015; 1852.
- [142] J. K. Kim, K. S. Lee, H. Y. Chang, W. K. Lee, and J. Il Lee, “Progression of diet induced nonalcoholic steatohepatitis is accompanied by increased expression of kruppel-like-factor 10 in mice”. *J. Transl. Med.*: 2014; 12: 1–11.
- [143] I. Andrés-blasco, Á. Vinué, A. Herrero-Cervera, S. Martínez-hervás, L. Nuñez, and L. Piqueras, “Hepatic lipase inactivation decreases atherosclerosis in insulin resistance by reducing LIGHT / Lymphotoxin β -Receptor pathway”. *Thromb. Haemost.*: 2016; 116.
- [144] B. Halvorsen *et al.*, “LIGHT/TNFSF14 is increased in patients with type 2 diabetes mellitus and promotes islet cell dysfunction and endothelial cell inflammation in vitro”. *Diabetologia*: 2016; 59: 2134–2144.
- [145] B.-C. Lee and J. Lee, “Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance”. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*: 2014; 1842: 446–462.
- [146] J. C. Lo *et al.*, “Lymphotoxin beta receptor-dependent control of lipid homeostasis”. *Science*: 2007; 316: 285–288.
- [147] M. Bijnen *et al.*, “Adipose tissue macrophages induce hepatic neutrophil recruitment and macrophage accumulation in mice”. *Gut*: 2018; 67: 1317–1327.
- [148] G. Tiller *et al.*, “LIGHT (TNFSF14) inhibits adipose differentiation without affecting adipocyte metabolism”. *Int. J. Obes.*: 2011; 35: 208–216.
- [149] A. Wree, M. E. Inzaugarat, and A. E. Feldstein, “Transmembrane BAX Inhibitor motif-containing 1, a novel anti-inflammatory approach for nonalcoholic steatohepatitis treatment”. *Hepatology*: 2018; 67: 438–441.
- [150] G. R. Hajer, T. W. Van Haeften, and F. L. J. Visseren, “Adipose tissue

- dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases”. *Eur. Heart J.*: 2008; 29: 2959–2971.
- [151] B. M. Saunders *et al.*, “Shining LIGHT on the metabolic role of the cytokine TNFSF14 and the implications on hepatic IL-6 production”. *Immunol. Cell Biol.*: 2018; 96: 41–53.
- [152] G. N. Ioannou, O. B. Morrow, M. L. Connole, and S. P. Lee, “Association between dietary nutrient composition and the incidence of cirrhosis or liver cancer in the united states population”. *Hepatology*: 2009; 50: 175–184.
- [153] K. Yasutake *et al.*, “Nutritional investigation of non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: the significance of dietary cholesterol”. *Scand. J. Gastroenterol.*: 2009; 44: 471–7.
- [154] H. González-Navarro *et al.*, “Molecular mechanisms of atherosclerosis in metabolic syndrome: role of reduced IRS2-dependent signaling”. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*: 2008; 28: 2187–94.
- [155] C. W. Joyce *et al.*, “ABCA1 overexpression in the liver of LDLr-KO mice leads to accumulation of pro-atherogenic lipoproteins and enhanced atherosclerosis”. *J. Biol. Chem.*: 2006; 281: 33053–65.
- [156] X.-Y. Zhao *et al.*, “Long noncoding RNA licensing of obesity-linked hepatic lipogenesis and NAFLD pathogenesis”. *Nat. Commun.*: 2018; 9: 2986.
- [157] C. Jin, J. Henao-Mejia, and R. A. Flavell, “Innate Immune Receptors: Key Regulators of Metabolic Disease Progression”. *Cell Metab.*: 2013; 17: 873–882.

ANEXO

PUBLICACIÓN DE LA TESIS

Título: Genetic inactivation of the LIGHT(TNFSF14) cytokine in mice restores glucose homeostasis and diminishes hepatic steatosis

Autores: Herrero-Cervera A, Vinué Á, Burks DJ, González-Navarro H.

Revista: *Diabetologia*. 2019 Nov, 62(11):2143-2157. doi: 10.1007/s00125-019-4962-6

PUBLICACIONES DURANTE EL PERIODO DE TESIS

Título: Type 1 diabetic mellitus patients with increased atherosclerosis risk display decreased CDKN2A/2B/2BAS gene expression in leukocytes

Autores: Martínez-Hervás S, Sánchez-García V, **Herrero-Cervera A**, Vinué Á, Real JT, Ascaso JF, Burks DJ, González-Navarro H

Revista: *Journal of Translational Medicine*. 2019 Jul; 17(1):222. doi: 10.1186/s12967-019-1977-1

Título: Changes in CDKN2A/2B expression associate with T-cell phenotype modulation in atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus

Autores: Vinué Á, Martínez-Hervás S, **Herrero-Cervera A**, Sánchez-García V, Andrés-Blasco I, Piqueras L, Sanz MJ, Real JT, Ascaso JF, Burks DJ, González-Navarro H

Revista: *Translational Research*. 2018 Jan; 931-5244(18): 30138-5. doi: 10.1016/j.trsl.2018.08.003

Título: Understanding the Impact of Dietary Cholesterol on Chronic Metabolic Diseases through Studies in Rodent Models

Autores: Vinué Á, **Herrero-Cervera A**, González-Navarro H

Revista: *Nutrients*. 2018 Jul; 10(7). doi: 10.3390/nu10070939

Título: The GLP-1 analogue lixisenatide decreases atherosclerosis in insulin-resistant mice by modulating macrophage phenotype

Autores: Vinué A, Navarro J, **Herrero-Cervera A**, García-Cubas M, Andrés-Blasco I, Martínez-Hervás S, Real JT, Ascaso JF, González-

Navarro H

Revista: *Diabetologia*. 2017 Sep; 60(9): 1801-12. doi: 10.1007/s00125-017-4330-3

Título: Hepatic lipase inactivation decreases atherosclerosis in insulin resistance by reducing LIGHT/Lymphotoxin β -Receptor pathway

Autores: Andrés-blasco I, Vinué Á, **Herrero-Cervera A**, Martínez-Hervás S, Nuñez L, Piqueras L, Ascaso JF, Sanz MJ, Burks D.J, González-Navarro H

Revista: *Thrombosis and Haemostasis*. 2016 Aug; 116(2): 379-93. doi: 10.1160/TH15-10-0773

OTRAS PUBLICACIONES

Título: Hepatic lipase deficiency produces glucose intolerance, inflammation and hepatic steatosis

Autores: Andrés-Blasco I, **Herrero-Cervera A**, Vinué Á, Martínez-Hervás S, Piqueras L, Sanz MJ, Burks D.J, González-Navarro H

Revista: *Journal of Endocrinology*. 2015 Dec; 227:179–9. doi: 10.1530/JOE-15-0219

Título: Ink4/Arf locus restores glucose tolerance and insulin sensitivity by reducing hepatic steatosis and inflammation in mice with impaired IRS2-dependent signalling

Autores: Vinué Á, Andrés-Blasco I, **Herrero-Cervera A**, Piqueras L, Andrés V, Burks DJ, Sanz MJ, González-Navarro H

Revista: *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015 Sep; 1852(9):1729–42. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.05.013



Genetic inactivation of the LIGHT (TNFSF14) cytokine in mice restores glucose homeostasis and diminishes hepatic steatosis

Andrea Herrero-Cervera¹ · Ángela Vinué¹ · Deborah J. Burks^{2,3} · Herminia González-Navarro^{1,3,4}Received: 17 December 2018 / Accepted: 10 June 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Aims/hypothesis Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is frequently associated with type 2 diabetes mellitus. Progression of NAFLD is mediated, among other things, by activation of inflammatory pathways. In the present study, the role of the proinflammatory cytokine LIGHT (TNFSF14) was explored in NAFLD and type 2 diabetes mellitus in mice deficient for the cytokine.

Methods *Light*-deficient (*Light*^{-/-}) mice and WT controls were fed a regular chow diet (RCD) or a high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) for 16 weeks. The expression of LIGHT and its receptors, herpes virus entry mediator (HVEM) and lymphotoxin β receptor (LTβR), was investigated in both dietary regimens. Glucose tolerance, insulin sensitivity, non-alcoholic fatty liver (NAFL), systemic and tissue inflammation, and metabolic gene expression were explored in *Light*^{-/-} and WT mice fed an RCD and an HFHCD. The effect of *Light* deficiency was also evaluated in hepatic tissue and in inflammation in HFHCD-fed *Irs2*^{+/-} mice with impaired insulin signalling.

Results *Light* deficiency did not have an effect on metabolism, in NAFL or in tissue and systemic inflammation, in RCD-fed WT mice. HVEM and LTβR were markedly increased in livers of HFHCD-fed WT mice compared with RCD-fed WT controls. In WT mice under HFHCD, *Light* deficiency improved glucose tolerance and insulin sensitivity. Non-alcoholic fatty liver disease activity (NAS) score, hepatic CD3⁺ T lymphocytes and F4/80⁺ macrophages were decreased in HFHCD-fed *Light*^{-/-} mice compared with HFHCD-fed WT controls. Consistent with a potential role of adipose tissue in hepatic homeostasis, *Light*^{-/-} mice exhibited augmented anti-inflammatory F4/80⁺CD206⁺ adipose tissue macrophages and reduced proinflammatory F4/80⁺CD11c⁺ adipose tissue macrophages. Moreover, adipose tissue explants from *Light*^{-/-} mice showed diminished secretion of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), TNF-α and IL-17 cytokines. Circulating *Light*^{-/-} leucocytes consistently displayed augmented levels of the patrolling Ly6C^{low} monocytes, decreased Th9 T cell subset and diminished plasma TNF-α and IL-6 levels. Similarly, *Light* deficiency in *Irs2*^{+/-} mice, which display impaired insulin signalling, also reduced NAFL as well as systemic and adipose tissue inflammation. Analysis of hepatic gene expression in *Light*^{-/-} mouse livers showed reduced levels of *Zbtb16*, the transcription factor essential for natural killer T (NKT) cell function, and two genes related to NAFLD and fibrosis, *Klf6* and *Tlr4*.

