

Gerard Baiges i Imane Djemmah

EL PAPER DE CCL2 EN LA *NAFLD*: CONNEXIÓ ENTRE INFLAMACIÓ I METABOLISME ENERGÈTIC

TREBALL DE FI DE GRAU

Dirigit pel Dr. Jorge Joven

Grau de Nutrició Humana i Dietètica – URV

Tarragona

2016



Treball realitzat durant el programa Alumne Intern entre el setembre de 2014 i el maig de 2016 a la Unitat de Recerca Biomèdica de l'antic Hospital Universitari Sant Joan de Reus, i tutoritzat pel Dr. Jorge Joven.

AGRAÏMENTS

Primer de tot, ens agradaria agrair al Dr. Jorge Joven per donar-nos l'oportunitat de poder realitzar el Treball de Fi de Grau en la Unitat de Recerca Biomèdica.

A més, volem agrair a la Fedra Luciano Mateo, per la seva dedicació, ajuda en tot moment i sobretot per la seva gran paciència. També, donar les gràcies a tots els integrants del grup per la seva ajuda i per fer-nos sentir integrants del grup, especialment a la Noemi Cabré i l'Anna Hernández.

CONTINGUTS

1. ABSTRACT.....	5
2. INTRODUCCIÓ	8
2.1. NAFLD (<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>)	8
2.1.1. Prevalença	8
2.1.2. Fisiopatologia	9
2.2. Inflamació	10
2.2.1. Les quimiocines.....	10
2.2.1.1 CCL2 (<i>Chemokine [C-C motif] Ligand 2</i>)	11
2.2.2. CCL2 I NAFLD	12
2.3. Oxidació.....	12
2.3.1. Les paraoxonases.....	12
2.3.1.1. PON1 (Paraoxonasa 1).....	13
2.3.2. PON1 i NAFLD.....	13
2.4. Dislipèmia i NAFLD.....	14
2.5. Fetge: òrgan metabòlic	14
2.5.1. Relació entre metabolisme, inflamació i oxidació.	14
2.5.2. Metabolisme energètic.....	15
2.5.2.1. Metabolòmica	15
3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS	16
4. MATERIALS I MÈTODES.....	16
4.1 Models animals	16
4.2 Obtenció i conservació de les mostres	17
4.3 Histologia Hepàtica.....	18
4.3.1 Valoració de l'esteatosi	18

4.4 Immunohistoquímica	18
4.5 Plataforma de metabolòmica dirigida: GC-EI-QTOF-MS	19
4.6 Anàlisi estadística.....	19
5. RESULTATS.....	20
5.1 Evolució de la ingesta d'aliments i del pes dels ratolins.	20
5.2 Valoració del grau d'esteatosi hepàtica.	20
5.3 Immunohistoquímica F4/80-macròfags	21
5.4 Metabolòmica.	22
5.4.1 L'efecte del tractament dietètica en les diferents mutacions.	23
5.4.1.1 <i>Wild-Type</i>	23
5.4.1.2 <i>PON1/LDLr knockout</i>	23
5.4.1.3 <i>CCL2/PON1/LDLr knockout</i>	23
5.4.2 Comparació entre els diferents models animals en dieta estàndard.....	24
5.4.2.1 Comparació entre <i>PON1/LDLr knockout</i> i <i>Wild-Type</i>	24
5.4.2.2 Comparació entre <i>CCL2/PON1/LDLr knockout</i> i <i>Wild-Type</i>	24
5.4.2.3 Comparació entre <i>CCL2/PON1/LDLr knockout</i> i <i>PON1/LDLr KO</i>	26
5.4.3 Comparació entre els diferents models animals en dieta rica en greix	26
5.4.3.1 Comparació entre <i>PON1/LDLr knockout</i> i <i>Wild-Type</i>	26
5.4.3.2 Comparació entre <i>CCL2/PON1/LDLr knockout</i> i <i>Wild-Type</i>	26
5.4.3.3 Comparació entre <i>CCL2/PON1/LDLr knockout</i> i <i>PON1/LDLr knockout</i>	27
6. DISCUSSIÓ.....	28
7. CONCLUSIONS.....	31
8. REFERÈNCIES	32
ANNEXOS.....	39

1. ABSTRACT

CATALÀ

Introducció

La ingesta excessiva d'energia provinent d'aliments d'alt contingut calòric i baix valor nutricional, és un problema important en les societats industrialitzades, ja que provoca l'aparició de patologies, com la malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD). Aquestes patologies tenen en comú característiques fisiopatològiques i mecanismes moleculars relacionats amb la inflamació i l'oxidació.

L'objectiu d'aquest estudi fou observar els efectes de la deficiència de la quimiocina CCL2 en el metabolisme d'un model animal d'estrès oxidatiu i hiperlipèmic, a més d'avaluar la influència del factor dietètic.

Metodologia

Es van utilitzar un total de 48 ratolins mascles. A les 10 setmanes d'edat, els animals es van distribuir de manera aleatòria segons el tractament dietètic: un grup (n=24) amb dieta estàndard (CD) i un segon grup (n=24) amb dieta rica en greix (HF). En cada grup es van utilitzar ratolins *Wild type* (n=8) i *PON1/LDLr knockout* (n=8) com a grup control i com a model d'estudi *CCL2/PON1/LDLr knockout* (n=8).

S'ha dut a terme una anàlisi metabòlica del teixit hepàtic mitjançant l'espectrometria de masses (GC-EI-QTOF-MS). També es van analitzar l'evolució del pes i la ingesta, tincions histològiques i immunohistoquímica (F4/80-macròfags) del teixit hepàtic.

Resultats:

En dieta estàndard, els ratolins *CCL2/PON1/LDLr knockout* van presentar menys esteatosi hepàtica que els *PON1/LDLr knockout*, assolint una equiparació amb els *Wild type*. No obstant, la presència de macròfags en el teixit hepàtic era significativament més elevada en els *CCL2/PON1/LDLr knockout*.

Els resultats obtinguts de l'anàlisi metabòlica van mostrar una similitud en la funcionalitat metabòlica entre els *CCL2/PON1/LDLr knockout* i els *Wild type* en presència d'una CD. En canvi, els *CCL2/PON1/LDLr knockout* amb una dieta HF presentaven alteracions a nivell del metabolisme de la glucosa.

Conclusions:

Els resultats suggereixen que la inhibició de CCL2 podria ser una teràpia interessant degut a la capacitat de regular la funcionalitat metabòlica i l'acumulació lipídica en els hepatòcits.

Introducción

La ingesta excesiva de energía que proviene de alimentos con alto contenido calórico y bajo valor nutricional, es un problema importante en las sociedades industrializadas, puesto que provocan la aparición de patologías, como la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). Estas patologías tienen en común características fisiopatológicas y mecanismos moleculares relacionados con la inflamación y la oxidación.

El objetivo de este estudio era observar los efectos de la deficiencia de la quimiocina CCL2 en el metabolismo de un modelo animal de estrés oxidativo e hiperlipemia, además de evaluar la influencia del factor dietético.

Metodología

Se utilizaron un total de 48 ratones machos. A las 10 semanas de edad, los animales se distribuyeron de forma aleatoria según el tratamiento dietético: un grupo (n=24) con dieta estándar (CD) y un segundo grupo (n=24) con dieta rica en grasa (HF). En cada grupo se utilizaron ratones *Wild type* (n=8) i *PON1/LDLr knockout* (n=8) como grupos controles y como modelo de estudio *CCL2/PON1/LDLr knockout* (n=8).

Se ha llevado a cabo un análisis metabolómico del tejido hepático mediante espectrometría de masas (GC-EI-QTOF-MS). También se analizaron la evolución del peso y la ingesta, tinciones histológicas e inmunohistoquímica (F4/80) del tejido hepático.

Resultados:

En dieta estándar, los *CCL2/PON1/LDLr knockout* presentaron menor esteatosis hepática que *PON1/LDLr knockout* logrando una equiparación con los *Wild-Type*. No obstante, la presencia de macrófagos en el tejido hepático era significativamente más elevada en los *CCL2/PON1/LDLr knockout*.

Los resultados obtenidos del análisis metabolómico mostraron una similitud en la funcionalidad metabólica entre los *CCL2/PON1/LDLr knockout* y los *Wild type* en presencia de una CD. En cambio, con una dieta HF, los *CCL2/PON1/LDLr knockout* presentaron alteraciones a nivel del metabolismo de la glucosa.

Conclusiones:

Los resultados sugieren que la inhibición de CCL2 podría ser una terapia interesante debido a la capacidad de regular la funcionalidad metabólica y la acumulación lipídica en los hepatocitos.

ANGLÈS

Background and aim

Excessive intake of energy from high-caloric foods and low nutritional value is a major problem in industrialized societies, since they cause the appearance of diseases, such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). These pathologies have in common pathophysiological features and molecular mechanisms related to inflammation and oxidation.

The aim of this study was to observe the effects of the deficiency of the chemokine CCL2 in the metabolism of an animal model with oxidative stress and hyperlipidemia, as well as to assess the influence of dietary factor.

Methods

A total of 48 male mice were used. At 10 week of age, the animals were randomly distributed according to the dietary treatment: one group (n=24) with chow diet (CD) and a second group (n=24) with high-fat diet (HF). In each group they were used *Wild type* and PON1/LDLr *knockout* were used as a control group and CCL2/PON1/LDLr *knockout* mice as a study model.

A metabolomic analysis of liver tissue by mass spectrometry (GC-EI- QTOF-MS) was performed. The evolution of animal weight and intake and histological and immunohistochemical staining of the liver tissue were also analyzed.

Results

In chow diet, CCL2/PON1/LDLr *knockout* mice had lower liver steatosis than PON1/LDLr *knockout* mice reaching equality with *Wild type*. However, the presence of macrophages in the liver tissue was significantly higher in the CCL2/PON1/LDLr *knockout*.

The results of metabolomic analysis showed a similarity in metabolic functionality between CCL2/PON1/LDLr *knockout* mice and *Wild type* in the presence of a CD. However, in HF diet, the CCL2/PON1/LDLr *knockout* mice showed alterations in glucose metabolism.

Conclusion

Results suggest that inhibition of CCL2 could be an interesting therapy due to its ability to regulate the metabolic function and lipid accumulation in hepatocytes.

2. INTRODUCCIÓ

Les modificacions dels hàbits dietètics i de l'estil de vida han conduït a un increment de la prevalença mundial de patologies tan importants com l'obesitat. Concretament, l'obesitat és la malaltia metabòlica més freqüent, amb múltiples repercussions orgàniques que suposen un problema social i de salut pública de primera magnitud. Aquest fet és degut a l'associació que presenta amb comorbiditats com ara la resistència a la insulina (RI), la diabetis *mellitus* tipus II (DMT2), la hipertensió arterial, l'hepatocarcinoma (HCC), l'aterosclerosi, la malaltia del fetge gras no associada al consum d'alcohol (NAFLD de l'anglès *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*), alguns càncers, entre d'altres... [1].

Actualment, es duen a terme una gran quantitat d'estudis per tal d'esbrinar quins són els principals processos involucrats en el desenvolupament d'aquestes patologies. S'ha observat que en la fisiopatologia de l'obesitat, i per tant, de la diabetis i/o l'esteatosi hepàtica, es produeixen un seguit d'interconnexions complexes entre les vies metabòliques, la inflamació i l'estrès oxidatiu [2,3]. Així doncs, sembla evident que per mantenir l'equilibri en l'organisme, és imprescindible la coordinació entre aquests tres factors. Aquesta coordinació requereix la participació de diverses cèl·lules, hormones i molècules (com les citoquines) implicades en el manteniment de l'homeòstasi de l'organisme entre els diferents òrgans. En tot aquest procés, el fetge juga un paper clau com a regulador del metabolisme dels lípids i de la glucosa. Qualsevol desregulació d'aquest òrgan augmenta la seva susceptibilitat al desenvolupament de patologies com la NAFLD [4].

2.1. NAFLD (*Non-alcoholic fatty liver disease*)

La NAFLD és una malaltia asimptomàtica [6]. A nivell histològic, es caracteritza per l'acumulació de triglicèrids en els hepatòcits en forma de vesícules macrovesiculars o microvesiculars [7]. Es diagnostica mitjançant una ressonància magnètica nuclear (RMN) o per una biòpsia hepàtica, un cop s'han exclòs causes secundàries d'acumulació de greix: consum elevat d'alcohol (major de 21 Unitats de Beguda Estàndard [UBE] en homes i 14 UBE en dones en un període de 2 anys), determinants medicaments o desordres hereditaris [8,9].

2.1.1. Prevalença

La NAFLD és actualment la malaltia crònica hepàtica més important en els països occidentals, degut a l'elevat risc actual de mortalitat. En els últims 15 anys, s'ha observat que les persones que pateixen aquesta malaltia tenen una incidència de mort entre un 34-36% més elevada que la població general [10].

Actualment, existeix una prevalença alarmant a nivell mundial que s'ha anat incrementant en el darrers anys. S'ha observat que tant als Estats Units, Europa com Àsia, oscil·la entre el 10-30% (Figura 1) [4,10]. També té un gran impacte en la població infantil, ja que es situa al voltant d'un 3-10%, incrementant-se fins 40-70% en nens amb obesitat. Aquest increment, es dóna paral·lelament amb l'actual epidèmia d'obesitat que existeix tant en la població adulta com en la població infantil [11,12].

Clínicament, la NAFLD està fortament associada a característiques de la síndrome metabòlica (SM) tal com, l'obesitat abdominal, la resistència a la insulina, la dislipèmia, la hipertrigliceridèmia i la hipertensió. Aquest fet condiciona al increment de la prevalença en aquests individus, ja que en obesos mòrbids sotmesos a cirurgia bariàtrica, pot arribar a excedir fins el 90% [13].

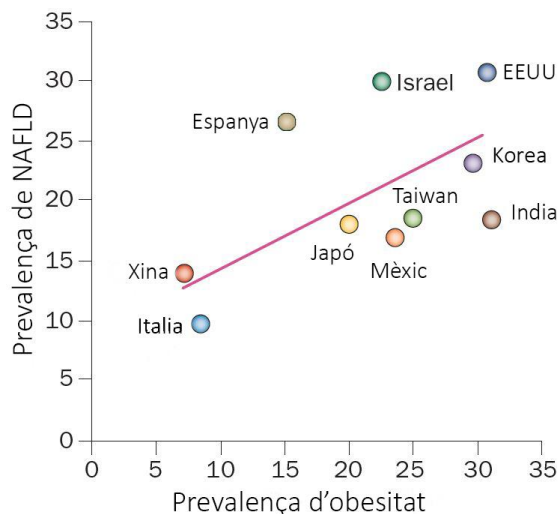


Figura 1. Correlació entre la prevalença de NAFLD i obesitat.

Adaptada de R Loomba *et al.* (2013).

2.1.2. Fisiopatologia

La NAFLD es caracteritza per l'ampli espectre de la condició clinicopatològica del propi fetge, que pot desenvolupar-se a una esteatohepatitis (NASH) i progressar a fibrosi, cirrosi i finalment a un HCC (Figura 2) [7].

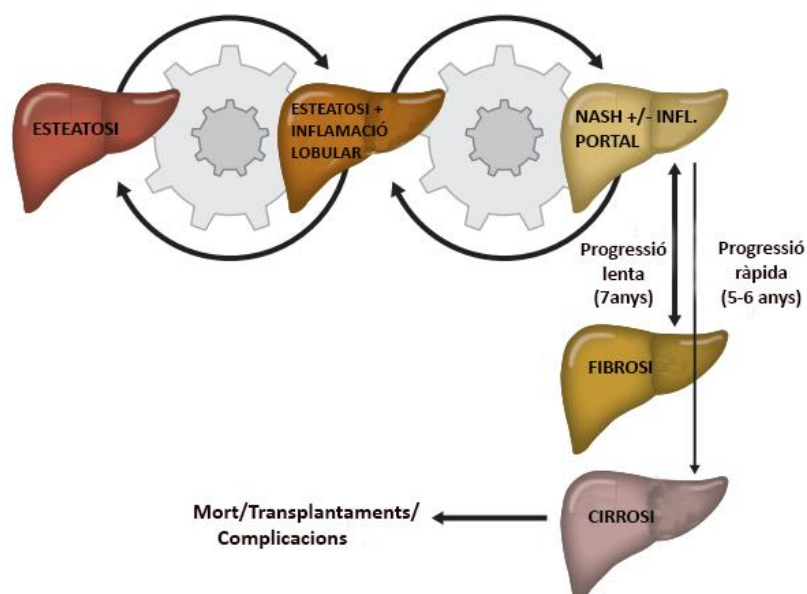


Figura 2. Espectre de la histologia de NAFLD.

Adaptada de Hardy *et al* (2016).

La teoria vigent que podria explicar els factors involucrats en la NAFLD està basada en tres “hits”. El primer “hit” està relacionat amb l’acumulació de triacilglicèrids a nivell dels hepatòcits. Els autors argumenten que l’esteatosi hepàtica pot ser conseqüència de la resistència perifèrica a la insulina en el teixit adipós, que provoca un increment de la lipòlisis en aquest teixit. Conseqüentment hi ha un augment dels àcids grassos lliures en plasma que són captats pel fetge, donant lloc a un augment dels nivells de lípids intracitoplasmàtics en els hepatòcits [11].

