

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