Conclusions/interpretation These results indicate that *Light* deficiency in HFHCD improves hepatic glucose tolerance, and reduces hepatic inflammation and NAFL. This is accompanied by decreased systemic inflammation and adipose tissue cytokine secretion and by changes in the expression of key genes such as *Klf6* and *Tlr4* involved in NAFLD. These results suggest that therapies to block LIGHT-dependent signalling might be useful to restore hepatic homeostasis and to restrain NAFLD.

Keywords Adipose tissue · Glucose intolerance · Hepatic steatosis · Insulin resistance · LIGHT (TNFSF14) · Metabolism

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00125-019-4962-6>) contains peer-reviewed but unedited supplementary material, which is available to authorised users.

✉ Herminia González-Navarro
herminia.gonzalez@uv.es

¹ INCLIVA Health Research Institute, Avda. Menéndez Pelayo, 4, 46010 Valencia, Spain

² The Prince Felipe Research Center (CIPF), Valencia, Spain

³ CIBER Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Madrid, Spain

⁴ Department of Didactics of Experimental and Social Sciences, University of Valencia, Valencia, Spain

Research in context

What is already known about this subject?

- Hepatic inflammation promotes the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)
- LIGHT (TNFSF14) is a proinflammatory cytokine increased in individuals with NAFLD and type 2 diabetes mellitus
- Cholesterol-rich diets and insulin resistance are both factors that predispose to NAFL-to-NASH (non-alcoholic steatohepatitis) transition

What is the key question?

- Does LIGHT modulate carbohydrate metabolism and progression of NAFLD in a cholesterol-rich diet?

What are the new findings?

- A high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) in WT mice promotes hepatic LIGHT/LT β R-HVEM-mediated signalling by increasing receptor expression
- *Light* deficiency in HFHCD-fed mice improves glucose tolerance, insulin sensitivity and NAFL, and reduces hepatic, adipose tissue and systemic inflammation
- *Light* deficiency decreases hepatic expression of genes associated with the NAFL-to-NASH transition, such as *Klf6* and *Tlr4*

How might this impact on clinical practice in the foreseeable future?

- Modulation of LIGHT-dependent signalling might be a therapeutic avenue to reduce the transition of NAFL to NASH associated with insulin resistance

Abbreviations

ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
ATM	Adipose tissue macrophage
CCR	C-C chemokine receptor
CXCR	CXC chemokine receptor
HCC	Hepatocellular carcinoma
HFHCD	High-fat high-cholesterol diet
HVEM	Herpes virus entry mediator
LIGHT	Homologous to Lymphotoxin, exhibits Inducible expression and competes with HSV Glycoprotein D for binding to Herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes
LT β R	Lymphotoxin β receptor
MCP1	Monocyte chemoattractant protein 1
NAFL	Non-alcoholic fatty liver
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NAS	Non-alcoholic fatty liver disease activity (score)
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NKT	Natural killer T
RCD	Regular chow diet
Th	T helper
TNFSF14	TNF superfamily member 14
SVF	Stromal vascular fraction
WT	Wild-type

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a major metabolic complication frequently associated with insulin resistance, a key feature of type 2 diabetes mellitus. Both of these metabolic alterations are becoming health problems due to the increasing obesity and sedentary lifestyle patterns in the population, which predispose to these pathologies [1].

Remarkably, NAFLD develops in up to 90% of obese and up to 70% of overweight people [2]. The excess of fat in adipose tissue and adipocyte hypertrophy activate NEFA release which accumulates in the liver, promoting non-alcoholic fatty liver (NAFL) [3]. Moreover, sustained adipose tissue expansion might activate stress-induced mitogen-activated protein kinases, generating adipose tissue dysfunction and promoting the release of proinflammatory cytokines into the bloodstream which facilitate inflammation-induced insulin resistance and NAFL. While NAFL is asymptomatic per se, hepatic inflammation induces the transition to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), a hepatic dysfunctional metabolic state. Interestingly, some studies in humans indicate that NASH might even develop before steatosis in some cases such as hepatic cholesterol accumulation [4], which induces inflammation and hepatic uptake of fatty acids. Current hypotheses on the NAFL-to-NASH transition involve many

factors such as defective insulin signalling, characteristic of insulin resistance, genetic predisposition and environmental factors such as cholesterol-enriched diets [5, 6].

LIGHT (TNFSF14) (Homologous to Lymphotoxin, exhibits Inducible expression and competes with HSV Glycoprotein D for binding to Herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes [TNF superfamily member 14]) is a soluble inflammatory cytokine that belongs to the TNF superfamily of proinflammatory molecules [7]. LIGHT is mainly produced by T cells and monocytes, and mediates its effects through three receptors, the lymphotoxin β receptor (LT β -R), the herpes virus entry mediator (HVEM) and decoy receptor 3 (DcR3) which inhibits its function [8]. Previous studies have shown that LIGHT-deficient macrophages display reduced production of cytokines [7], while constitutive overexpression of LIGHT promotes T lymphocyte activation and maturation and leads to severe inflammation and tissue destruction [9]. A role for LIGHT has also been suggested in hepatic homeostasis since investigations in humans associate enhanced levels of the cytokine with NAFLD [10], with insulin resistance and the metabolic syndrome [11], and with type 2 diabetes mellitus [12]. These studies suggest a function of LIGHT in the development of liver dysfunction-related diseases.

In the present study, we investigated whether genetic inactivation of LIGHT modulates hepatic metabolic diseases, insulin resistance and NAFLD, and potential underlying molecular mechanisms. To this end, metabolism, inflammation and hepatic derangement were investigated in *Light*^{-/-} and wild-type (WT) mice fed a regular chow diet (RCD) and a high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) for 16 weeks (NB *Light* is also known as *Tnfsf14*). In addition, studies were also performed in *Irs2*^{+/-} mice, which display impaired insulin signalling [13].

Methods

Generation of mice, diets and treatments The experimental (*Light*^{-/-} $n = 46$ and *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} $n = 21$) and control groups (WT = 36 and *Irs2*^{+/-} $n = 26$) were generated by crosses between WT, *Light*^{-/-} and *Irs2*^{+/-} mice at INCLIVA animal facility (all in C57BL/6J background). Mice had free access to water, and were under temperature- and humidity-controlled conditions ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, 40–45%) with 12 h light/dark cycles in a conventional animal facility. Mice were maintained on an RCD (2.8% fat; Panlab, Barcelona, Spain) and at 8 weeks of age were randomly placed on an HFHCD (10.8% fat, 0.75% cholesterol; S4892-E010, Ssniff, Soest, Germany) or left on an RCD for 16 more weeks. Analysis was performed in male and female mice. Animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee of INCLIVA and followed the 2010/63/EU directive from the European Parliament.

Plasma measurements, body and liver weight and fat mass distribution, and metabolic studies Biochemical determinations were performed in isolated plasma from whole blood in the presence of EDTA from overnight-fasted mice. Analysis included triacylglycerol, total cholesterol, ApoB-cholesterol, HDL-cholesterol [14], alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities following the indicated protocols. GTTs and ITTs [15] were performed in overnight- and 4 h-fasted mice, respectively, and glucose and insulin levels were measured as reported [16]. For liver weight and body fat mass distribution, liver and inguinal, epididymal and mesenteric fat pads were dissected from mouse bodies, weighed and expressed as percentage of total body weight. See [electronic supplementary material](#) (ESM) Methods.

Hepatic triacylglycerol content Triacylglycerol hepatic content was determined by tissue digestion and saponification in ethanolic potassium hydroxide [17], followed by an enzymatic measurement of glycerol content (Free Glycerol Reagent, Sigma, St Louis, MO, USA).

Western blot analysis Protein extracts were obtained by homogenising snap-frozen liver and adipose tissue as described [18] and prepared for immunoblot analysis using specific primary antibodies, anti-LT β R, anti-HVEM and anti- β -actin, followed by secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies and detected by chemiluminescence. See [electronic supplementary material](#) (ESM) Methods.

Immunohistopathological characterisation of liver Livers were sectioned from mice, washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde/PBS and paraffin embedded [13, 18]. Hepatic macrophage content was determined by anti-F4/80 marker immunohistochemistry [13]. For CD3, F4/80-LT β R, F4/80-HVEM and F4/80-LIGHT immunofluorescences, cross-sections were treated for antigen retrieval and incubated with primary antibodies followed by fluorescent secondary antibody [15]. Liver complications were assessed by steatosis, hepatocellular ballooning, lobular inflammation and non-alcoholic fatty liver disease activity (NAS) score in haematoxylin–eosin-stained sections and fibrosis in Masson trichrome-stained sections [19]. See [electronic supplementary material](#) (ESM) Methods.

Flow cytometry analysis of stromal vascular fraction cells from adipose tissue Stromal vascular fraction (SVF) cells were isolated by digestion of epididymal fat pads with 1 mg/ml type I collagenase (Worthington, Lakewood, NJ, USA) at 37°C for 30 min. SVF cells were washed, fixed with Zombie Aqua fixable viability kit (BioLegend, San Diego, CA, USA) and stained (30 min at room temperature) with anti-mouse F4/80-APC (MCA497APC, Bio-Rad, Hercules,

CA, USA), anti-mouse CD11c-PE (12-0114-81, eBioscience, San Diego, CA, USA) and anti-mouse CD206-AlexaFluor488 (MCA2235A488T, Bio-Rad). Stains were followed by incubation with FACS lysing solution for 15–20 min and flow cytometry analysis using FACSVerse (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) to determine proinflammatory M1 F4/80⁺CD11c⁺CD206⁻ adipose tissue macrophages (ATMs) and alternative M2 F4/80⁺CD11c⁻CD206⁺ ATMs.

ELISA Circulating levels of cytokines were determined in isolated plasma from heparinised mouse blood (10 U heparin/ml) obtained from different mice using the specific cytokine DuoSet ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Circulating leucocyte analysis by flow cytometry To characterise circulating leucocytes, 10 μ l heparinised whole blood was incubated for 30 min at room temperature with CD45-FITC, Ly6C-PerCP (553080 and 560525, BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) and CD115-APC (135509, BioLegend) for monocyte analysis. For identification of T helper (Th) cell subsets in mice, the human protocol was adapted for mouse blood as described [20, 21]. Mouse blood was also incubated (30 min, room temperature) with BV421-C-C chemokine receptor (CCR)4 (CD194) (131217, BioLegend), CD4-FITC (130-102-541, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany), CXC chemokine receptor (CXCR)3 (CD183)-APC (17-1831-80, eBioscience) and CCR6(CD196)-PEVio770 (130-103-818, Miltenyi). Stains were followed by incubation with FACS lysing solution (BD Biosciences) for 15–20 min before flow cytometry analysis using FACSVerse or Fortessa Flow cytometers (BD Biosciences).