El segon “hit” estableix que la lesió dels hepatòcits es caracteritza per la presència de cèl·lules immunitàries, com poden ser els macròfags, els limfòcits, els eosinòfils i ocasionalment els neutròfils, així com la secreció de citocines proinflamatòries, la disfunció mitocondrial i estrès oxidatiu. Tots aquests factors contribueixen al desenvolupament de NASH i/o fibrosi [15,16].

La presència de fibrosi en individus amb NASH es relaciona amb una major probabilitat d’esdevenir un fall hepàtic, hipertensió portal i/o HCC [17,18]. Aquest succés es podria explicar pel tercer “hit”, que sustenta la possibilitat d’una inhibició en la replicació dels hepatòcits madurs, produïda per la presència d’estrès oxidatiu. També destaca la incapacitat de substituir les cèl·lules mortes donant lloc a la formació de col·lagen i en conseqüència, promoure la presència de fibrosi hepàtica [15].

Per tant, aquest conjunt de factors: la inflamació, la desregulació metabòlica i la disfunció mitocondrial tenen una gran importància a l’hora d’entendre les bases d’aquesta malaltia.

2.2. Inflamació

La importància de la inflamació és més que notòria degut a la seva implicació en diverses malalties cròniques, com l’obesitat, la diabetis *mellitus* tipus II, la resistència a la insulina, NAFLD, etc.

La inflamació es considera un mecanisme de defensa destinat a garantir la supervivència de l’espècie, per la seva capacitat a fer front a infeccions o reparar els danys causats. No obstant això, una duració perllongada del procés de inflamació produeix un efecte totalment contrari en l’organisme [2].

La resposta inflamatòria i el grau en què actua, està controlada especialment per la secreció de quimiocines [19].

2.2.1. Les quimiocines

Les quimiocines són unes proteïnes de baix pes molecular (8-14kDa) que formen part de la família de les citocines. És caracteritzen per ser mediadores proinflamatòries, ja que promouen la migració de leucòcits cap als teixits lesionats [19].

Actualment, les podem trobar classificades en quatre subfamílies segons els residus de cisteïna en N-terminal que contenen: les quimiocines α (CXC), les quimiocines β (CC), les quimiocines γ (C) i les quimiocines δ (C3XC) [19,20]. En concret, la quimiocina més estudiada i detallada dintre de les CC és la proteïna quimioattractant de monòcits (MCP-1 de l'anglès *Monocyte Chemoattractant Protein -1*) també coneguda com a quimiocina CCL2 (de l'anglès, *C-C Chemokine Ligand 2*) [20].

2.2.1.1 CCL2 (*Chemokine [C-C motif] Ligand 2*)

La CCL2, membre de la família de les β -quimiocines, és codificada per un gen localitzat en el cromosoma 17 (17,q11.2). La transcripció d'aquest gen dona lloc a un pèptid de 99 aminoàcids que és precursor de la quimiocina CCL2 (76 aminoàcids) [21]. La seva estructura es caracteritza per la presència de dos molècules de cisteïna consecutives (C-C) enllaçades per un pont disulfur que manté l'estructura proteica [21, 22].

La CCL2 està present en diversos teixits, la qual cosa implica que hi hagi un ampli ventall de cèl·lules capaces de sintetitzar-les. Entre elles podem trobar els fibroblasts, les cèl·lules endotelials, les cèl·lules del múscul llis, els monòcits, les cèl·lules T i altres tipus de cèl·lules que modulen el flux de cèl·lules immunitàries cap a la zona afectada [23].

L'expressivitat de CCL2 està regulada a nivell transcripcional per diversos agents estimuladors incloent el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , de l'anglès *Tumoral Necrosis Factor alfa*), l'interferó gamma (IF-gamma), el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF de l'anglès: "*Platelet derived growth factor*") i altres factors d'estrès.

També existeixen agents inhibidors de l'expressió de CCL2 com poden ser l'àcid retinoic, glucocorticoides i estrògens [22,23].

La capacitat del sistema immunitari de fer front a un antigen o bé a una lesió del propi teixit, depèn molt de la secreció de quimiocines i el consegüent reclutament de cèl·lules immunitàries, en el lloc i en el moment en què ho precisa. Una part d'aquesta resposta produïda per CCL2, necessita la presència d'uns receptors per a poder induir una resposta específica. Concretament, el receptor de la quimiocina esmentada, és el CCR2 (de l'anglès *C-C Chemokine Receptor type*) [24]. Una vegada es produeix la unió entre CCL2 i CCR2 s'inicia una sèrie de reaccions que permeten mobilitzar la cèl·lula immunitària (monòcits, macròfags) a la zona afectada [25,26].

2.2.2. CCL2 I NAFLD

L'estat inflamatori que s'observa en la NAFLD, indica que la funcionalitat dels teixits es troba afectada, principalment la del teixit adipós. Aquesta situació es generada en part per l'acció de CCL2, que estimula la infiltració de monòcits al teixit adipós per induir una resposta inflamatòria. Aquesta resposta produeix canvis en la mida i en el nombre dels adipòcits i en la síntesis d'adipoquines com és el TNF α , agent estimulador de la CCL2 [27,28].

Per altra banda, la capacitat d'aquest teixit per emmagatzemar energia en forma de TG es troba afectada, la qual cosa implica que l'excedent s'hagi d'acumular en altres teixits que no tenen aquesta funció específica, com és el cas dels teixits hepàtic, muscular i pancreàtic. En el cas del fetge, aquesta situació acaba provocant una acumulació lipídica en els hepatòcits i, consegüentment, una disminució en la funcionalitat mitocondrial i un increment de la síntesi d'espècies reactives de l'oxigen (ROS de l'angles *Reactive oxygen species*), normalment atenuada per l'activitat de molècules antioxidants com per exemple, les paraoxonases (PON) [28].

Per tant, la inflamació i l'estrès oxidatiu són conceptes claus en tota la fisiopatologia de la NAFLD, ja que tenen una relació molt estreta.

2.3. Oxidació

L'estrès oxidatiu és un desequilibri redox entre la producció de molècules prooxidants i antioxidants. Està demostrat que una exposició excessiva a aquest desequilibri, és altament tòxica per a les cèl·lules i afecta als principals components cel·lulars: proteïnes, lípids i ADN [29].

La presència d'enzims antioxidants representa un important mecanisme en la disminució de la carga d'agents prooxidants. Concretament, destaquen les paraoxonases [30].

2.3.1. Les paraoxonases

Les paraoxonases van ser descobertes originàriament com a enzims que hidrolitzaven compostos d'organofosforats tòxics i exògens, com l'insecticida paraoxó. Hi ha tres membres dintre de la família de les paraoxonases: paraoxonasa 1 (PON1), paraoxonasa 2 (PON2) i paraoxonasa 3 (PON3). Aquestes estan codificats per tres gens localitzats de forma adjacent en el cromosoma 7 (7q21.3-q.22.1) en humans i en el cromosoma 6 en ratolins [31]. Els tres gens són idèntics al 70% i es creu que deriven d'un precursor comú [32].

En humans, els gens de PON1 i PON2 s'expressen principalment en el fetge i en el ronyó, i els seus productes proteics es troben en la circulació associats a les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL). En canvi, els gens de PON2 s'expressen en diversos teixits, però els seus productes proteics són exclusivament intracel·lulars [32,33].

Fins ara, l'evidència científica ha demostrat que les tres paraoxonases estan filogenèticament relacionades, tenen activitat lactonasa (hidrolitza homocisteïna tiolactona) i estan involucrades en la peroxidació lipídica i en processos d'aterosclerosi. Concretament, la PON1 contribueix a l'efecte ateroprotector de les HDL; l'efecte antiaterogènic de la PON2 s'atribueix a la protecció del mitocondri enfront a l'estrès oxidatiu, mentre que PON3 ha demostrat ser un factor protector contra l'obesitat [33,34,35]. No obstant, la PON més estudiada actualment és la PON1.

2.3.1.1. PON1 (Paraoxonasa 1)

La PON1 és una glicoproteïna que consta de 354 aminoàcids amb un pes molecular aproximat de 43 kDA [31]. Segons una cristal·lografia de X-raigs, l'estructura de la PON1 és una hèlix β de sis aspes i cada aspa conté 4 filaments. En el túnel central de l'hèlix hi ha 2 Ca^{2+} , essencials per l'estabilitat del l'enzim i l'activitat catalítica [34].

La PON1 és capaç d'hidrolitzar compostos orgànics fosforats (paraoxó, diazaxón, sarín) i té funció lactonasa i arilesterasa (hidrolitza fenilacetat) [35]. A més d'aquestes funcions, diversos estudis *in vivo* i *in vitro*, li han atribuït propietats antioxidants per la seva capacitat d'eliminar peròxids lipídics de les lipoproteïnes, en especial de les LDL [32,34,37].

No obstant, l'activitat de la PON1 està afectada per nombrosos factors: els polimorfismes genètics, l'edat, el gènere, el nivell d'estrès oxidatiu, els fosfolípids oxidats en LDL i HDL, el consum d'alcohol, el tabaquisme i l'activitat física [38].

2.3.2. PON1 i NAFLD

L'estrès oxidatiu juga un paper central en la patogènesis de NAFLD, ja que un augment de ROS pot causar la peroxidació lipídica, seguida d'una resposta inflamatòria. S'ha observat que els pacients amb NAFLD/NASH, presenten una disminució de l'activitat d'enzims antioxidants com la superòxid dismutasa, la catalasa, el glutatió i la PON1 [37,40,41].

Per explicar la disminució de l'activitat de la PON1, s'han suggerit diversos mecanismes: el primer, la PON1 és inactivada després de la peroxidació lipídica degut a un increment de radicals lliures; el segon, les alteracions en l'estructura i la composició de les HDL podrien afectar l'activitat de PON1. I el tercer: la disminució de l'activitat de PON1 podria ser secundària a una síntesi hepàtica de PON1 alterada [39].

Per aquest motiu, la mesura de PON1 en sèrum s'ha proposat com una possible prova per a l'avaluació del grau de la insuficiència hepàtica [41].

2.4. Dislipèmia i NAFLD

El receptor de la lipoproteïna de baixa densitat (LDLr), és una glicoproteïna exhibida en la superfície de les cèl·lules, que juga un paper crucial en el control de l'homeòstasi del colesterol sanguini mitjançant la captació del colesterol de les lipoproteïnes en circulació. La funció que desenvolupa està íntimament relacionada amb el metabolisme lipídic, on un canvi en la seva estructura o una disminució de la seva expressió interfereix en la funció que desenvolupa i pot donar conseqüències com un increment de les concentracions de les LDL i una disminució dels nivells de les HDL [42].

Aquesta condició es pot trobar en individus amb NAFLD. Concretament, es caracteritzen per tenir nivells de TG i LDL-c elevats. A més, les partícules de LDL són més petites i més denses, la qual cosa fa que siguin més aterogèniques. Els mecanismes d'aquesta alteració i/o desregulació encara no estan ben establerts, però sembla ser que la sobreproducció hepàtica de les partícules de molt baixa densitat (VLDL) jugui un paper important en l'alteració de la resta de lipoproteïnes en circulació [43,44].

2.5. Fetge: òrgan metabòlic

El fetge és un òrgan que desenvolupa diverses tasques crucials per al correcte funcionament de l'organisme. El paper més rellevant que desenvolupa és el d'un òrgan metabòlic que coordina totes les vies involucrades en el metabolisme energètic [45,46].

Durant una ingesta de carbohidrats, a part d'utilitzar la glucosa com a font d'energia també utilitza la via lipogènica per la síntesis de TG. Aquesta situació manifesta el nexa d'unió entre el metabolisme de la glucosa i el lipídic, regulat per l'activitat de la insulina [46]. No obstant, aquesta condició es pot veure afectada en la presència de NAFLD, degut a l'acumulació de vesícules lipídiques en els hepatòcits.

Probablement, aquest fet sorgeix d'una alteració en el metabolisme energètic que propicia l'acumulació lipídica i el increment d'àcids grassos lliures en sang [48,49].

2.5.1. Relació entre metabolisme, inflamació i oxidació.

Si s'observen tots els successos produïts al llarg de la història, es fa més que evident el vincle entre el metabolisme i el sistema immunitari.

Durant milers d'anys la població sota condicions de fam o malnutrició eren més susceptibles a les infeccions. No obstant, en les últimes dècades la situació ha canviat dràsticament, ja que s'ha passat de situacions de pobresa a tenir una abundància i disponibilitat d'aliments en tot moment [50].

Malauradament, aquest extrem repercuteix sobre la salut del individu ja que compromet la funcionalitat metabòlica, en la qual la inflamació i l'estrès oxidatiu hi són presents [51].

La interrelació entre els mecanismes de l'estrès oxidatiu i la inflamació generen un gran impacte en la transformació d'energia que duu a terme el mitocondri.

Els mitocondris hepàtics, presenten una sèrie de canvis morfològics i funcionals, que interfereixen en el correcte funcionament. Aquests culminen amb un augment de la producció de ROS i la subsegüent lesió dels hepatòcits.

2.5.2. Metabolisme energètic.

El mitocondri, és un orgànul cel·lular vinculat al metabolisme energètic. La seva funció és imprescindible per a l'obtenció d'energia, ja que proporciona al voltant del 90% de les molècules d'ATP mitjançant la fosforilació oxidativa. Aquest sistema d'obtenció d'energia funciona gràcies als coenzims NADH i FADH. Aquests, a través de reaccions d'oxidació-reducció, capten els electrons del cicle de l'àcid tricarboxílic (TCA, de l'anglès *Tricarboxilic Acid Cycle*) per cedir-los posteriorment a la cadena transportadora d'electrons per la producció d'ATP [52].

Les reaccions produïdes en el TCA proporcionen una gran varietat de metabòlits intermediaris que són utilitzats com a substrats en diferents rutes biosintètiques. A més a més, són imprescindibles per a la supervivència de la cèl·lula i la seva homeòstasi. Per aquesta raó, les reaccions anapleròtiques (catàlisis del piruvat, entre altres) tenen especial importància, ja que contribueixen al restabliment d'aquests metabòlits [53,54].

No obstant, la ingesta excessiva d'energia pot provocar l'aparició d'obesitat i comorbiditats associades, en les quals l'activitat mitocondrial es troba perjudicada. La disfunció mitocondrial es caracteritza per la inhibició del consum de O₂ mitocondrial, canvis en el potencial de la membrana i una reducció dels nivells d'ATP [55].

2.5.2.1. Metabolòmica

Les cèl·lules representen una xarxa en la qual interactuen gens, transcripcions, proteïnes, molècules de senyalització i metabòlits que defineixen el fenotip i la funció cel·lular. Per tal de poder estudiar el paper dels diferents metabòlits i trobar els mecanismes eficaços de diagnòstic i tractament, s'utilitza la tècnica metabolòmica. Aquesta permet estudiar el paper dels diferents metabòlits i entendre millor la seva interacció [56].

Concretament, les tècniques analítiques utilitzades per identificar els canvis en les concentracions endògenes de metabòlits són la cromatografia de ressonància magnètica nuclear (RMN) i de gasos, la cromatografia líquida i l'electroforesi capil·lar acoblada a espectrometria de masses [57,58].

3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

La inflamació interfereix el metabolisme cel·lular en les malalties cròniques. En totes, es repeteix la relació entre els macròfags (i altres cèl·lules immunes) i el mecanisme d'acumulació de lípids (especialment adipòcits), ja que l'excés d'ingesta d'energia propicia ambdós, la migració de monòcits/macròfags i el progrés de trastorns metabòlics.

Així doncs, és rellevant crear models animals en els quals es pugui estudiar l'efecte conjunt: la inflamació, l'estrès oxidatiu i les alteracions metabòliques. Per aquest motiu, la Unitat de Recerca Biomèdica, ha creat un model animal que integra la deficiència de CCL2, PON1 i del receptor de les LDL. Aquesta combinació permet estudiar d'una forma més específica, la relació entre oxidació-inflamació i l'efecte que té en el metabolisme energètic. Aquesta representació a petita escala de les manifestacions metabòliques, permetrà entendre els mecanismes involucrats i la importància de cada una d'elles en teixits tan importants des del punt de vista metabòlic, com és el hepàtic.

Per tant, l'objectiu principal d'aquest estudi és observar els efectes de la deficiència de CCL2 (C-C chemokine ligand 2) en les vies metabòliques d'un model animal d'estrès oxidatiu i hiperlipèmic. Així com determinar la influència del factor dietètic.

4. MATERIALS I MÈTODES

4.1 Models animals

Els animals d'estudi van ser ratolins mascles deficients en PON-1/LDLr/CCL2 (CPL KO), amb un *background* genètic corresponent a C57BL/6J. Aquests van ser estabulats en cicles de llum/fosc de 12 hores, amb una temperatura constant de 22°C i una humitat relativa del 55%. Fins al moment d'entrada en estudi, l'alimentació va estar basada en una dieta comercial (14% rica en proteïna pel manteniment de rosegadors, 0,03% colesterol, Harlan, Barcelona, Chow diet, CD). Tan l'aigua com el menjar es van subministrar *ad libitum*.