Adipose tissue explant isolation Epididymal fat pads were minced into 2–3 mm³ and incubated for 24 h at 100 mg/ml in six-well plates with DMEM-P/S/A-10%FBS medium in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Explants were washed with PBSIX twice and incubated with DMEM-P/S/A-0.1%FBS medium for 24 h, and the medium was collected for cytokine analysis by ELISA.

Experiments with bone marrow-derived macrophages Cells from femoral bone marrow were cultured at 1×10^6 cells/ml density and differentiated over 7 days [15], then incubated for 24 h with serum-free medium for cytokine secretion analysis. See [electronic supplementary material](#) (ESM) Methods.

Gene expression analysis by quantitative real-time PCR RNA (0.5–1 μ g) from mouse tissues was obtained using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), reverse-transcribed with the Maxima First-Strand kit and amplified with Luminaris Color qPCR MasterMIX (Fermentas,

Waltham, MA, USA) on a 7900 FastSystem thermal cycler. Results were analysed with the provided software (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). mRNA levels were normalised to the cyclophilin expression and relativised to controls. The primer sequences can be found in ESM Table 1.

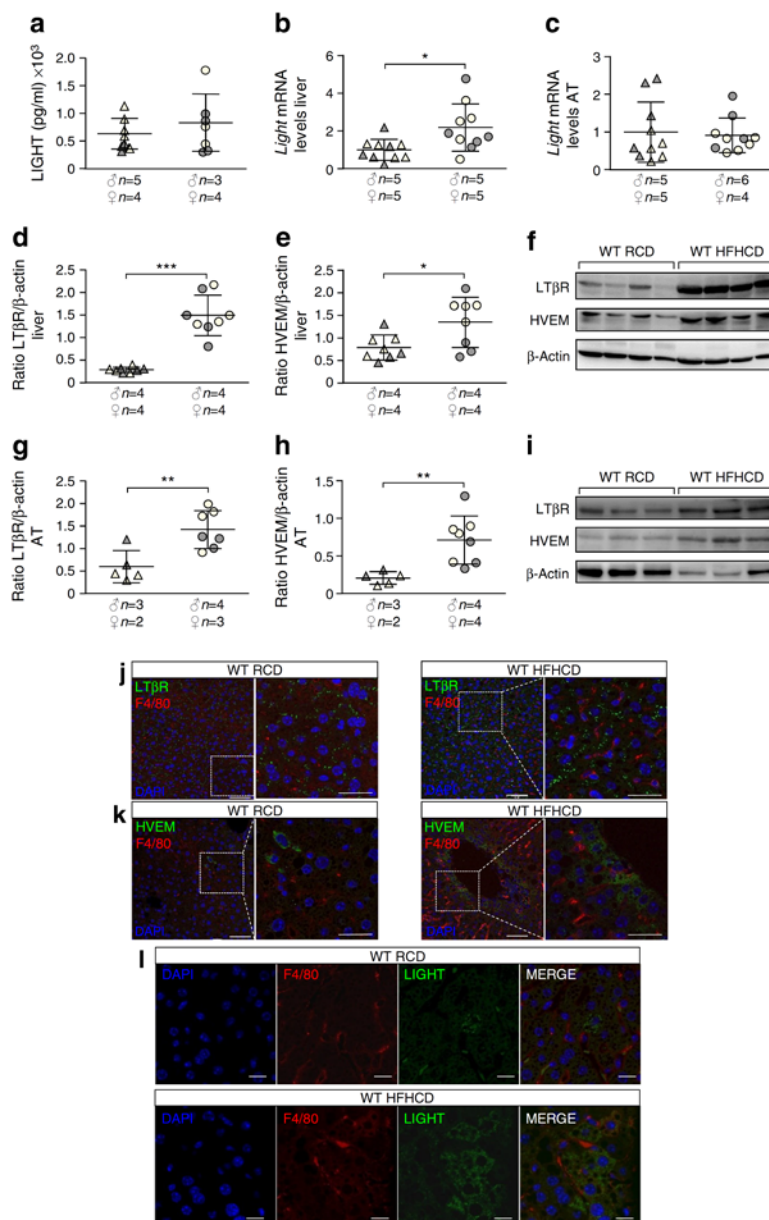
Statistical analysis Quantitative variables are shown as single data points and mean \pm SEM. Mouse sample replicates for in vivo data were obtained from individual mice. For adipose tissue and macrophage experiments, replicates were obtained from 4–6 samples derived from three or two independent mice per genotype. All data obtained were analysed by observers blinded to genotype and the criteria for exclusion were data out of range of the standard curve or samples that were lost during the experiment. Data were analysed for normal distribution using D'Agostino–Pearson omnibus test. Differences were evaluated with Student's *t* test (two groups, paired test), Mann–Whitney *U* test (nonparametric test), one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test (more than two mouse groups) and two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc multiple comparison test (two mouse groups and two treatments) (GraphPad Prism Software, La Jolla, CA, USA). Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. Male and female data were displayed together, and when sex-dependent responses were observed data were presented separately.

Results

HFHCD increases LT β R and HVEM expression in WT mice To evaluate the impact of HFHCD on LIGHT-mediated signalling in WT mice, circulating LIGHT levels and expression of LT β R and HVEM receptors in liver and adipose tissue were explored. Circulating LIGHT levels were similar between RCD- and HFHCD-fed WT mice (Fig. 1a). mRNA expression analysis showed enhanced levels of *Light* in liver in HFHCD-fed WT mice (Fig. 1b) but no changes in adipose tissue gene expression (Fig. 1c). Protein expression analysis of LIGHT receptors revealed augmented hepatic and adipose tissue levels of LT β R and HVEM (Fig. 1d–i) in HFHCD-fed WT mice compared with RCD-fed WT controls. Double immunofluorescences of LIGHT, LT β R and HVEM with F4/80 macrophage marker showed most of the receptor expression in parenchymal hepatic cells (Fig. 1j, k), while LIGHT levels were low and localised in macrophages as well as in other cell types (Fig. 1l). These data indicate that HFHCD feeding induces an increase in the LIGHT/LT β R–HVEM-dependent signalling.

Light deficiency improves glucose tolerance, insulin sensitivity and NAFLD in WT mice fed HFHCD Analysis of mice fed an RCD did not show differences in body weight, fat mass content or distribution between *Light*^{-/-} and WT mice or in liver

Fig. 1 LIGHT/LT β R-HVEM expression analysis in liver and adipose tissue from WT mice fed an RCD and an HFHCD. **(a)** Circulating plasma levels of LIGHT in mice fed an RCD and an HFHCD. mRNA levels of *Light* in **(b)** liver and **(c)** adipose tissue. Protein levels of **(d, g)** LT β R and **(e, h)** HVEM in liver **(d–f)** and adipose tissue **(g–i)** homogenates in RCD-fed and HFHCD-fed WT mice. **(f, i)** Representative blots showing LT β R and HVEM levels in **(f)** liver and **(i)** adipose tissue. Double immunofluorescence of **(j)** F4/80-LT β R, **(k)** F4/80-HVEM and **(l)** F4/80-LIGHT in WT mice fed an RCD and an HFHCD. Triangles, RCD-fed mice; circles, HFHCD-fed mice; white, male WT mice; grey, female WT mice. Scale bars, 50 μ m, and 20 μ m in the magnifications. mRNA levels were normalised to endogenous cyclophilin expression and are relative to RCD-fed mouse levels. Total protein levels were normalised to β -actin. Data are shown as individual data points with mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t* test (* p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001). AT, adipose tissue



weight (ESM Fig. 1a–d). Similarly, fasting glucose and insulin levels (Fig. 2a, b) were indistinguishable between mouse groups. No changes were observed in the GTT measured as the AUC_{glucose} variable, or in glucose-stimulated insulin release, measured as AUC_{insulin}, or in the ITT (Fig. 2c–e). Similarly, *Light* deficiency did not change body weight, body fat mass content or distribution, liver weight (ESM Fig. 2a–d), fasting glucose or insulin levels (Fig. 2f, g) in mice placed on

HFHCD. However, GTT revealed improved glucose tolerance, measured as the AUC_{glucose} variable (Fig. 2h), in *Light*-deficient mice compared with controls. No differences were observed in the glucose-stimulated insulin release during the GTT, measured as the AUC_{insulin} at 120 min of the test (Fig. 2i). However, AUC_{insulin} at 30 min in *Light*^{-/-} mice displayed an increase in insulin release compared with WT mice (Fig. 2j). ITT demonstrated improved insulin sensitivity in *Light*^{-/-}

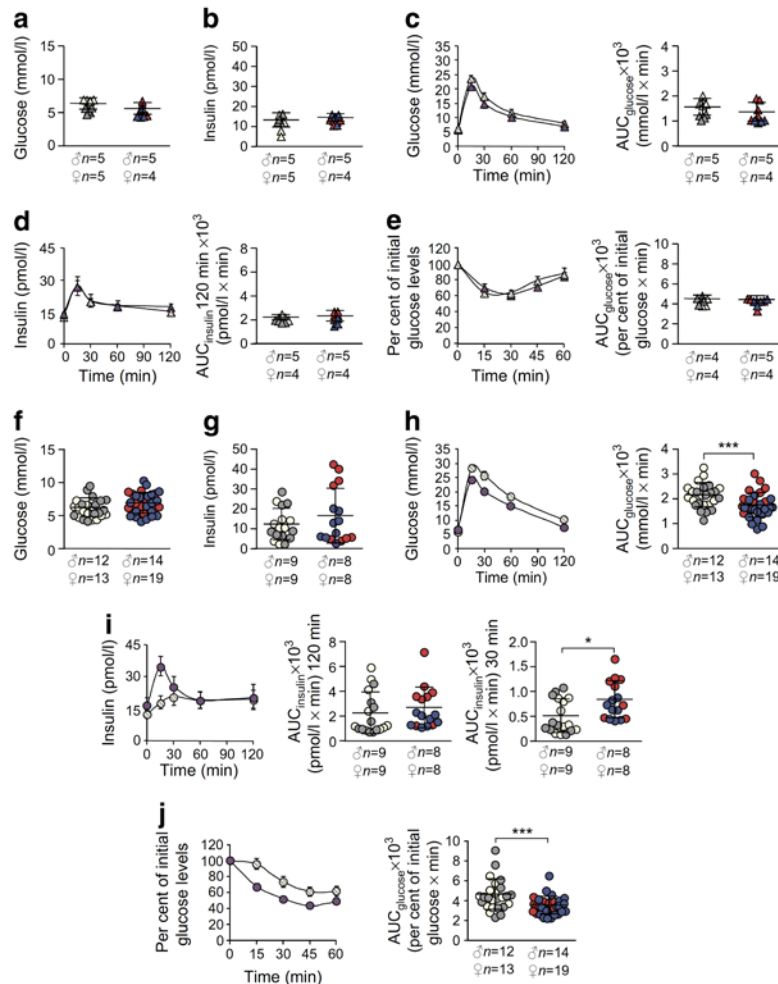


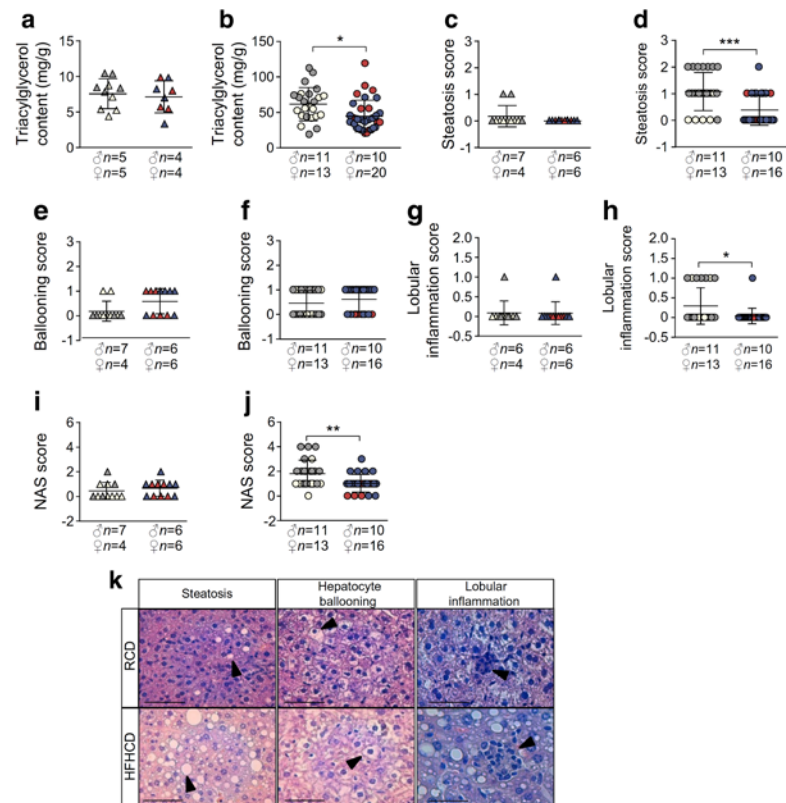
Fig. 2 Metabolic characterisation of WT and *Light*^{-/-} mice fed for 16 weeks with an RCD or an HFHCD. Plasma fasting (a) glucose and (b) insulin levels in WT and *Light*^{-/-} mice fed an RCD. Plasma (c) glucose and (d) insulin levels at the different time points during the GTT, which were used to calculate the AUC_{glucose} (e) and AUC_{insulin} (d), in RCD-fed WT and *Light*^{-/-} mice. (e) Plasma glucose levels (as a percentage relative to the initial glucose levels) during the ITT, together with the AUC_{glucose} in RCD-fed WT and *Light*^{-/-} mice. Plasma fasting (f) glucose and (g) insulin levels in WT and *Light*^{-/-} mice fed HFHCD. Plasma fasting (h) glucose and (i) insulin levels at the different time points

during the GTT and the AUC_{glucose} (h) and AUC_{insulin} at 120 and 30 min (i) in WT and *Light*^{-/-} mice fed HFHCD. (j) Plasma glucose levels (as a percentage relative to the initial glucose levels) during the ITT, together with AUC_{glucose} in mice fed HFHCD. Triangles, RCD-fed mice; circles, HFHCD-fed mice; white, male WT mice; grey, female WT mice; red, male *Light*^{-/-} mice; blue, female *Light*^{-/-} mice; hatched lines indicate both male and female mice. The line graphs in (c–e) and (h–j) show the mean of males and females. All other data are shown as individual data points with mean ± SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t* test (**p* < 0.05 and ****p* < 0.001)

mice, as revealed by a decrease in the AUC_{glucose} (Fig. 2j). Analysis of lipids indicated no effect of *Light* deficiency in total cholesterol, ApoB-cholesterol, HDL-cholesterol and triacylglycerol either in mice fed an RCD (ESM Fig. 1e–h) or mice fed HFHCD (ESM Fig. 2e–h). Therefore, *Light* deficiency does not have an effect in mice fed an RCD, but improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice fed HFHCD without changes in lipid plasma levels.

Light deficiency in RCD-fed mice did not affect hepatic triacylglycerol content, steatosis, ballooning, lobular inflammation or NAS score (Fig. 3a, c, e, g, i). But, *Light*^{-/-} mice fed HFHCD showed significantly diminished hepatic triacylglycerol content (Fig. 3b), hepatic steatosis (Fig. 3d), lobular inflammation (Fig. 3h) and NAS score (Fig. 3j) without changes in ballooning score (Fig. 3f). No differences in hepatic F4/80⁺ macrophage and CD3⁺ lymphocyte contents or collagen in

Fig. 3 Hepatic characterisation in WT and *Light*^{-/-} mice fed for 16 weeks with an RCD and HFHCD. Analysis of (a, b) triacylglycerol content, (c, d) steatosis score, (e, f) hepatocyte ballooning, (g, h) lobular inflammation and (i, j) NAS score, in mice fed an RCD (a, c, e, g, i) and HFHCD (b, d, f, h, j). (k) Representative images of steatosis, hepatocyte ballooning and lobular inflammation. Scale bars, 50 μ m. Triangles, RCD-fed mice; circles, HFHCD-fed mice; white, male WT mice; grey, female WT mice; red, male *Light*^{-/-} mice; blue, female *Light*^{-/-} mice. Data are shown as individual data points with mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t* test (a, b, d, i, j) and Mann-Whitney *U* test (c, e-h) (**p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001)



RCD-fed mice (Fig. 4a, d, g) were observed, but *Light*^{-/-} mice fed HFHCD displayed diminished macrophage and CD3⁺ lymphocytes compared with controls (Fig. 4b, e) without changes in fibrosis (Fig. 4h). No changes were seen in the activity of ALT or AST between genotypes in any dietary regimen (Fig. 4j, k, l, m). Comparison between the two dietary regimens in WT mice showed enhanced triacylglycerol and F4/80⁺ macrophage contents (ESM Fig. 3a, b) in mice fed HFHCD.

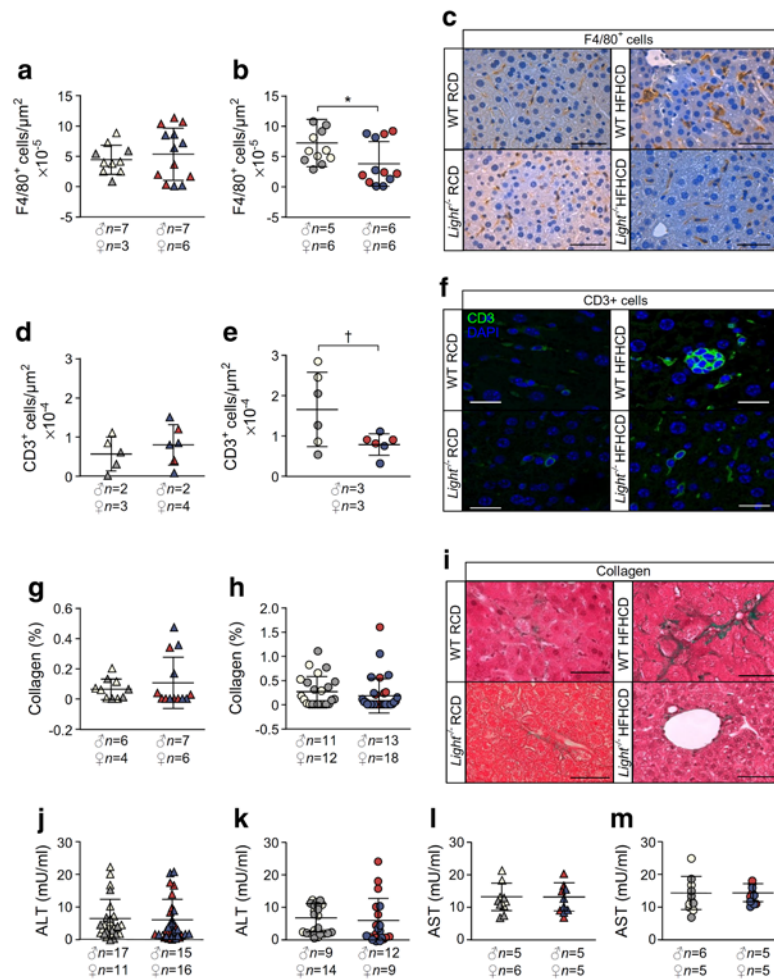
Analysis of hepatic gene expression showed augmented mRNA levels of *Cd11c*, *Zbtb16* and *Tbet* (Fig. 5a, c, d), which are determinant for proinflammatory macrophages, natural killer T (NKT) cell identity and proinflammatory Th1, respectively, in HFHCD-fed WT mice compared with RCD-fed WT controls. Consistently, mRNA expression of *Cd206*, *Gata3* and *Foxp3* (Fig. 5b, e, g), markers of anti-inflammatory macrophages, Th2 subset and Treg cells, respectively, were significantly decreased in WT and *Light*^{-/-} HFHCD-fed mice compared with their respective RCD-fed mice. Comparison between *Light*^{-/-} and WT mice indicated decreased mRNA expression of *Zbtb16* in mice fed HFHCD (Fig. 5c) and diminished anti-inflammatory *Cd206* and *Foxp3* (Fig. 5b, g) in *Light*^{-/-} mice compared with controls fed an RCD. mRNA

expression analysis of genes related to hepatic stellate cell activation, *Colla1* and *Acta2*, or genes associated with fibrosis, such as cytokine *Tgfb1*, *Mmp9* and *Timp1*, did not display changes among mouse groups (Fig. 5h-l).