A les 10 setmanes, 48 animals es van distribuir de forma aleatòria i segons el tractament dietètic en dos grups. Un grup (n=24) se li va administrar una dieta estàndard i l'altre grup (n=24) va rebre una dieta rica en greix (21% carbohidrats, 19% proteïnes i 60% lípids, SnifSpezialdiäten GmbH, Germany, high-fat diet, HF). Cada grup d'intervenció dietètica estava format pels següents animals d'estudi (Figura 4): animals CCL2/PON1/LDLr KO (CPL KO) (n=8), animals doble deficients en PON1/LDLr *knockout* (DKO) (n=8) i animals *Wild type* (WT) com a grups controls (n=8).

Durant les 14 setmanes de tractament, la ingesta d'aliments i el pes dels animals es van controlar setmanalment.

Tots els procediments van ser aprovats i realitzats conforme la política establerta pel Comitè d'Experimentació Animal de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili.

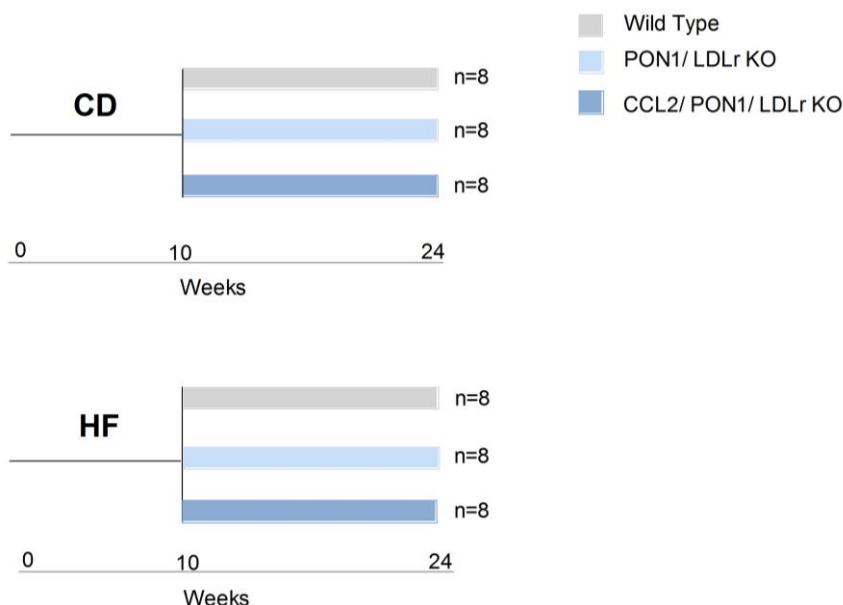


Figura 3. Distribució dels models animals.

4.2 Obtenció i conservació de les mostres

L'obtenció de les mostres de teixit i sang es van realitzar a les 24 setmanes d'edat dels animals en estudi. Van ser anestesiats amb una sobredosis de xilacina/ketamina (xilagesic 2%, Laboratorios Caliers, S.A; Barcelona; Ketolar 5mg/ml, Pfizer, Madrid). Per a comprovar que els animals van rebre l'anestèsia, es va realitzar la prova del reflex podal.

La sang es va extreure per punció intracardíaca. La sang es va recollir en tubs amb i sense àcid etilendiaminotetracètic (EDTA), per obtenir les mostres de plasma i sèrum, respectivament. Una vegada realitzada l'extracció, els ratolins van rebre una perfusió de sèrum fisiològic 0,1% (NaCl).

També es van extreure diversos teixits de interès que es van processar segons les anàlisis a realitzar posteriorment. Una part d'aquests teixits van ser congelats immediatament en nitrogen líquid i conservats a -80°C fins el moment de l'anàlisi. La resta, es van conservar en formol. Posteriorment, aquests últims van ser inclosos en parafina i tallats amb un micròtom en seccions de $2\ \mu\text{m}$ per dur a terme les diferents anàlisis histològiques i immunohistoquímiques.

4.3 Histologia Hepàtica

Per a l'avaluació morfològica del teixit hepàtic dels models animals es va utilitzar la tinció hematoxilina-eosina. Aquesta tinció permet visualitzar els diferents components cel·lulars gràcies a una reacció àcid-base [59].

4.3.1 Valoració de l'esteatosi

Per valorar el grau d'esteatosi es va utilitzar el mètode proposat per Brunt et al 1999 [60]. Aquest consisteix en observar les mostres al microscopi òptic (Nikon, Eclipse E600, Madrid, Espanya) sense identificar-les (blinded analysis). Tot seguit, es va realitzar una valoració semiquantitativa, en la qual es va assignar un valor del 0 al 3 (Taula 1), segons l'observació del nombre de cèl·lules hepàtiques amb vacuoles de greix respecte a l'àrea total de superfície cel·lular.

Taula 1. Relació entre la presència de greix al teixit hepàtic (%) i el grau d'esteatosi.

Grau d'esteatosi	Presència de greix (%)
Grau 0	< 5 %
Grau 1	Entre 5-33%
Grau 2	Entre 33-66%
Grau 3	> 66%

4.4 Immunohistoquímica

Es va dur a terme l'anàlisi immunohistoquímica a nivell de teixit hepàtic. Aquesta tècnica es basa en la unió específica de l'anticòs monoclonal primari Rat anti-mouse F4-80 (Serotec, Oxford, UK, MCA497R), situada a la superfície de macròfags i monòcits. Posteriorment, s'afegeix l'anticòs secundari biotilinat Goat anti-rat IgG (Vector, Burlingame, CA, USA BA-9400), que s'uneix amb l'anticòs primari. Amb la finalitat d'amplificar la senyal, s'utilitza un complex d'avidina-biotina conjugada amb l'enzim peroxidasa (ABC complex, Vectastain ABC Kit Standard, Vector, PK-4000) que s'acobla a la biotina conjugada. Per poder visualitzar aquesta unió específica, s'agrega un cromogen soluble (D.A.B, 3.3'diaminobenzadine, Dako, K3466) que reacciona amb la peroxidasa, donant lloc a un precipitat de color marró.

Finalment, mitjançant un microscopi òptic (Nikon, Eclipse E600, Madrid, Espanya) i utilitzant el software AnalSYS (SoftImaging System, Münster, Alemanya), es va procedir a quantificar els macròfags en 20 camps consecutius i aleatoris. Els resultats es van representar en forma de percentatge d'àrea tenyida respecte a l'àrea total del camp mesurat.

4.5 Plataforma de metabolòmica dirigida: GC-EI-QTOF-MS

Es va dur a terme una anàlisi metabolòmica dirigida per tal d'estudiar compostos implicats en el metabolisme energètic en tots els grups mitjançant espectrometria de masses (GC-EI-QTOF-MS) seguint el mètode proposat per Riera Borull et al (2016) [61].

Els metabòlits mitjançant aquest mètode de GC-EI-QTOF-MS es mostren en la Taula Annex1 i els criteris de selecció es basen en Shin et al. (2014) [62].

4.6 Anàlisi estadística

Els outliers van ser descartats mitjançant el test online Iglewicz and Hoaglin's robust (<http://contchart.com/outliers.aspx>).

Les diferències entre els grups es van comparar utilitzant un test estadístic no paramètric degut al tamany de la mostra ($n < 30$), U de Mann Witney. Els resultats s'expressen amb la mitjana $\pm$ error estàndard (SEM), si no s'indica el contrari.

Totes aquestes anàlisis estadístiques es van realitzar mitjançant el programari MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>), el SPSS 19.0 (IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Versin 19.0. Armonk, NY:IBM Corp.) i el GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Els valors de $p < 0,05$ es van considerar estadísticament significatius en totes les anàlisis.

5.RESULTATS

5.1 Evolució de la ingesta d'aliments i del pes dels ratolins

Durant les 14 setmanes d'estudi, es van recollir les dades relatives al pes i la ingesta dels models animals. Pel que fa a l'evolució del pes (Figures 4A-B), els ratolins *Wild type*, en dieta estàndard, van presentar un increment significatiu respecte els CCL2/PON1/LDLr *knockout* i els PON1/LDLr *knockout*. No obstant, aquesta tendència no es va observar en dieta rica en greix, ja que no es van obtenir diferències significatives entre ells. Els animals van presentar una ingesta similar en els dos tractaments dietètics (Figures 4C-D).

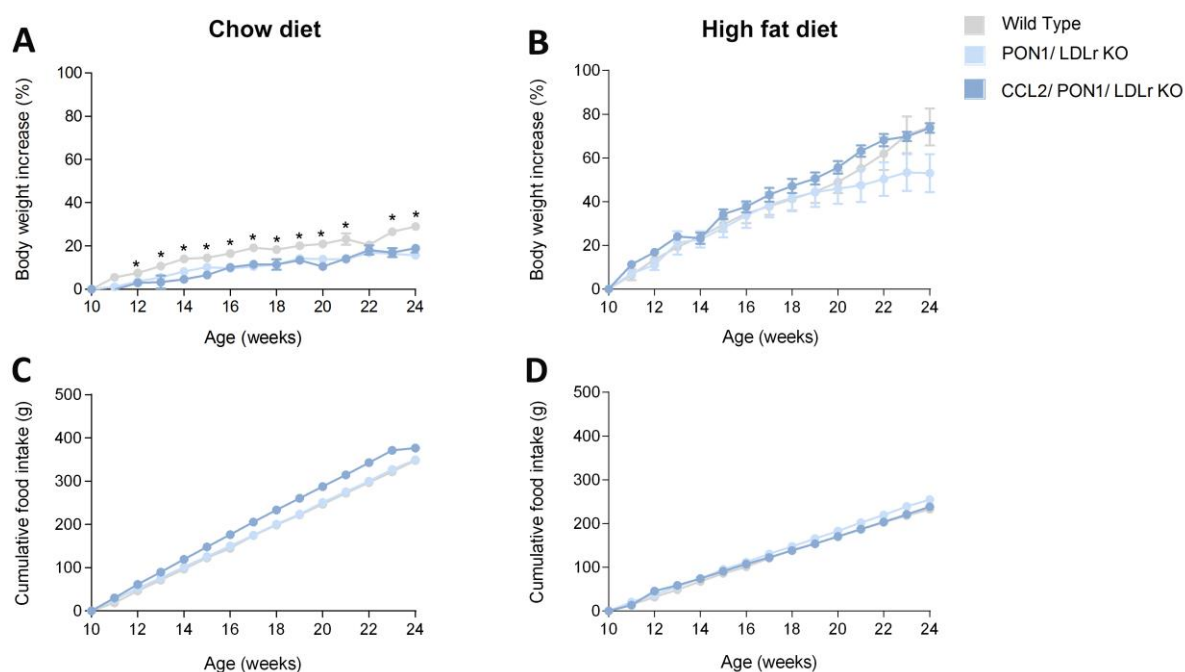


Figura 4. Increment de pes i ingesta acumulada dels animals d'estudi. (A i C) Increment del pes i ingesta acumulada dels grups alimentats amb dieta estàndard. **(B i D)** Increment de pes i ingesta acumulada dels grups alimentats amb dieta rica en greix. Les dades es presenten en mitjana $\pm$ SEM, considerant significació en $p < 0,05$.

5.2 Valoració del grau d'esteatosi hepàtica

Com es pot observar en la figura 5, el model PON1/LDLr *knockout* va presentar un increment significatiu d'esteatosi hepàtica, tant en dieta estàndard com dieta rica en greix. En canvi, en el model CCL2/PON1/LDLr *knockout*, el nivell d'esteatosi va disminuir significativament, tant en dieta estàndard com dieta rica en greix, fins assolir valors equiparables al model WT.

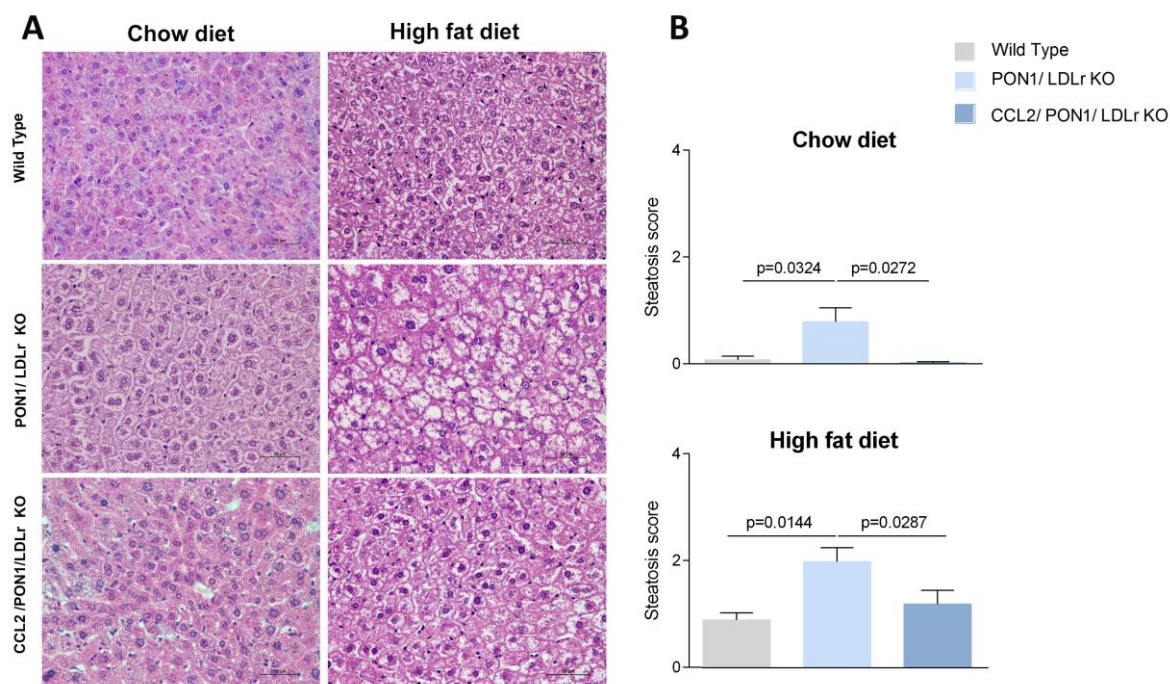


Figura 5. Efectes de les mutacions sobre el desenvolupament d'esteatosi. (A) Micrografia representativa dels hepatòcits dels animals alimentats amb dieta estàndard i dieta rica en greix, respectivament (x200). (B) Gràfics representatius del grau d'esteatosi dels animals tant en dieta estàndard com en dieta rica en greix. Les dades es presenten en mitjana $\pm$ SEM. S'indica la significació entre grups en $p < 0,05$.

5.3 Immunohistoquímica F4/80-macròfags

En els animals tractats amb dieta estàndard, s'observa que el model CCL2/PON1/LDLr knockout i el model PON1/LDLr knockout tenen un nombre de macròfags en el teixit hepàtic, estadísticament superior al model WT. Altrament, no es van trobar diferències significatives entre els models PON1/LDLr knockout i CCL2/PON1/LDLr knockout.

En canvi, els animals *Wild type* i CCL2/PON1/LDLr knockout tractats amb dieta rica en greix, van presentar un augment en el nombre de macròfags respecte als animals tractats amb dieta estàndard. Al contrari, els ratolins PON1/LDLr knockout van presentar una disminució del nombre de macròfags amb el tractament de la dieta rica en greix. Els tres grups d'animals van presentar diferències significatives entre ells (Figura 6).