These data indicate that HFHCD induces inflammation which is alleviated by *Light* deficiency.

Deficiency of *Light* reduces adipose tissue and systemic inflammation in WT mice fed HFHCD NAFLD and hepatic inflammation might be induced by dysfunctional visceral adipose tissue [22]. Analysis of male mouse adipose tissue showed decreased cytokine secretion of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), TNF- α and IL-17 by adipose tissue explants from *Light*^{-/-} mice compared with those secreted by WT controls (Fig. 6a, b, d). No differences were observed in IL-6 secretion from adipose tissue between mouse groups (Fig. 6c). In agreement with reduced proinflammatory cytokine secretion in adipose tissue, analysis of SVFs revealed a reduced percentage of the proinflammatory F4/80⁺CD11c⁺ ATMs in female mice (Fig. 6i) and augmented levels of the anti-inflammatory F4/80⁺CD206⁺ ATMs in *Light*^{-/-} male mice (Fig. 6g) without changes in total F4/80⁺ ATMs (Fig. 6e, h). Analysis of the transcription factor determinants of immune cellular subset

Fig. 4 Hepatic characterisation in WT and *Light*^{-/-} mice fed for 16 weeks with an RCD and an HFHCD. Hepatic cross-sectional analysis of (a–c) macrophage F4/80⁺ and (d–f) lymphocyte CD3⁺ contents (cell number relative to hepatic area in μm²) in WT and *Light*^{-/-} mice fed an RCD (a, d) or HFHCD (b, e). (c, f) Representative images of (c) F4/80 immunohistochemistry and (f) CD3 immunofluorescence for both dietary regimens and genotypes. (g–i) Percentage of collagen in Masson trichrome staining in WT and *Light*^{-/-} mice fed (g) an RCD or (h) an HFHCD. Representative images of (i) collagen stainings are shown for both dietary regimens and genotypes. Plasma levels of (j, k) ALT and (l, m) AST activity in RCD-fed (j, l) and HFHCD-fed (k, m) mice. Scale bars, (c, i) 50 μm and (f) 20 μm. Triangles, RCD-fed mice; circles, HFHCD-fed mice; white, male WT mice; grey, female WT mice; red, male *Light*^{-/-} mice; blue, female *Light*^{-/-} mice. Data are shown as individual data points with mean ± SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t* test (a, b, d, g, h, j–m) and Mann–Whitney *U* test (c) ([†]*p* = 0.05 and **p* < 0.05)



differentiation *Tbet*, *Gata3*, *Rorc* and *Foxp3* did not reveal differences between *Light*^{-/-} and WT mice (Fig. 6l–o).

Surprisingly, in contrast with these results, analysis of bone marrow-derived macrophages from *Light*^{-/-} female mice showed enhanced TNF-α and IL-6 secretion and diminished IL-10 levels compared with WT female controls (ESM Fig. 4b–d), thus indicating an intrinsic proinflammatory phenotype of *Light*-deficient macrophages. However, in vivo analysis showed diminished TNF-α and IL-6 circulating levels (Fig. 7b, c). Likewise, in vivo *Light* deficiency reduced total CD45⁺CD115⁺ monocytes in male mice (Fig. 7g), enhanced anti-inflammatory CD45⁺CD115⁺Ly6C^{low} monocytes in both sexes (Fig. 7g, i) and decreased proinflammatory CD45⁺CD115⁺Ly6C^{hi} monocytes in female mice (Fig. 7i). In addition, the CD4⁺CCR4⁻CCR6⁺ Th9 lymphocyte subset (Fig. 7n) was also reduced in HFHCD-fed *Light*^{-/-} mice

compared with WT controls. No major effect of *Light* deficiency was observed in circulating leucocytes (ESM Fig. 5a–h) or in the adipose tissue macrophage phenotype of adipose tissue (ESM Fig. 5j–l) in RCD-fed mice. Of note, the CCR4⁻CCR6⁺ Th9 population was increased in *Light*^{-/-} mice (ESM Fig. 5g). Hence, *Light* deficiency alleviates in vivo systemic and adipose tissue inflammation in HFHCD-fed mice.

Deficiency of *Light* reduces NAFLD, adipose tissue and systemic inflammation in *Irs2*^{+/-} mice fed HFHCD Next, *Light* deficiency was evaluated in the hepatic physiopathology in *Irs2*^{+/-} mice, which display enhanced insulin resistance and NAFL during aging compared with age-matched WT [13]. *Light* deficiency diminished triacylglycerol (ESM Fig. 6a) and F4/80⁺ macrophage (ESM Fig. 6b) contents in *Irs2*^{+/-} mice. As expected, compared with WT mice, *Irs2*^{+/-} mice displayed

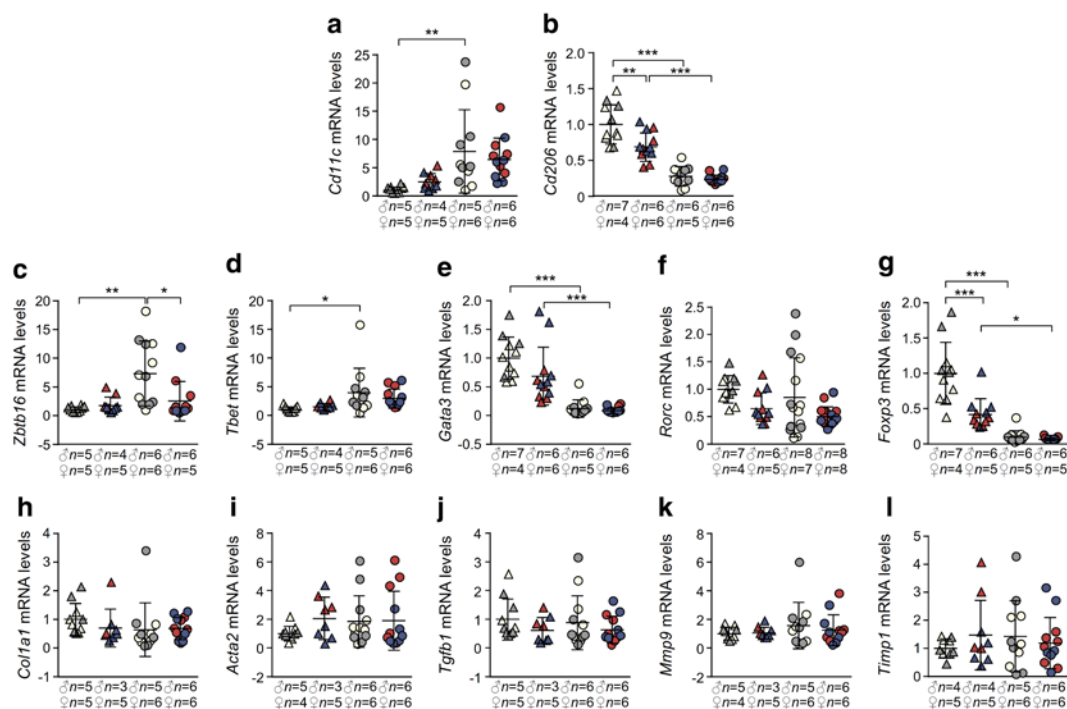


Fig. 5 Hepatic inflammatory and fibrosis marker analysis in WT and *Light*^{-/-} mice fed with an RCD and an HFHCD. mRNA levels of (a) *Cd11c* and (b) *Cd206* macrophage surface markers, and (c) *Zbtb16*, (d) *Tbet*, (e) *Gata3*, (f) *Rorc* and (g) *Foxp3* transcription factors in liver from all four groups of mice. mRNA levels of (h) *Coll1a1*, (i) *Acta2*, (j) *Tgfb1*, (k) *Mmp9* and (l) *Timp1* in liver from all four groups of mice. mRNA levels were normalised to cyclophilin mRNA levels and are relative to

levels in RCD-fed WT mouse. Triangles, RCD-fed mice; circles, HFHCD-fed mice; white, male WT mice; grey, female WT mice; red, male *Light*^{-/-} mice; blue, female *Light*^{-/-} mice. Data are shown as individual data points with mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc multiple comparison test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$)