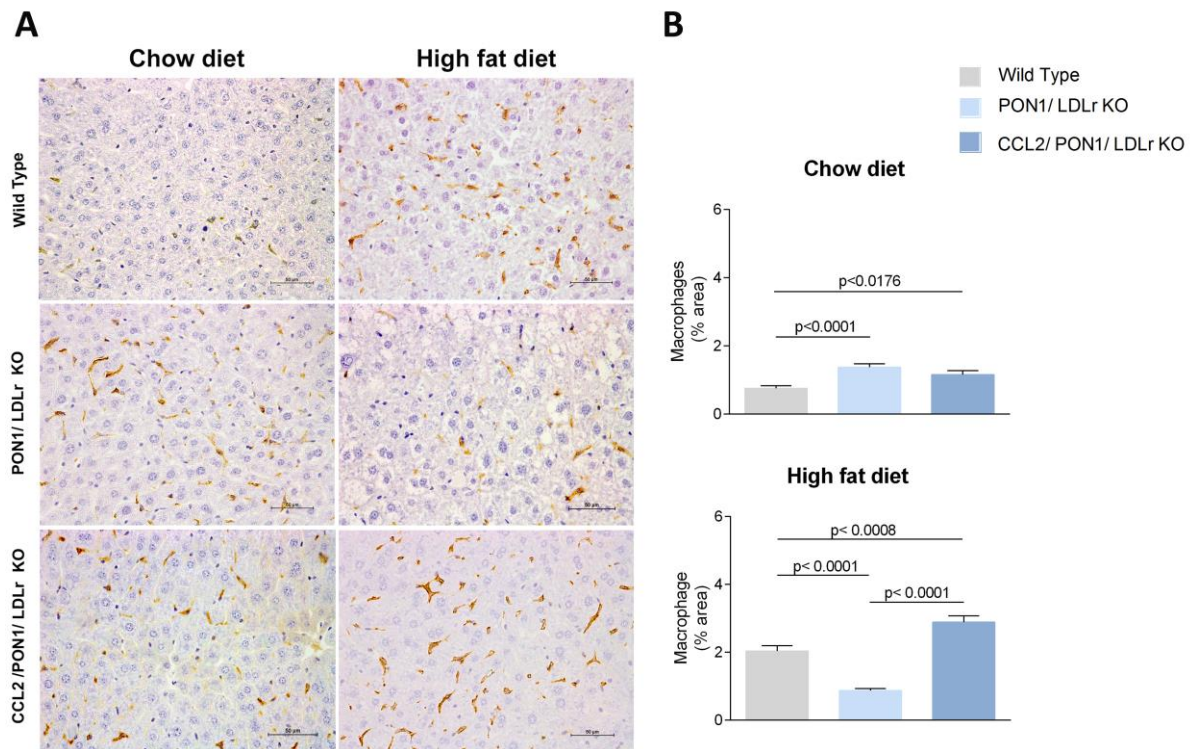


Figura 6. Immunohistoquímica de F4.80 en el teixit hepàtic. (A) Micrografia representativa dels macròfags en el teixit hepàtic dels diferents models animals alimentats amb dieta estàndard i dieta rica en greix, respectivament (x200). **(B)** Gràfics que representen el percentatge d'àrea afectada per macròfags en el teixit hepàtic d'animals amb dieta estàndard i dieta rica en greix, respectivament. Les dades es presenten en mitjana $\pm$ SEM. S'indica la significació entre grups en $p < 0,05$.

5.4 Metabolòmica

A partir dels resultats obtinguts mitjançant les tècniques de metabolòmica dirigida, es va realitzar l'anàlisi estadística dels resultats. Per tal de facilitar la interpretació de les dades es van realitzar esquemes dels metabòlits analitzats. Els colors indiquen quins metabòlits havien augmentat o disminuït respecte el grup control (colors roig i blau respectivament) i també quins no s'havien pogut detectar (color gris).

Els canvis entre grups van ser representats mitjançant el *Fold change*. D'altra banda, la relació entre els diferents grups es va representar mitjançant l'Anàlisi de Components Principals (PCA) i els *Heatmaps*. Concretament, el PCA és una tècnica estadística que té com a objectiu reduir el nombre de variables i les dimensions del conjunt de dades, retenint la màxima informació [63]. En el cas dels *Heatmap*, es tracta de representacions bidimensionals que proporcionen informació sobre la diferència de la concentració dels diferents metabòlits entre dos grups [64].

5.4.1 L'efecte del tractament dietètica en les diferents mutacions

5.4.1.1 *Wild-Type*

Els animals WT tractats amb dieta rica en greix van mostrar una reducció significativa de l'aconitat, malonil-CoA, glutamat i β -hidroxibutirat respecte als animals tractats amb dieta estàndard. Com s'observa en l'annex 1A, aquests metabòlits afecten diferents punts de les vies implicades en el metabolisme energètic. En fer una comparació entre els dos grups, es va observar una clara diferència metabòlica possiblement deguda a l'efecte dietètic (Annex 1B).

Si analitzem els metabòlits per separat, les diferències més destacables s'observen en l'aconitat (Annex 1B). Aquest metabòlit va presentar una variació estadísticament significativa segons la dieta administrada. L'anàlisi del *Heatmap* (Annex 1D) ens permet observar una disminució clara d'aquest compost, quan es va administrar una dieta rica en greix i un augment quan es va administrar a una dieta estàndard.

5.4.1.2 *PON1/LDLr knockout*

Els animals PL KO després de l'administració del tractament dietètic amb HF van presentar una disminució significativa dels diferents metabòlits implicats en el metabolisme energètic, respecte als animals tractats amb dieta estàndard. Concretament, es va observar una disminució significativa dels metabòlits relacionats amb el metabolisme de la glucosa, el metabolisme proteic i metabòlits intermediaris del TCA (Annex 2A). Malgrat això, no es van observar diferències significatives entre els dos grups (Annex 2B).

Les variacions dels metabòlits més destacables les trobem en el malonil-CoA, l'aconitat i el succinil-CoA, amb *fold change* de 4.6, 3.1 i 2.7 respectivament (Annex 2C). Tots aquests metabòlits estan implicats en el cicle de l'àcid tricarboxílic (TCA). L'anàlisi del *Heatmap* (Annex 2D) ens permet apreciar d'una manera més clara aquestes diferències.

5.4.1.3 *CCL2/PON1/LDLr knockout*

En dieta rica en greix, els animals CPL KO van presentar alteracions importants en el metabolisme de la glucosa. Com s'observa en l'annex 3A, hi ha una acumulació significativa dels metabòlits: glucosa-6-fosfat, la fructosa-6-fosfat i la fructosa-1,6-bisfosfat. Pel contrari, es va observar una disminució significativa del 6-fosfat-gluconat, 3-fosfo-glicerat i fosfoenolpiruvat. Respecte al TCA, hi ha una disminució significativa del malonil-CoA, l' α -cetoglutarat i el succinil-CoA. A més a més, els aminoàcids de cadena ramificada (BCCA, de l'anglès: Branched Chain Amino Acids) i la serina són significativament inferiors.

L'efecte de la dieta sembla tenir un efecte important en la funcionalitat metabòlica d'aquests animals, degut a les clares diferències que es poden observar en el PCA realitzat entre els dos grups. Com es pot observar en l'Annex 3B, els dos grups de tractament es distribueixen en dos espais diferents en una representació bidimensional del PCA.

Entre tots els metabòlits alterats, destaquem la glucosa-6-fosfat. Com podem observar a la figura Annex 3C, aquest metabòlit va presentar un clar augment quan es va administrar una dieta HF respecte CD. El *heatmap* (Annex 3D) ens permet confirmar els canvis metabòlics deguts a la dieta.

5.4.2 Comparació entre els diferents models animals en dieta estàndard

5.4.2.1 Comparació entre PON1/LDLr *knockout* i Wild-Type

En els animals PL KO respecte als WT alimentats amb dieta estàndard, es va observar una disminució significativa del 6-fosfogluconat, intermediari de la via de la pentosa fosfat i una alteració significativa del citrat, malonil-CoA i succinil-CoA en el TCA. Pel que fa referència als aminoàcids, es va observar una disminució significativa del β -hidroxibutirat deguda a una disminució significativa dels aminoàcids serina, valina i leucina (Annex 4A). No obstant, aquestes variacions no van mostrar diferències en la funcionalitat metabòlica entre els dos grups, ja que aquests es troben superposats en el mateix pla (Annex 4B).

Si observem les variacions dels diferents metabòlits (Annex 4C), podem ressaltar la disminució significativa del 6-fosfogluconat i l'augment de la glucosa-6-fosfat tot i que aquest últim, no va resultar significatiu. En el *heatmap* es poden observar diferents agrupacions dels metabòlits en funció de les alteracions degudes a la mutació (Annex 4D).

5.4.2.2 Comparació entre CCL2/PON1/LDLr *knockout* i Wild-Type

El model CPL KO respecte al WT, no va mostrar cap alteració significativa en el metabolisme energètic (Figura 7A). A més a més, amb el PCA (Figura 7B) podem afirmar que els dos grups mostren una clara igualtat en la funcionalitat metabòlica ja que es distribueixen en un mateix espai dintre d'un mateix pla.

Aquesta situació també es va observar en els *fold change* i el *heatmap* (Figura 7C-D), on la variabilitat de cadascun dels metabòlits va ser pràcticament inexistent.

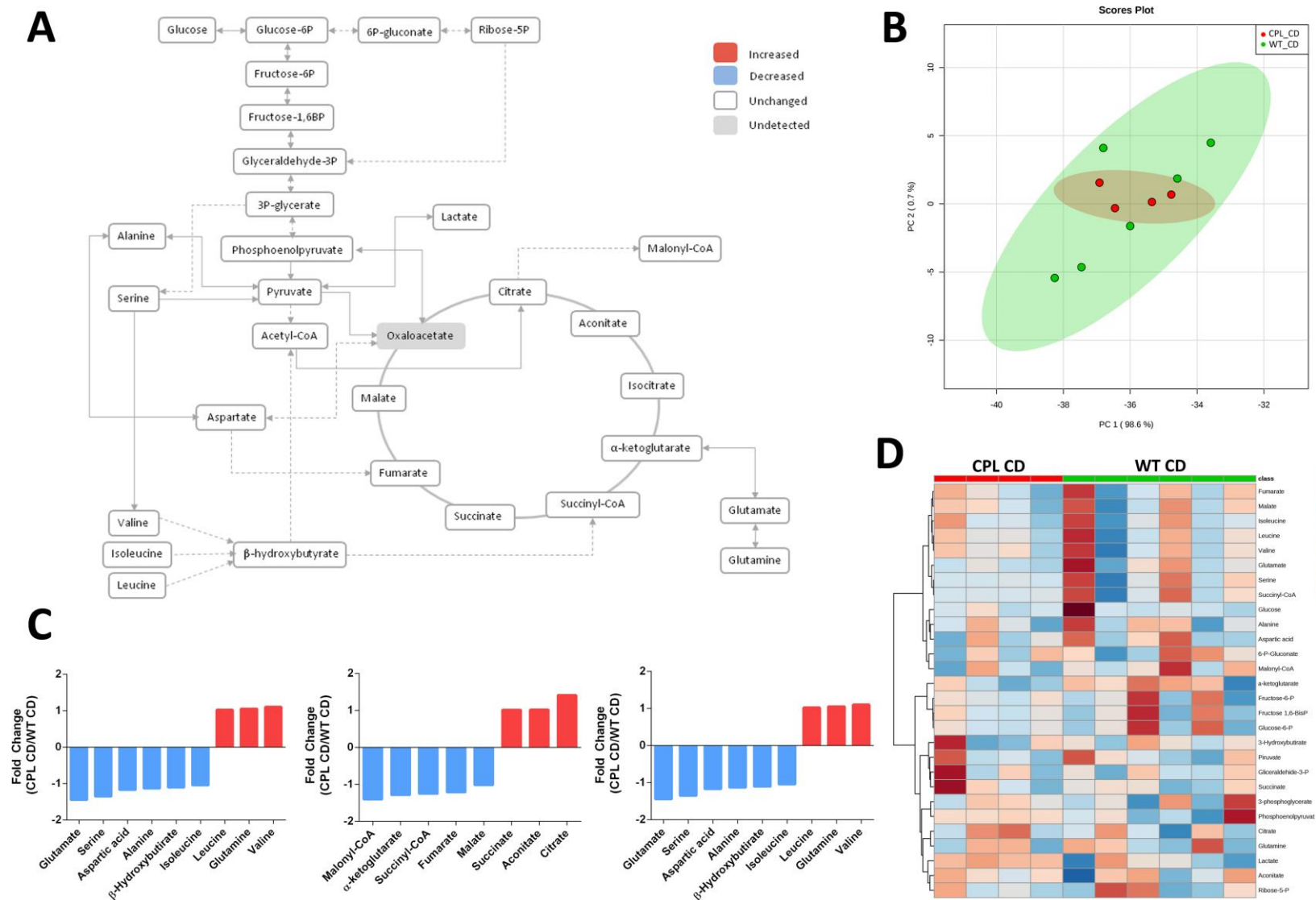


Figura 7. (A) Esquema del metabolisme energètic. Els metabòlits estan representats gràficament comparant CCL2/PON1/LDLr KO (CPL) vs (Wild-Type) WT en dieta estàndard: increment (roig), disminució (blau), no variació (blanc), no detectat (gris). La intensitat de colors varia segons: p-valor <0,01 (més intensitat) i p-valor entre 0,05 i 0,02 (menys intensitat). **(B)** L'Anàlisi de Component Principal (PCA) és una representació gràfica que permet observar les diferències entre el grup control i el grup d'intervenció. **(C)** *Fold-change* dels diferents metabòlits de les diferents vies metabòliques: glicòlisis, cicle de l'àcid cítric i metabolisme dels aminoàcids. **(D)** Visualització del *heatmap* i l'anàlisi d'agrupament jeràrquic d'acord amb les dades obtingudes del MetaboAnalyst. Files: metabòlits; columnes: identificació del ratolí; els colors indiquen: blau (disminució), roig (increment).

5.4.2.3 Comparació entre CCL2/PON1/LDLr *knockout* i PON1/LDLr *KO*

En l'Annex 5A s'observa que el metabolisme de la glucosa està alterat significativament. A més, ressaltava el increment significatiu de la 6-fosfogluconat amb un *fold change* de 4 i la disminució de la ribosa-5-fosfat amb un *fold change* -5.4. També destaca el increment dels BCCA (valina i leucina) i la serina, i en conseqüència, observem un increment del succinil-CoA. Si comparem els diferents metabòlits analitzats, s'observa una diferència metabòlica clara entre aquests dos grups en dieta estàndard (Annex 5B-D), ja que s'observen dos grups diferents.

5.4.3 Comparació entre els diferents models animals en dieta rica en greix

5.4.3.1 Comparació entre PON1/LDLr *knockout* i *Wild-Type*

El model PON1/LDLr sotmès a una dieta rica en greix manifestava alteracions en el metabolisme de la glucosa en comparació amb el model *Wild type*. Concretament, la glucosa-6-fosfoat, la fructosa-1,6-bisfosfat i el lactat van incrementar significativament, exceptuant el gluconat-6-fosfat que va disminuir (Annex 6A). Tanmateix, els BCCA, la serina, l'alanina i el glutamat van disminuir significativament, sent el més important la serina amb un *fold change* de -9.7 (Annex 6C). Pel que respecta al TCA, destaca la disminució significativa del succinil-CoA i el malonil-CoA, tal i com s'observa en l'Annex 6-A-C-D. Tot i així, comparant els metabòlits no es van mostrar diferències rellevants en la funcionalitat metabòlica entre els dos grups (Annex 6B).

5.4.3.2 Comparació entre CCL2/PON1/LDLr *knockout* i *Wild-Type*

El model CPL KO versus el model *Wild Type* va mostrar uns nivells significativament elevats dels metabòlits intermediaris del metabolisme de la glucosa, incloent a més, el increment significatiu de l'aconitat i el β -hidroxibutirat. En canvi, el glicerol-3-fosfat, la isoleucina i la leucina van resultar reduïts (Annex 7A-C). Aquestes diferències respecte al model *Wild type* no semblen influir de forma rellevant en el metabolisme energètic, ja que s'aprecia certa similitud entre els dos grups (Annex 7B-D).

5.4.3.3 Comparació entre CCL2/PON1/LDLr *knockout* i PON1/LDLr *knockout*

El model CPL KO sotmès a una dieta rica en greix i comparat amb el model PL KO, va presentar increments en diversos metabòlits, especialment en els involucrats en el metabolisme glucídic, ja que com s'observa en la figura Annex 8A-C, presenten uns nivells significativament incrementats.

A més a més, destaquen el malonil-CoA, el citrat, l'aconitat, el glutamat, la glutamina, l'aspartat i el β -hidroxibutirat. En canvi, la ribosa-5-fosfat, involucrada en la via de la pentosa fosfat, va disminuir significativament (Annex 8A). Tanmateix, aquestes variacions no van resultar suficients com per afirmar l'existència de variabilitat entre els dos grups, tot i observar una certa tendència a diferenciar-se (Annex 8B-D).

En resum, tal i com mostra la Taula 2, s'observa que quan s'inhibeix la quimiocina CCL2 en dieta estàndard, el model CPL KO presenta millora en l'esteatosi hepàtica i en la seva funcionalitat metabòlica, actuant com un model WT. No obstant, quan s'administra una dieta en greix, tot i la millora de l'esteatosi, el model CPL KO mostra alteracions en les diverses vies metabòliques.

Taula 2. Resum dels resultats obtinguts.

		DIETA ESTÀNDARD		DIETA RICA EN GREIX	
		CPL vs WT	CPL vs PL	CPL vs WT	CPL vs PL
ESTEATOSI		=	↓	=	↓
MACRÒFAGS		↑	=	↑	↑
METABOLISME	- Glucòlisis	=	↑	↓	↓
	- Cicle TCA	=	↑	↓	↓
	- Aminoàcids	=	↓	↑	=

Els resultats s'expressen en forma de signes: el igual indica que no hi ha diferències entre els models comparats. Les fletxes roges indiquen els canvis negatius i les fletxes verdes indiquen els canvis positius.

CCL2: CCL2/PON1/LDLr KO; WT: *Wild Type*; PL: PON1/LDLr KO

6.DISSCUSSIÓ

Avui en dia, les malalties cròniques representen un repte per a la salut pública degut a que són la primera causa de morbi-mortalitat a nivell mundial, donant lloc al 60% de les morts [65]. Entre aquestes malalties, es troba la NAFLD, una patologia crònica hepàtica que afecta al 10-30% de la població mundial [4,10]. Per aquest motiu, actualment s'estan duent a terme una gran quantitat d'estudis per tal d'esbrinar quins són els principals mecanismes involucrats en el desenvolupament d'aquestes patologies.