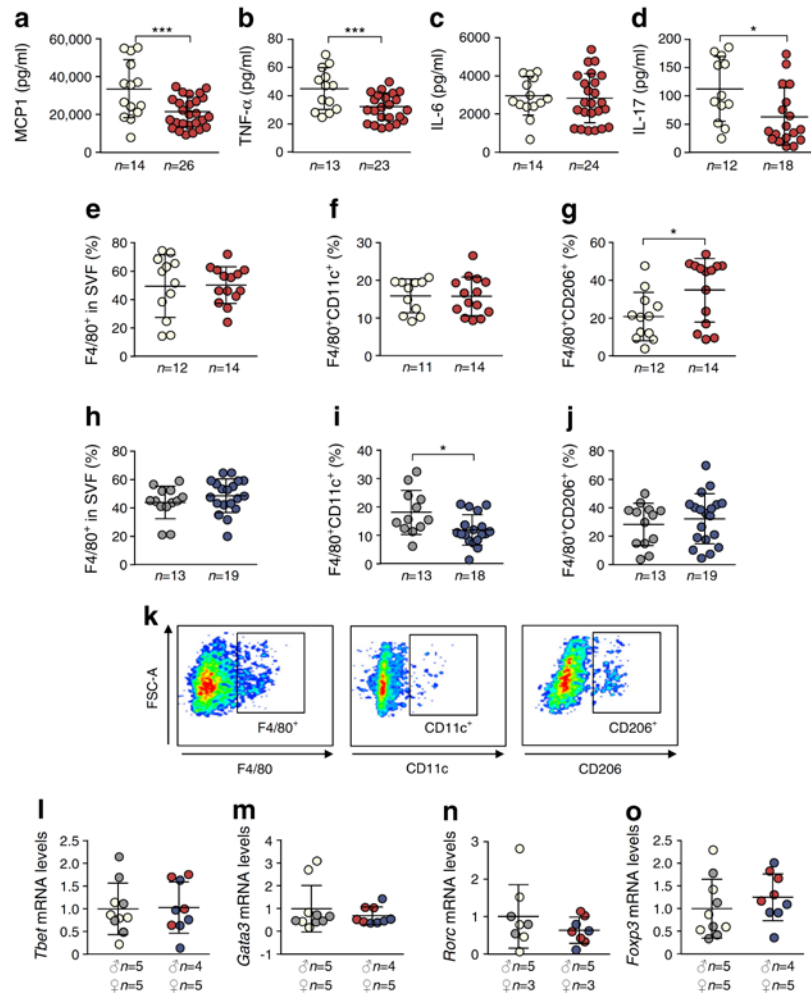
enhanced hepatic triacylglycerol and macrophage contents regardless of the presence of LIGHT (ESM Fig. 6d, e), indicating enhanced NAFLD in *Irs2*^{+/-} mice fed HFHCD. Circulating TNF- α and IL-17 cytokines (ESM Fig. 7b, d) were decreased in *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} mice compared with *Irs2*^{+/-} mice without differences in the other cytokines analysed (ESM Fig. 7a, c, e). Circulating leucocyte analysis showed no changes in lymphocytes, monocytes or neutrophils (ESM Fig. 7f) between mouse groups. *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} mice displayed augmented Ly6C^{low} monocyte percentage and CD4⁺CCR4⁺CCR6⁻ Th2 cells (ESM Fig. 7g, i), and diminished CD4⁺CXCR3⁺ Th1, CD4⁺CCR4⁺CCR6⁺ Th9 and CD4⁺CCR4⁺CCR6⁺ Th17 subsets (ESM Fig. 7h, j, k). *Irs2*^{+/-}*Light*^{-/-} mouse adipose tissue also displayed diminished secretion of TNF- α and IL-17 cytokines (ESM Fig. 7m, o) and diminished proinflammatory F4/80⁺CD11c⁺ ATMs and increased anti-inflammatory F4/80⁺CD206⁺ ATMs (ESM Fig. 7q, r). No changes in MCP1 and IL-6 secretion (ESM Fig. 7l, n) or in total F4/80⁺ ATMs (ESM Fig. 7p) were observed. Thus, *Light* deficiency ameliorates NAFL and associated inflammation in *Irs2*^{+/-} mice fed HFHCD.

Genetic inactivation of *Light* modulates hepatic expression in WT mice fed HFHCD LIGHT-dependent signalling might modulate metabolic gene expression in the liver [23]; thus, expression studies of hepatic metabolic genes related to lipogenesis, β -oxidation and gluconeogenesis were performed. Analysis showed decreased levels of *Lxr*, *Pparg*, *Ppara* and *Abca1* in *Light*^{-/-} mice (Fig. 8a, d, f, m), while *Srebf1c*, *Fasn* and *Ldlr* mRNA levels were enhanced (Fig. 8b, e, l). Expression analysis of the Krüppel-like factor (KLF) family genes showed reduced mRNA levels of *Klf6* in *Light*^{-/-} mice compared with WT controls (Fig. 8s). Similarly, *Light*^{-/-} mice displayed diminished *Tlr4* levels (Fig. 8u). Thus, *Light* deficiency might reduce NAFLD by diminishing *Klf6* and *Tlr4*, which associate with NASH.

Discussion

NAFLD is a major metabolic complication associated with type 2 diabetes mellitus and adipose tissue dysfunction. In the present study, we showed that genetic deficiency of

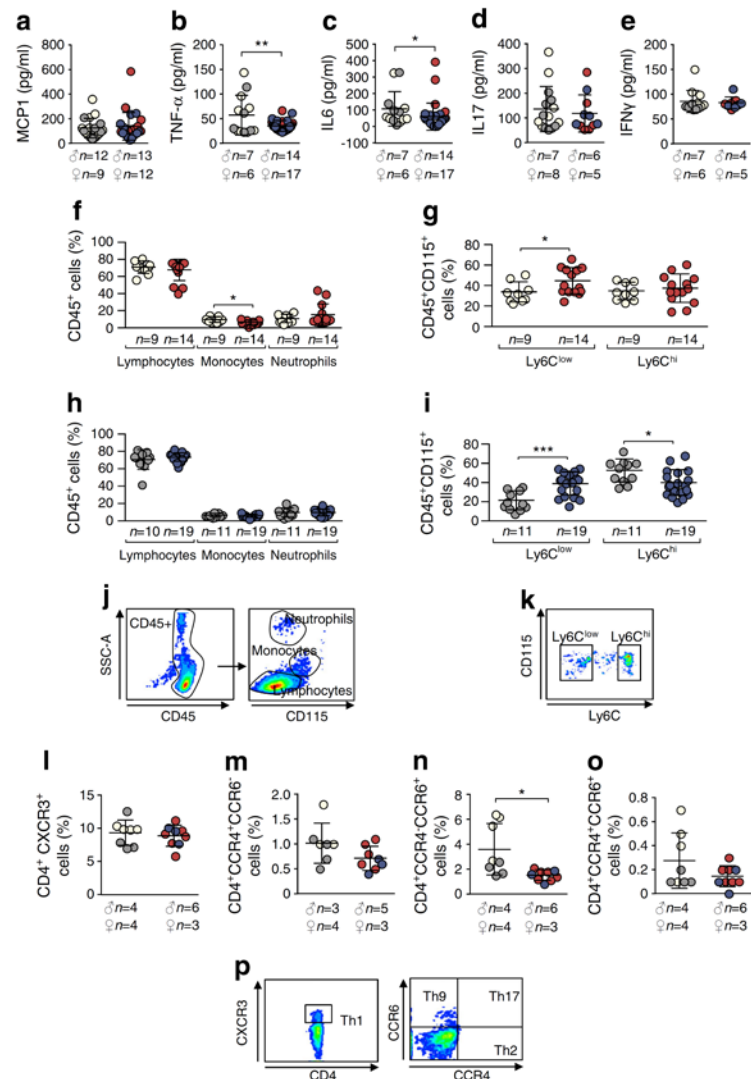
Fig. 6 Adipose tissue characterisation in WT and *Light*^{-/-} mice fed with HFHCD. (a) MCP1, (b) TNF- α , (c) IL-6 and (d) IL-17 cytokine secretion levels in adipose tissue from WT and *Light*^{-/-} mice. Analysis by flow cytometry of (e, h) total F4/80⁺, (f, i) proinflammatory F4/80⁺CD11c⁺ and (g, j) anti-inflammatory F4/80⁺CD206⁺ macrophage content in live cells of SVFs from adipose tissue in males (e–g) and females (h–j). (k) Representative flow cytometry plots displaying the gating strategy for the different populations. mRNA levels of (l) *Tbet*, (m) *Gata3*, (n) *Rorc* and (o) *Foxp3* transcription factors in adipose tissue from both groups of mice. mRNA levels were normalised to cyclophilin mRNA levels and are relative to levels in control WT mouse. Circles, HFHCD-fed mice; white, male WT mice; grey, female WT mice; red, male *Light*^{-/-} mice; blue, female *Light*^{-/-} mice. Data are shown as individual data points with mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t* test (**p* < 0.05 and ****p* < 0.001). FSC, forward scatter



Light, a proinflammatory cytokine, did not affect metabolism, NAFL or inflammation in WT mice fed an RCD. However, *Light*^{-/-} mice fed HFHCD displayed improved glucose tolerance, restored insulin sensitivity and decreased NAFL and hepatic inflammation compared with HFHCD-fed WT mice. Studies in RCD-fed and HFHCD-fed WT mice revealed augmented protein levels of LIGHT receptors, HVEM and LT β R, and increased hepatic triacylglycerol, inflammatory markers and macrophage content, suggesting a role of LIGHT-dependent signalling in NAFLD induced by HFHCD feeding. Moreover, adipose tissue from HFHCD-fed *Light*^{-/-} mice displayed decreased inflammation and diminished secretion of MCP1, TNF- α and IL-17 cytokines. In agreement with these findings, HFHCD-fed *Light*^{-/-} mice displayed diminished circulating levels of CD115⁺ monocytes, CCR4⁺CCR6⁺ Th9 T cells, IL-6 and TNF- α cytokines, while anti-

inflammatory CD115⁺Ly6C^{low} monocytes were augmented. Hepatic analysis showed reduced content of F4/80⁺ macrophages, CD3⁺ T cells and mRNA levels of the transcription factor *Zbtb16*, determinant for NKT function, a cellular subset associated with liver complications. Similarly, *Light* deficiency in HFHCD-fed *Irs2*^{+/-} mice, which have impaired insulin signalling, also reduced NAFL and inflammation. *Light*^{-/-} mouse liver analysis also revealed a metabolic gene expression signature consistent with improved hepatic homeostasis and reduced mRNA levels of *Klf6* and *Tlr4*, whose expression promotes NAFL-to-NASH and NASH-to-hepatocellular carcinoma (HCC) transitions. These results suggest that *Light* deficiency ameliorates deranged hepatic carbohydrate metabolism, NAFL and inflammation induced by HFHCD. Moreover, *Light* deficiency modulated immune cell phenotype, decreased inflammatory cytokine secretion and

Fig. 7 Analysis of circulating cytokines and leucocyte subsets in WT and *Light*^{-/-} mice fed HFHCD. Circulating plasma levels of (a) MCP1, (b) TNF- α , (c) IL-6, (d) IL-17 and (e) IFN- γ in *Light*^{-/-} and WT mice. (f, h) Percentages of circulating lymphocytes, monocytes and neutrophils identified in the CD45⁺ blood cell population by morphology and by the CD115⁺ monocyte marker and (g, i) CD45⁺CD115⁺Ly6C^{low} and CD45⁺CD115⁺Ly6C^{hi} monocyte subset percentages identified in the CD45⁺CD115⁺ cells in male (f, g) and female (h, i) mice. (j, k) Representative flow cytometry plots of the gating strategy for (j) leucocytes and (k) monocyte subsets in blood samples. Circulating levels of (l) CD4⁺CXCR3⁺ Th1, (m) CD4⁺CCR4⁺CCR6⁻ Th2, (n) CD4⁺CCR4⁺CCR6⁺ Th9 and (o) CD4⁺CCR4⁺CCR6⁺ Th17 cellular subpopulations in WT and *Light*^{-/-} mice. (p) Representative flow cytometry plots of the gating strategy for Th subpopulations in blood samples. Circles, HFHCD-fed mice; white, male WT mice; grey, female WT mice; red, male *Light*^{-/-} mice; blue, female *Light*^{-/-} mice. Data are shown as individual data points and with the mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t* test (a, d–i, l–o) and Mann–Whitney *U* test (b, c) (**p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001). SSC, side scatter