S'ha observat que en la fisiopatologia de l'obesitat, i per tant, de la diabetis i/o l'esteatosi hepàtica, es produeixen un seguit d'interconnexions complexes entre l'estat inflamatori, les vies metabòliques i l'estrès oxidatiu. En estudis anteriors realitzats a la Unitat de Recerca Biomèdica, es va observar que la manipulació de l'activitat de la quimiocina CCL2 (chemokine C-C motif ligand 2) pot provocar modificacions en l'evolució i en el desenvolupament d'aquestes patologies [66,67]. Per una banda, es va observar que la sobreexpressió de CCL2 s'associava a potenciar la inflamació, canvis immunitaris, disfunció mitocondrial, entre altres trastorns metabòlics. Per contra, la seva inhibició es va relacionar amb l'efecte oposat. A partir d'aquests resultats es va plantejar la hipòtesis de que la inhibició de CCL2 podria millorar les complicacions metabòliques observades en un model animal d'estrès i hiperlipèmia.

Pel que fa als resultats obtinguts en l'evolució del pes i de la ingesta, no es van trobar diferències significatives entre els ratolins PL KO i CPL KO. Tot i que, en diversos estudis s'ha observat que la deficiència de CCL2 està associada amb la disminució del pes i un manteniment de la ingesta [66,67].

Des del punt de vista histològic, la deficiència de CCL2 està associada a una menor esteatosi hepàtica. En ambdós tractaments dietètics, els ratolins CPL KO van presentar una evolució histològica similar als ratolins WT. Aquesta situació ha estat evidenciada en altres estudis, en les quals la deficiència de CCL2 sembla tenir un efecte substancial en la reducció de l'esteatosi hepàtica [68,69,70].

L'anàlisi immunohistoquímica va revelar que els ratolins CPL KO, en dieta rica en greix, van presentar major quantitat de macròfags en el fetge respecte a la resta de grups estudiats. Curiosament, aquestes cèl·lules van presentar variacions morfològiques (macròfags més grans). Aquestes diferències indueixen a pensar que els macròfags presents en el model animal CPL KO podrien ser macròfags residents del propi teixit, en aquest cas, les cèl·lules de Kupffer. D'altra banda, la funcionalitat dels macròfags observats en els ratolins PL KO i WT, podria no ser la mateixa que els ratolins CPL KO [71]. Aquest fet podria ser degut al tipus de macròfags, ja que segons l'evidència científica, hi ha dos tipus amb dues funcions diferents: pro i

antiinflamatoris (macròfags M1 i M2 respectivament) [71]. Els macròfags proinflamatoris es caracteritzen per l'expressió de les citocines proinflamatòries, òxid nítric, components intermediaris de nitrogen reactiu i ROS. En canvi, els macròfags M2 contribueixen a la remodelació de teixits, reparació i cicatrització de ferides en condicions fisiopatològiques [72,73].

Per tal d'observar les implicacions sobre el metabolisme energètic, es va realitzar una anàlisi metabòlica del teixit hepàtic. Aquesta revela que el model animal CPL KO en dieta rica en greix, presenta una alteració del metabolisme de la glucosa, ja que s'observa un augment dels metabòlits involucrats en la via glucolítica (glucosa-6-fosfat, fructosa-6-fosfat i fructosa-1,6-bisfosfat). Conseqüentment, s'observa una disminució de la concentració d'alguns metabòlits implicats en el TCA, que podria comportar a una reducció en la producció d'ATP [74]. Una resposta a aquest estat podria ser el increment de la gluconeogènesi, que donaria lloc a un augment de la proteòlisi i de la conversió de lactat a piruvat [75]. Aquest fet corroboraria la disminució del lactat i dels aminoàcids.

Aquesta situació també s'observa en el model animal PL KO, però de forma més accentuada ja que presenta una disminució de la glucòlisi. En canvi, en el model WT, la dieta rica en greix no sembla afectar-li de la mateixa manera degut a que només s'observa una major activitat del cicle TCA i un increment de la lipogènesi [76].

A l'hora de comparar els models entre si, en dieta estàndard, es pot apreciar un comportament similar entre els models CPL KO i WT, ja que no s'observen alteracions en les diferents vies metabòliques. En canvi, si comparem els models CPL KO i PL KO, s'observa una disminució dels metabòlits involucrats en el metabolisme de la glucosa possiblement degut a una major activitat de la via glucolítica i de la via de la pentosa fosfat. Aquesta última podria indicar un augment de la proliferació cel·lular en el teixit hepàtic d'aquests animals [77]. Davant la capacitat de metabolitzar la glucosa i el increment dels metabòlits involucrats en la gluconeogènesi (aminoàcids i lactat) podria indicar la disminució d'aquesta via. No obstant, tot i haver una disminució de la proteòlisi, possiblement existeix una certa degradació per part dels aminoàcids per donar suport al cicle TCA, donant lloc a un increment del succinil-CoA.

En canvi, quan s'administra una dieta rica en greix, s'observa un canvi en el patró en la funcionalitat metabòlica. Destaca una alteració en la glucòlisi possiblement deguda a un augment de la resistència a la insulina [78], la qual podria explicar l'augment dels metabòlits de la glucosa-6-fosfat, fructosa-6-fosfat i fructosa-1,6-fosfat. Altrament, aquest increment de la resistència a la insulina donaria lloc a un augment de la gluconeogènesi per satisfer les necessitats energètiques. Per aquest motiu, s'observa un increment de la degradació d'aminoàcids cetogènics (isoleucina i leucina), donant lloc a un augment de cossos cetònics, com és el cas del β -hidroxibutirat [79].

Altrament, quan es comparen els models CPL KO i PL KO, no s'aprecien diferències significatives en les concentracions dels aminoàcids. Això podria ser degut a una similitud en l'expressió de la proteòlisi. A més, cal destacar el increment de la glutaminòlisi possiblement degut a dos factors. El primer, podria ser per la necessitat de proporcionar metabòlits al cicle TCA mitjançant la síntesi de α -cetoglutarat. En canvi, el segon factor podria ser degut a un increment de la síntesi de glutatió, principal antioxidant intracel·lular que participa en la eliminació del peròxid de hidrogen (H_2O_2) i de productes de la peroxidació lipídica per mantenir la homeòstasi redox [80].

Per tant, en els resultats d'aquest estudi, es pot observar que la quimiocina CCL2 a part de contribuir a una millora en l'esteatosi hepàtica, també sembla tenir un efecte modulador en el metabolisme energètic. Per tant, es requereixen més estudis per tal de poder corroborar els resultats obtinguts en l'anàlisi metabòlica.

Una de les principals limitacions d'aquest estudi és no haver determinat l'activitat enzimàtica dels diferents enzims involucrats en cada via metabòlica, així com no conèixer els tipus de macròfags (proinflamatoris i antiinflamatoris) presents en el teixit hepàtic.

7.CONCLUSIONS

Diversos factors, incloent l'excés d'energia, la inflamació i l'oxidació, són responsables de la deposició de greix al fetge i per tant de la NAFLD. Concretament, en la inflamació, destaca el paper de la CCL2, una quimiocina que regula la migració de les cèl·lules immunitàries.

En aquest estudi, s'ha evidenciat que la inhibició d'aquesta quimiocina dona lloc a una millora de l'esteatosi hepàtica i de l'activitat metabòlica. Per tant, es pot apreciar que la inhibició de CCL2 té un paper rellevant en la disminució de l'esteatosi hepàtica i en la regulació del metabolisme energètic. No obstant, sembla que el factor dietètic també tingui un paper clau en el desenvolupament de la NAFLD, ja que els efectes esmentats anteriorment només s'observen quan s'administra una dieta estàndard.

Per corroborar els resultats del present estudi, es requereixen estudis addicionals que ens permetin confirmar la relació entre la CCL2 i NAFLD i determinar les possibles vies a través de les quals actua aquesta quimiocina. Així com, realitzar la quantificació dels diferents enzims involucrats en el metabolisme energètic per obtenir més informació i entendre les diferents alteracions en el seu conjunt.

8.REFERÈNCIES

1. Hurt RT; Kulisek C, Buchanan LA, McClave SA. The obesity Epidemic: Challenges, Health Initiatives, and implications for gastroenterologists. *Gastroenterology & Hepatology*. 2010; 6 (12): 780-792.
2. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006 Dec 14; 444 (7121): 860-7.
3. Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec; 8 (12): 923-34.
4. Fon Tacer K, Rozman D. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Focus on Lipoprotein and Lipid Deregulation. *Journal of Lipids*. 2011;2011:783976.
5. Schleicher J, Tokarski C, Marbach E, Matz-Soja M, Zellmer S, Gebhardt R, et al. Zonation of hepatic fatty acid metabolism - The diversity of its regulation and the benefit of modeling. *Biochimica et biophysica acta*. 2015 May;1851(5):641-56.
6. Ahmed M. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015. *World Journal of Hepatology*. 2015;7 (11):1450-1459.
7. Camp J, Joven J. Chemokine ligand 2 and paroxonase-1 in non-alcoholic fatty liver disease: The search for alternative causative factors. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 14; 21 (10): 2875-82.
8. Puri, P and Sanyal AJ, Definiciones, factores de riesgo y pruebas diagnósticas en la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Clinical Liver Disease*. September 2013. 2 (34): S48S-S52S.
9. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence and Outcomes. *Hepatology*. 2015 Dec 28.
10. Hardy T, Oakley F, Anstee QM, Day CP. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annual review of pathology*. 2016 Mar 3.
11. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive diseases*. 2010;28(1):155-61.
12. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Nov; 10 (11): 686-90.
13. Gerhard GS, Benotti P, Wood GC, Chu X, Argyropoulos G, Petrick A, et al. Identification of novel clinical factors associated with hepatic fat accumulation in extreme obesity. *Journal of obesity*. 2014;2014:368210.

14. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013 Jun;10(6):330-44.
15. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*. 2010 Feb; 103 (2):71-83.
16. Machado MV, Diehl AM. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2016 Feb 26.
17. Povero D, Feldstein AE. Novel Molecular Mechanisms in the Development of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Diabetes & metabolism journal*. 2016 Feb; 40 (1):1-11. PubMed PMID: 26912150.
18. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology*. 2015 Mar; 148 (3): 547-55.
19. Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta*. 2010 Nov 11; 411 (21-22): 1570-9.
20. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998 Feb 12; 338 (7): 436-45
21. Raves DT, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995; 6 (2): 109-18. Review.
22. Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 May; 41(5):998-1001.
23. Kumar SN, Boss JM. Site A of the MCP-1 distal regulatory region functions as a transcriptional modulator through the transcription factor NF1. *Mol Immunol*. 2000 Aug; 37 (11): 623-32.
24. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*. 2007; 25:787-820.
25. Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002;42:469-99
26. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol*. 1998 Aug 1; 161 (3):1083-6
27. A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism. *Mediators Inflamm*. 2010; 2010. pii: 326580.

28. Camps J, Joven J. Chemokine ligand 2 and paraoxonase-1 in non-alcoholic fatty liver disease: The search for alternative causative factors. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 14; 21(10): 2875-82.
29. Videla LA. Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. *World Journal of Hepatology*. 2009; 1 (1): 72-78.
30. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2014; 20 (25): 8082-8091.
31. Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Paraoxonase 1: Implication in Arteriosclerosis Diseases. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012; 4 (11):523-532.
32. Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009; 46(2): 83-106.
33. Abelló D, Sancho E, Camps J, Joven J. Exploring the Role of Paraoxonases in the Pathogenesis of Coronary Artery Disease: A Systematic Review. Miller FJ, ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15 (11): 20997-21010.
34. Mackness,M.,Mackness, B., Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene*. 2015 August 1; 567 (1): 12-21.
35. Hernández-Aguilera A, Sepúlveda J, Rodríguez-Gallego E, Guirro M, García-Heredia A, Cabré N, Luciano-Mateo F, Fort-Gallifa I, Martín-Paredero V, Joven J, Camps J. Immunohistochemical Analysis of Paraoxonases and Chemokines in Arteries of Patients with Peripheral Artery Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16 (5):11323-11338.
36. Mata C, Lares M, Hernández P. Enzima Paraoxonasa 1 y modulación del estrés oxidativo. *Síndrome Cardiometabólico* 3.1 (2013): 6-10.
37. García-Heredia A, Marsillach J, Rull A, et al. Paraoxonase-1 Inhibits Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Metabolic Alterations and Apoptosis in Endothelial Cells: A Nondirected Metabolomic Study. *Mediators of Inflammation*. 2013; 2013:156053.
38. Aneta Otocka-Kmiecik, Monika Orłowska-Majdak. The role of genetic (PON1 polymorphism) and environmental factors, especially physical activity, in antioxidant function of paraoxonase. *Postepy Hig Med Dosw* 2009 December 30; 63: 668–677.
39. Oliveira CP, Coelho AM, Barbeiro HV, Lima VM, Soriano F, Ribeiro C, Molan NA, Alves VA, Souza HP, Machado MC, Carrilho FJ. Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res*. 2006 February; 39(2): 189–194.

40. Sumida Y, Niki E, Naito Y, Oshikawa T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free Radic Res.* 2013 November; 47(11): 869–880.
40. Camps J, Marsillach J, Rull A, Alonso-Villaverde C, Joven J. Interrelationships between paraoxonase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in the regulation of hepatic inflammation. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 660: 5–18.
41. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Jama.* 2015 Jun 9;313(22):2263-73.
42. Haas JT, Francque S, Staels B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annual review of physiology.* 2016 Feb 10;78:181-205.
43. Machado MV, Diehl AM. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2016 Feb 26. Pii: S0016-5085(16)00257-2.
44. Schelicher J, Tokarski C, MArbach E, Matz-Soja M, Zellmer S, Gebhardt R, Schuser S. Zonation of hepatic fatty acid metabolism - The diversity of its regulation and the benefit of modeling. *Biochim Biophys Acta.* 2015 March; 1851 (5): 641-56.
45. Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med.* 2016 Mar 11; 48: e218.
46. Liangyou Rui. Energy Metabolism in the Liver. *Compr Physiol.* 2014 January; 4 (1): 177-197.
47. Lehner R, Cui Z, Vance DE. Subcellular localization, developmental expression and characterization of a liver triacylglycerol hydrolase. *Biochemical Journal.* 1999; 338 (Pt 3): 761-768.
48. V.W. Dolinsky, D. Gilham, M. Alam, D.E. Vance, R. Lehner. Triacylglycerol hydrolase: role in intracellular lipid metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 2004 July; 61(13): 1633–1651.
49. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005 May; 115 (5): 1111-9.
50. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006 Dec. 14; 444 (7121): 860-7.
51. Sorriento D, Pascale AV, Finelli R, Carillo AL, Annunziata R, Trimarco B, Iaccarino G. Targeting mitochondria as therapeutic strategy for metabolic disorders. *ScientificWorldJournal.* 2014 Mar 13; 2014: 604685.
52. Satapati S, Sunny NE, Kucejova B, Fu X, He TT, Méndez-Lucas A, Shelton JM, Perales JC, Browning JD, Burgess SC. Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver. *J Lipid Res.* 2012; 53 (6): 1080-92.
53. Brunengraber H, Roe CR. Anaplerotic molecules: current and future. *J Inherit Metab Dis.* 2006 Apr-Jun; 29 (2-3): 327-31.
54. Sorriento D, Pascale AV, Finelli R, et al. Targeting Mitochondria as Therapeutic Strategy for Metabolic Disorders. *The Scientific World Journal.* 2014; 2014: 604685.

55. Camps J, García- Heredia A, Hernández-Aguilera A, Joven J. Paraoxonases, mitochondrial dysfunction and non-communicable disease. *Chem Biol Interact.* 2016 Apr 7: S0009-2797 (16) 30119-3.
56. Nemutlu E, Zhang S, Juranic NO, Terzic A, Macura S, Dzeja P. ¹⁸O-assisted dynamic metabolomics for individualized diagnostics and treatment of human diseases. *Croatian Medical Journal.* 2012;53(6): 529-534.
57. Neumann S, Böcker S. Computational mass spectrometry for metabolomics: identification of metabolites and small molecules. *Anal Bioanal Chem.* 2010 December; 398(7-8): 2779–2788.
58. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, et al. Plasma Metabolomic Profile in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism: clinical and experimental.* 2011; 60 (3): 404-413.
59. Ross, Michael H. *Histologia: texto y atlas color con biología celular y molecular.* 6a ed. Buenos aires: Médica Panamericana, cop 2012.
60. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American journal of gastroenterology.* 1999 Sep; 94 (9): 2467-74.
61. Riera-Borull M, Rodríguez-Gallego E, Hernández-Aguilera A, Luciano F, Ras R, Cuyàs E, Camps J, Segura-Carretero A, Menendez JA, Joven J, Fernández-Arroyo S. Exploring the process of energy generation in pathophysiology by targeted metabolomics: Performance of a simple and quantitative method. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2016 Jan; 27 (1): 168-77
62. Shin S-Y, Fauman EB, Petersen A-K, et al. An atlas of genetic influences on human blood metabolites. *Nature genetics.* 2014; 46 (6): 543-550.
63. Jolliffe IT, Cadima J. Principal componenty analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2016 Apr 13; 374 (2065): 20150202.
64. Silva TS, Richard N. Visualization and Differential Analysis of Protein Expression Data Using R Methods *Mol Biol.* 2016;1362:105-18.
65. OMS. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2014. Suiza: Oleg Chestnov; 2014. [fecha consulta mayo 2016]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149296/1/WHO_NMH_NVI_15.1_spa.pdf?ua=1&ua=1
66. Rodríguez-Gallego E, Riera-Borrull M, Hernández-Aguilera A, Mariné-Casadó R, Rull A, Beltrán-Debón R, Luciano-Mateo F, Menendez JA, Vazquez-Martin A, Sirvent JJ, Martín-Paredero V, Corbí AL, Sierra-Filardi E, Aragonès G, García-Heredia A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. Ubiquitous transgenic overexpression of C-C chemokine ligand 2: a model to assess the combined effect of high energy intake and continuous low-grade inflammation. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:953841

67. Rull A, Rodríguez F, Aragonès G, Marsillach J, Beltrán R, Alonso-Villaverde C, Camps J, Joven J. Hepatic monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated by dietary cholesterol and contributes to liver steatosis. *Cytokine*. 2009 Dec;48 (3):273-9.
68. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, Huss S, Klussmann S, Eulberg D, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut*. 2012 Mar; 61(3):416-26.
69. Obstfeld AE, Sugaru E, Thearle M, Francisco AM, Gayet C, Ginsberg HN, Ables EV, Ferrante AW Jr. C-C chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis. *Diabetes*. 2010 Apr; 59(4):916-25.
70. Hackel D, Pflücke D, Neumann A, Viebahn J, Mousa S, Wischmeyer E, Roewer N, Brack A, Rittner HL. The connection of monocytes and reactive oxygen species in pain. *PLoS One*. 2013 May 2;8(5): e63564.
71. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, Huss S, Klussmann S, Eulberg D, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut*. 2012 Mar; 61(3): 416-26.
72. Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism. *Mediators Inflamm*. 2010; 2010. pii: 326580.
73. Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab*. 2012 Apr 4;15(4):432-7. doi: 10.1016/j.cmet.2011.11.013.
74. Grant CM. Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *J Biol*. 2008; 7(1):1.
75. Lin R, Elf S, Shan C, Kang HB, Ji Q, Zhou L, Hitosugi T, Zhang L, Zhang S, Seo JH, Xie J, Tucker M, Gu TL, Sudderth J, Jiang L, Mitsche M, DeBerardinis RJ, Wu S, Li Y, Mao H, Chen PR, Wang D, Chen GZ, Hurwitz SJ, Lonial S, Arellano ML, Khoury HJ, Khuri FR, Lee BH, Lei Q, Brat DJ, Ye K, Boggon TJ, He C, Kang S, Fan J, Chen J. 6 Phosphogluconate dehydrogenase links oxidative PPP, lipogenesis and tumour growth by inhibiting LKB1-AMPK signalling. *Nat Cell Biol*. 2015 Nov; 17(11): 1484-96.
76. An J, Muoio DM, Shiota M, Fujimoto Y, Cline GW, Shulman GI, Koves TR, Stevens R, Millington D, Newgard CB. Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med*. 2004 Mar; 10(3):268-74.
77. Yu HP, Xie JM, Li B, Sun YH, Gao QG, Ding ZH, Wu HR, Qin ZH. TIGAR regulates DNA damage and repair through pentosephosphate pathway and Cdk5-ATM pathway. *Sci Rep*. 2015 Apr 30; 5: 9853. doi: 10.1038/srep09853.

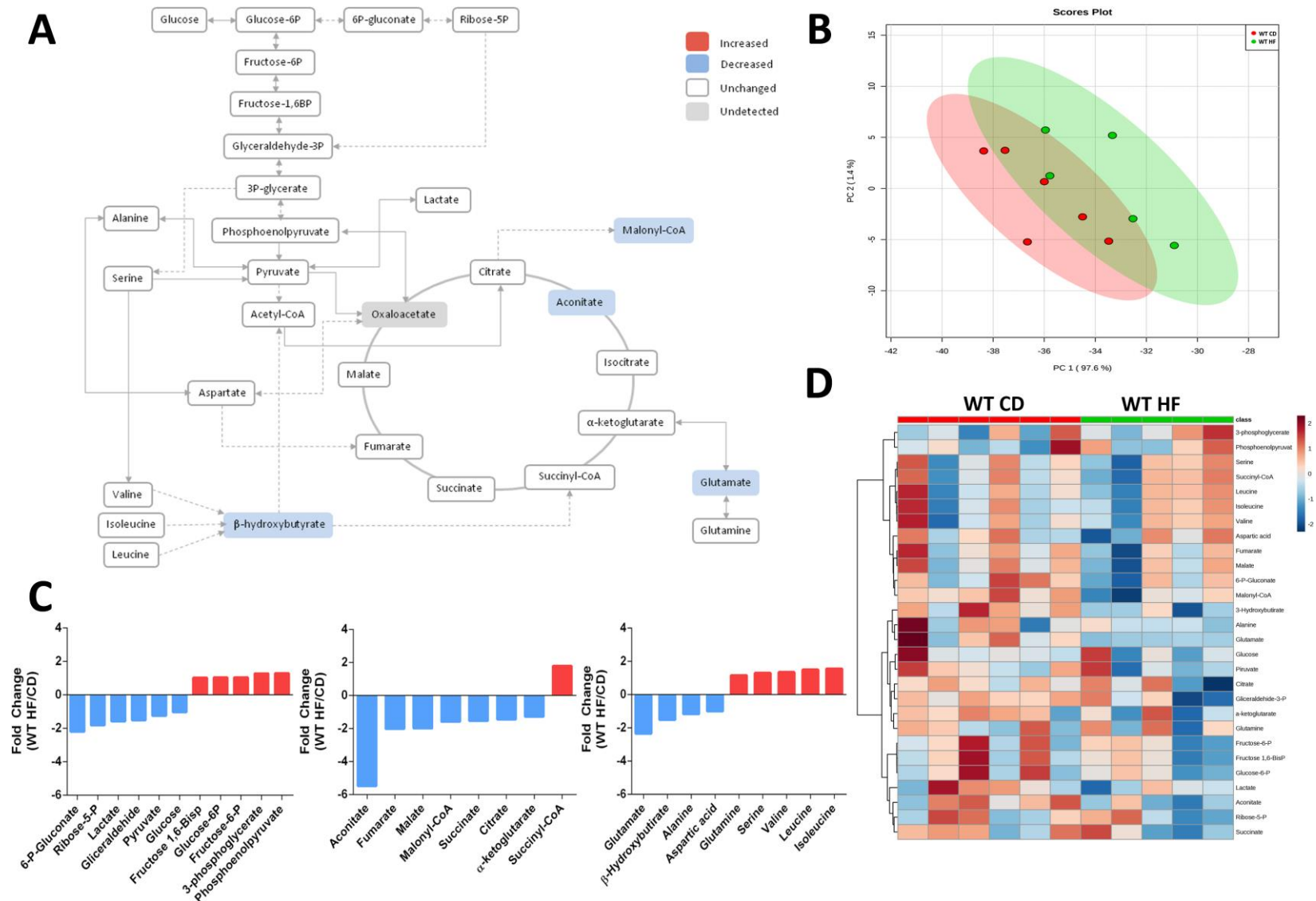
78. Guo X, Li H, Xu H, Woo S, Dong H, Lu F, J. Lange A, Wu Chaodong. Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2012 June 8; 2 (4): 358-367.
79. Cotter DG, Schugar RC, Crawford PA. Ketone body metabolism and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013 Apr 15; 304 (8): H1060-76. doi: 10.1152/ajpheart.00646.2012. Epub 2013 Feb 8.
80. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I, Asenjo M, Márquez J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002 May; 34(5):439-58.

ANNEXOS

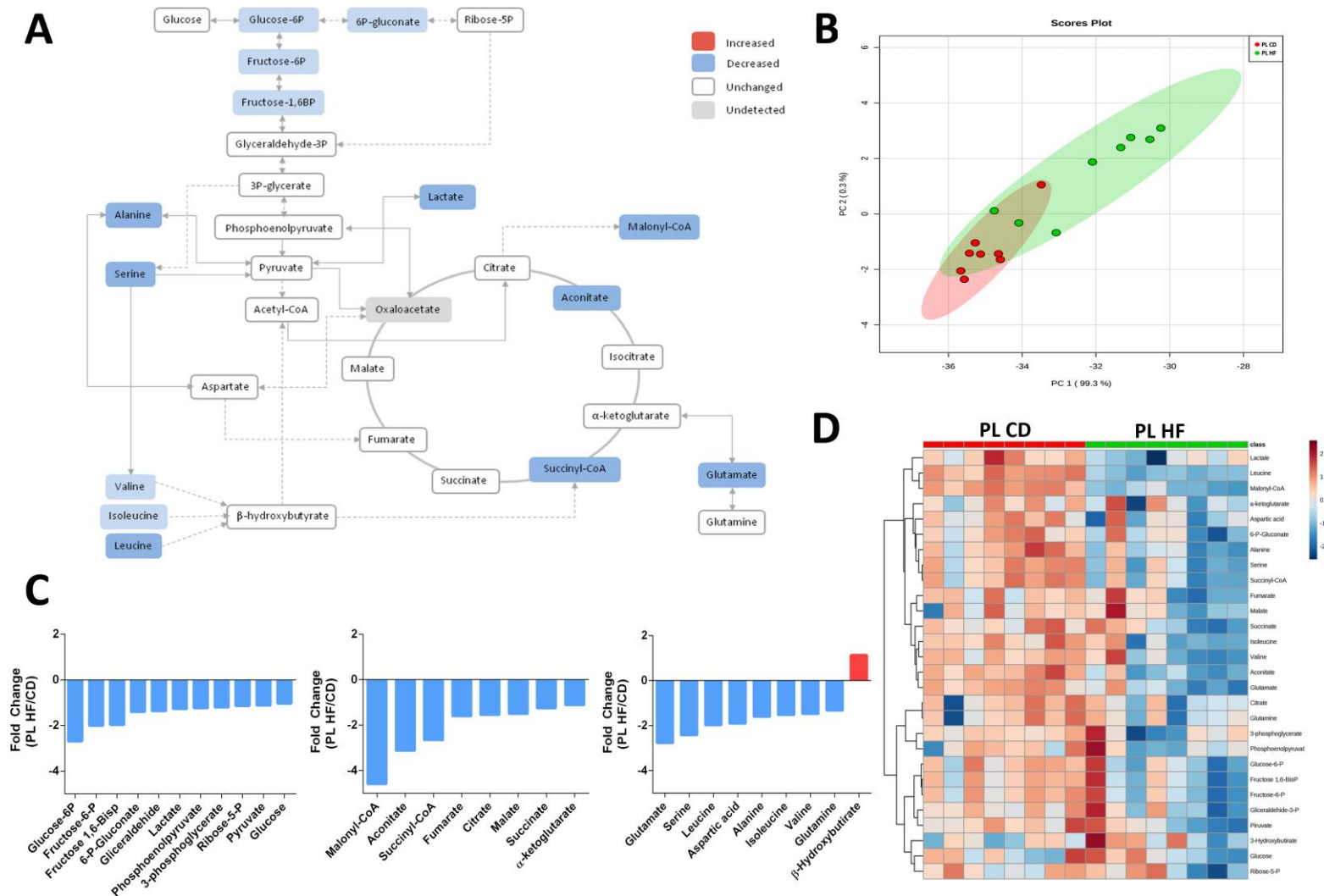
TAULA A1. Concentració dels metabòlits identificats en teixit hepàtic ($\mu\text{M}/100\text{ mg}$) de ratolins *Wild type mice* (WT), doble *knockout* de PON1/LDLr (PL KO), triple *knockout* de CCL2/PON1/LDLr (CPL KO) alimentats amb dieta estàndard (CD) i dieta rica en greix (HF) durant 14 setmanes.

Metabolite	Chow diet (CD)			High fat diet (HF)		
	Wild type	PL KO	CPL KO	Wild type	PL KO	CPL KO
β -Hydroxybutyrate	14.6 (11.5 - 15.9)	9.0 (6.8 - 10.6) ^A	13.2 (9.5 - 25.3)	9.7 (8.1 - 11.2) ^B	10.2 (7.7 - 13.4)	14.9 (13.1 - 17.2) ^{d, f}
3-phosphoglycerate	20.5 (10.7 - 56.9)	23.2 (21.4 - 24.4)	27.2 (18.8 - 33.6)	26.3 (19.5 - 82.2)	19.3 (9.3 - 22.9)	10.9 (6.1 - 16.8) ^{d, i}
6 phosphogluconate	40.0 (20.2 - 75.0)	8.5 (7.6 - 11.1) ^A	33.9 (18.2 - 51.4) ^E	18.2 (8.9 - 43.2)	6.0 (4.4 - 7.8) ^{b, h}	7.8 (5.4 - 21.8)
Aconitate	267.4 (88.1 - 454.0)	275.0 (238.6 - 328.9)	272.3 (210.5 - 385.6)	48.8 (27.9 - 117.2) ^B	88.1 (72.1 - 130.7) ^H	279.4 (229.4 - 313.1) ^{D, F}
α -ketoglutarate	0.6 (0.6 - 0.7)	0.6 (0.5 - 0.6)	0.5 (0.4 - 0.6)	0.5 (0.4 - 0.7)	0.5 (0.4 - 0.6)	0.4 (0.3 - 0.4) ⁱ
Alanine	1028.2 (782.3 - 1.234.9)	905.4 (840.5 - 1094.1)	908.0 (742.8 - 1110.2)	879.6 (833.5 - 935.8)	564.1 (470.9 - 707.8) ^{B, H}	709.2 (610.4 - 1344.4)
Aspartate	298.0 (196.7 - 812.0)	310.4 (203.3 - 446.7)	254.3 (161.9 - 493.0)	296.3 (95.6 - 765.1)	163.1 (76.1 - 223.8)	290.2 (252.1 - 309.3) ^f
Citrate-Isocitrate	1.1 (0.8 - 1.7)	3.6 (2.8 - 4.7) ^A	1.5 (0.9 - 2.3) ^e	0.8 (0.2 - 2.7)	2.3 (1.7 - 3.4)	0.7 (0.2 - 2.6) ^F
Fructose 1,6-Bisphosphate	12.2 (8.0 - 42.7)	42.1 (30.8 - 45.7)	14.1 (12.0 - 18.8) ^E	12.6 (3.9 - 15.7)	21.3 (14.5 - 35.6) ^{b, h}	42.6 (36.9 - 55.1) ^{D, f, i}
Fructose-6-Phosphate	4.3 (2.3 - 17.2)	13.9 (10.4 - 17.2)	5.4 (4.1 - 6.0) ^E	4.5 (1.2 - 6.1)	6.9 (4.7 - 11.7) ^h	17.7 (13.3 - 25.2) ^{D, F, i}
Fumarate	7.4 (4.3 - 12.4)	5.8 (4.2 - 6.0)	6.2 (3.9 - 9.7)	3.7 (2.1 - 7.7)	3.6 (2.3 - 5.2)	4.0 (3.6 - 6.6)
Glyceraldehyde 3-phosphate	5.4 (5.03 - 7.2)	4.8 (4.4 - 5.8)	6.1 (4.6 - 11.1)	3.6 (1.2 - 7.1)	3.4 (2.9 - 5.8)	3.4 (2.9 - 5.6)
Glucose	9158.8 (8.836.1 - 1.1074.4)	9669.8 (8.642.9 - 1.0489.2)	9181.5 (8846.2 - 9819.3)	8994.2 (6739.4 - 11787.4)	9333.5 (8156.1 - 10926.9)	8353.6 (7378.7 - 8885.7) ⁱ
Glucose 6-Phosphate	35.2 (17.4 - 303.9)	207.0 (145.6 - 266.4)	39.5 (30.6 - 54.6) ^E	36.6 (9.2 - 54.2)	76.8 (49.3 - 162.8) ^{b, h}	361.1 (269.1 - 483.7) ^{D, F, i}
Glutamate	229.2 (130.1 - 646.2)	132.2 (95.79 - 145.44)	158.5 (136.5 - 202.5)	97.7 (90.2 - 101.7) ^B	47.6 (29.6 - 69.9) ^{b, H}	111.6 (78.2 - 175.8) ^f
Glutamine	1.6 (0.9 - 2.7)	3.3 (3.6 - 4.4)	1.7 (0.9 - 2.2) ^e	1.8 (0.7 - 3.0)	2.5 (1.7 - 3.2)	0.7 (0.4 - 2.6) ^F
Isoleucine	52.8 (36.4 - 141.7)	32.7 (30.9 - 38.1)	50.4 (36.2 - 102.4)	81.8 (34.9 - 104.9)	21.4 (20.4 - 31.04) ^{B, h}	25.9 (19.9 - 36.4) ^{d, i}
Lactate	8984.4 (4706.0 - 1.3740.7)	11466.3 (11005.2 - 13532.1)	16145.6 (15849.1 - 18423.3) ^e	5683.0 (3594.9 - 7636.7)	9048.1 (7809.3 - 1.0465.9) ^{B, H}	11446.1 (8153.4 - 12239.3) ^{d, i}
Leucine	504.5 (327.2 - 1060.2)	277.9 (243.9 - 295.9) ^a	517.6 (403.3 - 686.2) ^E	754.7 (248.7 - 892.9)	140.7 (133.3 - 142.9) ^H	200.5 (140.7 - 264.7) ^{d, i}
Malate	251.7 (138.4 - 579.6)	138.3 (98.4 - 173.1)	247.5 (129.7 - 335.3)	126.8 (49.3 - 337.6)	92.7 (58.8 - 129.1)	110.9 (93.3 - 215.4)
Malonyl-CoA	9.6 (7.5 - 14.5)	4.7 (3.8 - 5.5) ^A	6.8 (5.5 - 11.9) ^e	6.1 (1.9 - 7.9) ^B	1.1 (0.9 - 1.4) ^{B, H}	1.8 (0.7 - 3.0) ^{i, F}
Phosphoenolpyruvate	70.2 (53.2 - 106.3)	86.4 (67.6 - 95.6)	86.6 (86.5 - 89.9)	90.5 (57.9 - 119.6)	69.5 (53.1 - 81.2)	57.4 (43.6 - 72.5) ⁱ
Pyruvate	17.9 (14.8 - 21.6)	16.8 (16.1 - 18.2)	16.7 (14.9 - 23.2)	14.4 (11.6 - 20.7)	14.9 (12.7 - 16.8)	12.8 (11.6 - 15.4)
Ribose-5-phosphate	16.9 (6.5 - 101.4)	81.2 (69.9 - 97.6)	14.9 (9.8 - 44.7) ^E	9.3 (2.8 - 69.8)	71.1 (51.2 - 97.7)	42.7 (14.2 - 59.9) ^f
Serine	1211.6 (636.2 - 3003.1)	392.46 (305.43 - 446.38) ^a	897.8 (876.0 - 954.4) ^E	1570.68 (363.06 - 2249.90)	162.25 (136.90 - 302.90) ^{B, H}	350.1 (178.8 - 597.1) ⁱ
Succinate	72.7 (48.9 - 79.0)	76.1 (70.6 - 93.5)	73.9 (48.5 - 170.3)	47.4 (39.1 - 77.3)	60.8 (47.1 - 83.6)	64.9 (58.8 - 73.3)
Succinyl-CoA	152.8 (77.8 - 535.7)	37.8 (29.2 - 44.1) ^a	121.9 (118.8 - 128.3) ^E	273.2 (32.4 - 411.1)	14.2 (13.2 - 27.1) ^{B, H}	32.8 (16.7 - 78.2) ⁱ
Valine	256.7 (154.4 - 548.7)	141.9 (130.9 - 147.6) ^a	283.8 (189.0 - 359.4) ^E	345.8 (157.5 - 422.3)	96.1 (85.4 - 126.4) ^{B, h}	122.9 (99.6 - 159.1) ⁱ