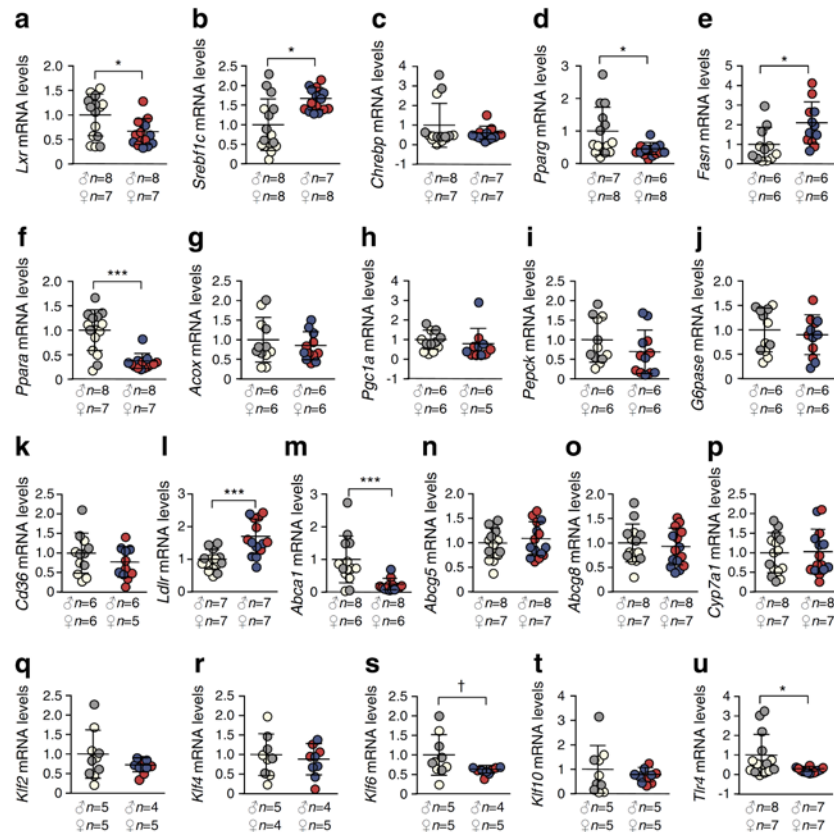
diminished pathways associated with NAFL-to-NASH transition, such as KLR6 and toll-like receptor 4 (TLR4). Altogether, these findings point to LIGHT-dependent signaling as a therapeutic target to restore hepatic homeostasis and to alleviate inflammation associated with NAFLD.

Earlier studies have shown elevated circulating LIGHT levels in individuals with insulin resistance/the metabolic syndrome [11] and type 2 diabetes mellitus [12]. We observed improved glucose tolerance in *Light*^{-/-} mice fed HFHCD. Moreover, *Light* deficiency decreased insulin resistance in HFHCD-fed WT mice, suggesting that LIGHT could interfere with insulin sensitivity, as has been shown for other cytokines such as TNF- α [24]. LIGHT exerts important effects on

circulating lipid levels by modulating hepatocyte gene expression and hepatic T lymphocytes [23, 25]. However *Light* deficiency did not modify circulating lipid levels in WT mice.

Notably, in agreement with previous investigations showing enhanced LIGHT levels in human NAFLD [10], *Light* deficiency reduced NAFLD, macrophage and T cell content in HFHCD-fed WT mice. Reduced hepatic inflammation in *Light*^{-/-} mice was accompanied by decreased inflammatory CD11c⁺ macrophages in adipose tissue, which is consistent with reports showing that adipose tissue inflammation signals the progression of NAFLD [22]. Moreover, adipose tissue transplantation from obese mice with a high CD11c⁺ cell content induced hepatic macrophage accumulation and liver

Fig. 8 Hepatic expression in HFHCD-fed WT and *Light*^{-/-} mice. mRNA levels of (a) *Lxr*, (b) *Srebf1c*, (c) *Chrebp*, (d) *Pparg*, (e) *Fasn*, (f) *Ppara*, (g) *Acox*, (h) *Pgc1a*, (i) *Pepck*, (j) *G6pase*, (k) *Cd36*, (l) *Ldlr*, (m) *Apoa1*, (n) *Abcg5*, (o) *Abcg8*, (p) *Cyp7a1*, (q) *Klf2*, (r) *Klf4*, (s) *Klf6*, (t) *Klf10* and (u) *Tlr4* in *Light*^{-/-} and WT control mice. mRNA levels were normalised to endogenous cyclophilin expression and are relative to WT mouse levels. Circles, HFHCD-fed mice; white, male WT mice; grey, female WT mice; red, male *Light*^{-/-} mice; blue, female *Light*^{-/-} mice. Data are shown as individual data points with mean ± SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t* test (a–c, e–i, k–u) and Mann–Whitney *U* test (d, j) (**p* = 0.05, ***p* < 0.05 and ****p* < 0.001)



damage in high-cholesterol diet-fed *Ldlr*^{-/-} mice [26], which did not develop in RCD-fed mice. These findings suggest that adipose tissue with increased inflammatory CD11c⁺ cells, in the presence of HFHCD, might induce hepatic inflammation and that *Light* deficiency could alleviate inflammation by modulating adipose tissue dysfunction. In support of this hypothesis, LIGHT promotes adipose tissue dysfunction by inhibiting adipogenesis [27], which accommodates excess of fat, and exacerbates adipocyte inflammatory response [28]. In agreement with all of the above, adipose tissue explants from HFHCD-fed *Light*-deficient mice displayed decreased secretion of MCP1, TNF- α and IL-17, whose actions have been related to progression of insulin resistance, liver damage, fibrosis and NASH [29].

The above results indicate that LIGHT (TNFSF14) might alter hepatic homeostasis and function by reducing accumulation of inflammatory cells and inflammatory cytokine secretion. Nevertheless, *Light* deficiency also affected systemic inflammation. HFHCD-fed *Light*^{-/-} mice showed enhanced circulating Ly6C^{low} monocytes and diminished circulating pro-inflammatory Th9 cells and TNF- α and IL-6 cytokine levels. These data might indicate that *Light* deficiency reduces

inflammatory potential of immune cells. However, unexpectedly, augmented secretion of proinflammatory IL-6 and TNF- α cytokines was observed in isolated bone marrow-derived macrophages from *Light*^{-/-} mice compared with WT controls, suggesting an anti-inflammatory role of LIGHT. In addition, immune cells in RCD-fed mice did not display major differences between *Light*^{-/-} and WT mice, with the exception of Th9 which was downregulated in HFHCD conditions but enhanced in RCD-fed *Light*^{-/-} mice. Altogether, this indicates that the immune cell phenotype in our experimental setting with HFHCD feeding is diet dependent and not developmental. On the other hand, in vivo macrophage *Light* deficiency by means of bone marrow transplantation studies showed a protective role of LIGHT (TNFSF14) in a diet-induced obesity model [30]. But, a previous report using a long-term inflammatory choline-deficient high-fat diet demonstrated augmented secretion of LIGHT by hepatic NKT cells during NASH-to-HCC transition, and consequently *Light* deficiency ameliorated disease progression [4]. Consistent with this, *Light* deficiency in HFHCD-fed mice reduced macrophage and T cell hepatic content, hepatic NKT transcription factor expression and NAFLD progression,

suggesting a proinflammatory role of the cytokine by modulating different immune cells. Notably, the finding that LT β R and HVEM expression was markedly augmented, in steatotic and inflamed liver upon HFHCD feeding, indicates that LIGHT-dependent signalling is relevant and induced by stress signals such as the HFHCD feeding. Altogether, this supports the hypothesis that the HFHCD phenotype is partly due to the LIGHT/LT β R-HVEM axis and that defective signalling through this axis restrains NAFLD progression.

Altogether, our findings suggest that LIGHT has a complex role in hepatic metabolic diseases, having divergent effects depending on the experimental setting, diets and the mouse models used. Of note, our study showing that *Light* deficiency confers protection against NAFLD might be highly relevant in clinical scenarios such as a high dietary cholesterol content or in the presence of insulin resistance. Thus, *Light* deficiency in the absence of obesity and in cholesterol-enriched diets might potentially be protective since clinical data in NAFLD in lean individuals provide experimental evidence associating the presence of cholesterol in the diet with progression to NASH [31, 32]. Likewise, *Light* deficiency might also be protective in insulin resistance, since the metabolic syndrome/insulin resistance individuals without obesity, who also display impaired insulin signalling [33], exhibit enhanced circulating LIGHT levels [11]. In this sense, *Light* deficiency decreased hepatic inflammation and steatosis, adipose tissue and systemic inflammation in HFHCD-fed *Irs2*^{-/-} mice, which display impaired insulin signalling and higher hepatic dysfunction than HFHCD-fed WT mice. Thus, therapies targeted to inhibit LIGHT might be of use in these clinical cases.

LT β R-dependent signalling controls lipid homeostasis by modulating gene expression in the liver [23]. Analysis of lipogenic, β -oxidation and gluconeogenic genes did not consistently show improvement of these pathways in *Light*-deficient mice. Thus, protective *Pparg* and *Ppara* gene mRNA expression levels were unexpectedly decreased while mRNA levels of *Srebf1c*, *Ldlr* and *Fasn* related to lipogenesis and lipid uptake were higher, which could alternatively indicate a compensatory mechanism induced by reduced hepatic lipid pool. In fact, *Light*-deficient mice had diminished *Lxr* and *Abca1*, whose activities are associated with aberrant lipid storage and accumulation of hepatic cholesterol pool in NAFLD [34, 35]. Nevertheless, additional studies are required to fully understand the metabolic regulation of hepatic LIGHT-mediated signalling. Consistent with improved NAFL, *Light* deficiency decreased important hepatic genes associated with liver damage such as *Zbtb16* [4, 36], a transcription factor determinant for NKT cells, as well as *Klf6* and *Tlr4*, whose function is highly relevant in the NAFL-to-NASH transition, hepatic stellate cell activation and HCC [36, 37]. Altogether, these findings indicate that *Light* deficiency might reduce NAFL progression by modulating relevant hepatic genes involved in NAFLD.