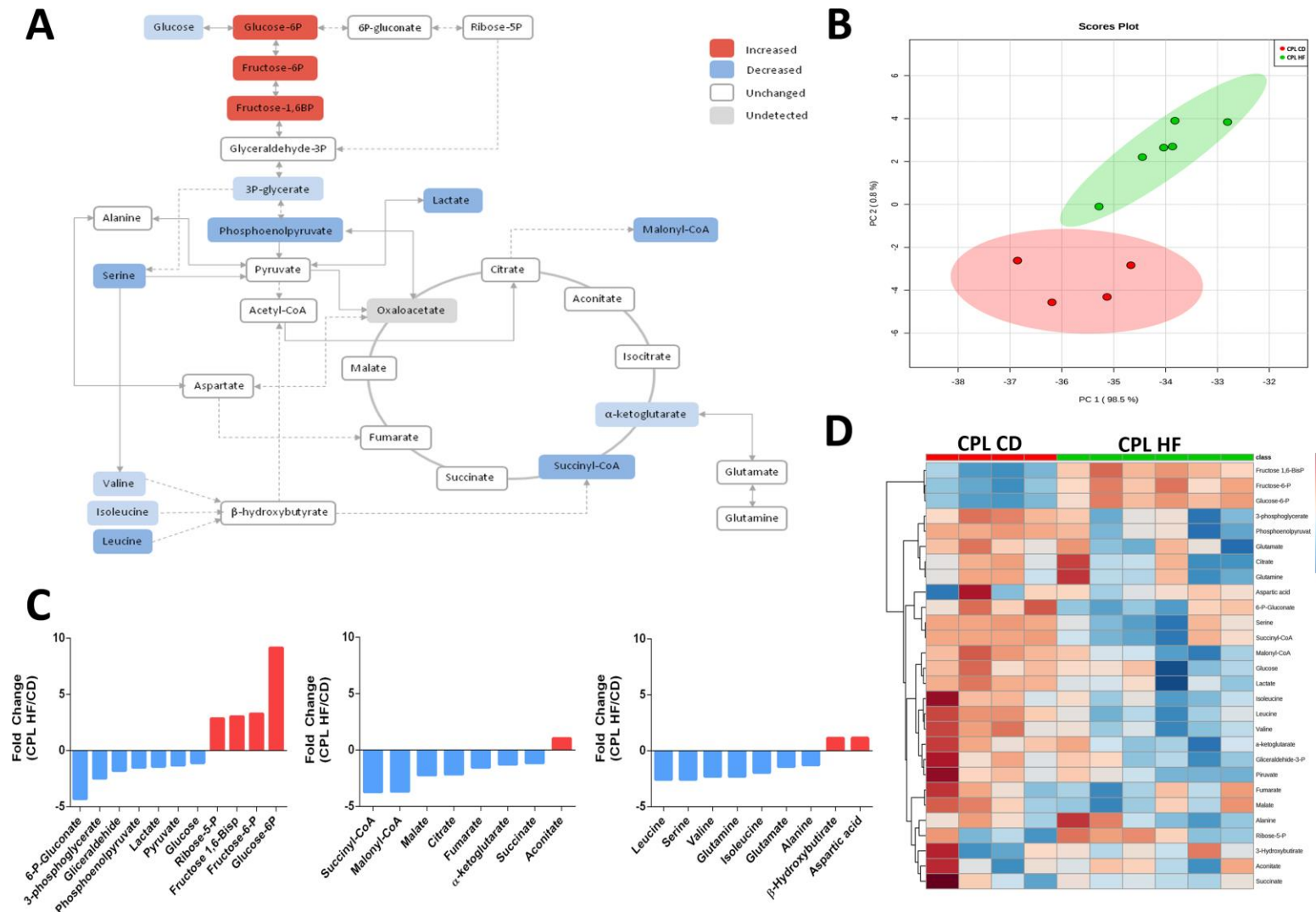
Les dades estan expressades en mediana $\pm$ rang interquartílic. Les diferents comparacions realitzades estan representades amb les lletres següents: ^{a/A} PL KO vs WT (CD) ^{b/B} PL KO vs WT (HF), ^{c/C} CPL KO vs WT (CD), ^{d/D} CPL KO vs WT (HF), ^{e/E} CPL vs PL (CD), ^{f/F} CPL vs PL (HF), ^{g/G} WT (HF) vs WT (CD), ^{h/H} PL KO (HF) vs PL KO (CD), ^{i/I} CPL KO (HF) vs CPL KO (CD). Les lletres minúscules representen els resultats del test de U-ManWhitney amb $p < 0.05$. Les lletres majúscules representen $p < 0.01$.



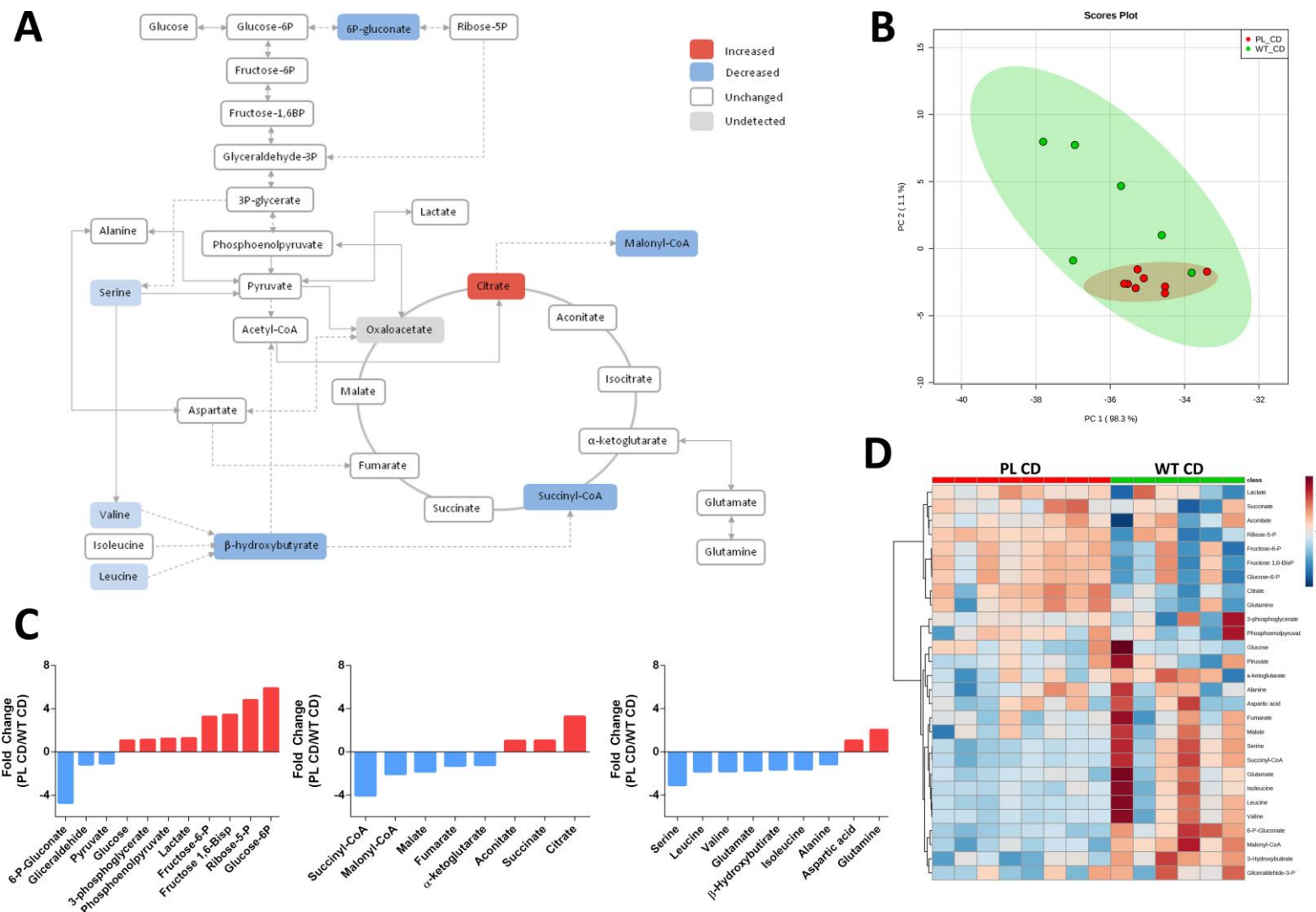
Annex 1. (A) Esquema del metabolisme energètic. Els metabòlits estan representats gràficament comparant *Chow Diet* (CD) vs *High Fat Diet* (HF) en *Wild Type* (WT): increment (roig), disminució (blau), no variació (blanc), no detectat (gris). La intensitat de colors varia segons: p-valor <0,01 (més intensitat) i p-valor entre 0,05 i 0,02 (menys intensitat). **(B)** L'Anàlisi de Component Principal (PCA) és una representació gràfica que permet observar les diferències entre el grup control i el grup d'intervenció. **(C)** *Fold-change* dels diferents metabòlits de les diferents vies metabòliques: glicòlisis, cicle de l'àcid cítric i metabolisme dels aminoàcids. **(D)** Visualització del *heatmap* i l'anàlisi d'agrupament jeràrquic d'acord amb les dades obtingudes del MetaboAnalyst. Files: metabòlits; columnes: identificació del ratolí; els colors indiquen: blau (disminució), roig (increment).



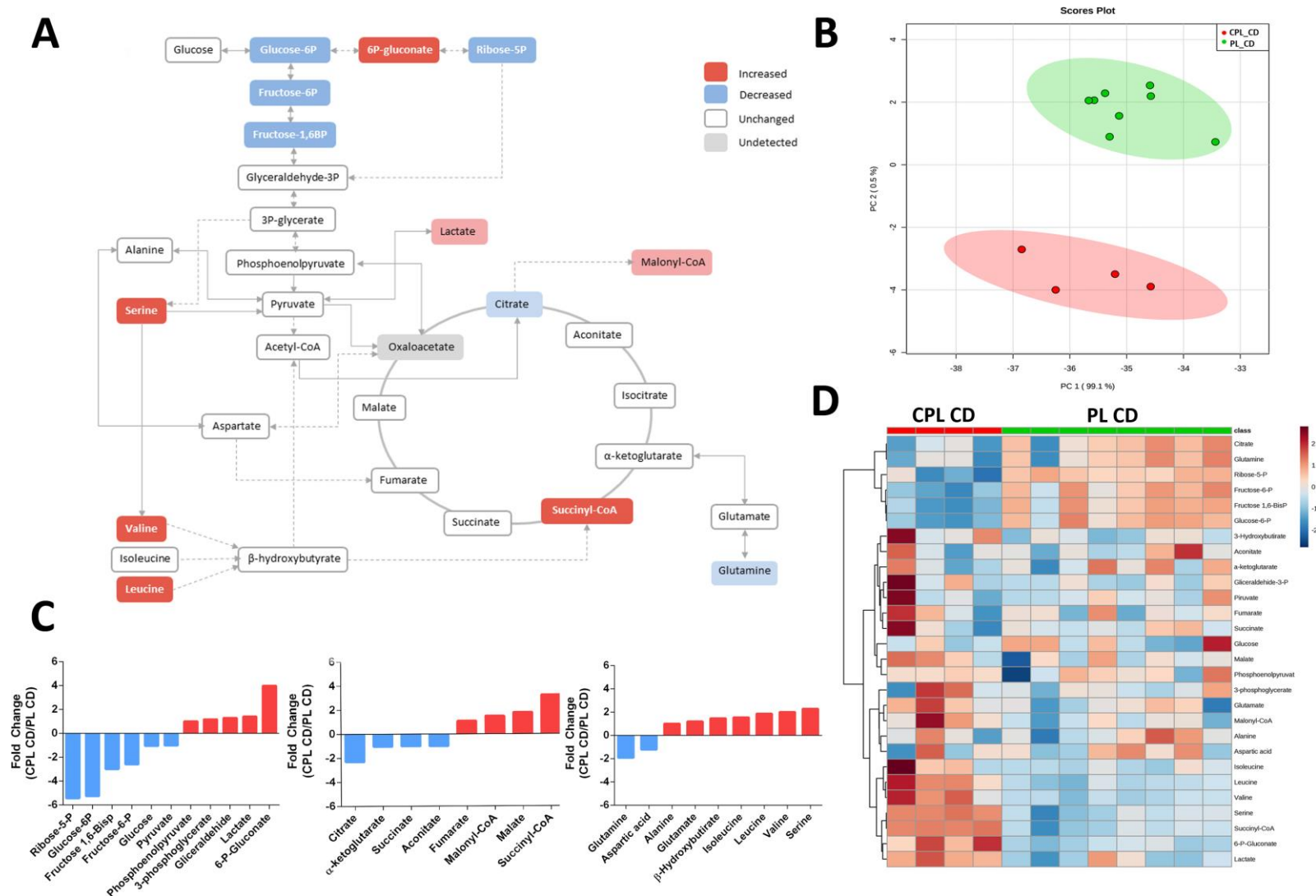
Annex 2. (A) Esquema del metabolisme energètic. Els metabòlits estan representats gràficament comparant *Chow Diet* (CD) vs *High Fat Diet* (HF) en PON1/LDLr (PL): increment (roig), disminució (blau), no variació (blanc), no detectat (gris). La intensitat de colors varia segons: p-valor <0,01 (més intensitat) i p-valor entre 0,05 i 0,02 (menys intensitat). **(B)** L'Anàlisi de Component Principal (PCA) és una representació gràfica que permet observar les diferències entre el grup control i el grup d'intervenció. **(C)** *Fold-change* dels diferents metabòlits de les diferents vies metabòliques: glicòlisi, cicle de l'àcid cítric i metabolisme dels aminoàcids. **(D)** Visualització del *heatmap* i l'anàlisi d'agrupament jeràrquic d'acord amb les dades obtingudes del MetaboAnalyst. Files: metabòlits; columnes: identificació del ratolí; els colors indiquen: blau (disminució), roig (increment).



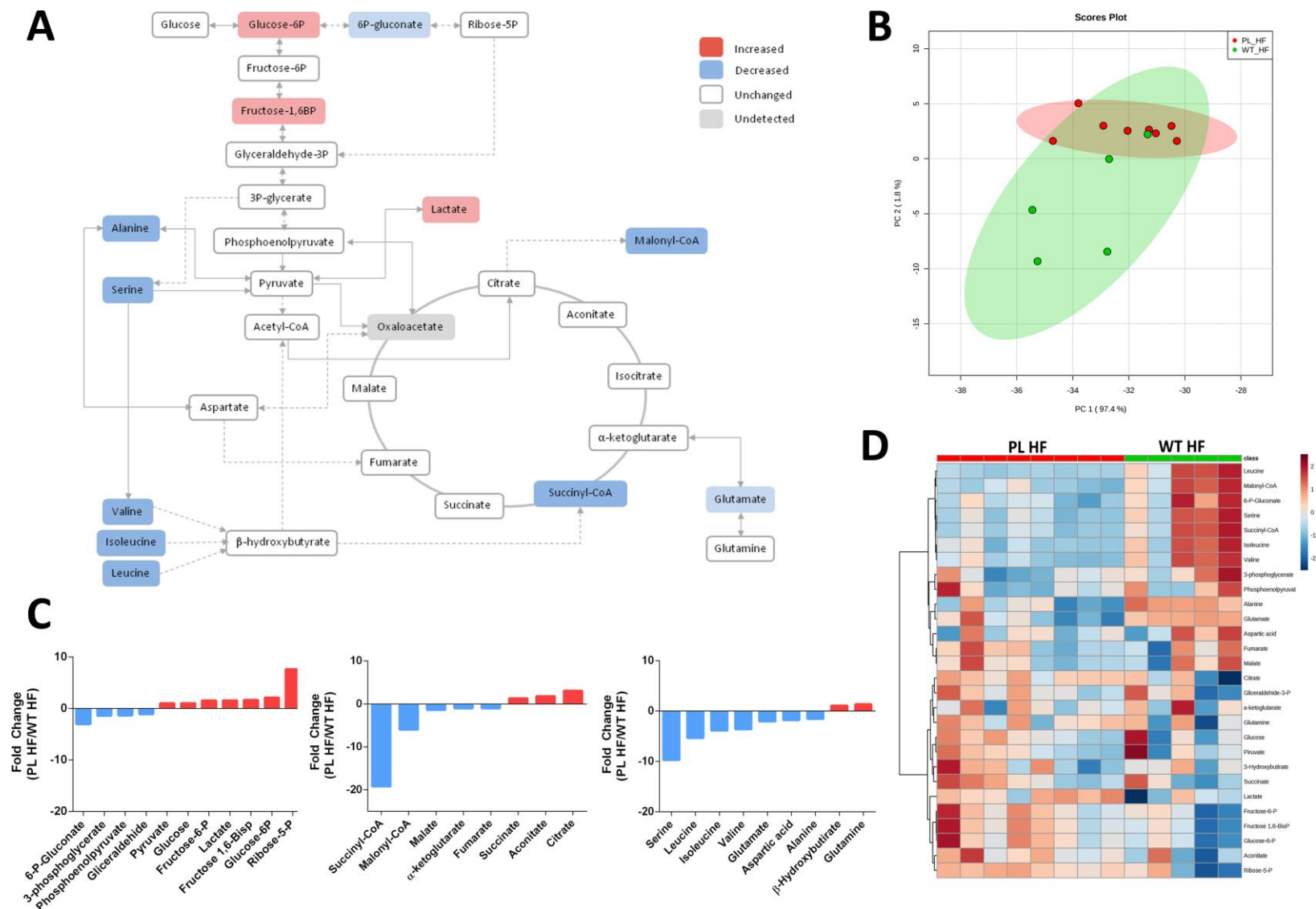
Annex 3. (A) Esquema del metabolisme energètic. Els metabòlits estan representats gràficament comparant *Chow Diet* (CD) vs *High Fat Diet* (HF) en CCL2/PON1/LDLr KO (CPL): increment (roig), disminució (blau), no variació (blanc), no detectat (gris). La intensitat de colors varia segons: p-valor <0,01 (més intensitat) i p-valor entre 0,05 i 0,02 (menys intensitat). **(B)** L'Anàlisi de Component Principal (PCA) és una representació gràfica que permet observar les diferències entre el grup control i el grup d'intervenció. **(C)** *Fold-change* dels diferents metabòlits de les diferents vies metabòliques: glicòlisis, cicle de l'àcid cítric i metabolisme dels aminoàcids. **(D)** Visualització del *heatmap* i l'anàlisi d'agrupament jeràrquic d'acord amb les dades obtingudes del MetaboAnalyst. Files: metabòlits; columnes: identificació del ratolí; els colors indiquen: blau (disminució), roig (increment).



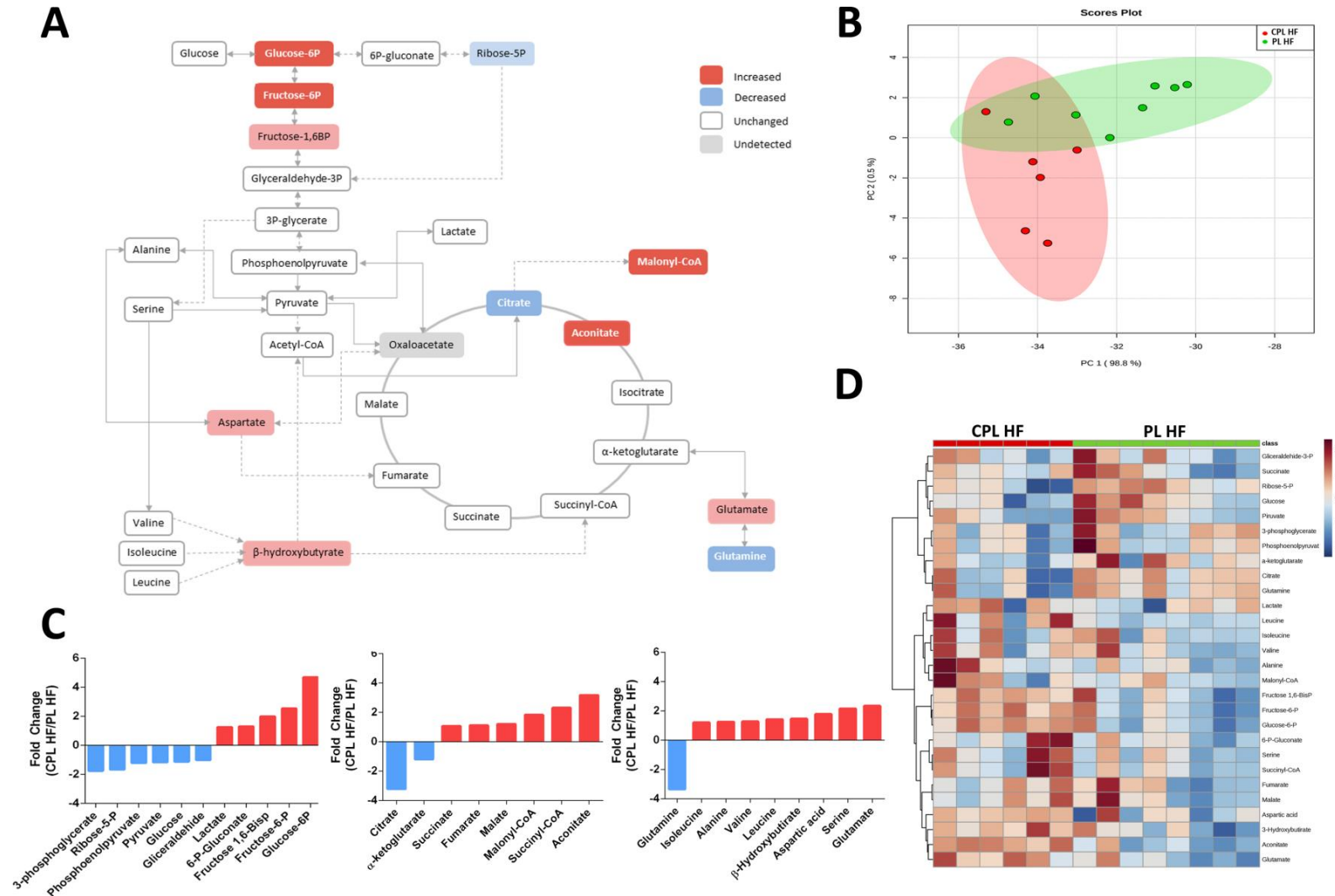
Annex 4. (A) Esquema del metabolisme energètic. Els metabòlits estan representats gràficament comparant PON1/LDLr (PL) vs *Wild Type* (WT) en dieta estàndard: increment (roig), disminució (blau), no variació (blanc), no detectat (gris). La intensitat de colors varia segons: p-valor <0,01 (més intensitat) i p-valor entre 0,05 i 0,02 (menys intensitat). **(B)** L'Anàlisi de Component Principal (PCA) és una representació gràfica que permet observar les diferències entre el grup control i el grup d'intervenció. **(C)** *Fold-change* dels diferents metabòlits de les diferents vies metabòliques: glicòlisis, cicle de l'àcid cítric i metabolisme dels aminoàcids. **(D)** Visualització del *heatmap* i l'anàlisi d'agrupament jeràrquic d'acord amb les dades obtingudes del MetaboAnalyst. Files: metabòlits; columnes: identificació del ratolí; els colors indiquen: blau (disminució), roig (increment).



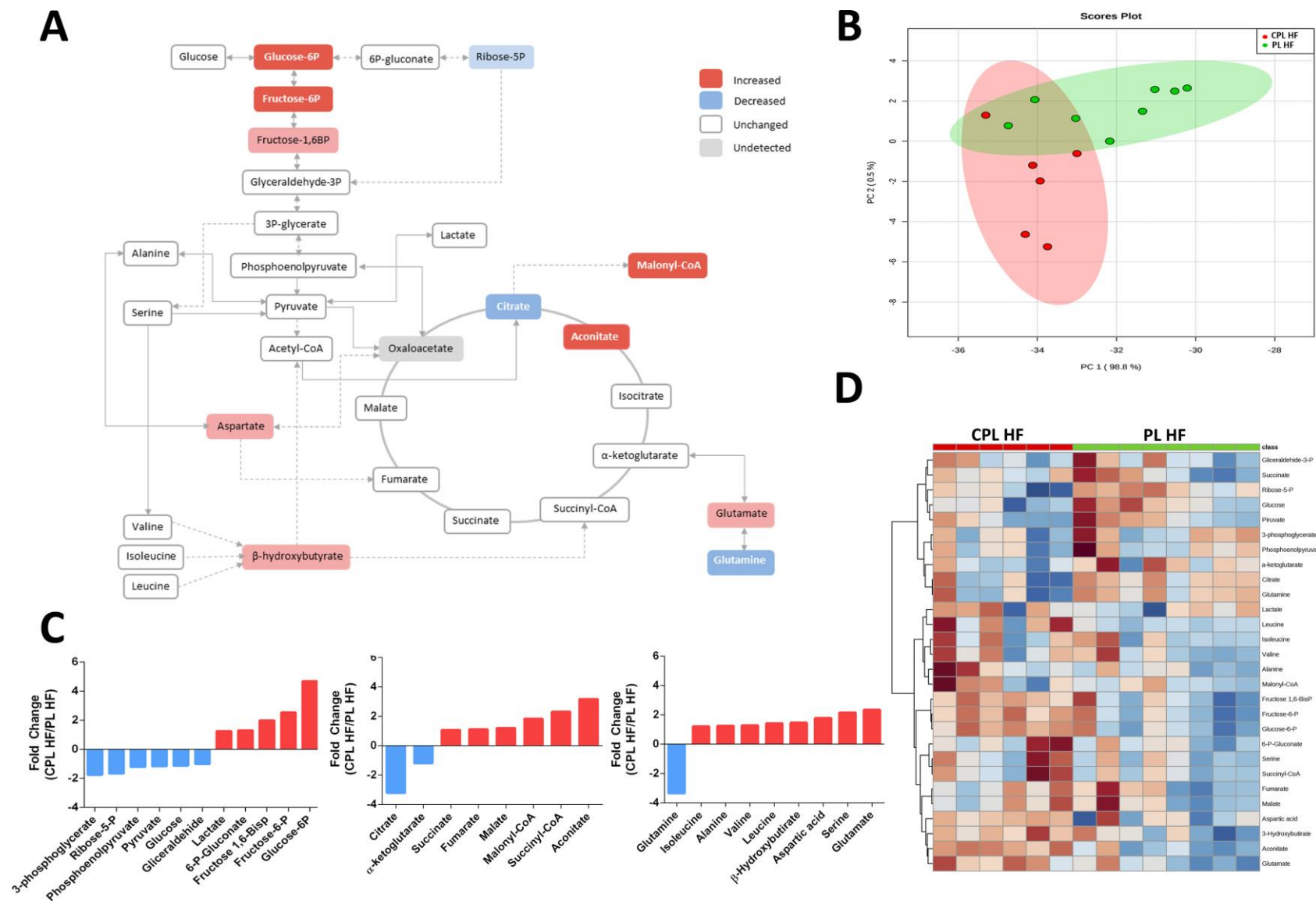
Annex 5. (A) Esquema del metabolisme energètic. Els metabòlits estan representats gràficament comparant CCL2/PON1/LDLr KO (CPL) vs PON1/LDLr KO (PL) en dieta estàndard: increment (roig), disminució (blau), no variació (blanc), no detectat (gris). La intensitat de colors varia segons: p-valor <0,01 (més intensitat) i p-valor entre 0,05 i 0,02 (menys intensitat). **(B)** L'Anàlisi de Component Principal (PCA) és una representació gràfica que permet observar les diferències entre el grup control i el grup d'intervenció. **(C)** *Fold-change* dels diferents metabòlits de les diferents vies metabòliques: glicòlisis, cicle de l'àcid cítric i metabolisme dels aminoàcids. **(D)** Visualització del *heatmap* i l'anàlisi d'agrupament jeràrquic d'acord amb les dades obtingudes del MetaboAnalyst. Files: metabòlits; columnes: identificació del ratolí; els colors indiquen: blau (disminució), roig (increment).



Annex 6. (A) Esquema del metabolisme energètic. Els metabòlits estan representats gràficament comparant PON1/LDLr KO (PL) vs *Wild Type* (WT), en dieta rica en greix: increment (roig), disminució (blau), no variació (blanc), no detectat (gris). La intensitat de colors varia segons: p-valor <0,01 (més intensitat) i p-valor entre 0,05 i 0,02 (menys intensitat). **(B)** L'Anàlisi de Component Principal (PCA) és una representació gràfica que permet observar les diferències entre el grup control i el grup d'intervenció. **(C)** *Fold-change* dels diferents metabòlits de les diferents vies metabòliques: glicòlisis, cicle de l'àcid cítric i metabolisme dels aminoàcids. **(D)** Visualització del *heatmap* i l'anàlisi d'agrupament jeràrquic d'acord amb les dades obtingudes del MetaboAnalyst. Files: metabòlits; columnes: identificació del ratolí; els colors indiquen: blau (disminució), roig (increment).



Annex 7. (A) Esquema del metabolisme energètic. Els metabòlits estan representats gràficament comparant CCL2/PON1/LDLr KO (CPL) vs *Wild Type* (WT), en dieta rica en greix: increment (roig), disminució (blau), no variació (blanc), no detectat (gris). La intensitat de colors varia segons: p-valor <0,01 (més intensitat) i p-valor entre 0,05 i 0,02 (menys intensitat). **(B)** L'Anàlisi de Component Principal (PCA) és una representació gràfica que permet observar les diferències entre el grup control i el grup d'intervenció. **(C)** *Fold-change* dels diferents metabòlits de les diferents vies metabòliques: glicòlisis, cicle de l'àcid cítric i metabolisme dels aminoàcids. **(D)** Visualització del *heatmap* i l'anàlisi d'agrupament jeràrquic d'acord amb les dades obtingudes del MetaboAnalyst. Files: metabòlits; columnes: identificació del ratolí; els colors indiquen: blau (disminució), roig (increment).



Annex 8. (A) Esquema del metabolisme energètic. Els metabòlits estan representats gràficament comparant CCL2/PON1/LDLr KO (CPL) vs PON1/LDLr KO (PL) en dieta rica en greix: increment (roig), disminució (blau), no variació (blanc), no detectat (gris). La intensitat de colors varia segons: p-valor <0,01 (més intensitat) i p-valor entre 0,05 i 0,02 (menys intensitat). **(B)** L'Anàlisi de Component Principal (PCA) és una representació gràfica que permet observar les diferències entre el grup control i el grup d'intervenció. **(C)** *Fold-change* dels diferents metabòlits de les diferents vies metabòliques: glicòlisi, cicle de l'àcid cítric i metabolisme dels aminoàcids. **(D)** Visualització del *heatmap* i l'anàlisi d'agrupament jeràrquic d'acord amb les dades obtingudes del MetaboAnalyst. Files: metabòlits; columnes: identificació del ratolí; els colors indiquen: blau (disminució), roig (increment).