In summary, the present study showed that *Light* deficiency in HFHCD mice improves glucose tolerance and insulin sensitivity, and reduces NAFL, hepatic inflammation and adipose tissue proinflammatory cytokine secretion. In addition, *Light* deficiency produced a hepatic expression signature consistent with improved hepatic homeostasis and conferred protection against inflammation associated with NAFL-to-NASH transition by diminishing the hepatic expression of relevant actors in this pathologic process, *Klf6* and *Tlr4* genes. These results suggest that blocking LIGHT-dependent signalling might be of use in NAFLD in insulin resistance states and in NAFLD caused by cholesterol-enriched diets.

Acknowledgements We thank K. Pfeffer for providing *Light*-deficient mice, G. Herrera (Central Unit for Research in Medicine, INCLIVA, Spain) for assistance with flow cytometry analysis and A. Díaz (Central Unit for Research in Medicine, University of Valencia, Spain) for help with animal care.

Data availability All data generated or analysed during this study are included in the published article (and its additional files). Data regarding the manuscript are available upon reasonable request made to the corresponding author.

Funding This study was supported by grants from the Carlos III Health Institute (PI16/00091 awarded to HG-N), Generalitat Valenciana (APOTIP/2018/02 to HG-N), the European Regional Development Fund (FEDER) and a grant from the European Foundation for the Study of Diabetes/Novo Nordisk (Programme for Diabetes Research in Europe) awarded to HG-N. HG-N is an investigator in the Miguel Servet II programme (CP16/00013). AV and AH-C received salary support from the European Foundation for the Study of Diabetes/NOVO Nordisk and from Proyecto Paula (a Fundraising initiative for the study of Diabetes). This work was also supported by CIBERDEM (CB07/08/0043 to DJB), a Carlos III Health Institute initiative. The study sponsors were not involved in the design of the study; the collection, analysis, and interpretation of data; writing the report; or the decision to submit the report for publication.

Duality of interest The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

Contribution statement AH-C and AV acquired and analysed all of the data, participated in the interpretation of results and helped to write the manuscript. DJB participated in study design, writing and critical revision of the manuscript. HG-N conceived and designed the study, supervised the data acquisition, interpreted the results and wrote the manuscript. All authors gave final approval of the version to be published. HG-N is the guarantor of this work.

References

1. World Health Organization (2016) Global report on diabetes. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf?sequence=1
2. Anstee QM, Targher G, Day CP (2013) Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10(6):330–344. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.41>

3. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH (2011) Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332(6037):1519–1523. <https://doi.org/10.1126/science.1204265>
4. Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K et al (2014) Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell* 26(4):549–564. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.003>
5. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA (2016) The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 65(8):1038–1048. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>
6. Wouters K, van Gorp PJ, Bieghs V et al (2008) Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 48(2):474–486. <https://doi.org/10.1002/hep.22363>
7. Doherty TA, Soroosh P, Khorram N et al (2011) The tumor necrosis factor family member LIGHT is a target for asthmatic airway remodeling. *Nat Med* 17(5):596–603. <https://doi.org/10.1038/nm.2356>
8. Lin WW, Hsieh SL (2011) Decoy receptor 3: a pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer. *Biochem Pharmacol* 81(7):838–847. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.01.011>
9. Shaikh RB, Santee S, Granger SW et al (2001) Constitutive expression of LIGHT on T cells leads to lymphocyte activation, inflammation, and tissue destruction. *J Immunol* 167(11):6330–6337. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6330>
10. Otterdal K, Haukeland JW, Yndestad A et al (2015) Increased serum levels of LIGHT/TNFSF14 in nonalcoholic fatty liver disease: possible role in hepatic inflammation. *Clin Transl Gastroenterol* 6(7):e95. <https://doi.org/10.1038/ctg.2015.23>
11. Andres-Blasco I, Vinue A, Herrero-Cervera A et al (2016) Hepatic lipase inactivation decreases atherosclerosis in insulin resistance by reducing LIGHT/lymphotoxin β -receptor pathway. *Thromb Haemost* 116(2):379–393. <https://doi.org/10.1160/TH15-10-0773>
12. Halvorsen B, Santilli F, Scholz H et al (2016) LIGHT/TNFSF14 is increased in patients with type 2 diabetes mellitus and promotes islet cell dysfunction and endothelial cell inflammation in vitro. *Diabetologia* 59(10):2134–2144. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4036-y>
13. Vinue A, Andres-Blasco I, Herrero-Cervera A et al (2015) Ink4/Arf locus restores glucose tolerance and insulin sensitivity by reducing hepatic steatosis and inflammation in mice with impaired IRS2-dependent signalling. *Biochim Biophys Acta* 1852(9):1729–1742. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.05.013>
14. González-Navarro H, Nong Z, Amar MJ et al (2004) The ligand-binding function of hepatic lipase modulates the development of atherosclerosis in transgenic mice. *J Biol Chem* 279(44):45312–45321. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406495200>
15. Vinue A, Navarro J, Herrero-Cervera A et al (2017) The GLP-1 analogue lixisenatide decreases atherosclerosis in insulin-resistant mice by modulating macrophage phenotype. *Diabetologia* 60(9):1801–1812. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4330-3>
16. Andres-Blasco I, Herrero-Cervera A, Vinue A et al (2015) Hepatic lipase deficiency produces glucose intolerance, inflammation and hepatic steatosis. *J Endocrinol* 227(3):179–191. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0219>
17. Norris AW, Chen L, Fisher SJ et al (2003) Muscle-specific PPAR γ -deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J Clin Invest* 112(4):608–618. <https://doi.org/10.1172/JCI17305>
18. Gonzalez-Navarro H, Vinue A, Sanz MJ et al (2013) Increased dosage of Ink4/Arf protects against glucose intolerance and insulin resistance associated with aging. *Aging Cell* 12(1):102–111. <https://doi.org/10.1111/ace1.12023>
19. Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T et al (2016) A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol* 65(3):579–588. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.005>
20. Mahnke YD, Beddall MH, Roederer M (2013) OMIP-017: human CD4(+) helper T-cell subsets including follicular helper cells. *Cytometry A* 83(5):439–440
21. Vinue A, MartInez-HervAs S, Herrero-Cervera A et al (2018) Changes in CDKN2A/2B expression associate with T cell phenotype modulation in atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus. *Transl Res* 203:31–48
22. Duval C, Thissen U, Keshtkar S et al (2010) Adipose tissue dysfunction signals progression of hepatic steatosis towards nonalcoholic steatohepatitis in C57BL/6 mice. *Diabetes* 59(12):3181–3191. <https://doi.org/10.2337/db10-0224>
23. Lo JC, Wang Y, Tumanov AV et al (2007) Lymphotoxin β receptor-dependent control of lipid homeostasis. *Science* 316(5822):285–288. <https://doi.org/10.1126/science.1137221>
24. Lee BC, Lee J (2014) Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta* 1842(3):446–462. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.017>
25. Chellan B, Koroleva EP, Sontag TJ et al (2013) LIGHT/TNFSR14 can regulate hepatic lipase expression by hepatocytes independent of T cells and Kupffer cells. *PLoS One* 8(1):e54719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054719>
26. Bijnen M, Josefs T, Cuijpers I et al (2018) Adipose tissue macrophages induce hepatic neutrophil recruitment and macrophage accumulation in mice. *Gut* 67(7):1317–1327. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313654>
27. Tiller G, Laumen H, Fischer-Posovszky P et al (2011) LIGHT (TNFSF14) inhibits adipose differentiation without affecting adipocyte metabolism. *Int J Obes* 35(2):208–216. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.126>
28. Kim HM, Jeong CS, Choi HS, Kawada T, Yu R (2011) LIGHT/TNFSF14 enhances adipose tissue inflammatory responses through its interaction with HVEM. *FEBS Lett* 585(3):579–584. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.011>
29. Wree A, Inzaugarat ME, Feldstein AE (2018) Transmembrane BAX inhibitor motif-containing 1, a novel anti-inflammatory approach for nonalcoholic steatohepatitis treatment. *Hepatology* 67(1):438–441. <https://doi.org/10.1002/hep.29495>
30. Saunders BM, Rudnicka C, Filipovska A et al (2018) Shining LIGHT on the metabolic role of the cytokine TNFSF14 and the implications on hepatic IL-6 production. *Immunol Cell Biol* 96(1):41–53. <https://doi.org/10.1111/imcb.1002>
31. Ioannou GN, Morrow OB, Connole ML, Lee SP (2009) Association between dietary nutrient composition and the incidence of cirrhosis or liver cancer in the United States population. *Hepatology* 50(1):175–184. <https://doi.org/10.1002/hep.22941>
32. Yasutake K, Nakamura M, Shima Y et al (2009) Nutritional investigation of non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: the significance of dietary cholesterol. *Scand J Gastroenterol* 44(4):471–477. <https://doi.org/10.1080/0036520802588133>
33. Gonzalez-Navarro H, Vinue A, Vila-Caballer M et al (2008) Molecular mechanisms of atherosclerosis in metabolic syndrome: role of reduced IRS2-dependent signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(12):2187–2194. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.175299>
34. Joyce CW, Wagner EM, Basso F et al (2006) ABCA1 overexpression in the liver of LDLr-KO mice leads to accumulation of pro-atherogenic lipoproteins and enhanced atherosclerosis. *J Biol Chem* 281(44):33053–33065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604526200>
35. Zhao XY, Xiong X, Liu T et al (2018) Long noncoding RNA licensing of obesity-linked hepatic lipogenesis and NAFLD

- pathogenesis. *Nat Commun* 9(1):2986. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05383-2>
36. Jin C, Henao-Mejia J, Flavell RA (2013) Innate immune receptors: key regulators of metabolic disease progression. *Cell Metab* 17(6): 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.011>
37. Miele L, Beale G, Patman G et al (2008) The Kruppel-like factor 6 genotype is associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 135(1):282–291. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.04.004>

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